



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาเชื้อหุ้มของไวรัสไข้เลือดออก: การออกแบบและการ  
สร้างเชื้อหุ้มไวรัสจำลองและการวิเคราะห์เชื้อหุ้มจำลองนั้น

ดร. พัลลภ กาญจนภาณุรักษ์ และคณะ  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

30 มิถุนายน 2551

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาเชื้อหุ้มของไวรัสไข้เลือดออก: การออกแบบและการสร้างเชื้อหุ้ม  
ไวรัสจำลองและการวิเคราะห์เชื้อหุ้มจำลองนั้น

### คณะผู้วิจัย

- ดร. พัลลภ กาญจนภาณุรักษ์
- ศาสตราจารย์ ดร.ประพนธ์ วิไลรัตน์

### สังกัด

- ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ: MRG4980055  
ชื่อโครงการ: การศึกษาเยื่อหุ้มของไวรัสไข้เลือดออก: การออกแบบและการสร้างเยื่อหุ้มไวรัสจำลองและการวิเคราะห์เยื่อหุ้มจำลองนั้น (เนื้อหาของงานวิจัยได้ถูกปรับเปลี่ยนไปจากเดิม บทคัดย่อและรายละเอียดที่ตามมาเป็นเนื้อหาที่แก้ไขแล้ว)  
ชื่อนักวิจัย: นายพัลลภ กาญจนภาณุรัช  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
อีเมลล์: [scpkb@mahidol.ac.th](mailto:scpkb@mahidol.ac.th)  
ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2549 ถึง 30 มิถุนายน 2551 (2 ปี)

เมมเบรนของเซลล์ต่างๆนั้นมีความซับซ้อนของโครงสร้างอันเกิดจากส่วนประกอบที่ต่างกันของชั้นแต่ละชั้นในไบเลเยอร์โดยเลเยอร์ชั้นในส่วนใหญ่ประกอบด้วย phosphatidylserine (PS) และ phosphatidylethanolamine (PE) ส่วนเลเยอร์ชั้นนอกประกอบด้วย phosphatidylcholine (PC) และ sphingomyelin คุณสมบัติความไม่สมมาตรนี้จะเสียไปเมื่อมีการย้ายตำแหน่งของโมเลกุลลิพิดบางชนิด เช่นการเคลื่อนที่ของ PS จากเลเยอร์ชั้นในสู่ชั้นนอก สำหรับกรณีของ PS นี้ ปรากฏการณ์ที่น่าสนใจหนึ่งที่เกิดขึ้นคือการจับเกาะระหว่างโปรตีน annexin V และ PS การวิจัยนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของความหนาแน่นของ PS ในชั้นไบเลเยอร์ต่อการจับเกาะของ annexin V โดยใช้เมมเบรนจำลองชนิด supported planar lipid bilayer (SLB) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, porcine brain L- $\alpha$ -phosphatidylserine, และ cholesterol ข้อมูลจากเทคนิค fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) ได้แสดงค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของ 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (DPPE-NBD) ในไบเลเยอร์ มีค่าเท่ากับ  $7.2 \pm 1.1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  และมีค่า mobile fraction เท่ากับ 96% ค่า mobile fraction ที่สูงและสัมประสิทธิ์การแพร่ที่สูงนี้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลลิพิดต่างๆในเมมเบรนจำลองชนิดไบเลเยอร์ที่เตรียมขึ้นนี้มีการเคลื่อนตัวที่เหมาะสม การทดลองต่อไปจะศึกษาถึงการกระจายตัวของ annexin V บนผิวของเมมเบรน ตลอดจนอัตราการเคลื่อนที่โดยใช้เทคนิคทาง optical microscopy และ FRAP ผลการทดลองดังกล่าวอาจนำไปสู่ความเข้าใจใหม่เกี่ยวกับกลไกการจับเกาะระหว่าง annexin V และเมมเบรน หรือแม้กระทั่งปัจจัยสำคัญในกระบวนการ apoptosis อีกด้วย

คำหลัก: lipid bilayer, annexin V, fluorescence recovery after photobleaching, lateral diffusion

Project Code: MRG4980055

Project Title: Study of dengue envelope membrane: experimental modeling of the dengue lipid bilayer and characterizations  
(The research direction has been substantially modified from the original proposal. The abstract and details that follow are the modified version.)

Investigator: Pallop Karnchanaphanurach  
Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Email Address: [scpkb@mahidol.ac.th](mailto:scpkb@mahidol.ac.th)

Project Period: July 1, 2006 to June 30, 2008

The cell membrane is asymmetric: Its inner leaflet consists mostly of phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) lipids while its outer leaflet mostly consists of phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin. The cell membrane loses its asymmetry when components of its inner leaflet, mainly PS molecules, flip to the outer leaflet. When this occurs, binding of certain membrane proteins such as annexin V, which binds specifically to PS, is enabled. Here, we study the effect of membrane density of PS molecules on annexin V binding using a supported, planar lipid bilayer (SLB) system, made of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, porcine brain L- $\alpha$ -phosphatidylserine, and cholesterol. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) data indicate that the fluorescently labeled phospholipid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (DPPE-NBD) in SLBs on glass cover slips have a diffusion coefficient of  $7.2 \pm 1.1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  and the mobile fraction was 96%. This high mobile fraction suggests that the lipids in the SLB are sufficiently mobile. Further studies involve determination of protein distribution and measurement of the mobility of protein on the bilayer using confocal microscopy and FRAP. The results could provide a better understanding of cellular processes that occur only when the membrane is symmetric and certain proteins have bound to it such as apoptosis.

Keywords: lipid bilayer, annexin V, fluorescence recovery after photobleaching, lateral diffusion

## หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

### ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่

- ชื่อโครงการ** การศึกษาเยื่อหุ้มของไวรัสไข้เลือดออก: การออกแบบและการสร้างเยื่อหุ้มไวรัสจำลอง และการวิเคราะห์เยื่อหุ้มจำลองนั้น  
  
Study of dengue envelope membrane: Experimental modeling of the dengue lipid bilayer and characterizations
- ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail**  
ดร. พัลลภ กาญจนภาณุรักษ์  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400  
โทรศัพท์ (02)201-5133, (01)285-4343  
โทรสาร (02)354-7151  
e-mail scpkb@mahidol.ac.th
- สาขาวิชาที่ทำการวิจัย** Supported bilayers for biophysical studies of PS-annexin V interaction
- ระยะเวลาดำเนินงาน** 2 ปี
- ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วน เพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง**  
เสนอขอทุนวิจัยจากศูนย์นวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
- ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา**

การศึกษาปรากฏการณ์ทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นที่เมมเบรนของเซลล์โดยตรงนั้นเป็นสิ่งที่ยากจนอาจเป็นเรื่องที่เป็นไปไม่ได้ในหลายระบบ อันเนื่องมาจากความซับซ้อนในโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนนั่นเอง ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการคิดค้นระบบแบบจำลองที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเซลล์เมมเบรนเพื่อให้การศึกษาดำเนินไปได้ต่อไป แบบจำลองที่สำคัญและได้รับความนิยมคือ supported planar lipid membranes หรือ supported lipid bilayers (SLB) เนื่องจากคุณสมบัติที่เอื้อต่อการทำงานของโปรตีนและลิพิดโมเลกุลอันเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์เมมเบรน และเนื่องจากความสำคัญต่อการศึกษาวิจัยในหลายระบบ โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้าง SLB ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการศึกษาปรากฏการณ์ในระดับเซลล์เมมเบรน

และเพื่อเป็นการสาธิตถึงการศึกษาวิจัยระบบทางชีวเคมีโดยใช้ SLB ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของความหนาแน่นของ phosphatidylserine (PS) ต่อการจับเกาะของโปรตีน annexin V บนผิวของ SLB ที่เตรียมขึ้นโดยใช้เทคนิคได้ทำการศึกษา การศึกษา annexin V นั้นมีความสำคัญและน่าสนใจเนื่องจาก annexin V ได้ถูกนำมาใช้เป็น imaging agent ที่แพร่หลายในปัจจุบันเพื่อตรวจสอบสภาพ apoptosis ของเซลล์ในร่างกาย นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามในการศึกษาถึงบทบาทหน้าที่ที่ชัดเจนของ annexin V ในกระแสเลือด ถึงแม้ว่านักวิทยาศาสตร์หลายฝ่ายได้ทำการศึกษาหน้าที่ต่างๆของ annexin V เช่น blood coagulation, immune response และ apoptosis มาแล้ว แต่ก็ยังขาดความชัดเจนอยู่อีกไม่น้อย ผู้วิจัยหวังว่าการนำ SLB มาช่วยศึกษาระบบการยึดเกาะกับ PS ในเมมเบรนจะช่วยให้เกิดความกระจ่างถึงกระบวนการทำงานและหน้าที่ของ annexin V ขึ้น

## 8. วัตถุประสงค์

1. เพื่อสร้าง supported lipid bilayers ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับระบบแบบจำลองของเซลล์เมมเบรน
2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของความหนาแน่นของ phosphatidylserine ต่อการจับเกาะของ annexin V บนผิวเมมเบรน

## 9. ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียม supported lipid bilayers พร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติ
  - 1.1 เตรียม unilamellar lipid vesicles โดยการละลายฟอสโฟลิปิดใน Tris buffer เพื่อให้ได้ multilamellar lipid vesicles จากนั้นจึงผ่านกระบวนการ extrusion ซึ่งก็คือการผ่านสารละลายฟอสโฟลิปิดที่ได้ สู่มเมเบรนโพลีคาร์บอนเนตหลายๆครั้ง โดยใช้ mini extruder จากบริษัท Avanti Polar Lipid
  - 1.2 เตรียมเมมเบรนชนิดลิปิดไบเลเยอร์ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว โดยการผ่านสารละลายของ lipid vesicles จากข้อ 1.1 ลงบนสไลด์ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วย Piranha solution (3:1, concentrated sulfuric acid: 30% hydrogen peroxide) แล้วปล่อยให้ไว้ 15 นาที ให้เกิดการถ่ายโอนลิปิดลงบนผิวของสไลด์ จากนั้นจึงล้างผิวของสไลด์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หลายๆรอบ
  - 1.3 เพื่อเป็นการยืนยันเบื้องต้นว่าชั้นเมมเบรนบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมได้มีการจัดเรียงตัวในลักษณะไบเลเยอร์และไม่ซ้อนกันหลายชั้น ผู้วิจัยผสมฟอสโฟลิปิดที่มีโมเลกุลเรืองแสงติดอยู่ (NBD-DPPE) ในขั้นตอนที่ 1.1 ในอัตราส่วน 1:10 ต่อโมล (NBD-DPPE: DPPE) จากนั้นจึงใช้เครื่อง confocal laser scanning microscope (CLSM) เพื่อทำการสแกนสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ NBD ทำการสแกนในแต่ละระนาบที่ระดับความสูงจากผิวของสไลด์ต่างกัน โดยแต่ละระนาบมีระยะห่างประมาณ 10 nm

- 1.4 เพื่อเป็นการยืนยันว่าโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดในเมมเบรนที่เตรียมขึ้นมีความเคลื่อนไหวในแนวระนาบอย่างอิสระ ผู้วิจัยได้ใช้เครื่อง CLSM นี้ในการทำการทดลอง fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)
  - 1.5 เพื่อเป็นการยืนยันถึงโครงสร้างชนิด bilayer ผู้วิจัยได้ใช้เครื่อง atomic force microscope ในการตรวจวัดความหนาและลักษณะพื้นผิวของ SLB
2. การศึกษาอิทธิพลของความหนาแน่นของ phosphatidylserine (PS) ต่อการจับเกาะของ annexin V บนพื้นผิวของ SLB
    - 2.1 ความหนาแน่นของ PS ใน SLB สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยการใช้ปริมาณของ PS ระดับต่างๆในชั้นการเตรียม SLB
    - 2.2 หลังจากเตรียม SLB ที่ต้องการแล้ว annexin V จะถูก incubate กับ SLB เป็นเวลาประมาณ 10 นาที หลังจากนั้น SLB จะถูกล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์
      - \* annexin V ที่ใช้เป็นชนิดที่เชื่อมกับฟลูออโรฟอร์ Alexa Fluor-488 เพื่อให้สามารถติดตามระดับการจับเกาะกับ SLB และสามารถติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนได้โดยใช้ CLSM
      - \* สารละลายบัฟเฟอร์มี 2 แบบ คือ 1) binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, และ 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) และ 2) unbinding buffer (25 mM HEPES, 140 mM NaCl, และ 1 mM EDTA, pH 7.4)
    - 2.3 ศึกษาระดับการจับเกาะของ annexin V บนพื้นผิว SLB โดยใช้ CLSM และศึกษาระดับการเคลื่อนไหวในแนวระนาบของ SLB โดยใช้เทคนิค FRAP

เนื้อหางานวิจัย  
ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่

---

---

## Introduction

A biological membrane is an important component in both prokaryotic and eukaryotic cells. It is primarily composed of lipids which arrange into bilayers. Supported lipid bilayers (SLB), lipid bilayers formed through spontaneous fusion of unilamellar lipid vesicles on solid substrates, have been found to be excellent models of biological membranes, (1) owing to their numerous advantages. Lipids and reconstituted proteins in supported membranes retain lateral mobility. (2) The molecular properties of membrane constituents and their compositions can be systematically varied. Moreover, these model membranes offer a thin, optically-penetrable, two-dimensional structures that can be studied using a wide range of interface-sensitive techniques that include total internal reflection fluorescence, (3) atomic force spectroscopy, (4,5) X-ray and neutron scattering, (6,7) Fourier-transform infrared spectroscopy, (8) quartz crystal microbalance, (9) surface plasmon resonance, (9,10) nuclear magnetic resonance, (11) and even mass spectrometry. (12)

The lipid membrane in cells is asymmetric with the inner leaflet composed of phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) lipids while the outer leaflet is composed of phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin. (13,14) Loss of membrane asymmetry occurs with the externalization of PS lipids to the outer leaflet. PS on the outer leaflet of the bilayer can easily be detected using a PS binding protein such as annexin V. (13-15) Most research on SLB and annexin V has tended to concentrate on the effects of annexin V concentration or substrate type on SLB formation and mobility. (16-19) This body of work has suggested that high annexin V concentration lowers the mobility of the SLB. However, the density of PS (or its availability) may also affect binding of annexin V and hence, the mobility of the SLB. (15) In this work, we consider this alternate scenario. PS concentration in the SLB made is varied while keeping annexin V concentration constant. The distribution of the protein and mobility of the lipid bilayer and annexin V is studied using confocal microscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). As the interaction between phospholipids and proteins is crucial in certain cellular processes such as apoptosis, (13) the findings of this research could elucidate the mechanisms that depend on membrane density and protein interaction, as a result.

## Materials and Methods

*Materials.* 1, 2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC), porcine brain L- $\alpha$ -Phosphatidylserine (PS), and 1, 2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1, 3-benzoxadiazol-4-yl) (DPPE-NBD) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc (AL, USA) and used without further purification. The following were from Sigma-Aldrich Chemical Co (MO, USA) and were of high purity: Cholesterol, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, HEPES, CaCl<sub>2</sub>, and EDTA. Chloroform (HPLC grade) was from Labscan Asia Co Ltd (Bangkok, Thailand). Annexin V-Alexa Fluor 488 was purchased from Molecular Probes Inc (CA, USA).

*Preparation of Small Unilamellar Vesicles (SUV).* DOPC and PS were dissolved in chloroform at a ratio of 9:1 (mol/mol) [6]. Cholesterol dissolved in chloroform was added to the phospholipid mixture to get a phospholipid to cholesterol ratio of 1:1. (20) DPPE-NBD, dissolved in chloroform, was added to the lipid mixture at a concentration of 10 mol% (of total lipids). The chloroform was then evaporated using a rotary evaporator (Buchi, Italy) and high vacuum for 3 hours. The lyophilized lipids were then dissolved in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4. PBS is prepared using 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The final concentration of lipids in buffer is 0.2 mg/mL. (20) Lipid vesicles were hydrated by sonicating at room temperature for 15 minutes or until the solution was clear. This was followed by 5 freeze-thaw cycles using dry ice bath and warm water (about 50°C).

*Formation of Supported Lipid Bilayers (SLB).* The cleanliness of the glass substrate was of great importance to the experiment. Cover slips (Fisher Scientific, PA, USA) were treated with sulfo-chromic acid and alcoholic KOH. The cover slips were then thoroughly rinsed with DI water and absolute ethanol (Merck, Germany). The cover slips were stored in ethanol until use. On cleaned cover slips, a silicone gasket with two ports (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) was placed. Prepared SUVs were deposited through one of the ports until the gasket was full. The SUVs were then allowed to form into bilayers by incubating for 10 minutes in the dark. Following incubation, free vesicles and aggregates were removed by washing with PBS buffer 3 times.

*Reconstitution of Annexin V-Alexa Fluor 488.* Annexin V-alexa fluor 488 was taken from stock (concentration was not provided by the vendor) and made into 5% (vol/vol) solution with either annexin binding buffer or unbinding buffer. Annexin binding buffer is prepared using 10mM HEPES, 140mM NaCl, and 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4. Annexin unbinding buffer is prepared using 25mM HEPES, 140mM NaCl, and

1mM EDTA, pH 7.4. Binding and unbinding buffers are used according to the experiments performed (see next section). To remove aggregates and equilibrate with the appropriate buffer, the 5% annexin solution was dialyzed using a spin-trap from GE Biosciences. Manufacturer's instructions were followed on use. To each well of the gasket containing the lipid bilayer, 20 $\mu$ L of 5% annexin V-Alexa Fluor 488 solution was added. The well was then filled with the appropriate buffer. The lipid and protein was allowed to incubate for 10 minutes in the dark before being washed with buffer 3 times.

*Confocal Microscopy and FRAP.* For all observation and experiments, a confocal laser scanning microscope (CLSM) from Olympus (FV 1000) was used. Prior to viewing samples on the confocal microscope, the samples were equilibrated for 5-10 minutes. The excitation wavelength was 488/495 nm. Magnification used was 10x and 40x and always 40x for FRAP experiments. For FRAP experiments, an area 10  $\mu$ m in diameter was selected and laser of 100% intensity was used to illuminate the spot for 380 ms. This induced bleaching of fluorophores. The area was then monitored for 160 seconds for fluorescence recovery.

## Results and Discussion

*Mobility of SLB.* Using CLSM and FRAP, the mobility of the SLB was observed. Figure 1 shows a series of images. In Figure 1a, nothing is observed because no dye was used. In Figure 1b (1), however, bright green spots cover the entire area of view with the brightest spots being dye aggregates. Figure 1b (1) is the image taken before any bleaching. Figure 1b (2) is taken during the photobleaching. The red circle represents the area bleached. It can be seen that the fluorophores in the area are almost completely bleached out but 10 seconds later (Figure 1b (3)), dye molecules from surrounding area have migrated in. By 160 seconds (Figure 1b (4)), the bleached area is almost indistinguishable from the rest of the image. This suggests that the SLB and the dye molecules in the SLB are mobile and will diffuse into the bleached area when a gradient occurs.

The sequence of images comprising Figure 1b is best represented graphically. By monitoring the fluorescence intensity in the red circle, it is possible to obtain an intensity profile. Figure 2 shows an intensity profile obtained from two replicates of the experiment.

The intensity profile obtained in Figure 2 can be fitted using standard diffusion models. To fit the above intensity profile, the diffusion model derived and explained in a paper by Axelrod *et al* (21) was used. The intensity profile was fitted in MATLAB 7 (The MathWorks Inc, MA, USA). It was then possible to calculate the diffusion coefficient and mobile fraction. (21) The average diffusion coefficient was found to be

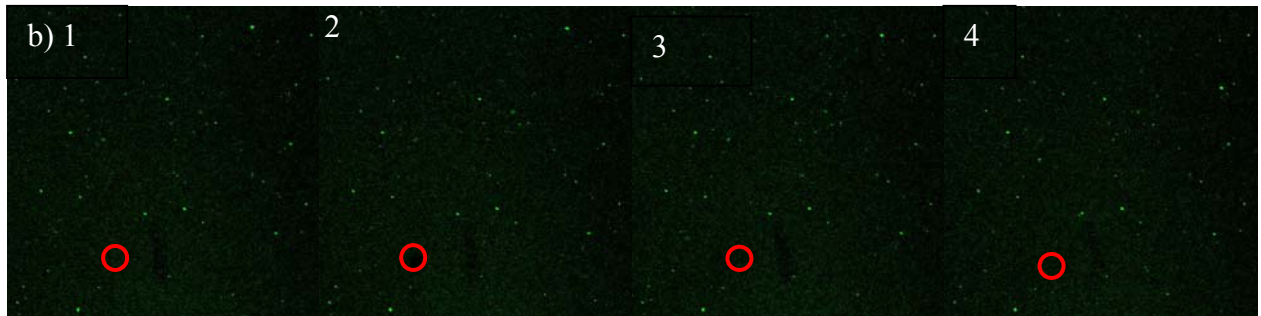


Figure 1. Images from FRAP experiment. a) SLB with no DPPE-NBD dye as control b) SLB with DPPE-NBD dye during FRAP experiment. Sequence of images with 1) before bleaching, 2) during bleach, 3) 10 seconds after bleach, 4) 160 seconds after bleach.

$7.2 \pm 1.1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ . This value is consistent with the diffusion coefficient of lipids in cell membranes which was reported to be  $8.0 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  in (22) and  $8.2 \pm 1.2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  in (23), at  $37^\circ\text{C}$ . In addition, the mobile fraction was 96%. Thus, it may be concluded that the SLB was sufficiently mobile.

*Binding of Annexin V-Alexa Fluor 488 to the SLB.* In this work, in addition to being concerned with the dynamics of the SLB, dynamics of the annexin V protein conjugated to alexa fluor 488 fluorescent dye in the SLB is also an issue. A first step in studying the latter involves the study of binding and unbinding of the annexin V protein. Annexin V binds to PS in the lipid bilayer when  $\text{Ca}^{+2}$  is sufficiently present. (13-15) Thus, a preliminary study of binding and unbinding of annexin V to the SLB involved adding the protein to the formed SLB using binding and unbinding buffers, respectively. Figure 3 shows the results obtained from binding and unbinding scenarios.

From Figure 3a, it can be seen that the annexin V-alexa fluor 488 has bound to the SLB because small green fluorescent spots are observed, albeit the signal is weak. However, in Figure 3b, no fluorescent spots are observed. Thus, annexin V binds to the SLB only when  $\text{Ca}^{+2}$  are available while in the presence of a chelating agent such as EDTA, no binding occurs, regardless of the presence of PS.

