

เพปไทด์ของปูทะเล *Scylla paramamosain* จากรีคอมบิแนนท์เซลล์และฤทธิ์ต้านจุลชีพ

นางสาวปวันรัตน์ อ่ำไพพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหารภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

MUD CRAB *Scylla paramamosain* PEPTIDE FROM RECOMBINANT CELL AND ITS
ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Miss Pawanrat Amphaiphan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

เพปไทด์ของปูทะเล *Scylla paramamosain* จาก

รีคอมบิแนนท์เซลล์และฤทธิ์ต้านจุลชีพ

โดย

นางสาวปวันรัตน์ อัมไพพันธ์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทรประภา อิมจงใจรัก

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ทารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รชนี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทรประภา อิมจงใจรัก)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเจียร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. ปิติ อัมไพพันธ์)

ปวันรัตน์ อัมไพพันธุ์ : เปปไทด์ของปูทะเล *Scylla paramamosain* จากรีคอมบิแนนท์ เซลล์และฤทธิ์ต้านจุลชีพ (MUD CRAB *Scylla paramamosain* PEPTIDE FROM RECOMBINANT CELL AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY) อ. ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. จันทรประภา อิมจงใจรัก. 69 หน้า.

เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต ในธรรมชาติ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพ bactenecin-likeSp (bacSp) ในเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล *Scylla paramamosain* ซึ่งพบว่ามียุทธิต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ สมบัติทางชีวภาพ และฤทธิ์ การต้านจุลินทรีย์ของรีคอมบิแนนท์ bacSp โดยผลที่ได้พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่มีการแสดงออก ของรีคอมบิแนนท์ bacSp ภายหลังการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 1 mM IPTG คือ 18 ชั่วโมง โดยอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion body) เมื่อทำการ ละลายรีคอมบิแนนท์ bacSp ด้วยยูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์ จากนั้นผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni^{2+} -NTA โครมาโตกราฟี และนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ผ่านการ แยกบริสุทธิ์ให้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว มีขนาดประมาณ 5,000 ดาลตัน เมื่อนำรีคอม บิแนนท์ bacSp ที่ได้ และเปปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp มาตรวจสอบคุณสมบัติการยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์ พบว่ารีคอมบิแนนท์ และเปปไทด์สังเคราะห์ของ bacSp มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ ของ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ และพบว่าเปปไทด์มีเสถียรภาพในการทนความร้อนได้ที่ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และที่ pH 6.5-9

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2556.....

5372495523 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : ANTIMICROBIAL PEPTIDE / MUD CRAB / *Scylla paramamosain*

PAWANRAT AMPHAIPHAN: MUD CRAB *Scylla paramamosain* PEPTIDE FROM RECOMBINANT CELL AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY. ADVISOR : ASSIST. PROF. CHANPRAPA IMJONGJIRAK, Ph.D., 69 pp.

Antimicrobial peptides (AMPs) are small molecules of the important component of the natural defense system against microbial invasion. AMPs show broad spectrum antimicrobial activities against bacteria, fungi and virus. They are attractive candidates for food preservatives from natural sources. In previous study, the bactenecin-like *Sp* (*bacSp*) antimicrobial peptide was report from the hemocyte of mud crab, *Scylla paramamosain*. The *bacSp* showed strong antimicrobial activities against microorganisms. The objective of this study is to express and purify the recombinant *bacSp* and to investigate the biological activity and its antimicrobial activity of recombinant *bacSp*. As a result, a high level of recombinant *bacSp* expression after induction with 1 mM IPTG was 18 hour. It was found that the recombinant *bacSp* formed inclusion bodies. The insoluble protein was then solubilized with 8 M urea and purified using Ni²⁺-NTA affinity chromatography. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant *bacSp* revealed a single protein band, had a molecular weight approximate 5,000 Da. The purified recombinant *bacSp* and synthetic peptide showed antimicrobial activity against *Vibrio parahaemolyticus*. The antimicrobial peptide *bacSp* exhibited heat stability up to 121 °C for 15 minutes and activity at pH range from 6.5 to 9.