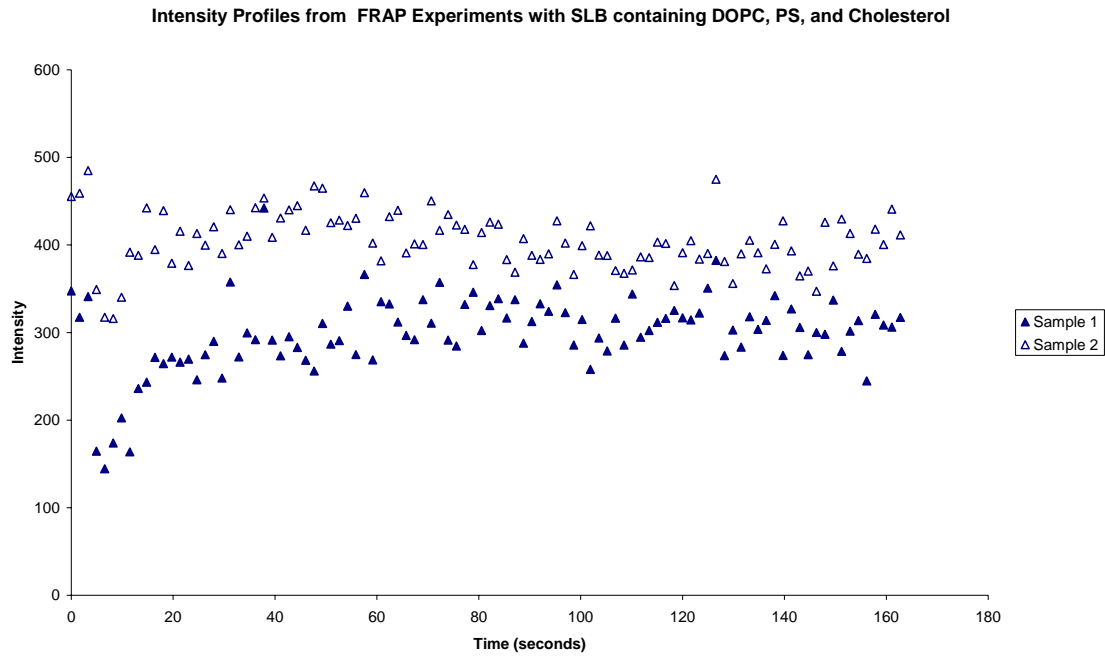


Figure 2. Intensity Profiles from 2 replicates of the same experiment.

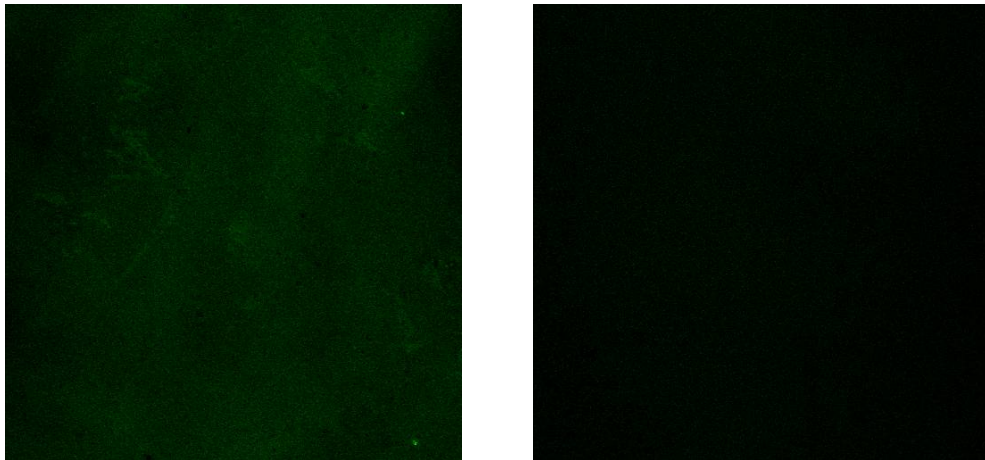


Figure 3. Images of SLB with annexin V at 40x magnification: a) SLB and annexin V-alexa fluor 488 in binding buffer b) SLB and annexin V-alexa fluor 488 in unbinding buffer.

## Conclusion

From the results presented above, it may be concluded that an SLB was successfully made that is demonstrably mobile like cell membranes and annexin V proteins bind and interact with this bilayer. In addition, annexin V, a protein that binds to PS in the lipid bilayer only in the presence of  $Ca^{+2}$ , continues to behave selectively in the model bilayer. Thus, the system intended for study is feasible. The next step in

this work is to further study the dynamics of annexin V in the bilayer and when the PS density is varied. This study could elucidate the phospholipid density dependent dynamics of certain membrane proteins, which could provide insights into cellular processes that occur because of membrane lipid and protein interactions such as apoptosis.

## References

1. Sackmann E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* 1996;271:43-48.
2. Brian AA, McConnell HM. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6159-6163.
3. Kalb E, Frey S, Tamm LK. Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* 1992;1103:307-316.
4. Puntheeranurak T, Stroh C, Zhu R, Angsuthanasombat C, Hinterdorfer P. Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. *Ultramicroscopy* 2005;105:115-124.
5. Reviakine I, Brisson A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 2000;16:1806-1815.
6. Kjaer K, Als-Nielsen J, Helm CA, Laxhuber LA, Mohwald H. Ordering in lipid monolayers studied by synchrotron X-ray-diffraction and fluorescence microscopy. *Phys Rev Lett* 1987;58:2224-2227.
7. Johnson S, et al. Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons. *Biophys J* 1991;59:289-294.
8. Tatulian SA, Hinterdorfer P, Baber G, Tamm LK. Influenza hemagglutinin assumes a tilted conformation during membrane-fusion as determined by attenuated total-reflection FTIR spectroscopy. *EMBO J* 1995;14:5514-5523.
9. Keller CA, Glasmaestar K, Zhdanov VP, Kasemo B. The formation of supported membranes from vesicles. *Phys Rev Lett* 2000;84:5443-5446.
10. Terrettaz S, Stora T, Duschl C, Vogel H. Protein-binding to supported lipid-membranes – investigation of the cholera-toxin ganglioside interaction by simultaneous impedance spectroscopy and surface-plasmon resonance. *Langmuir* 1993;9:1361-1369.
11. Bayerl TM, Bloom M. Physical-properties of single phospholipid-bilayers adsorbed to micro glass-beads – a new vesicular model system studied by H-2-nuclear magnetic- resonance. *Biophys J* 1990;58:357-362.

12. Kraft ML, Weber PK, Longo ML, Hutcheon ID, Boxer SG. Phase separation of lipid membranes analyzed with high-resolution secondary ion mass spectrometry. *Science* 2006;313:1948-1951.
13. van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1-9.
14. Balasubramanian K, Mirnikjoo B, Schroit AJ. Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: Implications for apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282:18357-18364.
15. Appelt U, Sheriff A, Gaipl US, Kalden JR, Voll RE, Hermann M. Viable, apoptotic and necrotic monocytes expose phosphatidylserine: Cooperative binding of the ligand Annexin V to dying but not viable cells and implications for PS-dependent clearance. *Cell Death Differ* 2005;12:194-196.
16. Cézanne L, et al. Organization and dynamics of the proteolipid complexes formed by annexin V and lipids in planar supported lipid bilayers. *Biochemistry* 1998;38:2779-2786.
17. Saurel O, Cézanne L, Milon A, Tocanne J, Demange P. Influence of annexin V on the structure and dynamics of phosphatidylcholine/phosphatidylserine bilayers: A fluorescence and NMR study. *Biochemistry* 1998;37:1403-1410.
18. Megli FM, Selvaggi M, Liemann S, Quagliariello E, Huber R. The calcium-dependent binding of annexin V to phospholipid vesicles influences the bilayer inner fluidity gradient. *Biochemistry* 1998;37:10540-10546.
19. Wagner ML, Tamm LK. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: Silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophys J* 2000;79:1400-1414.
20. Yoon TY, et al. Topographic control of lipid-raft reconstitution in model membranes. *Nat Mater* 2006;5:281-285.
21. Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 1976;16:1055-1069.
22. Golan DE, Alecio MR, Veatch WR, Rando RR. Lateral mobility of phospholipid and cholesterol in the human erythrocyte membrane: Effects of protein-lipid interactions. *Biochemistry* 1984;23:332-339.
23. Bloom JA, Webb WW. Lipid diffusibility in the intact erythrocyte membrane. *Biophys J* 1983;42:295-305.

**Output**  
**ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่**

---

---

1. บทความทางวิชาการในหนังสือรวมบทความวิชาการเนื่องในวาระเฉลิมฉลองครบรอบ 50 ปีแห่งการสถาปนาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ตีพิมพ์ในปี 2552) (เอกสารแนบที่ 1)
2. เสนอผลงานทางวิชาการแบบ oral presentation ในการประชุม Pure and Applied Chemistry International Conference 2009 (PACCON 2009) ระหว่างวันที่ 14-16 มกราคม 2552 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร (เอกสารแนบที่ 2)
3. เกิดการพัฒนาบุคลากรระดับบัณฑิตศึกษาในระดับ ป.โท จำนวน 2 คนคือนางสาวอชญา เมตรี และนายพงสิทธิ์ ตั้งคณานุรักษ์ โดยเป็นนักศึกษาในหลักสูตรเคมีเชิงฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และจะสำเร็จการศึกษาในปี 2552
4. เกิดงานวิจัยใหม่อีก 2 ด้าน อันได้แก่
  - 4.1 การศึกษาองค์ประกอบของเยื่อหุ้มไวรัสไข้เลือดออก  
งานวิจัยนี้ยังอยู่ระหว่างการดำเนินงาน (เอกสารแนบที่ 3)
  - 4.2 การพัฒนา biosensor สำหรับ Salmonella  
งานวิจัยนี้ยังอยู่ระหว่างการดำเนินงาน (เอกสารแนบที่ 4)
5. ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการในวารสารนานาชาติ ซึ่งผู้วิจัยจะจัดส่ง preprint มาภายหลัง

---

---

ภาคผนวก

---

---

เอกสารแนบที่ 1

# Supported Planar Lipid Membranes and Their Applications

**Pallop Karnchanaphanurach**

Department of Chemistry, Center for Innovation in Chemistry,  
and Center for Alternative Energy, Faculty of Science, Mahidol University

## **Abstract**

The natural membranes provide key environments for many biological processes, including cellular communication and transport of small molecules. To capture the complex behaviors associated with the membranes, it is important to gain biophysical knowledge of the membranes themselves. The supported planar lipid membranes offer a crucial link toward the understanding of biomembranes and related biological activities. This article presents the general overview of this type of model membranes, from preparation methods to exciting research arenas where the supported membranes play an active role.

## **Keywords**

Supported planar lipid membrane; bilayer; vesicle; lateral mobility

## **Introduction**

Living cells and organelles could not have existed and maintained their functions without natural mechanics to set boundary from the environment and to produce compartmentalization within the cell. Such mechanics is provided by biological membranes that consist of lipid bilayer. In addition to cholesterol for mammalian cells and phospholipids of various chain lengths and head groups, the bilayer also contains many proteins and carbohydrates inserted or attached to the membrane surface. Integral proteins such as ion channels span the membrane asymmetrically. Peripheral proteins associate with the lipid bilayer either by partially immersing, by anchoring to the lipids, or by interacting with other proteins in the membrane. Many peripheral proteins such as the ubiquitously expressed protein decay-accelerating factor (DAF or CD55) in human anchor to the exoplasmic membrane surface via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) linkage, which in turn partially inserts into the lipid bilayer. (1-3) A high percentage of membrane proteins and lipids in human also covalently link to carbohydrates, which are thought to play a vital role in cell communication with the surroundings. (4) All of these molecular components are held together non-covalently in the membrane, allowing most of them to be

laterally mobile. The ability of lipids and proteins to traverse in the two-dimensional plane is fundamental to many biological processes. (5,6) Together with structural complexity of the membranes, the dynamics of various membrane components adds up to an already complicated picture of living systems, often too convoluted to dissect scientifically.

Supported planar lipid membranes prove to be a successful model for the study of membrane structure and protein dynamics, owing to their numerous advantages. Lipids and reconstituted proteins in supported membranes retain lateral mobility. (7) The molecular properties of membrane constituents and their compositions can be systematically varied. Moreover, these model membranes offer a thin, optically-penetrable, two-dimensional structures that can be studied using a wide range of interface-sensitive techniques that include total internal reflection fluorescence, (8) atomic force spectroscopy, (9,10) X-ray and neutron scattering, (11,12) Fourier-transform infrared spectroscopy, (13) quartz crystal microbalance, (14) surface plasmon resonance, (14,15) nuclear magnetic resonance, (16) and even mass spectrometry. (17) This article presents a general overview of physical properties of the supported planar lipid membranes, along with key aspects of their research applications.

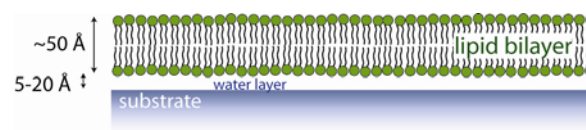


Figure 1. Schematic diagram showing the main structure of supported planar lipid bilayer.

### **Supported planar lipid membranes**

The lipid bilayer is separated from the solid support by an ultrathin film of water molecules of thickness 5-20 Å. (12,16) This water layer serves as a lubricant to relieve the membrane of motional friction with the underlying substrate surface which is usually glass, mica, silicon, or quartz. The suppressed friction thus enables the lipids to move freely in the two-dimensional plane. The supported membranes are stably held on the substrate by a combination of hydration, steric, electrostatic, and van der Waals forces. (18) The thermal and mechanical stability of the membranes is sufficient to withstand high flow rate of solution, (19) making them very useful particularly for flow-based experiments.

The supported lipid membranes are prepared by three general approaches: i) the monolayer transfer by the Langmuir-Blodgett (LB) and the Langmuir-Schaefer (LS) techniques (Fig 2A); ii) the spontaneous lipid vesicle fusion (Fig 2B); and iii) the combination of the two (Fig 2C). In its simplest procedure, the first method involves vertically passing a solid substrate through a monolayer film of lipids suspended at air/water interface (LB) in order to deposit one

layer of lipid membrane on the substrate. A bilayer is then formed by horizontally pressing the solid-supported monolayer to the suspended monolayer in a trough (LS). The advantage of this technique is an easy manipulation of the lipid composition and density of the membranes. This means that the asymmetric properties of the membrane bilayers can be tuned at will. However, the downside of this method is an inability to incorporate membrane proteins in the bilayers because of the potential loss of proteins to the aqueous reservoir that suspends the monolayer. In addition, during the transfer of the monolayer, the proteins may be exposed to air and consequentially dehydrate, resulting in the denaturation of the proteins. The second approach to prepare the supported bilayers involves spontaneous fusion of the unilamellar lipid vesicles on solid substrate. The fusion process is thought to initiate with low-density adsorption of the vesicles to the solid surface. (14,20) At a critical density of the adsorbed vesicles, they coalesce to form larger vesicles. (10) These vesicles ultimately rupture, fuse, and spread to form a lipid bilayer. (10) To make the supported membranes biologically functional, vesicles with reconstituted integral proteins can be used to infuse the membranes. Another powerful way to incorporate the proteins is to include some molecular anchors in the preformed planar bilayer and subsequently introduce

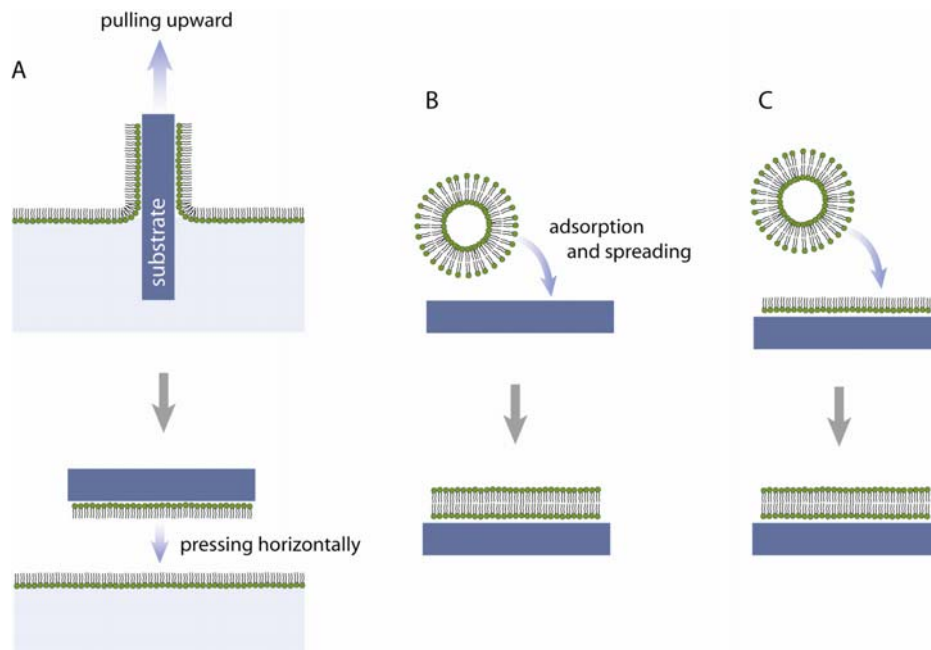


Figure 2. General procedures for the formation of supported bilayers. A) The Langmuir-Blodgett (vertical dipping) is used to deposit the monolayer, followed by the Langmuir-Schaefer (horizontal contacting) to complete the bilayer structure. B) The vesicle fusion directly deposits the bilayer on solid substrate. C) The combined method uses the LB to prepare a single monolayer and sequentially introduces the upper leaflet via vesicle fusion.

proteins that have been tailored to specifically bind to those anchors. Since the vesicle fusion method primarily relies on the spontaneous fusion mechanism, the controlled variation of membrane compositions can be difficult to achieve. The advantages of the LB/LS technique and the vesicle fusion can be combined in the third method, where the lower leaflet is first deposited onto the substrate by the LB procedure, followed by spontaneous fusion of the vesicles to obtain the bilayer.

As noted earlier, the spacing between the bilayer and the solid support is only 5-20 Å. (12,16) While this thin space may provide enough room to allow good lateral fluidity for lipids, it could prove problematic for reconstituted transmembrane proteins. Large integral proteins such as some ion channels likely protrude far away from the membrane surface. If this protruded portion is located at the inner leaflet, the protein may directly contact the bare solid surface (Fig 3A), resulting in loss of protein mobility, functionality, and even complete denaturation. This problem can be overcome by adding cushion between the membrane and the substrate as illustrated in Fig 3B. (21) Polymer materials are good candidates for this purpose because of their generally hydrophilic properties, chemical stability, and good wetting properties at the interface. A good example of polymer cushions is regenerated cellulose, which has been shown to retain functionality of the incorporated proteins. (22) An alternative strategy to increase the membrane-substrate gap makes use of lipopolymer linkers. (23) The lipid-like end of these linkers hooks to the membrane while the macromolecular head group acts as a spacer (Fig 3C). The unique benefit of this approach comes from the fact that the spacer length, density, and viscosity of the linker layer can be systematically controlled. Another intriguing choice of spacer is bacterial cell-surface layer (S-layer) proteins. (24) However, the use of S-layer proteins has so far been limited to gold and silver substrates.

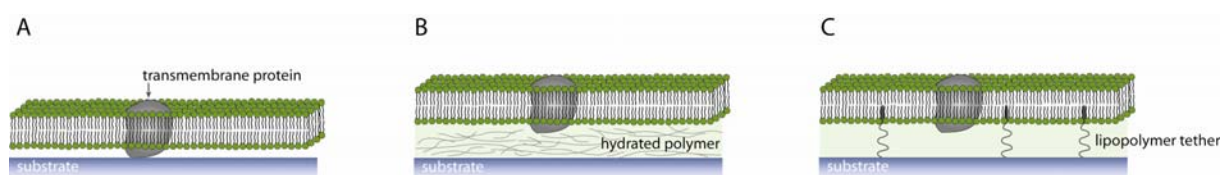


Figure 3. Degree of interaction of a transmembrane protein with three types of supports. A) The bare solid support. B) The hydrated-polymer cushioned support. C) The support cushioned by lipopolymer tethers.

### Protein interactions at the membrane interface

The supported planar lipid membranes provide an excellent environment for preserving much of the protein functions over a large two-dimensional macroscopic area. They are therefore

a desirable model for investigations of molecular interactions at the membrane interface. The use of protein-functionalized supported membranes was first pioneered in the study of molecular recognition and associated dynamics in the immunological synapse. (7) An important event in adhesion and communication of immune cells occurs when an antigen-presenting cell (APC) interacts with a T cell prior to activation of the immune response. This cell-cell interaction is strongly coupled with the binding of T cell receptors (TCRs) on the T cell to peptide fragments carried by major histocompatibility complex (MHC) on the APC. The binding of multiple molecules creates a supramolecular activation cluster (SMAC). Upon this binding, it is likely that the mobility of each protein will be altered. By using fluorescence video microscopy, Brian and McConnell was able to visualize this crucial change in dynamics and demonstrate that immobile peptide-MHC could activate the cytotoxic T cells. (7) This sophisticated use of supported membranes had since led to many more immunological transmembrane communication findings. (25-28) The dynamic trajectory for immunological synapse has been found to start with the initial diffuse protein distribution and end with static protein organization. In addition to a better description of immunological synapse, accurate quantitative information has been accumulated over the years. For example, it has been reported that the total MHC accumulation at the synapse has a strong correlation with the half-time of TCR-peptide-MHC binding, (26) and that at least 60 peptide-MHC per  $\mu\text{m}^2$  in the SMAC is needed for proliferation. (26) Together with theoretical modeling, it was further suggested that the increased accumulation of peptide-MHC is necessitated by the low TCR-peptide-MHC binding affinity and also helps level off the strong signal by inducing endocytosis of activated TCRs. (26)

The lenient membrane environment for proteins, the versatile geometry of the supported membrane systems, and the insulating properties of the bilayers all provide a suitable platform for electrochemical sensing, particularly in the study of ion channels. (29) The set up is analogous to a traditional patch-clamp technique, which involves sealing a fine glass pipette tip with a cell or patch of membrane and monitoring the electric current activity as ions pass through the ion channels. In one study, the lipid bilayer with reconstituted gramicidin channels was polymer-cushioned on a semiconductor electrode. (29) By using a combination of DC current recording to observe the channel activity and fluorescence imaging to simultaneously follow the colocalization of the proteins, a strong correlation was observed between the channel activity and the dimerization of gramicidin. (29) The improvement of sensitivity of this approach to the level of single-molecule events has later been achieved by using membranes supported on

indium-tin-oxide (30) or semiconductor materials (31,32) and analyzed with time-resolved Fourier transform impedance spectroscopy.