Department : Food Technology Student's Signature

Field of Study : Food Technology Advisor's Signature

Academic Year : 2013

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทรประภา อิมจงใจรัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเสนอแนวคิด วิธีเริ่มของงานวิจัยนี้และได้สละเวลาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ แก้ไข ข้อบกพร่องในทุกขั้นตอนของการทำวิจัย รวมถึงตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียรและ ดร. ปิติ อ่ำพ่ายพิ ที่กรุณาสละเวลามาร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่อง และ ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบุคลากรและเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำงาน วิจัยรวมถึงเพื่อนปริญญาโท และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกคน ที่เป็นกำลังใจและ คอยให้คำแนะนำด้วยดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาผู้เป็นกำลังใจสำคัญ เป็นแรงผลักดันและ คอยอยู่เคียงข้างลูกตลอดมา รวมทั้งให้การส่งเสริมสนับสนุนการศึกษาแก่ผู้วิจัยอย่างดียิ่งจน ประสบผลสำเร็จในการศึกษา ซึ่งผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ หรือเกี่ยวข้องทั่วไป และหากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 เพปไทด์ต้านจุลชีพ.....	3
2.2 โครงสร้างทุติยภูมิของเพปไทด์ต้านจุลชีพ.....	3
2.3 กลไกในการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลชีพ.....	4
2.4 แหล่งที่มาของเพปไทด์ต้านจุลชีพ.....	8
2.4.1 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากแมลง.....	8
2.4.2 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากสัตว์.....	9
2.4.3 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากพืช.....	9
2.4.4 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากแบคทีเรีย.....	10
2.5 เพปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์ทะเลกลุ่ม crustacean.....	11
2.6 ยีนเพปไทด์ต้านจุลชีพ bactenecin.....	13
2.7 เชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	13
2.8 การนำเพปไทด์ต้านจุลชีพมาใช้ในอาหาร.....	14

	หน้า
2.9 ระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	14
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	18
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	18
3.2 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	20
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	21
3.3.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	21
3.3.2 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส.....	22
3.3.3 การสกัดแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	23
3.3.4 การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	23
3.3.5 การหาปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	24
3.3.5.1 การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน.....	24
3.3.5.2 การหาปริมาณรีคอมบิแนนท์ bacSp.....	24
3.3.6 การสร้างเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp.....	24
3.3.7 การตรวจสอบสมบัติทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp และเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp.....	25
3.3.7.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์.....	25
3.3.7.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	25
3.3.7.3 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์.....	26
3.3.8 ผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติการต้านจุลชีพ.....	26
3.3.9 ผลของ pH ต่อคุณสมบัติการต้านจุลชีพ.....	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	28
4.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp.....	28
4.2 การสกัดแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp.....	31
4.3 การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp.....	32

4.4 การตรวจสอบสมบัติทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp และเพปไทด์สังเคราะห์ bacSp.....	35
4.5 ผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติการต้านจุลชีพ.....	36
4.6 ผลของ pH ต่อคุณสมบัติการต้านจุลชีพ.....	37
บทที่ 5 วิจัยณ์ผลการทดลอง.....	39
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	44
รายการอ้างอิง.....	45
ภาคผนวก.....	57
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	58
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	60
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	66
ภาคผนวก ง กราฟโปรตีนมาตรฐานเพื่อหาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Bradford.....	67
ภาคผนวก จ Restriction Map of pET28(b).....	68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	69

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ของรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	36
4.2	ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ของเพปไทด์สังเคราะห์ bacSp ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	37
4.3	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ของรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ pH ต่างๆ.....	38
4.4	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ของเพปไทด์สังเคราะห์ bacSp ที่ pH ต่างๆ.....	38

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	กลไกการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลชีพในลักษณะ ของแบบจำลองบาร์เรล-สเตฟวี.....	5
2.2	กลไกการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลชีพในลักษณะ ของแบบจำลองคาร์เปท.....	6
2.3	กลไกการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลชีพในลักษณะ ของแบบจำลองโทรอยดัล.....	7
4.1	การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b-bacSp.....	29
4.2	การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp เมื่อวิเคราะห์โปรตีน ในเซลล์รีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG บน 20% SDS-PAGE.....	30
4.3	แถบโปรตีนใน cell lysate ของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG บน 20% SDS-PAGE.....	31
4.4	รีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ด้วย 20% SDS-PAGE.....	33
4.5	รีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp ที่แยกบริสุทธิ์ด้วย Ni ²⁺ -NTA affinity column chromatography และวิเคราะห์ด้วย 20% SDS-PAGE.....	34
ง.1	กราฟโปรตีนมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร.....	67