The idea of a special form of membrane partitioning known as liquid-ordered, cholesterol-rich domains or lipid rafts has attracted massive interest over the past decade. (33,34) These domains are thought to provide crucial platforms for many biological processes, including cell signaling, cell adhesion, and pathogenic infection. The supported bilayers serve as an indispensable tool for investigations of physical properties of the domains that are difficult, if not possible, to study. Using nanometer scale-sensitive, integrated technique of atomic force microscopy and near-field scanning optical microscopy, phase separation and dynamic nature of the domains could be followed in real time. (35) Particularly interesting is a stable existence of nanometer-sized domains, which were previously thought to be too thermodynamically unstable to occur in cell membranes. (36,37) A more relevant system to the cell membranes utilized peptide- and protein-incorporated model bilayers, where it was found that  $\beta$ -amyloid peptide A $\beta$ 42 was preferentially localized in the domains. (38) In addition to peptides, a protein called synapsin in the neural synapse system was also found to have domain-dependent activity. (35)

### **Lipid membrane patterning**

Due to strong dependence on supporting materials, the two-dimensional shape of planar lipid bilayers can be controlled by directly manipulating the solid supports. If a substrate surface is overlaid with an array of lipid-barriers, then we would obtain an array of partitioned bilayers. A variety of techniques such as photolithography, electron-beam lithography, and contact printing can be used to create the barriers. Currently, two general schemes are used to generate the patterning. The first method directly confines bilayers to specific locations on the surface. This can be achieved either by using an optical mask to spatially control the cross-linking of some lipids such as diacetylene lipid (39) or printing onto/blotting out certain areas of membrane by using lipid-specific stamp such as polydimethylsiloxane. (40) Alternatively, the lipid microarrays can be obtained by contact printing the lipid-repellant barriers or hydrophobic proteins onto the substrate surface prior to the bilayer deposition. (41) These barriers effectively confine the bilayers within the untreated areas, resulting in corrals of membranes on the substrate. Since the membrane fully retains its fluidity and bilayer structure in each corral, (42) the micropatterned lipid membranes can potentially be used as platforms for combinatorial libraries of small molecules, proteins, and other analytes. Parallel screening of candidates for drug discovery is also feasible.

In addition to the biotechnological applications, micropatterned lipid membranes offer new opportunities in cell membrane studies. In one instance of immunological synapse studies, an array of 100-nm-linewidth chromium barriers was deposited on glass substrate using electron-beam lithography. (43) The artificial patterned APC membrane was then prepared on the substrate. The patterned chromium grids then acted as diffusion barriers to individual patches of membranes. When the T cell interacted with this patterned membrane, it was found that the lipids, peptide-MHCs, as well as intercellular adhesion molecules (ICAMs) induced pattern formation of the TCRs and lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1, a ligand to ICAM) on the T cell membrane as well. The fact that the patterns on both membranes were governed by the arrangement of the chromium grids indicates that the TCRs were not preclustered prior to contact with the membrane. An observation that each TCR was located in the grid corner nearest to the SMAC center also suggests that the TCR organization is linked to the cytoskeletal network of the T cell. (43)

### **Hybrid designs using supported membranes**

The ability to preserve protein functions of the bilayers has found broad applications in new technologies, including in the field of microfluidics. The inner surfaces of microfluidic channels that were coated with lipid bilayers protected the enzymes from denaturation and gave strong signal-to-noise ratio. (44) When the alkaline phosphatase enzymes were tethered to the lipid membrane-coated channels via biotin-streptavidin linkages, the result was a better signal-to-noise reading and only small amount of protein was needed to run the assay. (45) The application of fluidics to study the enzymatic activity in supported membrane systems also resulted in greater sensitivity in data acquisition. (44,45)

The supported planar lipid membranes have also been used as a biocompatible support for DNA-tethered vesicles. (46) The two vesicles fused together when placed in a close proximity. The rate of this fusion could be controlled by tweaking the degree of DNA hybridization, (47) making this a potential tool for the study of membrane fusion. If the vesicles were composed of charged lipids, the distance between any two vesicles could be adjusted using electric field parallel to the bilayer surface. (48) Vesicles can also be tethered to the bilayers with biotin-streptavidin coupling. It was demonstrated with single-molecule accuracy that yeast SNARE proteins incorporated in bilayer-tethered vesicles mediate fusion with free-standing SNARE-vesicles. (49)

### **Conclusion**

The biologically functional environment and the versatile manipulation of the supported planar lipid membranes have given researchers a powerful tool to address important challenges in cell membrane phenomena. Applications of this class of model membranes in the immunological and neural synapse studies and in the lipid raft characterizations have yielded a plethora of insightful information. The development for more sophisticated supported membranes is ongoing, and there is no reason not to expect more new discoveries on membrane interface. The coupling between the supported membranes and new analytical techniques marks a promising possibility for future technological inventions. In a similar manner to the microfluidics applications, the bilayers with functional proteins may give nanodevices an immunologically-benign shield and molecular specificity needed to make successful therapeutic agents. Patterning technology with greater precision and accuracy could pave for combinatorial biochemistry and membrane-active drug screening. The supported bilayers also serve as a platform not only for functionalized vesicles, but also for pathogenic studies. Model membranes may be constructed to resemble the envelopes of some viruses. These membranes could then be used to reveal much of the unknown factors in viral infections. They can even be envisioned to provide core structures for new drug delivery systems.

### **Acknowledgment**

The author would like to thank many scientists whose works have been chosen for this article and would like to apologize for other investigators who are not included here due to limited space. Special thanks go to Asiya Mehtar and Pongsit Tangcananurak for your support. This article is financially supported in part by the Thailand Research Fund, and the Center for Innovation in Chemistry and the Center for Alternative Energy, Faculty of Science, Mahidol University.

### **References**

1. Daniels G. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang* 2007;93:331-340.
2. Medof ME, et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding the complete sequence of decay-accelerating factor of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2007-2011.
3. Lukacik P, et al. Complement regulation at the molecular level: the structure of decay-accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1279-1284.
4. Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am* 1993;268:82-89.

5. Saxton MJ, Jacobson K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1997;26:373-399.
6. Karnchanaphanurach P, et al. Membrane skeleton-linked protein complex induced by C3b deposition on human erythrocytes. *J Clin Invest*; in press.
7. Brian AA, McConnell HM. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6159-6163.
8. Kalb E, Frey S, Tamm LK. Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* 1992;1103:307-316.
9. Puntheeranurak T, Stroh C, Zhu R, Angsuthanasombat C, Hinterdorfer P. Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. *Ultramicroscopy* 2005;105:115-124.
10. Reviakine I, Brisson A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 2000;16:1806-1815.
11. Kjaer K, Als-Nielsen J, Helm CA, Laxhuber LA, Mohwald H. Ordering in lipid monolayers studied by synchrotron X-ray-diffraction and fluorescence microscopy. *Phys Rev Lett* 1987;58:2224-2227.
12. Johnson S, et al. Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons. *Biophys J* 1991;59:289-294.
13. Tatulian SA, Hinterdorfer P, Baber G, Tamm LK. Influenza hemagglutinin assumes a tilted conformation during membrane-fusion as determined by attenuated total-reflection FTIR spectroscopy. *EMBO J* 1995;14:5514-5523.
14. Keller CA, Glasmaestar K, Zhdanov VP, Kasemo B. The formation of supported membranes from vesicles. *Phys Rev Lett* 2000;84:5443-5446.
15. Terrettaz S, Stora T, Duschl C, Vogel H. Protein-binding to supported lipid-membranes – investigation of the cholera-toxin ganglioside interaction by simultaneous impedance spectroscopy and surface-plasmon resonance. *Langmuir* 1993;9:1361-1369.
16. Bayerl TM, Bloom M. Physical-properties of single phospholipid-bilayers adsorbed to micro glass-beads – a new vesicular model system studied by H-2-nuclear magnetic-resonance. *Biophys J* 1990;58:357-362.
17. Kraft ML, Weber PK, Longo ML, Hutcheon ID, Boxer SG. Phase separation of lipid membranes analyzed with high-resolution secondary ion mass spectrometry. *Science* 2006;313:1948-1951.

18. Cremer PS, Boxer SG. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *J Phys Chem B* 1999;103:2554-2559.
19. Tadini-Buoninsegni F, Bartolommei G, Moncelli MR, Fendler K. Charge transfer in p-type ATPases investigated on planar membranes. *Arch Biochem Biophys* 2008;476:75-86.
20. Zhdanov VP, Keller CA, Glasmaestar K, Kasemo B. Simulation of adsorption kinetics of lipid vesicles. *J Chem Phys* 2000;112:900-909.
21. Tanaka M, Sackmann E. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* 2005;437:656-663.
22. Goennenwein S, Tanaka M, Hu B, Moroder L, Sackmann E. Functional incorporation of integrins into solid supported membranes on ultrathin films of cellulose: impact on adhesion. *Biophys J* 2003;85:646-655.
23. Purruicker O, Foertig A, Jordan R, Tanaka M. Supported membranes with well-defined polymer tethers – incorporation of cell receptors. *Chem Phys Chem* 2004;5:327-335.
24. Wetzer B, Pum D, Sleytr UB. S-layer stabilized solid supported lipid bilayers. *J Struct Biol* 1997;119:123-128.
25. Watts TH, Gaub HE, McConnell HM. T-cell-mediated association of peptide antigen and major histocompatibility complex protein detected by energy-transfer in an evanescent wave-field. *Nature* 1986;320:179-181.
26. Grakoui A, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285:221-227.
27. Bruinsma R, Behrisch A, Sackmann E. Adhesive switching of membranes: experiment and theory. *Phys Rev E* 2000;61:4253-4267.
28. Stoddart A, Dykstra ML, Brown BK, Song WX, Pierce SK, Brodsky FM. Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity* 2002;17:451-462.
29. Borisenko V, et al. Simultaneous optical and electrical recording of single gramicidin channels. *Biophys J* 2003;84:612-622.
30. Hillebrandt H, Wiegand G, Tanaka M, Sackmann E. High electric resistance polymer/lipid composite films on indium-tin-oxide electrodes. *Langmuir* 1999;15:8451-8459.
31. Steinhoff G, Purruicker O, Tanaka M, Stutzmann M, Eickhoff M.  $\text{Al}_x\text{Ga}_{1-x}\text{N}$  – a new material system for biosensors. *Adv Funct Mater* 2003;13:841-846.

32. Steinhoff G, et al. Recording of cell action potentials with AlGaIn/GaN field-effect transistor. *Appl Phys Lett* 2005;86:033901.
33. Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000;275:17221-17224.
34. Simons K, Vaz WL. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2004;33:269-295.
35. Murray J, Cuccia L, Ianoul A, Cheetham JC, Johnston LJ. Imaging the selective binding of synapsin to anionic membrane domains. *ChemBioChem* 2004;5:1489- 1494.
36. de Almeida RFM, Loura LMS, Federov A, Prieto M. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J Mol Biol* 2005;346:1109-1120.
37. Frolov VAJ, Chizmadzhev YA, Cohen FS, Zimmerberg J. "Entropic traps" in the kinetics of phase separation in multicomponent membranes stabilize nanodomains. *Biophys J* 2006;91:189-205.
38. Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease (review). *Mol Membr Biol* 2006;23:111-122.
39. Morigaki K, Baumgart T, Offenhausser A, Knoll W. Patterning solid-supported lipid bilayer membranes by lithographic polymerization of a diacetylene lipid. *Ang Chem Inter Ed* 2001;40:172-174.
40. Hovis JS, Boxer SG. Patterning barriers to lateral diffusion in supported lipid bilayer membranes by blotting and stamping. *Langmuir* 2000;16:894-897.
41. Sapuri AR, Baksh MM, Groves JT. Electrostatically targeted intermembrane lipid exchange with micropatterned supported membranes. *Langmuir* 2003;19:1606-1610.
42. Groves JT, Ulman N, Boxer SG. Micropatterning fluid lipid bilayers on solid supports. *Science* 1997;275:651-653.
43. Mossman KD, Campi G, Groves JT, Dustin ML. Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science* 2005;310:1191-1193.
44. Yang T, Jung SY, Mao H, Cremer PS. Fabrication of phospholipid bilayer-coated microchannels for on-chip immunoassays. *Anal Chem* 2001;73:165-169.
45. Mao H, Yang T, Cremer PS. Design and characterization of immobilized enzymes in microfluidic systems. *Anal Chem* 2002;74:379-385.
46. Chan Y-HM, Lenz P, Boxer SG. Kinetics of DNA-mediated docking reactions between vesicles tethered to supported lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:18913-18918.

47. Stengel G, Zahn R, Hook F. DNA-induced programmable fusion of phospholipid vesicles. *J Am Chem Soc* 2007;129:9584-9585.
48. Yoshina-Ishii C, Boxer SG. Controlling two-dimensional tethered vesicle motion using an electric field: interplay of electrophoresis and electro-osmosis. *Langmuir* 2006;22:2384-2391.
49. Yoon T-Y, Okumus B, Zhang F, Shin Y-K, Ha T. Multiple intermediates in SNARE-induced membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:19731-19736.

เอกสารแนบที่ 2

# PHOSPHATIDYLSERINE (PS) DENSITY DEPENDENT DYNAMICS OF ANNEXIN V ON SUPPORTED LIPID BILAYERS

A. Mehtar<sup>1</sup>, P. Tangcananurak<sup>1</sup>, T. Puntheeranurak<sup>2</sup>, P. Wilairat<sup>3</sup> and P. Karnchanaphanurach<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400 Thailand

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>Department of Biochemistry Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>4</sup>Center for Alternative Energy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

\*Email: [scpkb@mahidol.ac.th](mailto:scpkb@mahidol.ac.th)

**Abstract:** The cell membrane is asymmetric: Its inner leaflet consists mostly of phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) lipids while its outer leaflet mostly consists of phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin. The cell membrane loses its asymmetry when components of its inner leaflet, mainly PS molecules, flip to the outer leaflet. When this occurs, binding of certain membrane proteins such as annexin V, which binds specifically to PS, is enabled. Here, we study the effect of membrane density of PS molecules on annexin V binding using a supported, planar lipid bilayer (SLB) system, made of 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine, porcine brain L- $\alpha$ -Phosphatidylserine, and cholesterol. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) data indicate that the fluorescently labeled phospholipid 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (DPPE-NBD) in SLBs on glass cover slips have a diffusion coefficient of  $7.2 \pm 1.1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  and the mobile fraction was 96%. This high mobile fraction suggests that the lipids in the SLB are sufficiently mobile. Further studies involve determination of protein distribution and measurement of the mobility of protein on the bilayer using confocal microscopy and FRAP. The results could provide a better understanding of cellular processes that occur only when the membrane is symmetric and certain proteins have bound to it such as apoptosis.

## Introduction

A biological membrane is an important component in both prokaryotic and eukaryotic cells. It is primarily composed of lipids which arrange into bilayers [1]. Supported lipid bilayers (SLB), lipid bilayers formed through spontaneous fusion of unilamellar lipid vesicles on solid substrates, have been found to be excellent models of biological membranes [2]. A key characteristic of biological membranes is its dynamics and this is preserved in supported lipid bilayer systems, making it ideal for study of membrane properties and protein interactions.

The lipid membrane in cells is asymmetric with the inner leaflet composed of phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) lipids while the outer leaflet is composed of phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin [3-4]. Loss of membrane asymmetry occurs with the externalization of PS lipids to the outer leaflet. PS on the outer leaflet of the

bilayer can easily be detected using a PS binding protein such as annexin V [3-5].

Most research on SLB and annexin V has tended to concentrate on the effects of annexin V concentration or substrate type on SLB formation and mobility [6-9]. This body of work has suggested that high annexin V concentration lowers the mobility of the SLB. However, the density of PS (or its availability) may also affect binding of annexin V and hence, the mobility of the SLB [5]. In this work, we consider this alternate scenario. PS concentration in the SLB made is varied while keeping annexin V concentration constant. The distribution of the protein and mobility of the lipid bilayer and annexin V is studied using confocal microscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). As the interaction between phospholipids and proteins is crucial in certain cellular processes such as apoptosis [3], the findings of this research could elucidate the mechanisms that depend on membrane density and protein interaction, as a result.

## Materials and Methods

**Materials.** 1, 2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC), porcine brain L- $\alpha$ -Phosphatidylserine (PS), and 1, 2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1, 3-benzoxadiazol-4-yl) (DPPE-NBD) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc (AL, USA) and used without further purification. The following were from Sigma-Aldrich Chemical Co (MO, USA) and were of high purity: Cholesterol, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, HEPES, CaCl<sub>2</sub>, and EDTA. Chloroform (HPLC grade) was from Labscan Asia Co Ltd (Bangkok, Thailand). Annexin V-Alexa Fluor 488 was purchased from Molecular Probes Inc (CA, USA).

**Preparation of Small Unilamellar Vesicles (SUV).**

DOPC and PS were dissolved in chloroform at a ratio of 9:1 (mol/mol) [6]. Cholesterol dissolved in chloroform was added to the phospholipid mixture to get a phospholipid to cholesterol ratio of 1:1 [10]. DPPE-NBD, dissolved in chloroform, was added to the lipid mixture at a concentration of 10 mol% (of total lipids). The chloroform was then evaporated using a rotary evaporator (Buchi, Italy) and high vacuum for 3 hours. The lyophilized lipids were then dissolved in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4. PBS is prepared

using 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The final concentration of lipids in buffer is 0.2 mg/mL [10]. Lipid vesicles were hydrated by sonicating at room temperature for 15 minutes or until the solution was clear. This was followed by 5 freeze-thaw cycles using dry ice bath and warm water (about 50°C).

*Formation of Supported Lipid Bilayers (SLB).* The cleanliness of the glass substrate was of great importance to the experiment. Cover slips (Fisher Scientific, PA, USA) were treated with sulfo-chromic acid and alcoholic KOH. The cover slips were then thoroughly rinsed with DI water and absolute ethanol (Merck, Germany). The cover slips were stored in ethanol until use.

On cleaned cover slips, a silicone gasket with two ports (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) was placed. Prepared SUVs were deposited through one of the ports until the gasket was full. The SUVs were then allowed to form into bilayers by incubating for 10 minutes in the dark. Following incubation, free vesicles and aggregates were removed by washing with PBS buffer 3 times.

*Reconstitution of Annexin V-Alexa Fluor 488.* Annexin V-alexa fluor 488 was taken from stock (concentration was not provided by the vendor) and made into 5% (vol/vol) solution with either annexin binding buffer or unbinding buffer. Annexin binding buffer is prepared using 10mM HEPES, 140mM NaCl, and 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4. Annexin unbinding buffer is prepared using 25mM HEPES, 140mM NaCl, and 1mM EDTA,

pH 7.4. Binding and unbinding buffers are used according to the experiments performed (see next section).

To remove aggregates and equilibrate with the appropriate buffer, the 5% annexin solution was dialyzed using a spin-trap from GE Biosciences. Manufacturer's instructions were followed on use. To each well of the gasket containing the lipid bilayer, 20μL of 5% annexin V-Alexa Fluor 488 solution was added. The well was then filled with the appropriate buffer. The lipid and protein was allowed to incubate for 10 minutes in the dark before being washed with buffer 3 times.

*Confocal Microscopy and FRAP.* For all observation and experiments, a confocal laser scanning microscope (CLSM) from Olympus (FV 1000) was used. Prior to viewing samples on the confocal microscope, the samples were equilibrated for 5-10 minutes. The excitation wavelength was 488/495 nm. Magnification used was 10x and 40x and always 40x for FRAP experiments. For FRAP experiments, an area 10 μm in diameter was selected and laser of 100% intensity was used to illuminate the spot for 380 ms. This induced bleaching of fluorophores. The area was then monitored for 160 seconds for fluorescence recovery.

## Results and Discussion

*Mobility of SLB.* Using CLSM and FRAP, the mobility of the SLB was observed. Figure 1 shows a series of images.

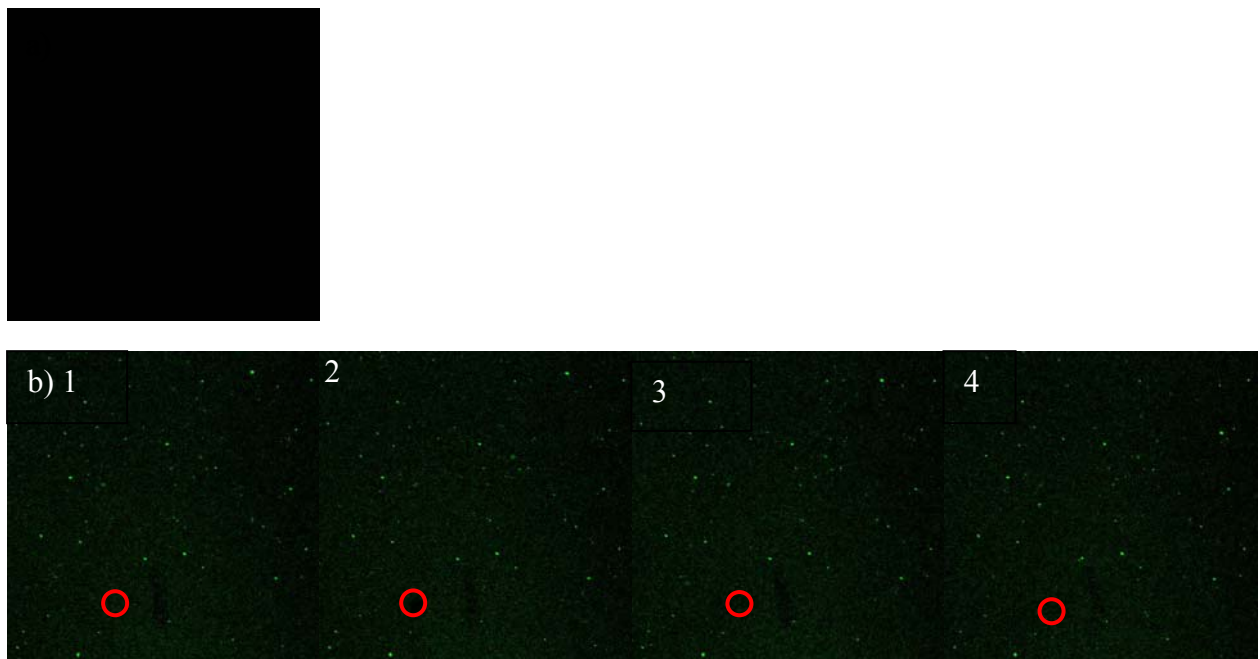


Figure 1. Images from FRAP experiment. a) SLB with no DPPE-NBD dye as control b) SLB with DPPE-NBD dye during FRAP experiment. Sequence of images with 1) before bleaching, 2) during bleach, 3) 10 seconds after bleach, 4) 160 seconds after bleach.

### Intensity Profiles from FRAP Experiments with SLB containing DOPC, PS, and Cholesterol

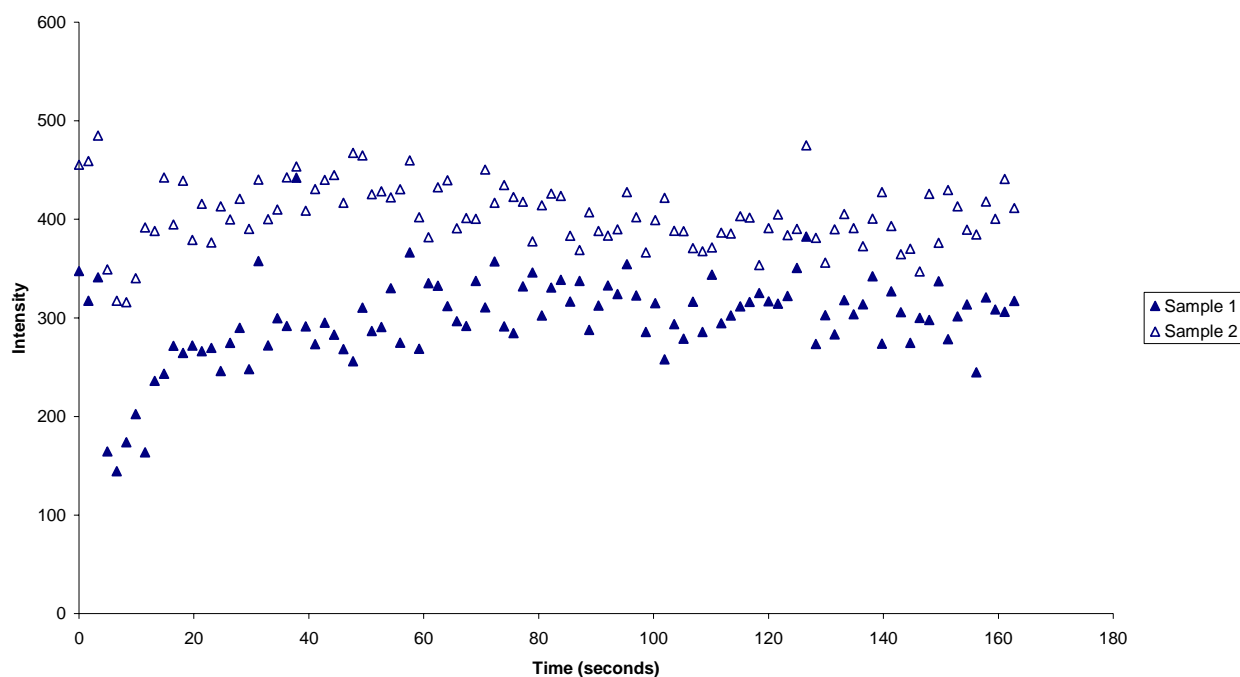


Figure 2. Intensity Profiles from 2 replicates of the same experiment.

In Figure 1a, nothing is observed because no dye was used. In Figure 1b (1), however, bright green spots cover the entire area of view with the brightest spots being dye aggregates. Figure 1b (1) is the image taken before any bleaching. Figure 1b (2) is taken during the photobleaching. The red circle represents the area bleached. It can be seen that the fluorophores in the area are almost completely bleached out but 10 seconds later (Figure 1b (3)), dye molecules from surrounding area have migrated in. By 160 seconds (Figure 1b (4)), the bleached area is almost indistinguishable from the rest of the image. This suggests that the SLB and the dye molecules in the SLB are mobile and will diffuse into the bleached area when a gradient occurs.

The sequence of images comprising Figure 1b is best represented graphically. By monitoring the fluorescence intensity in the red circle, it is possible to obtain an intensity profile. Figure 2 shows an intensity profile obtained from two replicates of the experiment.

The intensity profile obtained in Figure 2 can be fitted using standard diffusion models. To fit the above intensity profile, the diffusion model derived and explained in a paper by Axelrod *et al* [11] was used. The intensity profile was fitted in MATLAB 7 (The MathWorks Inc, MA, USA). It was then possible to calculate the diffusion coefficient and mobile fraction [11]. The average diffusion coefficient was found to be

$7.2 \pm 1.1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ . This value is consistent with the diffusion coefficient of lipids in cell membranes which was reported to be  $8.0 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  in [12] and  $8.2 \pm 1.2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  in [13], at  $37^\circ\text{C}$ . In addition, the mobile fraction was 96%. Thus, it may be concluded that the SLB was sufficiently mobile

*Binding of Annexin V-Alexa Fluor 488 to the SLB.* In this work, in addition to being concerned with the dynamics of the SLB, dynamics of the annexin V protein conjugated to alexa fluor 488 fluorescent dye in the SLB is also an issue. A first step in studying the latter involves the study of binding and unbinding of the annexin V protein. Annexin V binds to PS in the lipid bilayer when  $\text{Ca}^{+2}$  is sufficiently present [3-5]. Thus, a preliminary study of binding and unbinding of annexin V to the SLB involved adding the protein to the formed SLB using binding and unbinding buffers, respectively. Figure 3 shows the results obtained from binding and unbinding scenarios.

From Figure 3a, it can be seen that the annexin V-alexa fluor 488 has bound to the SLB because small green fluorescent spots are observed, albeit the signal is weak. However, in Figure 3b, no fluorescent spots are observed. Thus, annexin V binds to the SLB only when  $\text{Ca}^{+2}$  are available while in the presence of a chelating agent such as EDTA, no binding occurs, regardless of the presence of PS.

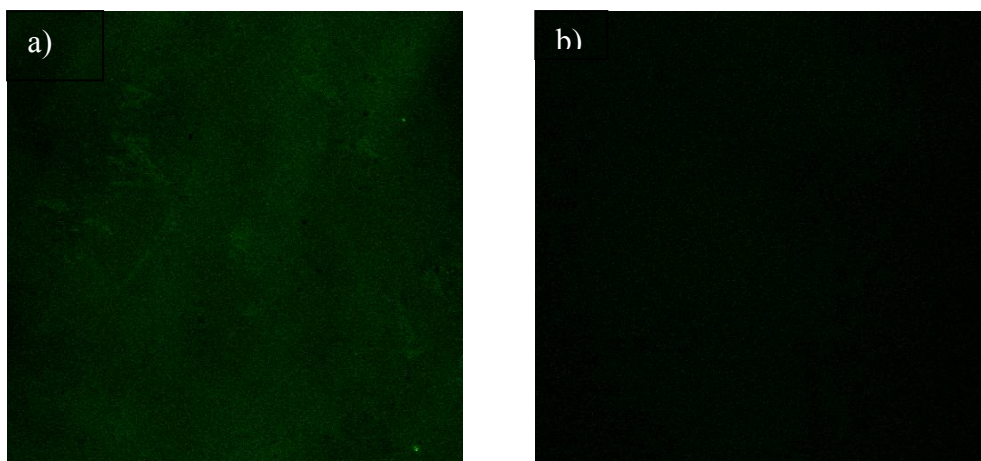


Figure 3. Images of SLB with annexin V at 40x magnification: a) SLB and annexin V-alexa fluor 488 in binding buffer b) SLB and annexin V-alexa fluor 488 in unbinding buffer.

### Conclusions

From the results presented above, it may be concluded that an SLB was successfully made that is demonstrably mobile like cell membranes and annexin V proteins bind and interact with this bilayer. In addition, annexin V, a protein that binds to PS in the lipid bilayer only in the presence of  $\text{Ca}^{+2}$ , continues to behave selectively in the model bilayer. Thus, the system intended for study is feasible. The next step in this work is to further study the dynamics of annexin V in the bilayer and when the PS density is varied. This study could elucidate the phospholipid density dependent dynamics of certain membrane proteins, which could provide insights into cellular processes that occur because of membrane lipid and protein interactions such as apoptosis.

### Acknowledgement

The authors (AM, PT, and PK) thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for financial support of this research. PK also thanks the Thailand Research Fund for financial support.

### References

- [1] M. Eisenberg and S. McLaughlin, *Bioscience*. **26** (1976), pp. 436-443.
- [2] S. G. Boxer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4** (2000), pp. 704-709.
- [3] M. van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. S. Ramaekers, B. Schutte and C. P. M. Reutelingsperger, *Cytometry*. **31** (1998), pp. 1-9.
- [4] K. Balasubramanian, B. Mirnikjoo and A. J. Schroit, *J. Biol. Chem.* **282** (2007), pp. 18357-18364.
- [5] U. Appelt, A. Sheriff, U. S. Gaipf, J. R. Kalden, R. E. Voll and M. Hermann, *Cell Death Differ.* **12** (2005), pp. 194-196.
- [6] L. Cézanne, A. Lopez, F. Loste, G. Parnaud, O. Saurel, P. Demange and J. Tocanne, *Biochemistry*. **38** (1998), pp. 2779-2786.
- [7] O. Saurel, L. Cézanne, A. Milon, J. Tocanne and P. Demange, *Biochemistry*. **37** (1998), pp. 1403-1410.
- [8] F. M. Megli, M. Selvaggi, S. Liemann, E. Quagliariello and R. Huber, *Biochemistry*. **37** (1998), pp. 10540-10546.
- [9] M. L. Wagner and L. K. Tamm, *Biophys. J.* **79** (2000), pp. 1400-1414.
- [10] T. Y. Yoon, C. Jeong, S. W. Lee, J. H. Kim, M. C. Choi, S. J. Kim, M. W. Kim and S. D. Lee, *Nat. Mater.* **5** (2006), pp. 281-285.
- [11] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson and W. W. Webb, *Biophys. J.* **16** (1976), pp. 1055-1069.
- [12] D. E. Golan, M. R. Alecio, W. R. Veatch and R. R. Rando, *Biochemistry*. **23** (1984), pp. 332-339.
- [13] J. A. Bloom and W. W. Webb, *Biophys. J.* **42** (1983), pp. 295-305.

เอกสารแนบที่ 3

## ที่มาของปัญหา

ที่มาของปัญหาและแรงจูงใจในการที่เลือกทำการศึกษาชิ้นนี้ มาจากความสำคัญของไวรัสเดงกี ที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก ที่เป็นที่รู้จักกันดีในเรื่องของความรุนแรงของอาการที่ผู้ป่วยจะได้รับ สำหรับสถิติที่องค์การอนามัยโลกได้ทำการสำรวจไว้ พบว่าในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อมากกว่าประมาณ 20 ถึง 100 ล้านคน ขณะที่จะมีผู้เสียชีวิตประมาณ 10,000 คน และด้วยความหลากหลายถึงสี่สายพันธุ์ของไวรัสชนิดดังกล่าว จึงทำให้ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการรักษา อย่างไรก็ตามก็ให้เกิดความพยายามของนักวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะความพยายามในการทำควมเข้าใจกลไกต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ

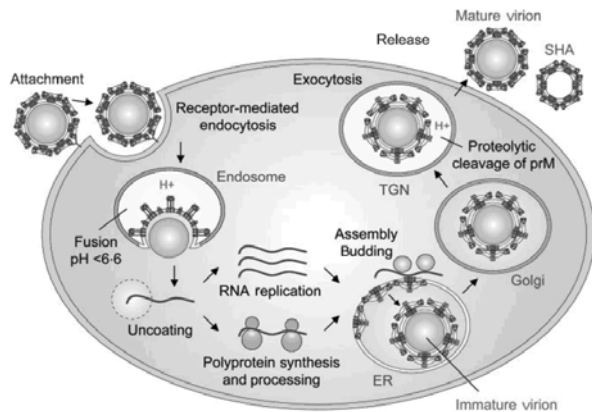


แผนภาพแสดงการแพร่กระจายของแหล่งที่อยู่ที่มีการแพร่พันธุ์ของยุงลาย (เทา), แสดงการแพร่ระบาดของโรคไข้เลือดออก (ดำ)  
ที่มา : es.wikipedia.org

งานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับไวรัสเดงกี ในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นในด้านของการศึกษาถึงโครงสร้างสามมิติของไวรัส, การศึกษาพฤติกรรมของ RNA ของไวรัสที่มีการแสดงออกเมื่อมีการถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์, การศึกษากระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส เรื่อยไปจนถึงการศึกษาการวิวัฒนาการของไวรัสดังกล่าว ล้วนนำมาซึ่งความรู้ที่สำคัญทำให้เรามีความเข้าใจในกลไกทางชีวภาพได้ดีมากขึ้น สามารถที่จะนำไปพัฒนาตัวยาใหม่ๆที่จะนำมาใช้ในการรักษาต่อไป

สำหรับจุดมุ่งหมายของงานวิจัยชิ้นนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษากระบวนการหลอมรวมระหว่างไวรัสกับเซลล์ซึ่งถือเป็นเหตุการณ์แรกของวงจรในการแพร่พันธุ์ของไวรัส โดยกลุ่มวิจัยเรามองว่าความเข้าใจในคุณสมบัติของเยื่อหุ้มไวรัสซึ่งประกอบไปด้วยชั้นโปรตีนและไขมันจะช่วยให้เราสามารถที่จะเข้าใจ สามารถอธิบายกลไกการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสได้ดีมากยิ่งขึ้น โดยในการศึกษาหัวข้อดังกล่าวทางกลุ่มของเราจะทำการ

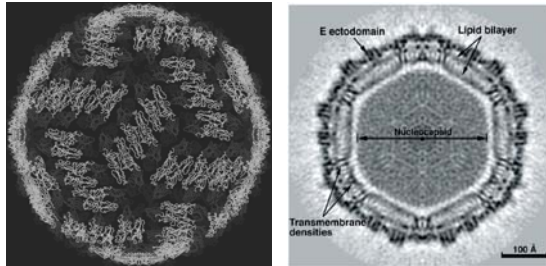
ภาพแสดงกลไกในการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสเดงกี  
ที่มา: Journal of General Virology (2006), 87, 2755–2766



จำลอง  
จริงให้

## เกี่ยวกับไวรัสเดงกี (dengue virus)

ไวรัสเดงกี (Dengue Virus) จัดอยู่กลุ่มของ Flavivirus ที่มีโครงสร้างเป็นแบบ icosahedra องค์ประกอบของไวรัสชนิดดังกล่าวจะประกอบไปด้วยเยื่อหุ้มภายนอกที่ประกอบไปด้วยชั้นของโปรตีนและไขมัน โดยในส่วนของโปรตีนยังสามารถที่จะแบ่งออกเป็นเมมเบรนโปรตีน (membrane protein) ซึ่งแทรกอยู่ในชั้นของไขมัน และเอ็นวิลอปโปรตีนหรือ โปรตีนที่อยู่ชั้นนอกสุดโดยจะมีบทบาทสำคัญอย่างมากในกลไกการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส



โครงสร้างของไวรัสเดงกีที่ได้จากภาพถ่ายอิเล็กตรอน

ที่มา: Nature Structural Biology volume 10 number 11, November 2003

ในขั้นต้นของการศึกษา เราจะทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของชั้นเยื่อหุ้มไขมันซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะช่วยในการศึกษาสมบัติต่างๆของเยื่อหุ้มไวรัสที่เรามีความสนใจต่อไป

## จุดประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทำการศึกษารายละเอียดของชั้นไขมันที่ประกอบด้วยสารจำพวกฟอสโฟไลปิดบนเยื่อหุ้มเมมเบรนของไวรัสเดงกี โดยการใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปคโตรเมตรี

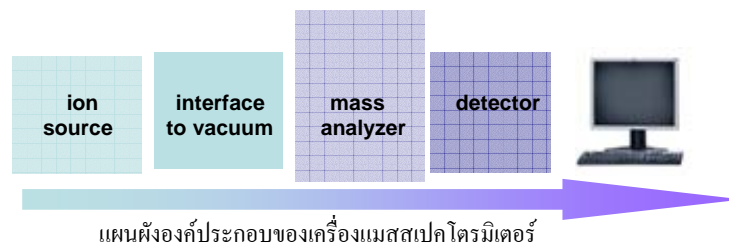
## บทนำ

สำหรับการวิเคราะห์ฟอสโฟไลปิดนั้น ถือว่าไม่ใช่เรื่องใหม่สำหรับนักวิทยาศาสตร์เนื่องจากมีการทำวิจัยทางด้านนี้มานาน ตลอดจนมีการพัฒนารูปแบบในการวิเคราะห์เรื่อยๆมา วิธีการที่ถือว่าเป็นพื้นฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและใช้กันมานานวิธีหนึ่งคือการวิเคราะห์โดยวิธี thin layer chromatography ซึ่งสามารถที่จะทำการระบุชนิดของสารที่ทำการวิเคราะห์โดยอาศัยความแตกต่างในเรื่องของการละลายในตัวทำละลายที่ไม่เท่ากันของสารที่ทำการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวก็ยังมีข้อด้อยในด้านของใช้เวลาในการเตรียมวิธีการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน รวมทั้งไม่เหมาะสมในแง่ของการทำปริมาณวิเคราะห์ในปัจจุบันเทคนิคอย่างไฮเพอร์ฟอร์มแมน ลิควิดโครมาโทกราฟีและแก๊สโครมาโทกราฟีมีการนำมาใช้ในการศึกษาสารชนิดดังกล่าวอย่างกว้างขวาง โดยในการศึกษาส่วนใหญ่จะมุ่งไปที่การศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบของฟอสโฟไลปิด เมื่อพิจารณาเทคนิคเหล่านี้แล้วทางกลุ่มของเราจึงมองเห็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่ง นั่นก็คือความหลากหลายของฟอสโฟไลปิดที่แบ่งออกเป็นจำพวกต่างๆ ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ยังไม่มีความเหมาะสมเพียงพอในการศึกษาความหลากหลายดังกล่าว

ขณะเดียวกันเทคนิคอย่างแมสสเปคโตรเมตรี ก็เริ่มเป็นที่นิยมอย่างมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะการศึกษาในเชิงชีวภาพ ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวจะสามารถที่จะให้ข้อมูลที่สำคัญต่างๆ โดยเฉพาะความสามารถในการระบุตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์รวมถึงความไวที่สูงทำให้สามารถที่จะทำการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณเล็กน้อยได้ และด้วยการพัฒนาของเครื่องมือที่ล้ำหน้าไปมากในเวลานี้จึงทำให้เราสามารถที่จะประยุกต์ไปใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีวภาพใหม่ๆได้



analyzer โดยในงานวิจัยขั้นนี้ได้นำระบบ time of flight หรือ time of flight mass spectrometer มาใช้ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ทางภาควิชาเคมีมีอยู่



ตามแผนผังที่แสดงจะพบว่าเครื่องมือดังกล่าวจะประกอบไปด้วยส่วนต่างๆที่มีความสำคัญ ได้แก่

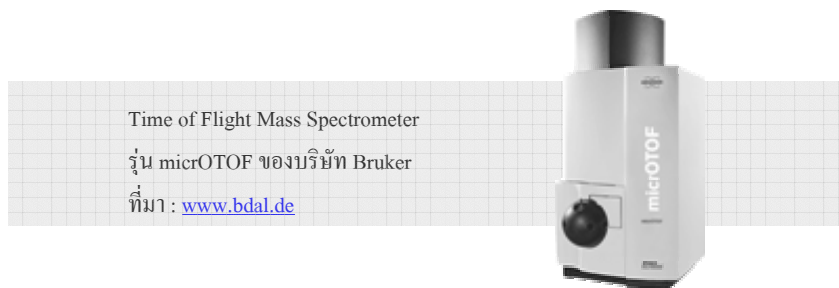
Ion source แหล่งกำเนิดไอออนเป็นส่วนต้นของเครื่องมือที่จะทำการเปลี่ยนสภาพของสารที่เราทำการวิเคราะห์ให้อยู่ในรูปของไอออน ซึ่งจะถูกส่งผ่านไปทำการวิเคราะห์ที่หน่วยวัดเคราะห์มวล (mass analyzer) ต่อไป

Mass Analyzer จะเป็นหน่วยที่ทำการวิเคราะห์ไอออนที่เข้ามาว่ามีค่ามวลต่อประจุเท่าใด โดยรูปแบบของการวิเคราะห์จะแบ่งออกเป็นสองชนิด ตามชนิดของเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

- ion trap mass analyzer , อาศัยหลักการของการให้ไฟฟ้ากระแสตรงและคลื่นวิทยุที่จะทำให้สามารถที่จะกักไอออนที่เราสนใจได้
- time of flight mass analyzer, อาศัยหลักการที่ว่าไอออนที่มีมวลและประจุต่างกันจะมีความเร็วหรือใช้เวลาใน mass analyzer ไม่เท่ากัน ตามแตกต่างดังกล่าวสามารถที่จะคำนวณออกมาในรูปของค่ามวลต่อประจุได้ ( $m/z$ )

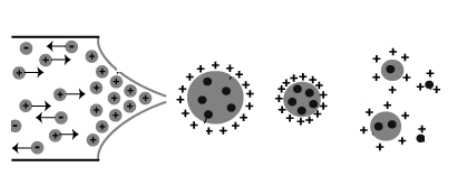
Detector หน่วยตรวจวัด ซึ่งจะทำหน้าที่ในการตรวจจับ ไอออนที่เข้ามา ซึ่งสัญญาณที่อุปกรณ์นี้ทำการวัดได้จะถูกนำไปแปรผล, เก็บรวบรวม, และทำการวิเคราะห์ต่อไปโดยเครื่องคอมพิวเตอร์

แมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิดที่เราใช้ในงานวิจัยนี้คือเครื่อง Electrospray-Time of Flight Mass Spectrometer ซึ่งเป็นเครื่องมือประจำภาควิชาเคมี



Ionization source : Electrospray Ionization Source (ESI) ถือว่าเป็นการ ionize ที่ใช้พลังงานต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการ ionization วิธีอื่น กระบวนการจะเริ่มจากการสเปรย์สารละลายที่เราทำการวิเคราะห์ผ่านหลอดโลหะขนาดเล็ก (needle) โดยความช่วยเหลือของก๊าซแห้ง ซึ่งจะทำให้ได้หยดของสารละลายขนาดเล็กจำนวนมาก และด้วยความต่างศักย์ระหว่างปลายของหลอดโลหะกับผนังอิเล็กโทรด หยดไอออนดังกล่าวก็จะถูกเร่งเข้าสู่ระบบสูญญากาศภายในพร้อมๆ กับการระเหยไปของตัวทำละลายด้วยความช่วยเหลือของความร้อนภายในระบบ ขณะเดียวกันก็จะส่งผลให้ความหนาแน่นของประจุที่ผิวของหยดสารละลายมีสูงขึ้น กระทั่งเกิดการปลั๊กกันของไอออนและกระจายออกเป็นไอออนอิสระซึ่งจะเข้าสู่ระบบสูญญากาศเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

ภาพแสดงกระบวนการ ionization ที่จาก ESI source  
ที่มา: www.ms.ansci.de



ลักษณะของไอออนที่ได้จาก ionization source ดังกล่าวนี้นี้จะเป็นไอออนที่มีพลังงานไม่สูงมาก ทำให้ไม่เกิดการสลายตัวไป ซึ่งข้อดีคือสามารถที่จะทำให้ได้ spectrum ที่สามารถคำนวณกลับไปหาจำนวนโมเลกุลรวมถึงขนาดของประจุของไอออนที่ทำการวิเคราะห์ได้



Mass Analyzer: Time of Flight Mass Analyzer ไอออนที่เข้ามาถึงในส่วนนี้จะถูกเร่งโดยบริเวณที่เรียกว่า acceleration region พลังงานที่ไอออนได้รับจะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานจลน์วิ่งเข้าไปในส่วนของ drift tube ซึ่งไอออนที่มีมวลและประจุต่างกันจะวิ่งด้วยความเร็วใน drift tube ได้เร็วไม่เท่ากัน

สมการที่ใช้ในการอธิบายเหตุการณ์ดังกล่าวเป็นดังนี้

พลังงานศักย์ที่ไอออนได้รับจากบริเวณเร่ง (acceleration region) เมื่อมีการให้ค่าศักย์เข้าไปค่าหนึ่ง

$$E = ZeU \quad \text{เมื่อ } U \text{ คือ ค่าศักย์ที่เราให้เข้าไป (Volt)}$$

$Z$  คือ ค่าประจุของไอออน

$e$  คือ ประจุของอิเล็กตรอน ( $1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$ )

พลังงานศักย์ดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนไปเป็นพลังงานจลน์ให้ไอออนนำไปใช้ในการเคลื่อนที่ใน drift tube ซึ่งเป็นบริเวณ field free region

$$ZeU = (1/2)m_i v_i^2 \quad \text{เมื่อ } v \text{ คือความเร็ว (m/s) ของประจุ}$$

คิดเป็นความเร็วที่ใช้ในการเคลื่อนที่  $v_i = \sqrt{\frac{2ZeU}{m_i}}$  หรือเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ใน drift tube ของไอออน

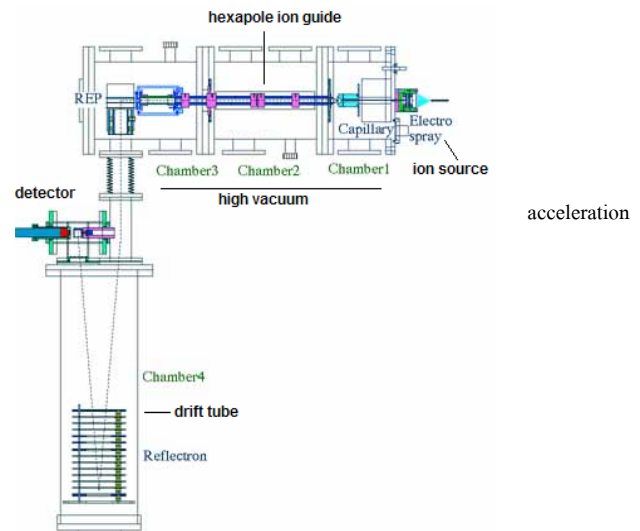
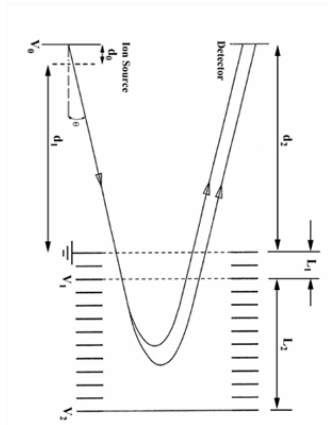
$$t_i = \frac{s}{\sqrt{\frac{2ZeU}{m_i}}} \quad \text{เมื่อ } s \text{ คือ ระยะของ drift tube ซึ่งเป็นค่าคงที่}$$

ระยะเวลาที่เครื่องทำการวัดได้สามารถที่จะคำนวณออกมาเป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z)

$$m/z = 2eU(t/s)^2$$

นอกจากนี้ในส่วนนี้ยังมีอุปกรณ์ reflectron ที่ทำหน้าที่ในการ focus รวมทั้งลดการกระจายพลังงานของไอออนชนิดเดียวกันที่มีพลังงานไม่เท่ากัน โดยสำหรับเครื่องที่เราใช้นี้จะมี reflectron ที่มีรูปแบบเป็น orthogonal acceleration reflector

Orthogonal  
reflectron



ในการศึกษาเราจะทำการเชื่อมต่อเครื่องไฮเพอร์

ฟอร์ม

แมนส์ ลิกวิดโครมาโทกราฟี (HPLC) มาเข้ากับแมสสเปคโตรมิเตอร์ โดย Condition ที่ใช้ในเครื่อง HPLC เราจะทำการวิเคราะห์ในโหมดที่เป็น normal phase

Gradient Elution เพื่อทำการแยกฟอสโฟไลปิดออกเป็นหมู่ต่างๆ อีกทั้งยังเป็นการลดความซับซ้อนในการวิเคราะห์เมื่อสารดังกล่าวเข้าสู่เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์

## สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Condition for Measurement)

HPLC : Agilent 1100 series, Agilent Technology

Column : Zorbax RX SIL, (4.6×150 mm.), Agilent Technology

Flow rate : 1 ml / min

Temperature : 30 °C

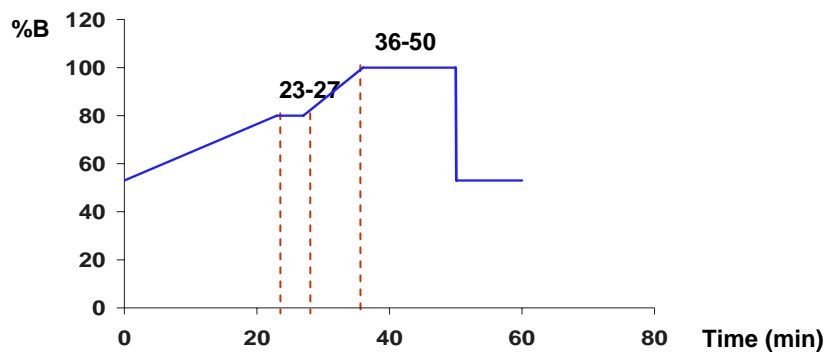
Sample inject 80 microliter

Gradient Step Elution

A hexane:isopropanol (3:2)

B hexane:Isopropanol:5 mM ammonium formate

(56.7:37.8:5.5)



แผนผังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ ปริมาณของ Mobile phase B ที่เพิ่มขึ้น

Time of Flight Mass Spectrometer : MicrOTOF , Bruker Daltonic

Source Type : Negative

Ion-polarity : Negative

Scan Range : 50 – 1000 m/z

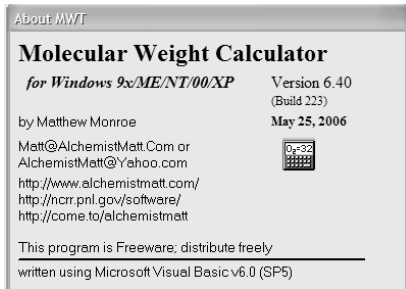
Set Pulsar Push 360 V      Capillary Exit: -100.0 V

Set Reflector 1300 V      Hexapole RF: 200.0 V

Set Flight Tube 9000 V      Skimmer 1: -35.0 V

Set Detector TOF 2090 V      Hexapole 1: -23.0 V

## เกี่ยวกับซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์



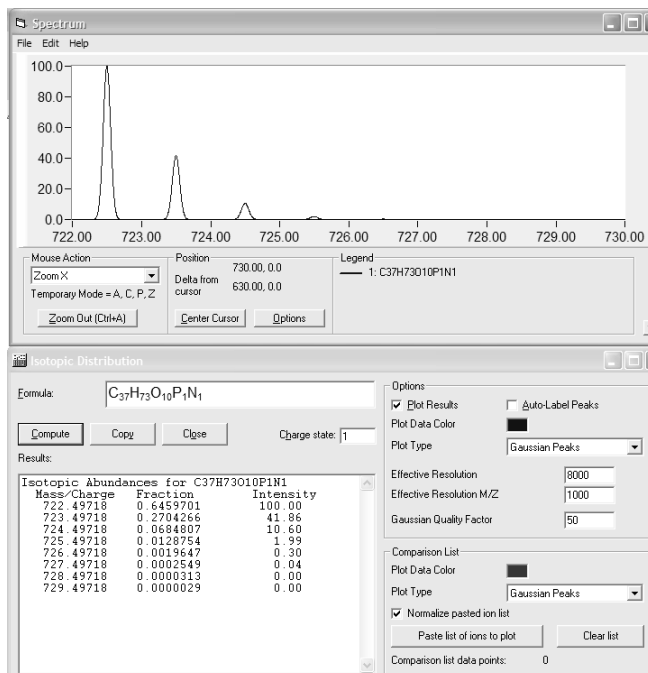
ข้อมูลที่ทำการวัดได้จากเครื่องมือจะถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ Molecular Weight Calculator Version 6.40

: เขียน โดย Matthew Monroe

โดยซอฟต์แวร์ที่ใช้จะทำหน้าที่ในการคำนวณค่าความเข้มของสัญญาณที่เป็นไปได้ตลอดจนรูปแบบการกระจายตัวของสัญญาณที่เกิดจากไอโซโทป (isotope distribution) อันเป็นผลมาจากอะตอมที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลที่เราทำการวิเคราะห์

รูปแบบการใช้งานจะเริ่มจากการใส่สูตรโมเลกุลของสารที่เราสนใจลงไป จากนั้นตัวซอฟต์แวร์จะทำการคำนวณตลอดจนการสร้างกราฟแมสสเปกตรัมขึ้นมา

ค่าตัวเลขต่างๆที่เครื่องทำการคำนวณได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับผลที่ทำการวัดได้จริงเพื่อทำการวิเคราะห์ โดยเฉพาะการระบุความเป็นฟอสโฟไลปิดของสารที่เราทำการวิเคราะห์



ภาพตัวอย่างสเปกตรัมที่ได้จากการคำนวณโดยใช้ซอฟต์แวร์ molecular weight calculation

## รูปแบบของการวิเคราะห์ปริมาณ

ในการวิเคราะห์ปริมาณของฟอสโฟไลปิดที่ได้จากการสกัดออกมาจากตัวอย่างไวรัสจะดำเนินการเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากฟอสโฟไลปิดของตัวอย่างเทียบกับสัญญาณของฟอสโฟไลปิดมาตรฐาน สำหรับฟอสโฟไลปิดมาตรฐานที่เราใช้จะเป็นฟอสโฟไลปิดที่ได้มาจากการสังเคราะห์ โดยมีความยาวของสายโซ่กรดไขมันที่สั้นและพบได้น้อยตามธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้ไม่เกิดการเหลื่อมล้ำของสัญญาณกับสัญญาณที่ทำการวัดได้จากตัวอย่าง

หน้าที่ที่สำคัญนอกจากจะเป็นสารที่ใช้เทียบเพื่อหาปริมาณแล้ว มาตรฐานฟอสโฟไลปิดดังกล่าวยังทำหน้าที่เป็นตัวชี้วัดว่า ฟอสโฟไลปิดของตัวอย่างที่เราทำการวิเคราะห์จัดอยู่ในฟอสโฟไลปิดจำพวกใด

ฟอสโฟไลปิดมาตรฐานที่เราใช้มีรายการดังนี้

- 1, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)] (Sodium Salt) (DMPG)
- 2, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DMPE)
- 3, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC)
- 4, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*L*-Serine] (Sodium Salt) (DMPS)

มาตรฐานที่ใช้ทำการสั่งซื้อมาจากบริษัท Avanti Polar Lipid

ข้อมูลที่เป็น :

ตารางแสดงสูตร โครงสร้างและค่ามวลโมเลกุลที่แท้จริง (exact molecular weight)

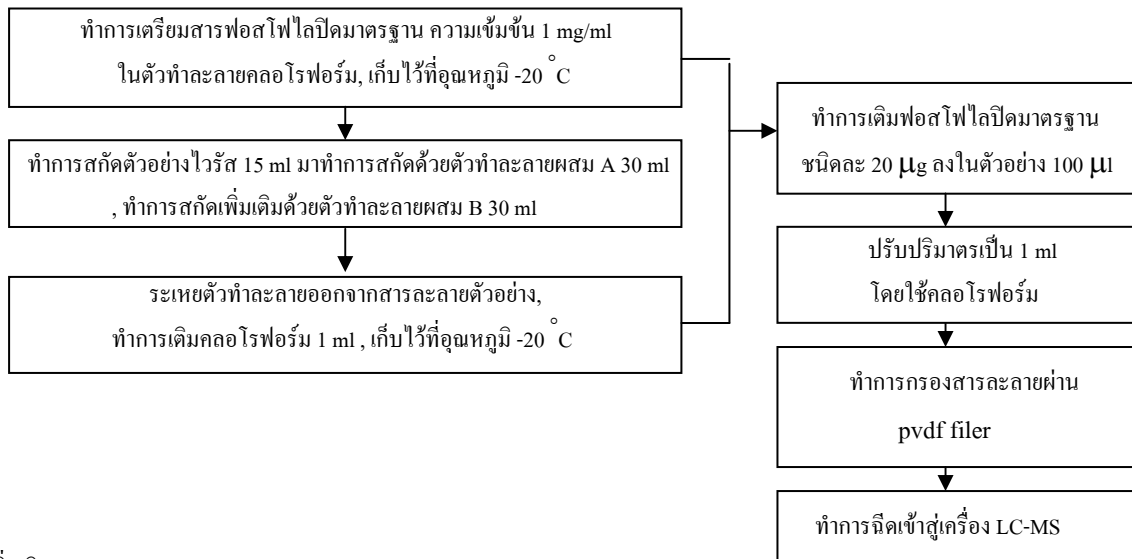
Phospholipid	Chemical formula	Exact Molecular Weight
DMPG	$C_{34}H_{66}O_{10}P$	688.429 Da
DMPE	$C_{33}H_{65}O_8PN$	635.453 Da
DMPC	$C_{37}H_{73}O_{10}PN$	677.500 Da
DMPS	$C_{34}H_{65}O_{10}PN$	701.424 Da

## ขั้นตอนโดยรวมในการวิเคราะห์



ขั้นตอนจะเริ่มต้นจากการเตรียมสารฟอสโฟไลปิดมาตรฐานและตัวอย่างในคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยในส่วนของตัวอย่างไวรัสที่เราใช้คือไวรัสแดงกี Serotype 2 ซึ่งได้รับมาจากผู้ป่วยไข้เลือดออก เมื่อทำการสกัดฟอสโฟไลปิดจากตัวอย่างได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ LC-MS ซึ่งข้อมูลที่ได้จากเครื่องมือจะถูกนำไปประมวลผล และทำการวิเคราะห์โดยซอฟต์แวร์ต่อไป

### ในส่วนของการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์



### เพิ่มเติม

ตัวทำละลายผสม A : chloroform: methanol (2:1), contained 0.01 BHT

ตัวทำละลายผสม B : chloroform: methanol (35:5), contained 0.01 BHT

BHT : butylate hydroxy toluene ทำหน้าที่เป็น antioxidant

pvdf : polyvinylidene fluoride

## ในส่วนของการเตรียม mobile phase

*Mobile Phase A* : hexane/isopropanol (3:2)

- ทำการเตรียมสารละลายผสม hexane : isopropanol ในสัดส่วน 3 : 2 (v/v) ปริมาตรรวม 1000 ml
- ทำการปั่น โดยเครื่อง magnetic stirrer , sonicate เป็นเวลา 20 นาที เพื่อไล่อากาศที่อยู่ภายในสารละลาย

*Mobile Phase B* : hexane/isopropanol/ammonium formate (56.7:37.8:5.5)

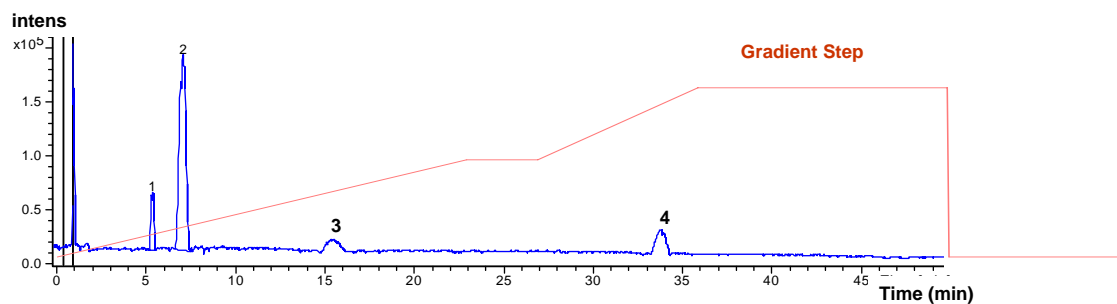
- ทำการเตรียมสารละลาย ammonium formate ความเข้มข้น 5 mM ในตัวทำละลายน้ำ
- นำ hexane, isopropanol และ 5mM ammonium formate มาผสมกันในสัดส่วนดังกล่าว
- ทำการปั่นโดยเครื่อง magnetic stirrer , sonicate เป็นเวลา 20 นาที เพื่อไล่อากาศที่อยู่ภายในสารละลาย

## ผลการทดลอง

### 1. การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานฟอสโฟไลปิด

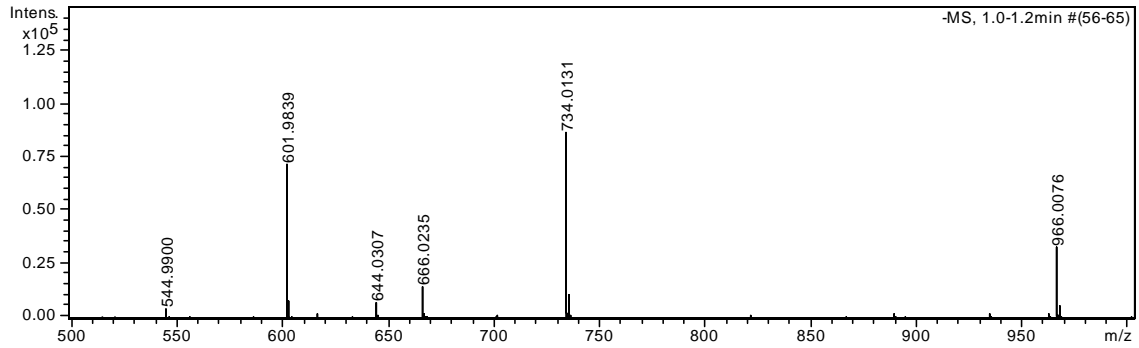
- : ที่มีความเข้มข้นของฟอสโฟไลปิดแต่ละชนิด (PG, PE, PE, PS ) เท่ากับ 50 ppm
- : ทำการละลายในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม 1 ml
- : ทำการฉีดตัวอย่างเข้าสู่การวิเคราะห์ปริมาณ 80  $\mu$ L

Ion Chromatogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time และ intensity  
ที่ได้จากการฉีดสารละลายฟอสโฟไลปิดมาตรฐานปริมาณ 80  $\mu$ L

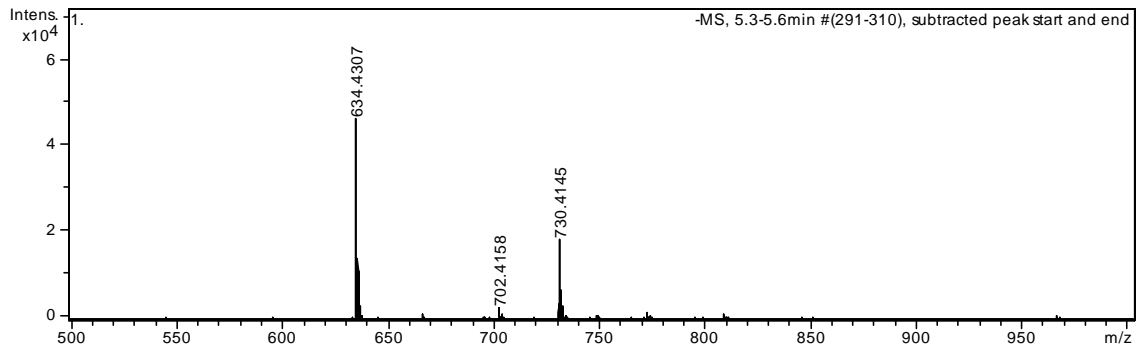


ผลของแมสสเปกตรัมที่ได้จากการเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลาที่มึสัญญาณปรากฏใน Ion chromatogram

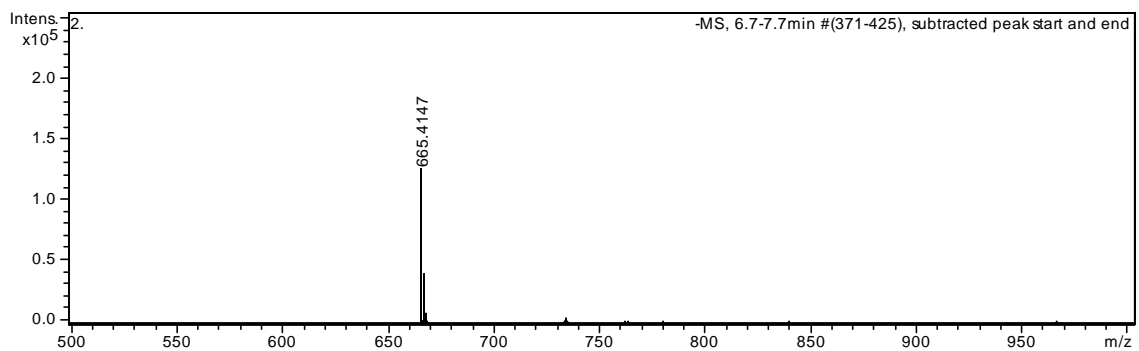
แมสสเปกตรัมที่ได้จากการเฉลี่ยตั้งเวลา 1.0 – 1.2 นาที



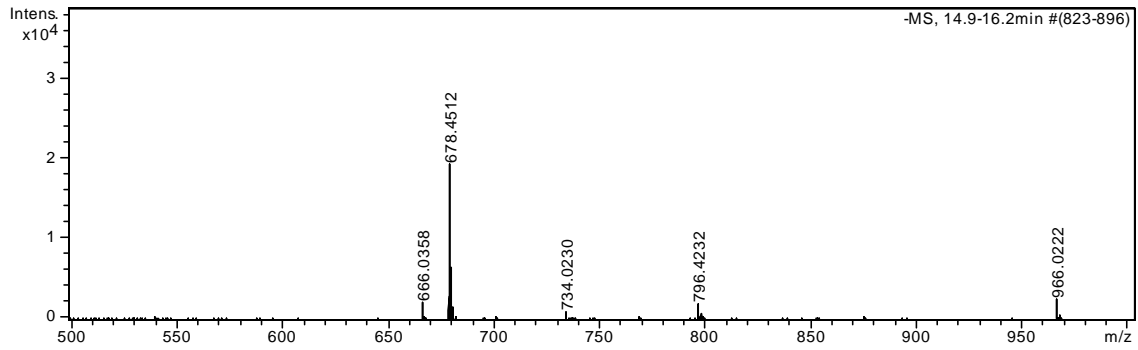
แมสสเปกตรัมที่ได้จากการเฉลี่ยตั้งเวลา 5.3 – 5.6 นาที



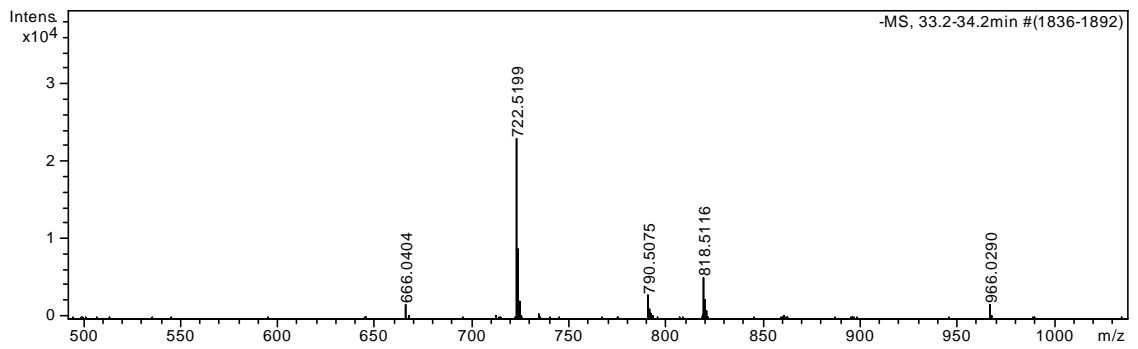
แมสสเปกตรัมที่ได้จากการเฉลี่ยตั้งเวลา 6.7 – 7.7 นาที



แมสสเปกตรัมที่ได้ทำการเฉลี่ยตั้งเวลา 14.9 – 16.2 นาที



แมสสเปกตรัมที่ได้ทำการเฉลี่ยตั้งเวลา 33.2 – 34.2 นาที



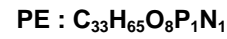
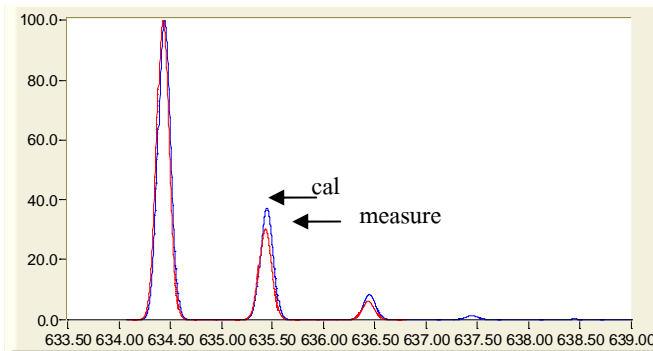
ตารางแสดงค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ปรากฏในแมสสเปกตรัมที่เวลาต่างๆ

เวลา	ค่า m/z ที่ปรากฏ	หมายเหตุ
1-1.2 นาที	544.99, 601.9839, 644.0307, 666.0235, 734.0131, 996.0076	
5.3-5.6 นาที	634.4307, 702.4158, 730.4145	DMPE, m/z = 634.4307, [M-H] <sup>-</sup>
6.7-7.7 นาที	665.4147	DMPG, m/z = 665.4147, [M] <sup>-</sup>
14.9-16.2 นาที	666.0358, 678.4512, 734.0230, 796.4232, 966.0222	DMPS, m/z = 678.4512, [M] <sup>-</sup>
33.2-34.2 นาที	666.0404, 722.5199, 790.5075, 818.5116, 966.0290	DMPC, m/z = 722.5199, [M+HCOO] <sup>-</sup>

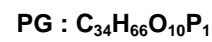
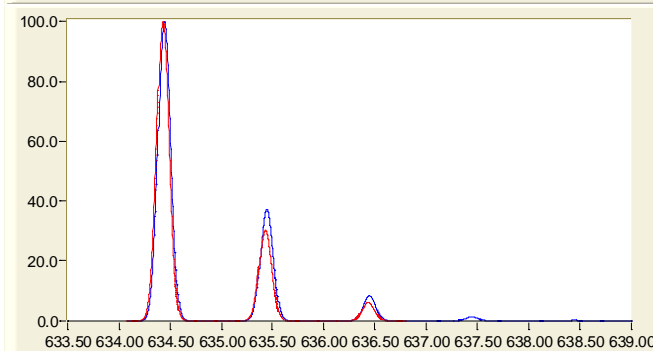
ตารางแสดงค่าความเข้มของสัญญาณจากค่า m/z ของสารมาตรฐานฟอสโฟลิปิดที่สนใจ

Phospholipid	m/z	intensity
DMPE	634.4307	46204
	635.4303	14035
	636.4352	2848
DMPG	665.4147	126823
	666.4171	40467
	667.4192	7815
DMPS	678.4512	19252
	679.4538	6537
	680.4565	1579
DMPC	722.5199	23152
	723.5247	8841
	724.5277	2173

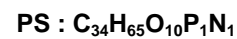
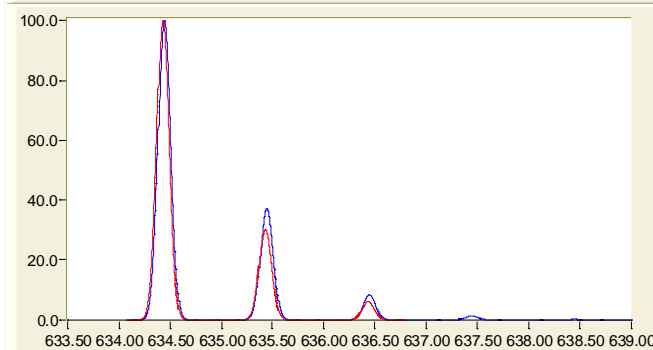
ผลการเปรียบเทียบค่า m/z และ intensity ที่คำนวณได้จากซอฟต์แวร์ “Molecular Weight Calculator” เทียบกับค่าผลการทดลอง ที่ทำการวัดได้จริง



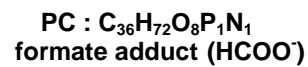
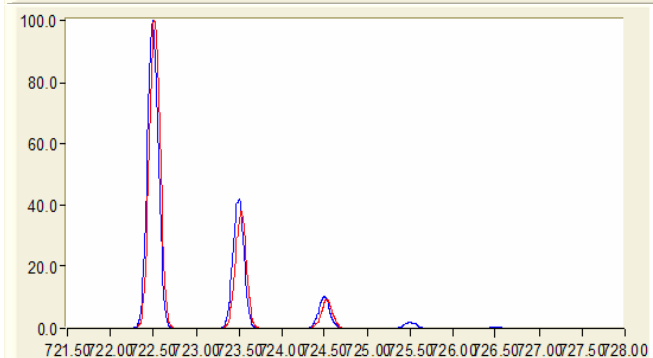
m/z		intensity	
cal	mea	cal	mea
634.4448	634.4307	100.00	100.00
635.4448	635.4303	37.34	30.38
636.4448	636.4352	8.42	6.16



m/z		intensity	
cal	mea	cal	mea
665.4393	665.4147	100.00	100.00
666.4393	666.4171	38.14	31.91
667.4393	667.4192	9.13	6.16



m/z		intensity	
cal	mea	cal	mea
678.4346	678.4512	100.00	100.00
679.4346	679.4538	38.50	33.95
680.4346	680.4565	9.27	8.20



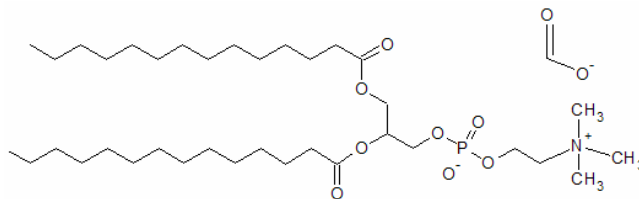
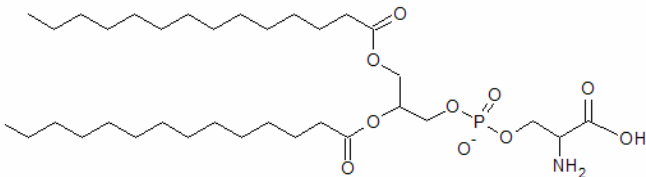
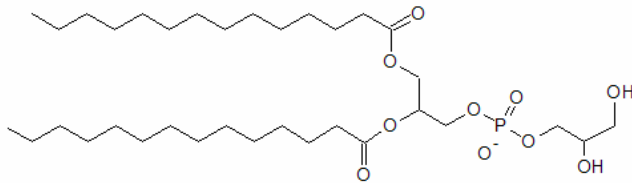
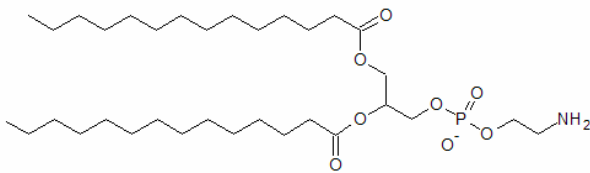
m/z		intensity	
cal	mea	cal	mea
722.4972	722.5199	100.00	100.00
723.4972	723.5247	41.86	38.19
724.4973	724.5277	10.60	9.39

## วิเคราะห์ผลการทดลอง

### 1. ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแยก (separation)

จากผลการแยกที่ได้พบว่า condition ที่เราใช้สามารถที่จะแยกฟอสโฟไลปิดออกเป็นจำพวกต่างๆ โดยหลักการที่ทำให้เราสามารถที่จะแยกออกมาได้น่าจะเป็นผลอันเนื่องมาจากสภาพขั้วที่แตกต่างกันของส่วนที่แสดงความเป็นขั้วของฟอสโฟไลปิด ซึ่งทำให้ฟอสโฟไลปิดแต่ละจำพวกมีแรงกระทำกับ stationary phase ที่ต่างกันไป

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ DMPG, DMPE, DMPS, DMPC



จากโครงสร้างที่ปรากฏ เนื่องจากสารมาตรฐานฟอสโฟไลปิดที่ทำกรวิเคราะห์มีความยาวของกรดไขมันยาวและมีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลเหมือนกัน ความแตกต่างที่ทำให้ฟอสโฟไลปิดแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันแง่ของ retention time จึงน่าจะมาจากความแตกต่างของ head group ซึ่งเมื่อพิจารณาเราจะพบว่า head group ที่มีสภาพขั้วน้อยที่สุดนั่นก็คือ head group หรือ head group ที่มาจาก DMPE โดยมีเพียงอะตอมไนโตรเจนที่แสดงความเป็นขั้ว ขณะที่ฟอสโฟไลปิดจำพวกอื่นจะมีอะตอมออกซิเจนซึ่งอยู่ในรูปของหมู่ไฮดรอกซิลหรือคาร์บอกซิลิก

โดยในการทดลองนี้เราสามารถเรียงลำดับความแรงของสภาพขั้วของ head group ได้ดังนี้

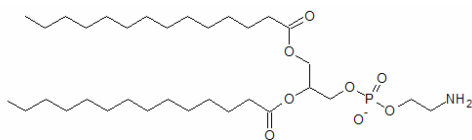
Adduct PC > PS > PG > PE

หน้าที่ของ Ammonium formate ที่เราเติมเข้าไปในระบบ นอกจากจะช่วยในเรื่องของการ ionization แล้วสารดังกล่าวยังมีส่วนในการเพิ่มความเป็นไอออนิกของสารละลาย ทำให้สารที่เราทำการวิเคราะห์หรือฟอสโฟไลปิดถูกชะออกมาจากระบบได้อย่างรวดเร็วขึ้น ซึ่งเป็นผลทำให้สัญญาณที่แสดงใน ion chromatogram มีความคมสูง

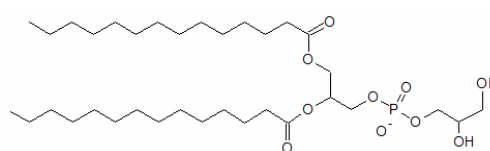
เหตุผลส่วนหนึ่งที่เราใช้เวลาในการวิเคราะห์เป็นเวลานาน เนื่องจากระบบของเรามีความต้องการให้ค่า resolution ของการแยกมีสูงมากๆ เพื่อที่ว่าเมื่อเราทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเฉพาะความหลากหลายและความซับซ้อนของสารที่เราทำการวิเคราะห์ที่ยังคงเหลืออยู่และอาจทำให้เกิดการซ้อนเหลื่อมของสัญญาณ มีน้อยลง

ในกรณีที่เกิดการซ้อนเหลื่อมของสัญญาณของ ion chromatogram ที่เราทำการวิเคราะห์ โดยเฉพาะสัญญาณที่มาจาก PE และ PG ซึ่งอยู่ใกล้กันและอาจเกิดการซ้อนของสัญญาณได้เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความซับซ้อนมากขึ้น การซ้อนของสัญญาณดังกล่าวจะส่งผลให้การวิเคราะห์เป็นไปอย่างยุ่งยากมากขึ้น โดยเฉพาะการที่จะแยกฟอสโฟไลปิดสองชนิดนี้ออกจากกัน อย่างไรก็ตามข้อสังเกตที่สำคัญอย่างหนึ่งคือจะพบว่าโมเลกุลของ PE นั้นจะมีองค์ประกอบอย่างในโตรเจนอะตอมอยู่ 1 อะตอม ขณะที่ PG ไม่มีอยู่เลย ความแตกต่างดังกล่าวส่งผลให้ค่า m/z ที่ทำการวัดได้จาก PE มีค่าเป็นเลขคู่ขณะที่ PG เป็นเลขคี่

โครงสร้างของ PE



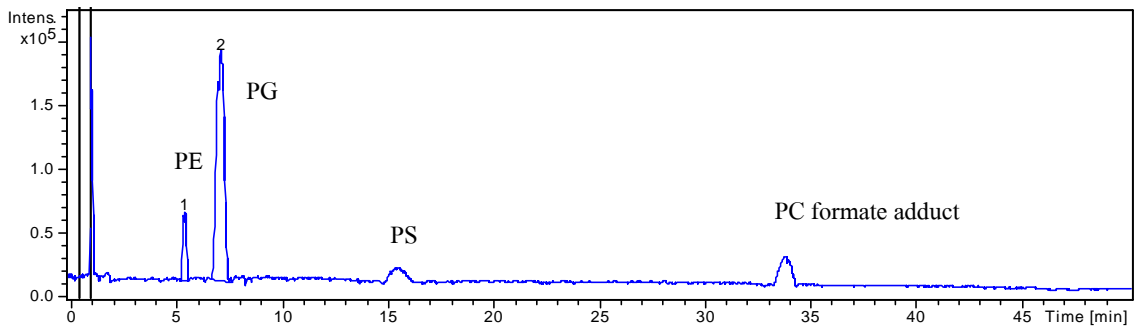
โครงสร้างของ PG



## 2. ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ทางแมสสเปกโตรเมตรี (Mass Analysis)

จากผลการทดลองที่ทำการวัดได้ พบว่าเทคนิคดังกล่าวมีความสามารถในการที่จะตรวจจับตัวอย่างที่มีความหลากหลายได้ โดยเฉพาะสารที่เราทำการวิเคราะห์อย่างฟอสโฟไลปิด เครื่องมือดังกล่าวสามารถที่จะให้ข้อมูลในเชิงคุณภาพและปริมาณไปพร้อมๆกัน โดยเฉพาะค่า m/z และรูปแบบการกระจายตัวของไอโซโทป ซึ่งสามารถที่จะทำการคำนวณและทำให้ทราบค่ามวลโมเลกุลของตัวอย่างฟอสโฟไลปิดที่เราทำการวิเคราะห์ได้

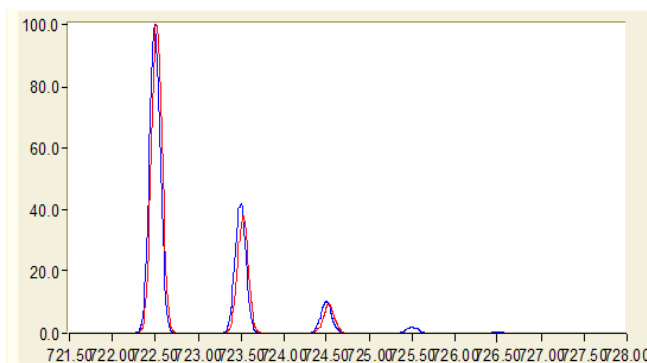
ในการทดสอบกับสารมาตรฐานฟอสโฟไลปิดที่มีความเข้มข้นเท่ากัน จะพบว่าความไวในการตรวจวัดสัญญาณที่ได้จากฟอสโฟไลปิดแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยจากผลการทดลองเราจะพบว่าฟอสโฟไลปิดที่มีความไวในการตรวจวัดสูงที่สุดคือ PG รองลงมาคือ PE, PC และ PS ซึ่งทั้งนี้ น่าจะเป็นผลมาจากความสามารถในการถูก ionization ของฟอสโฟไลปิดแต่ละจำพวกที่ไม่เท่ากันภายใน ionization source



จากประสิทธิภาพของเครื่องมือดังกล่าว โดยเฉพาะค่า resolution ของเครื่องมือที่สูงประมาณ 8,000-10,000 ทำให้ค่า m/z ที่วัดได้มีความแม่นยำสูง ทำให้เราสามารถที่จะแยกความแตกต่างของสัญญาณที่อยู่ข้างเคียง รวมถึงสามารถที่จะนำมาพิจารณาการกระจายตัวของไอโซโทปซึ่งเป็นประโยชน์ในการที่จะระบุความเป็นฟอสโฟไลปิดของสารที่เราทำการวิเคราะห์ได้

### 3. ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ (Data Analysis)

จากผลของการใช้ซอฟต์แวร์ในการคำนวณรูปแบบการกระจายตัวที่เป็นไปได้ของฟอสโฟไลปิดที่เราทำการวิเคราะห์ เราพบว่ารูปแบบของการกระจายตัวของไอโซโทปรวมทั้งสัดส่วนของสัญญาณมีความใกล้เคียงกับรูปแบบที่การกระจายตัวของสารฟอสโฟไลปิดที่เราทำการวัดได้จริง อย่างไรก็ตามเราจะพบว่าสัญญาณที่ได้จากไอโซโทปในส่วนของการคำนวณโดยใช้ซอฟต์แวร์จะมีความเข้มของสัญญาณมากกว่าค่าที่เราทำการวัดได้จริงซึ่งทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากความสามารถในการวัดหรือข้อจำกัดของเครื่องมือซึ่งไม่สามารถที่จะให้ค่าตรงตามทฤษฎีได้ และในการที่เราจะทำการปรับปรุงรูปแบบการคำนวณให้มีความใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการวัดก็อาจจะทำได้ด้วยการปรับค่าตัวแปรที่ใช้ในการคำนวณต่างๆ ซึ่งจะทำให้ผลในการคำนวณมีความใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากขึ้น

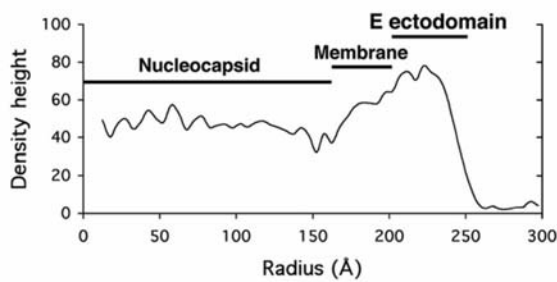


**PC : C<sub>36</sub>H<sub>72</sub>O<sub>8</sub>P<sub>1</sub>N<sub>1</sub>  
formate adduct (HCOO')**

m/z		intensity	
cal	mea	cal	mea
722.4972	722.5199	100.00	100.00
723.4972	723.5247	41.86	38.19
724.4973	724.5277	10.60	9.39

#### 4. ในส่วนของกรวิเคราะห์ตัวอย่าง

ผลจากการสกัดตัวอย่างที่เราใช้พบว่ายังไม่สามารถที่จะทำการสกัดปริมาณของฟอสโฟไลปิดออกมาได้เพียงพอต่อการวิเคราะห์ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาแล้วเราพบว่าอาจจะเป็นผลมาจากขนาดที่เล็กมากของไวรัสชนิดดังกล่าว เมื่อเราทำการประมาณปริมาณของฟอสโฟไลปิดที่มีอยู่ในไวรัสโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนซึ่งเป็นงานของนักวิจัยชาวต่างชาติ พบว่าปริมาณของฟอสโฟไลปิดจะมีอยู่ประมาณในช่วงนาโนกรัมต่อจำนวนไวรัสประมาณ 1 ล้านตัว ซึ่งจุดนี้ก็ยังคงเป็นปัญหาสำหรับการวิเคราะห์ของเรา โดยทางกลุ่มของเราเห็นว่าอาจจะต้องมีการปรับปรุงวิธีที่ใช้ในการสกัดรวมถึงการใช้ปริมาณของตัวอย่างให้มากขึ้น



กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของชั้นต่างๆที่ประกอบเป็นตัวไวรัสแดงก็  
แหล่งข้อมูล : Cell, Vol. 108, 717–725, March 8, 2002

#### เอกสารอ้างอิง

1. Fei Gao, Xinkui Tian, Dawei Wen, Jie Liao, Tao Wang, Huwei Liu, *Biochim Biophys Acta.*, 2006, Jul,1761(7),667-76.
2. Chang Wang, Hongwei Kong, Yufeng Guan, Jun Yang, Jianren Gu, Shengli Yang, Guowang Xu, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 4108-4116
3. J. A. Barnes, D. J. Pehowich,t and T. M. Allen, *Journal of Lipid Research*, 1987, volume 28
4. Richard J. Kuhn, Wei Zhang, Michael G. Rossmann, Sergei V. Pletnev, Jeroen Corver, Edith Lenches, Christopher T. Jones, Suchetana Mukhopadhyay, Paul R. Chipman, Ellen G. Strauss, Timothy S. Baker and James H. Strauss, *Cell*, 2002, Vol. 108, 717–725

## **Progress report on “Analysis of Dengue Viral Membrane”**

Prepared by Mr. Pongsit Tangcananurak SCPC/M, ID. 5037242

### Objective

To define the lipids component of the dengue virus, especially their class and fatty acid contents.

### Introduction

Dengue Hemorrhagic fever, a disease caused by dengue virus, has been a serious public health problem in many tropical countries. The fact that there are four different serotypes and infection is sequential has made disease control a difficult task. Therefore, obtaining complete physical and biological information seems to be the only way to gain insight into its nature and treatment.

In virus replication cycle, fusion process is defined as an important state. Not only is it the first moment before virus enters the cell but also a distinct mechanism takes place. To penetrate into the cell, it is necessary for the viral structure to change and the part responsible for this is the virus envelope, formed with proteins and lipid molecules. Fusion mechanism was proposed and this is related to the conformational change of enveloped protein. However, function and composition of supported lipid are still debated and the way that it may exhibit distinct feature have attracted our research group to study. Cause from it feasible application in lipid analysis, high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry technique (LC-MS) has been chosen to use and this is resulted from its high specific and sensitivity yielding completed profile of this kind of molecule. The study procedure will be divided into three steps including of virus purification, lipid extraction and LC-MS analysis.

### Material

Dengue virus type 2 samples were obtained from our partner, department of microbiology. All chemicals used were purchased from Sigma-Aldrich, Merck chemical and Electron Microscope Science. Lipids standard were supplied from Avanti polar lipids.

### Instruments and equipments

Ultracentrifugation (Beckman Coulter), Centex Shrimp, Mahidol University  
High Performance Liquid Chromatography (1100 series, Agilent technologies),  
Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University.  
Time of Flight Mass Spectrometer (microTOF, Bruker daltonic), Department of  
Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University.  
Zorbax RX-SIL column (4.6× 150 mm) including of guard column (Agilent  
technologies)  
Transmission Electron microscope, Ramathibodi Hospital

### Methods

#### *Virus Purification*

Obtained virus sample were clarified by centrifugation at 5000 RPM, 4 °C for 10 min in order to vanish remaining cell debris, then the virus particles were pelleted (350,000×g, 4 °C for 2 hr) and loaded onto hand-layering CsCl gradient (15-40% w/w CsCl in 0.05% DEPC water, 1.5 ml for each layer). Isopycnic centrifugation was performed at 200,000×g, 4 °C for 20 hr. The obtained virus bands were collected and performed buffer exchange (PBS buffer, pH 7.4). The virus was stored at -80 °C and some fractions were used to examine with electron microscope.

#### *Transmission Electron Microscope*

This step was done to verify the purity and existing of virus particle. 5 µL of virus samples (sonication or freeze and thaw have been tried in order to reduce aggregation of viral particle) were loaded onto formvar coated copper grids (300 meshes) and were incubated for 10-40 min. The excess sample liquid (also include of unabsorbed virus) was wicked away with filter paper and negative stained for 1 min. using 2% PTA (phosphotungstic acid) in TN buffer (pH 7.4, also in 0.1% DEPC water has been tried) or 0.5 % uranyl acetate (in 0.1% DEPC water). The staining reagent was wicked away with filter paper and the sample grids were allowed to dry.

#### *Lipid Extraction*

Standard phospholipids (~1 mg/ml for each species) dissolved in 1:1 chloroform/methanol were added directly to purified virus sample for quantitative analysis and the obtained mixture was extracted as following. Virus solution (186 µL) was extracted with 1:1 (0.1N) HCl/methanol (800 µL) by vortex for 2 min. After that equal amount of chloroform (800 µL) was added and allowed to phase separation. Organic layer was collected and dried in rotary evaporator. The obtained dry lipids were redissolved in mixture of 1:1 mobile phase A/mobile phase B and stored at -20 °C prior to analysis by LC-MS.

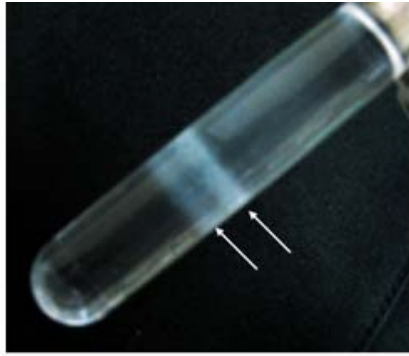
#### *LC-MS Analysis*

Following the condition from the previous study of phospholipids using LC-MS (Fei Gao et al, ref.1) gradient separation was performed using mobile phase A (hexane:isopropanol, 3:2 v/v) and B (hexane:isopropanol: 5mM ammonium formate solution, 56.7:37.8:5.5 v/v/v). HPLC was coupled with TOF mass spectrometer via ESI ion source with flow rate 1 ml/min. The lipid sample was analyzed in negative ion mode; lipid identification was obtained from isotropic pattern analysis with bruker data analysis software package. The amount of sample lipid was defined by comparison with standard lipid signals.

### Results and Discussion

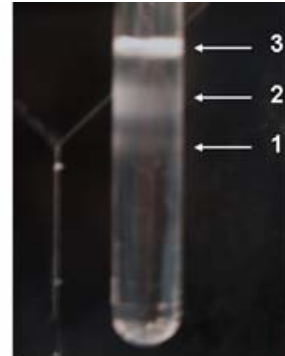
#### *Virus purification*

Gradient purification of virus sample reveals two separated bands (figure 1); however they are close together which require additional purification.



**1<sup>st</sup> round of CsCl gradient purification**

Experiment date 28-29 March 2008



**2<sup>nd</sup> round of CsCl gradient purification**

31 March 2008

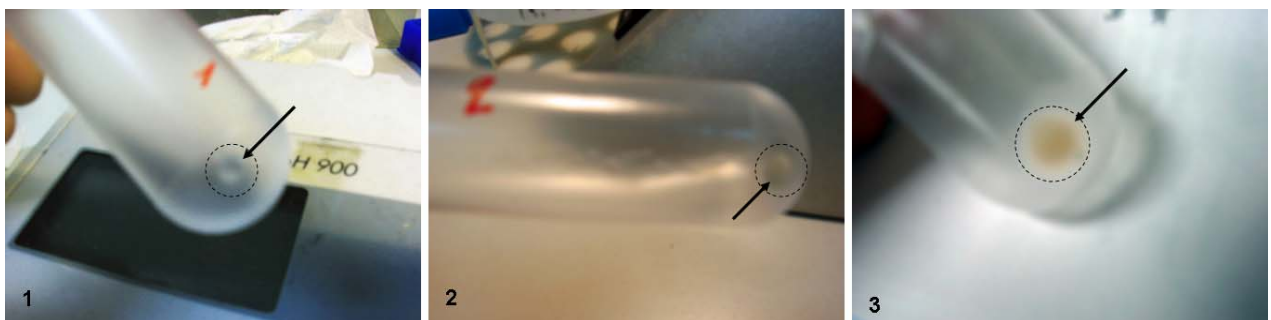
**Figure 1;** Isopycnic centrifugation for virus purification

These two bands correspond to 29% and 33% w/w of CsCl concentration, respectively from above. Second round gradient purification has been tried by loading the previous obtained bands onto the pre-prepared CsCl solution layer (35% and 40%, 3 ml for each layer) and adjusts the above volume with 30% CsCl solution. For this additional step (200,000×g, 4°C, for 6 hr) we obtained the separate 3 band (correspond to CsCl concentration at 35% for band no.1, 32.5% for band no.2, and 30.5% for band no.1) which can be collected separately using sharp tip syringe, although the below two bands are particularly broad (band no.2) and difficult to visualize.

**Table 1.** Show the results obtained from 2<sup>nd</sup> round of CsCl gradient purification.

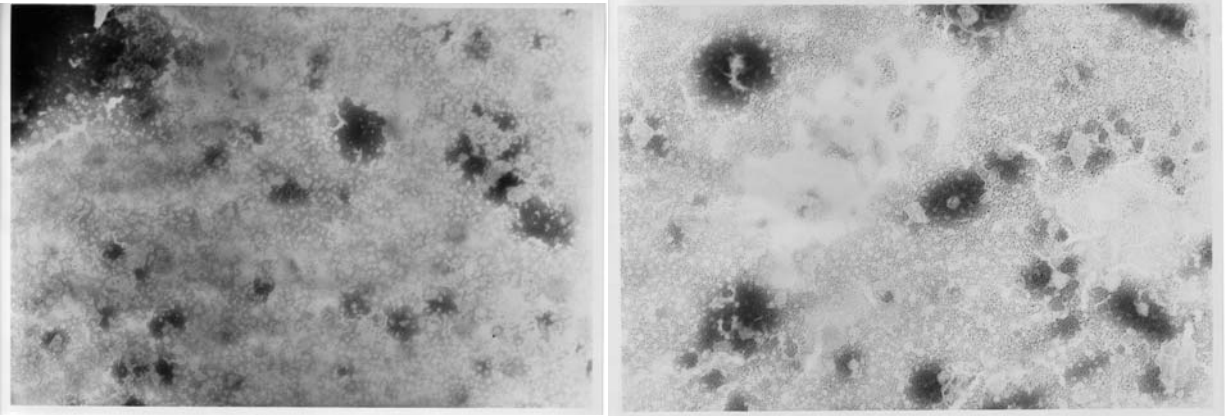
Band no.	Correspond to CsCl concentration(w/w) at	estimate density (g/ml)	Average volume (ml)	note
1	35.0 %	1.35	0.7	-
2	32.5 %	1.32	1.1	-
3	30.5 %	1.29	0.9	Particles aggregation

Note: estimated density of separated band were defined by correlation the obtained result with the previous report of Bruner and Vinograd (ref.2) showing refractive index, concentration of CsCl and density(g/ml, computed from refractive index) at 25°C.



**Figure 2;** Expected virus pellet obtained from all three purified band (no.1 highest density – no.3 lowest density), *experiment date 1\_April\_2008*

All three bands were examined with electron microscope. However, both lower two bands (low dense band, no.1 and no.2) show nothing when examined by electron microscope. The only one (band no. 3), expected virus band, was also characterized although EM images were still unacceptable, figure 3, resulting from aggregation of unspecified particles and this problem has still been solving (dilution, sonication, negative staining with uranyl acetate will be tried).

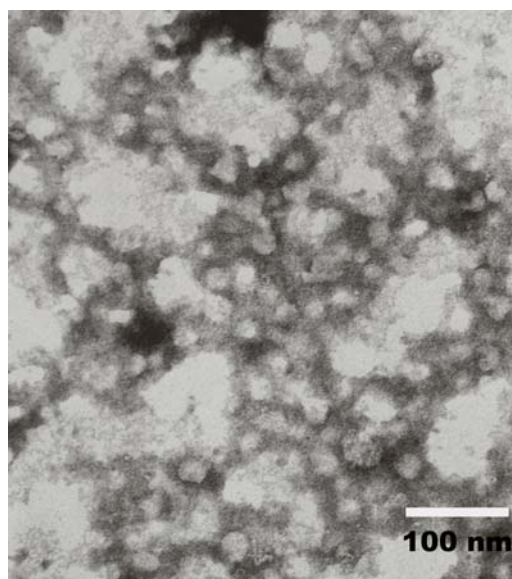


Dilute 10 time with PBS buffer (1:10), magnificent 60,000x Dilute 10 time with PBS buffer (1:10), magnificent 60,000x  
*Obtained EM results date 20 may*

2008

**Figure 3:** The virus sample were diluted with PBS buffer (1X, pH 7.4 ) at 1:10 dilution and loaded onto 300 mesh formvar coated copper grid and stain with 2 % PTA (in TN buffer, pH 7.4, adjust pH with KOH)

Negative staining with 0.5% uranyl acetate (in 0.1% DEPC water) has been tried and the result is showed below, figure 4, which is the first time which we can see the expected virus particles. This results confirmed the present of the our virus particles and allow us to perform the next step, lipid extraction.



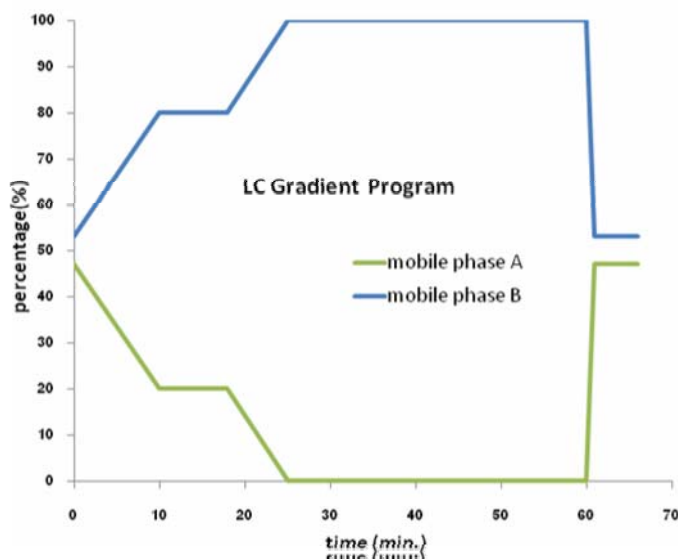
(8 mm on photograph = 100 nm)

**Figure 4.** EM image shows expected virus particle at 80,000 x magnificent (40,000 x in EM instrument and x2 after transfer from film to photograph , total 40k x 2 = 80,000 x magnificent, 14 July 2008)

### LC-MS Analysis

Differences from the previous study (ref.1), time of flight mass spectrometer have been used instead resulting from high accurate m/z detection and availability in our department. Electrospray ionization source (ESI) was implemented in our study, cause from its soft ionization nature and addition of high accurate m/z detection of TOF mass analyzer make it suitable for lipid identification (molecular weight and isotropic pattern)

The gradient was set as following diagram.



Some important mass spectrometer parameter

Total run time 66 min, data acquisition time 66 min + delay acquisition time 0 min (no delay)

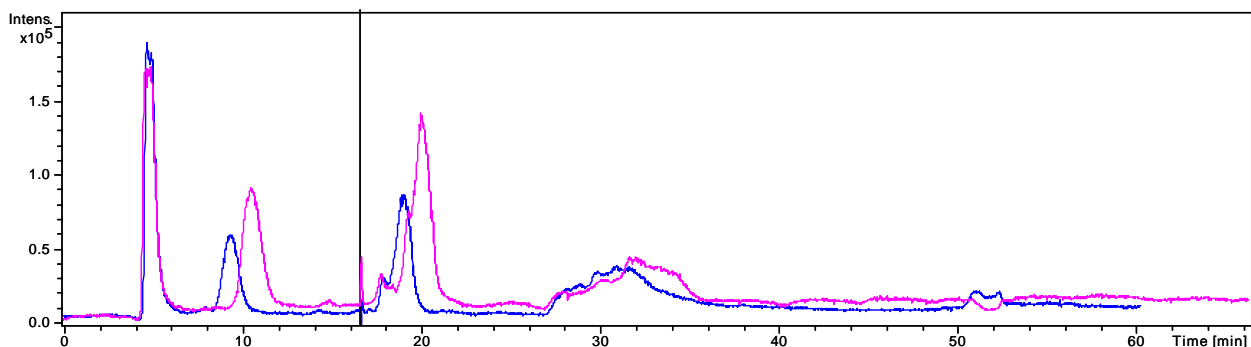
All MS parameter were set for negative ion mode analysis

MS intensity threshold: 5000 (minimal intensity which will be recorded)

Acquisition mass range: 50-1000 m/z

Flow rate and column temperature are set to be 0.4 ml/min and 30 °C respectively, using this condition all lipid sample will be eluted from the column (with guard column) within 55 minute which there will be 15 minutes for column to be equilibrated prior for the next run. Injection of sample 4 microliter and wash three time with mobile phase A (hexane/isoprpanol,3:1) reveals the sufficient amount for our analysis, although some lipid species exhibits low signal response. After performing 2 successive experiments the ion chromatogram results show a few shifting in retention time, in which there is slower in sample elution time for the 2<sup>nd</sup> round of analysis as show in figure 5-a.

**Figure 5;** a. Total ion chromatograms show variation in retention time of 2 successive analyses, when blue and pink line represent 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> injection respectively



b. Base peak chromatogram, m/z range was set to 500-1000, when green and blue line represent 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> injection respectively

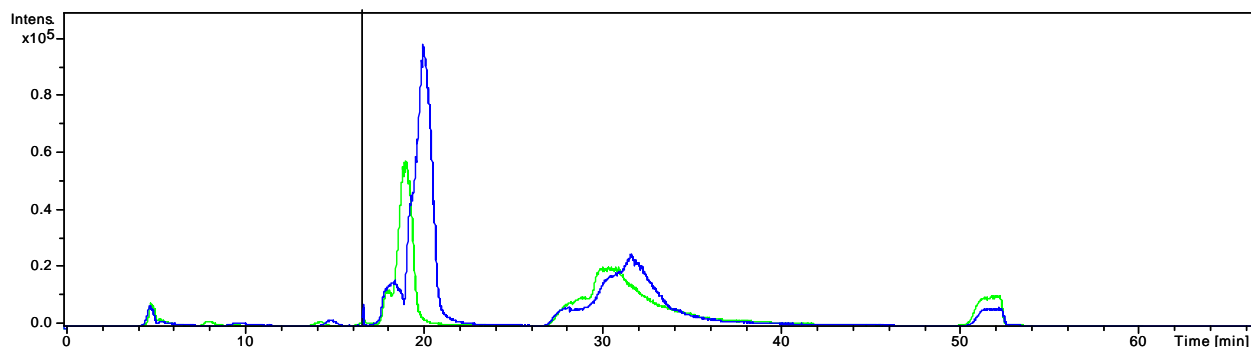


Table 2: Amount of lipid used to test LC-MS condition, see figure 5

Lipid Class	Species and M.W. (exact mass)	concentration (mg/ml)
PE	DMPE <sup>std</sup> 635.453	0.412
PG	DMPG <sup>std</sup> 665.439	0.472
PS	DMPS <sup>std</sup> 678.435	0.444
PC	DMPC <sup>std</sup> 677.500	0.416

*Note:* std: standard lipid (internal standard for quantitative analysis)

(PE)Phosphatidylethanolamine; (DMPE)1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine

(PG)Phosphatidylglycerol; 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]

(PS)Phosphatidylserine; (DMPS) 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]

(PC)Phosphatidylcholine; (DMPC) 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine

Extracted viral lipid sample was investigated by comparing with standard phospholipids prepared following extraction protocol in which the viral sample was replaced by PBS buffer.

Results obtained from both of standard and extracted viral lipid reveal no difference in total ion chromatograms profile. Average whole mass spectrum was performed (Bruker analysis tool) to investigate the presence of viral lipids, however, there still show no obvious difference between both fractions and this may result from the quality and amount of purified virus particles in purification step.

Figure 6. Total ion chromatogram; blue line for standard phospholipids; red line for expected viral lipid.

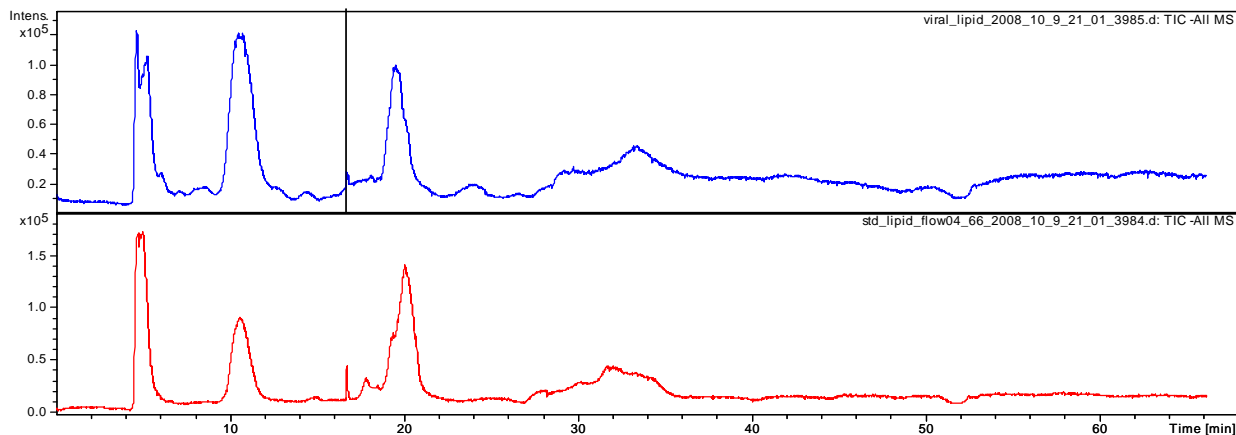
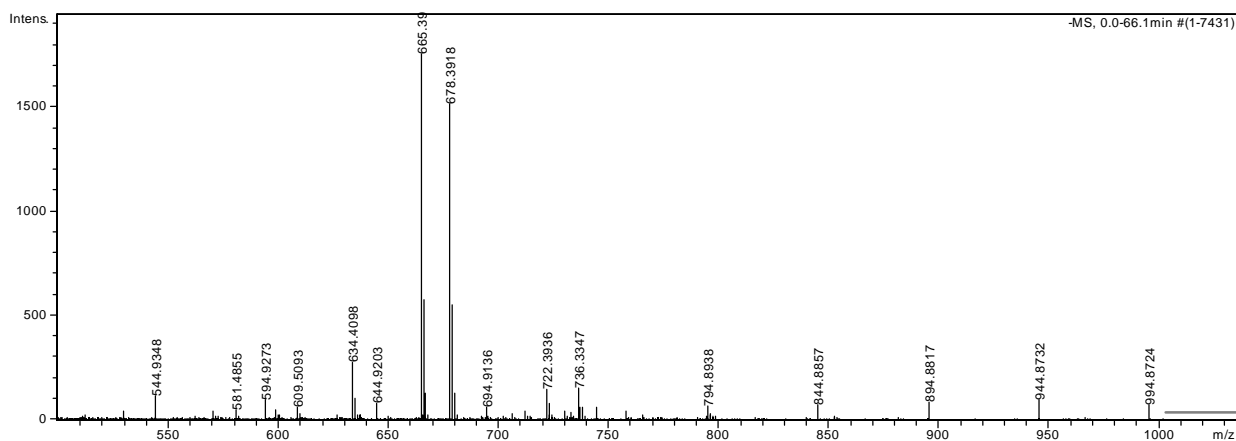
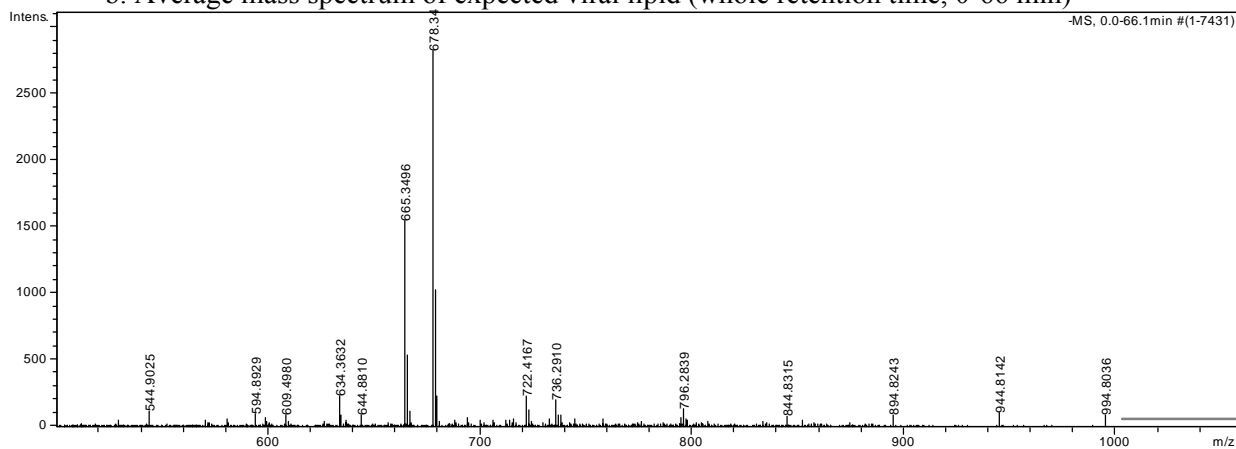


Figure 7. a. Average mass spectrum of standard phospholipids (whole retention time, 0-66 min, m/z 500-1000)



b. Average mass spectrum of expected viral lipid (whole retention time, 0-66 min)



## Reference

1. Fei Gao et al, *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jul;1761(7):667-676
2. Bruner, R., Vinograd, J. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 108, 18-29

#### เอกสารแนบที่ 4

# **M**icro Raman Enhanced by Chemically Modified Platform

## For *Salmonella Typhi* identification

Prepared by Mr.Pongsit Tangcananurak

---

### **Objectives:**

1. To construct functionalized glass surface for specific capturing of *Salmonella Typhi*
2. To implement micro-Raman spectroscopy as a sensing element for bacteria identification

### **Introduction**

Thanks to advance technology in imaging and spectroscopy, today Raman spectroscopy have been concerned to be one of ideal techniques that serve as an biological tool to investigate into life. Although non invasive and rapid detection was its exceptional aspect however, capability to measure in micro scale is more attractive. This provided a new way of investigation, from ensemble property to the single system, Single cell analysis.

One of successful development of such technique in single cell research was bacteria identification. By collected characteristic fingerprint of each bacteria cell under investigation, bacteria identification can be performed within a few hours. It sound simple however, to reach some level of meaningful results, there require the efficient statistical tool and independent repeated experiment may affected by existence of other species. Concerning such difficulty, in this work, specifically bacteria capturing surface was developed, especially for *Salmonella Typhi*. Simple and low cost, glass slide was selected as substrate with will be further to be chemically modified with biomolecule through antibody-antigen concept. Couple this with micro Raman detection, reliable and rapid identification will be met.

### **Work Flow:**

1. Glass surface functionalization and characterization
2. Specificity Bacteria-surface binding investigation
3. Micro-Raman investigation of *Salmonella Typhi* captured by the chemically modified glass surface.

### **Material & Chemical**

#### Instrument

Olympus BX51 microscope, Center of Excellence for Shrimp molecular biology and biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Confocal laser scanning microscope, Olympus FV-1000 , Center of Nanoimaging, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Laser Micro Raman Apparatus, HORIBA T64000, Condensed Matter Physics Laboratory, University of Maine, Le Mans, France

All chemicals were supplied from Sigma-Aldrich including of

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC), 3-

Aminopropyltriethoxysilane, Hydroxylamine hydrochloride, N-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS), Bovine Serum Albumin (BSA, MW ~66,430 kD)

Rabbit polyclonal antibodies against *Salmonella-O* (somatic) and *H* (flagella) were purchased from S & A reagents lab, Bangkok, Thailand

## **1. Glass surface functionalization and characterization**

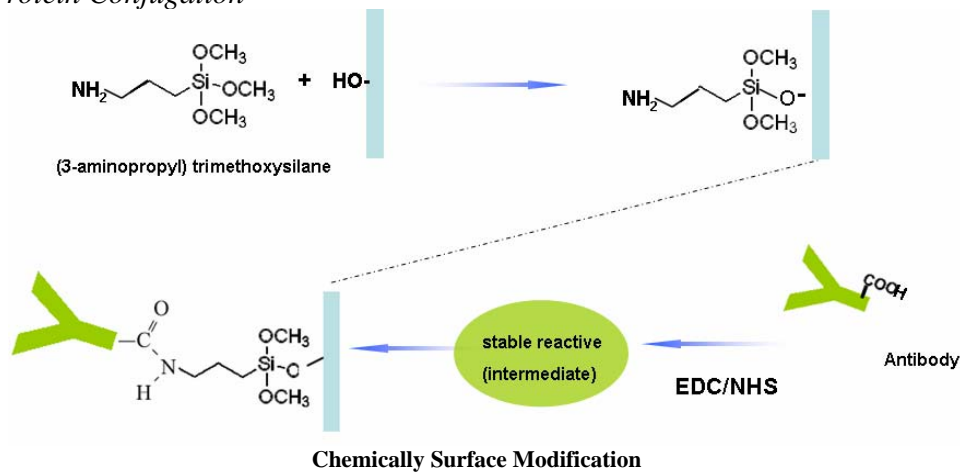
### *Slide Cleaning*

The slides were cleaned by immerse overnight in detergent solution, followed by rinsing several times with tap water. 37% HCl: methanol (1:1) solution was used to eliminate organic residues, by immerse the pre-clean slides in this solution for 1 hr and rinse several times with DI water, ethanol (sonication 15 min) and allowed to air dry.

### *Silanization*

200 microliter of aminosilane was used to silanize glass slides by performing chemical vapor deposition for 2 hr in an evacuated vessel. After that the slides were washed several times with water, ethanol, sonicate in ethanol and allowed to air dry.

### Covalently Protein Conjugation



Silanized glass slides were immobilized with protein by following the instruction from PIERCE protein conjugation protocol in which the amount of reagents used were properly (see table 1) adjusted for desired protein concentration. Briefly, concentrated solution of EDAC (in MES buffer, pH 6.0) was added to protein solution to yield the final concentration having EDAC 10-20 times more than protein concentration. Concentrated sulfo-NHS solution was introduced resulting in 2 times more than EDAC in the final concentration, mix well and left for reaction for 15 min. After that, rises the pH of reaction solution above 7 by adding basic buffer (conc PBS, pH 7.4 or carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.04). This resulted solution was loaded onto the clean-dried silanized glass and left for reaction to complete for 4 hr. Rinse several times with PBS buffer (pH 7.4) and keep in PBS (containing 15 mM sodium azide), pH 7.4 at 4 C prior to any analysis.

### Surface Characterization

Existence of protein molecules on the modified glass surface was examined by confocal scanning fluorescence microscope. Because from natural lack of fluorescence emission, protein molecules functionalized on the platform were visualized with fluorescence dye molecules and this was fulfilled with reactivity against free amine group of FITC-isothiocyanate molecule that is a dye of choice for reveal the immobilized protein. Some may argue that these molecules should also bind to amine groups on the silanized glass; however this possibility will be tested. According to dye-protein conjugation protocol of Sigma-Aldrich, FITC-isothiocyanate solution (about 0.2 mg/ml, in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.04) was loaded directly onto the functionalized surface and left for reaction to precede 2 hr. Several rinses with PBS buffer (pH 7.42) must be employed in order to remove the excess dye on the functionalized surface before examination with confocal scanning fluorescence microscope.

## 2. Bacteria-Surface Binding Investigation

### Platform

Before bacteria binding test, the platform was blocked with 2 % blocking buffer (2% BSA in PBS, pH 7.4) for 1 hr 30 min in order to minimize unspecific binding, followed by rinsing several times with PBS buffer. The air dry platform was used immediately or keeps at 4°C for further use.

### *Bacteria Culture*

Log phase *Salmonella Typhi* bacteria were used in this study. Briefly, The bacteria were grown on Muller Hinton solid media (containing 2% agar) and after 72 hr of incubation at 37 C, one colony of was picked and transfer to Muller Hinton broth, liquid media. The bacteria were allowed to grow further in this broth and 18 hr before use (bacteria binding), 2% of these bacteria were prepared in the same media in order to obtain the bacteria in log phase grown.

### *Bacteria Binding and Staining*

Before any bacteria binding experiment, the bacteria sample was washed and re-suspended in PBS buffer, pH 7.4. Sample was loaded (2 µL, 10<sup>8</sup> CFU/ml) directly onto the functionalized platform and allowed to binding for 10 min. The platform was washed by firstly draining the residue of bacteria solution on the surface and rinsed three times with PBS buffer. Before bacteria examination with light microscope (100x objective lens), the captured bacteria were rapidly fixed and performed negative staining for bacteria's type (gram negative) confirmation.

### Technical Note

#### Negative Staining for Bacteria Type Identification

1. The bacteria bound slides were fixed by passing rapidly through the hot flame.
2. Crystal violet solution was dropped onto the specimen and left for 1 min before drain off.
3. Adding logal's iodine solution, left for 1 min and drain off.
4. Decolorization with 95% ethanol for 15 min and rinse thoroughly with tap water.
5. Staining with safrarin-O for 30 min, rinse with tap water and allow to dryness before examination with microscope.

### 3. Micro-Raman investigation of *Salmonella Typhi* captured by the chemically modified glass surface

Captured bacteria on functionalized surface were investigated by mean of confocal Raman spectroscopy technique. Micro investigation at an interested sample spots were succeeded with 100x/0.80 objective lens (*Olympus-LMPlanFI*), of microscope equipped with automated x-y stage. According to this setup, laser diameter as low as 5  $\mu\text{m}$  can be obtained which is sufficient enough for single cell analysis. 514.13 nm Ar/Kr laser (*Innova 70C, Coherent*), 30 mW, was used as excitation source in which the scattering light was managed through 600 line/mm grating, hole 200  $\mu\text{m}$ , and 100  $\mu\text{m}$  slit before detection with liquid N<sub>2</sub> cooled CCD detector, -135 K (*Symphony, HORIBA*). 150 seconds exposure time with 3 accumulations was implemented in single Raman spectra measurement while for Raman mapping experiment, at an array size of 13x22 (XxY, increment 0.2  $\mu\text{m}$  along X axis and 0.14  $\mu\text{m}$  along y axis), exposure time of 90 s with 2 accumulations was used instead, resulting in total run time about 15 hrs.

#### Previous Results and Discussion

##### Glass surface functionalization and characterization

Bovine serum albumin (BSA) and antibody against *Salmonella Typhi*'s somatic domain were selected as a model protein to test our chemistry. Both pre-purified protein solutions in MES buffer (pH 6.0) 100  $\mu\text{L}$  was used and follow chemistry as previously described.

Table 1. Show the amount of various chemical used to validate our conjugation chemistry

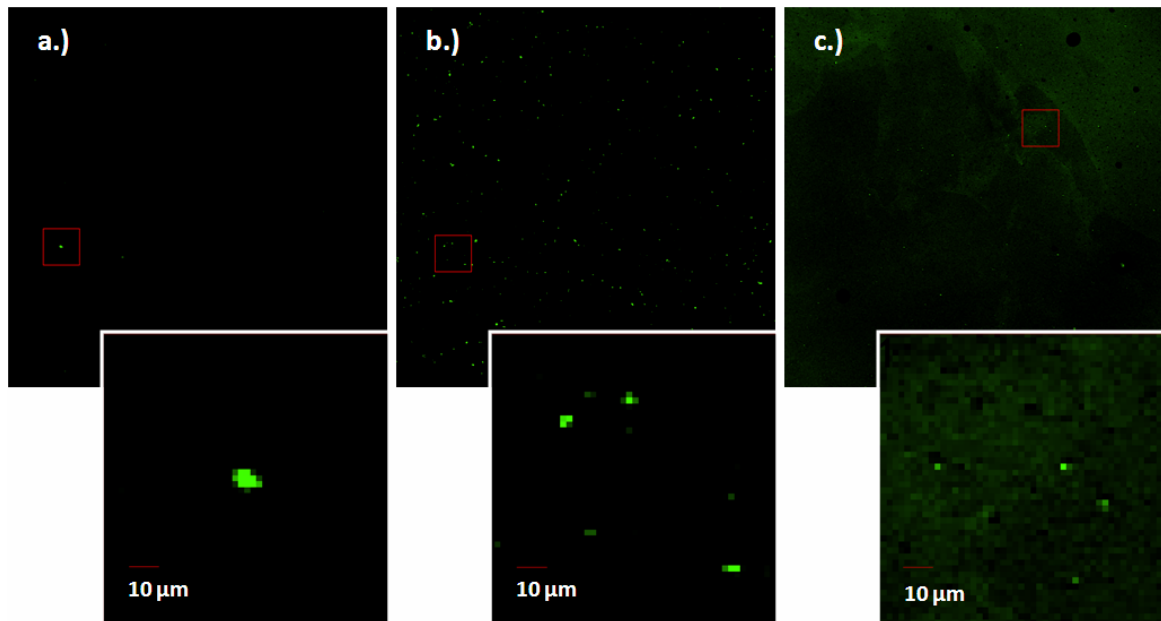
Amount of Protein	EDC	Sulfo-NHS	Base	Reaction time
BSA (3.59 mg/ml) in MES, 100 $\mu\text{L}$				
Anti-O (3.67mg/ml) in MES, 100 $\mu\text{L}$	(76.2 mM in MES) 1.06 $\mu\text{L}$ *	(92.6 M in MES) 1.75 $\mu\text{L}$ **	carbonate- bicarbonate buffer, pH 9.04, 200 $\mu\text{L}$	2 hr
Silanized glass (control)				

\* using this amount will result in 15 times more than protein concentration in Molar unit. \*\* resulting in 2 times more than EDAC final concentration. Concentration and amount of reagents used in the reaction was optimized with respect to the BSA concentration (MW 64 kD), which is also the highest protein concentration solution in this experiment, 3.59 mg/ml.

By examination with 10X objective lens, as predicted, the results revealed the present of protein chemically linked to the surface by appearing as the green location in the image, b.) BSA coated glass and c.) Anti-H coated glass. Contrasted to the specimens a. (only silanized glass, no protein coating step) revealing minimal fluorescence signal, these successfully confirmed our covalently conjugation chemistry implemented in our study. However, according to the magnified areas of each specimen, existence of large fluorescence spots can be seen and these may resulted from cluster of biomolecules, protein agglomeration, especially for BSA coated glass. The dirty green around magnified area of image c) could not be identified exactly, cause from various components in antiserum solution purchased, although desalted cleaning was performed. Homogeneity of protein coverage was another factor to be concerned; although our

previous results revealed heterogeneous coverage, this problem will be solved in the future, for example, by improving our silanization method, reducing coating area, or adjusting concentration of all chemical reagents used.

Figure 1. Fluorescence image of a.) silanized slide (non protein treating), b.) BSA coated glass and c) anti-O coated glass. Some minimal fluorescence signal showing in image a) may results from some complete conjugation reaction between FITC-dye molecules and bare free-amine group or remaining dirty organic compound on glass surface.



#### Bacteria-Surface Binding Investigation

Four different kinds of platform were investigated including of silanized, BSA coated, polyclonal antibody against flagella (anti-H), and against somatic domain (anti-O). Although in microscope, all exhibited in increasing number of capture bacteria when the concentration is higher, this depended on the area that we interested and cannot be comparable between them. There are many factors to affect this appearance, such as a large area of specimen contributing to degree of heterogeneity of the surface, efficiency to block unspecific binding of BSA or kinetic aspect of bacteria biding. So, specificity still be not met, like as show below (figure 2.), comparison between silanized glass, BSA coated glass and anti-O coated glass. Optimization of this step will be study further including of bacteria biding incubation time, cross reactivity against other bacteria species, temperature during such binding, buffer used or changing to implement monoclonal antibody in our study.

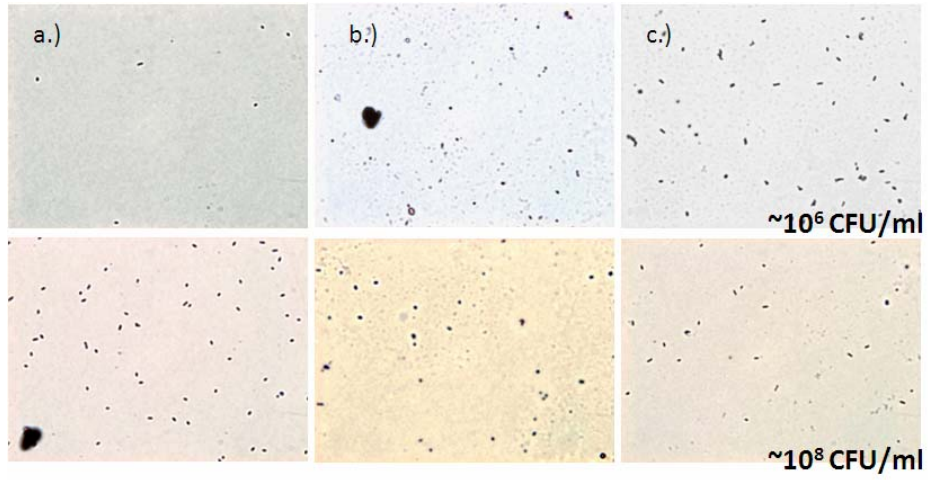


Figure 2. Image of captured bacteria under 100x light microscope, a) anti-O coated glass, b) BSA coated glass and c) silanized glass, CFU stand for colony forming unit reflecting the amount of bacteria cells in the solution.

Micro-Raman investigation of Salmonella Typhi captured by the chemically modified glass surface

Feasibility to implement Micro Raman spectroscopy for bacteria identification was studied. Red line excitation has been tried and what we got is only large fluorescence interference, result not shown. Green line has been used instead according its less fluorescence. Instrument set up as described before was optimized for single bacteria measurement. Although in this experiment, information of immobilized protein (antibody) could not be detected or for resolved spectrum of single bacteria having not been met, vibration of C-CH<sub>3</sub> around 2850 – 3000 cm<sup>-1</sup> arising from bacteria can be seen, reflecting hydrocarbon component in this organism. As shown below, figure 3 and figure 4, comparing obtained spectrum between clean area (no bacteria) and single bacteria cell, characteristic peak of this bacteria around 2900 cm<sup>-1</sup> dominated.

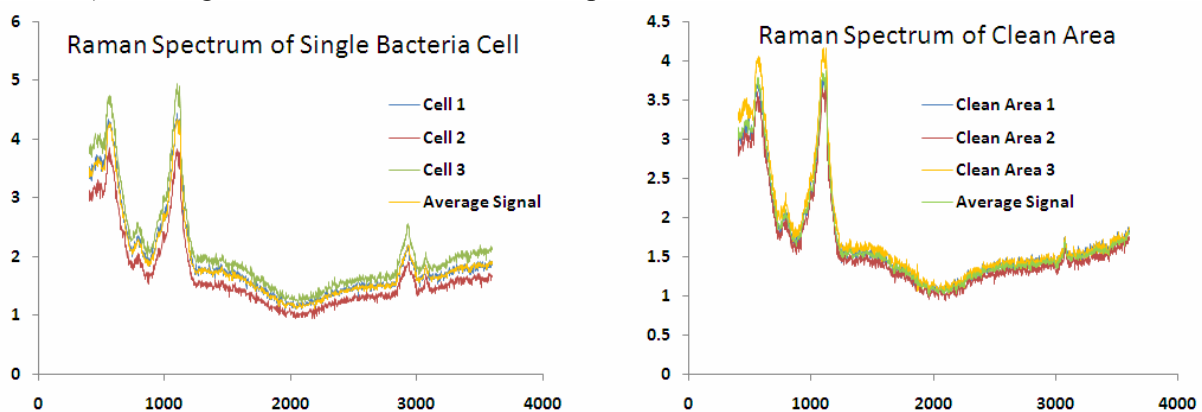
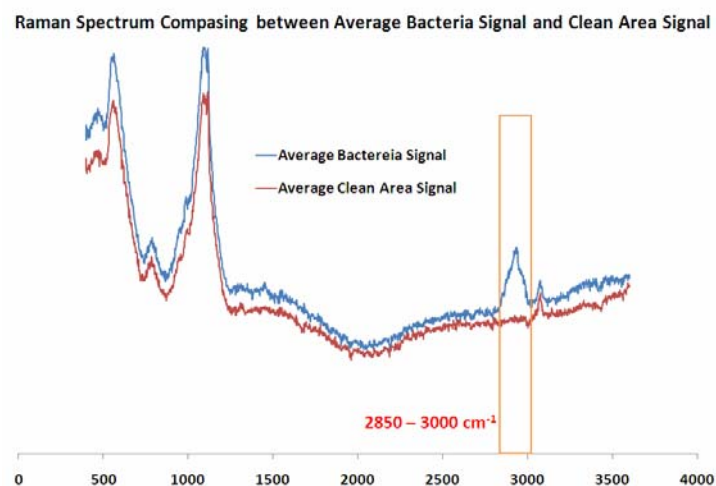


Figure 3. a) Raman spectrum obtained from single bacteria measurement, three different cells were selected randomly from those on the same anti-H coated platform. b) Raman Spectrum of clean area without any bacteria cells.

Figure 4. Show average Raman spectrum for clean area spot and single bacteria, dominated signal around 2900 cm<sup>-1</sup> was assigned to be bacteria's characteristic.



This signal is only trace that represents the bacteria characteristic and according from this result, Raman mapping was possible to be done, by collected the signal between 2850 – 3000 cm<sup>-1</sup> in an array size of 13x22 covering all single cell area. As predicted, the obtained results

showed the image that correspond to single bacteria, figure 5, 2  $\mu\text{m}$  in length of this cell image agree well with actual size of this organism.

Figure 5. Shown Raman mapping result, the red rectangular represent the area under investigation covering 7.6  $\mu\text{m}^2$