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยสี่ที่มีความจำเป็นในการดำรงชีวิตของมนุษย์ มนุษย์ทุกคนต้องการบริโภคอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีประโยชน์และมีความปลอดภัยต่อร่างกาย แต่หากอาหารไม่ได้มีการเก็บรักษาที่ดีอาจทำให้เกิดการเสื่อมเสียได้ง่าย จุลินทรีย์เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียได้โดยง่าย ซึ่งจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่ผู้บริโภคไม่สามารถยอมรับได้ ทั้งในด้านของกลิ่น สี และรสชาติ หากผู้บริโภคได้บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์จะทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยหรือเกิดโรคอาหารเป็นพิษขึ้น เช่น ปวดท้อง ท้องร่วง อาเจียน หรือเป็นไข้ได้

การใช้สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยชะลอการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ และสามารถช่วยลดการเสื่อมเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาการใช้สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดธรรมชาติเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีเป็นจำนวนมาก การใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติเป็นทางเลือกใหม่ที่จะช่วยเพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค สารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีรายงานการวิจัยในการนำมาใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารมีอยู่หลายชนิด เช่น น้ำมันหอมระเหย เอนไซม์ และเปปไทด์ต้านจุลชีพ เป็นต้น

เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีความสำคัญต่อระบบการป้องกันตัวเองของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ พบได้ทั่วไปในแบคทีเรีย ฟิชและสัตว์ การนำเปปไทด์ต้านจุลชีพมาใช้ทดแทนวัตถุกันเสียในอาหาร เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ถือเป็นนวัตกรรมใหม่ และเป็นที่ยอมรับกันแล้วในทางประเทศตะวันตก และได้มีการบรรจุไว้ในโปรแกรมความปลอดภัยทางด้านอาหาร เปปไทด์ที่ได้รับอนุญาตให้ใช้กัน ได้แก่ แลคโตเฟอริน และแบคเทอริโอซิน อย่างไรก็ตามความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน การค้นหาเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ จากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เพิ่มเติมรวมทั้งการทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะทำให้มีข้อมูลของเปปไทด์ต้านจุลชีพอีกมากมายหลายชนิดยิ่งขึ้น

จากการสร้างห้องสมุด Expressed Sequence Tag (EST) จากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล พบว่ามีเปปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ต้านจุลชีพ bactenecin-likeSp (bacSp) ซึ่งภายในโมเลกุลประกอบด้วยโพรลีนเป็นจำนวนมาก มีน้ำหนักโมเลกุล 4645 ดาลตันและมีค่า pI 12.63 เปปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp มีความคล้ายกับยีน bactenecin 7 ในวัว และ proline-rich antibacterial peptide ในปู *Carcinus maenas* 64% และ 62% ตามลำดับ โดยจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า ปลายด้าน N-terminus ของโปรตีน bacSp ประกอบด้วยโพรลีนอยู่เป็นจำนวนมาก (มีปริมาณโพรลีน 42.50% ในเปปไทด์ทั้งหมด) จากข้อมูลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าเปปไทด์ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ต้านจุลชีพ bactenecin-likeSp (bacSp) ในสภาวะต่าง ๆ และสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร *Vibrio parahaemolyticus*

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์ bactenecin-likeSp (bacSp) ใน *Escherichia coli* และการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์
2. ศึกษาสมบัติทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์ bactenecin-likeSp (bacSp) ในสภาวะต่าง ๆ และสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร *Vibrio parahaemolyticus*

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เพปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides)

เพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides, AMPs) เป็นกลุ่มของเพปไทด์ที่มีขนาดเล็ก โดยทั่วไปมีประจุบวก (cationic antimicrobial peptide) มีขนาดประมาณ 10 กิโลดาลตัน โครงสร้างมีลักษณะเป็นสายยาว สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทั้งในแบคทีเรีย พืช และสัตว์ (Onaizi and Leong, 2011) เป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (innate immunity) ความสำคัญของเพปไทด์ต้านจุลชีพในระบบภูมิคุ้มกันอยู่ที่ความสามารถในการทำงานแบบไม่เฉพาะเจาะจง ทำให้แบคทีเรียเกิดการดี้อย่างยาก และสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด (broad-spectrum) ซึ่งเพปไทด์ต้านจุลชีพบางชนิด อาจมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อรา ไวรัส และอาจมีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (สรศักดิ์ อินทรสุต, 2556)

ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) ถือได้ว่าเป็นปราการด่านแรกในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมที่รับเข้าไป ภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะถูกกระตุ้นด้วยโมเลกุลที่อยู่บนผิวของเชื้อโรคหลาย ๆ ชนิด เป็นการตอบสนองในเบื้องต้นก่อนที่จะมีการตอบสนองของ adaptive immune response และเพปไทด์ต้านจุลชีพมีประสิทธิภาพในการแพร่ไปยังจุดที่ติดเชื้อมีได้อย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบและศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของเพปไทด์ต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ทำให้มีประโยชน์ในแง่ของการนำไปใช้เป็นสารต้านจุลชีพ

2.2 โครงสร้างทุติยภูมิของเพปไทด์ต้านจุลชีพ

ปัจจุบันเพปไทด์ต้านจุลชีพสามารถแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และลำดับกรดอะมิโนภายในโปรตีนได้เป็น 4 กลุ่ม (Hancock and Lehrer, 1998) ดังนี้

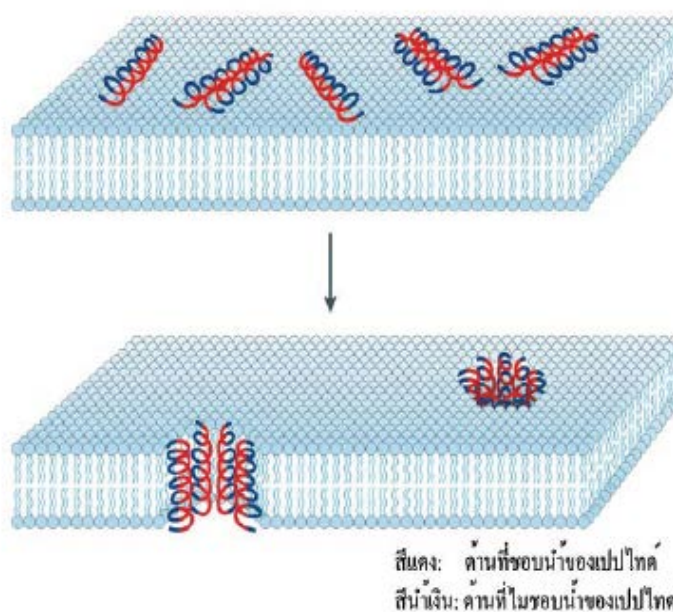
1. Alpha-helix structure เป็นโครงสร้างที่มีการศึกษาและพบมากที่สุด ลักษณะโครงสร้างเป็นเกลียวเวียนขวา เพปไทด์ที่พบในกลุ่มนี้ เช่น magainin ซึ่งแยกได้จากผิวหนังของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำจำพวกกบ *Xenopus* (Boman, 1991) และ LL-37 ซึ่งเป็นโปรตีนภายในไลโซไซม์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ของมนุษย์ (Turner et al., 1998) เป็นต้น
2. Beta-sheet structure เป็นโครงสร้างที่มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) อย่างน้อย 2 พันธะซึ่งเกิดจากการที่สายโปรตีนมีกรดอะมิโนซิสทีอีนจำนวนมาก ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้ง่าย เพปไทด์ที่พบในกลุ่มนี้ เช่น tachyplesin 1 พบใน *Tachypleus tridentatus* (Matsuzaki, 1997) และ protegrin-1 ที่ได้จากเม็ดเลือดขาวของสุกร (Aumelas et al., 1996) เป็นต้น
3. Linear structure ไม่เกิดพันธะไดซัลไฟด์ในสายของเพปไทด์ด้านจุลชีพ เช่น indolicidin ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ของวัว (Selsted et al., 1992) และ histatin ในน้ำลายมนุษย์ (Helmerhorst et al., 1999) เป็นต้น
4. Loop structure ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ในการคงรูปร่างของเพปไทด์เพียงพันธะเดียว เช่น lactoferricin พบในน้ำนมจากวัวและมนุษย์ (Odell et al., 1996) เป็นต้น

2.3 กลไกในการทำงานของเพปไทด์ด้านจุลชีพ

เพปไทด์ด้านจุลชีพโดยส่วนมากจะมีคุณสมบัติเป็น amphipathic มีประจุสุทธิเป็นบวก และประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) โดยกลไกการทำงานของเพปไทด์ด้านจุลชีพเริ่มต้นด้วยการดึงดูดกัน ระหว่างขั้วบวกของเพปไทด์กับขั้วลบที่อยู่ในบริเวณพื้นผิวของจุลินทรีย์ เพปไทด์จึงถูกดึงดูดเข้ามาใกล้จุลินทรีย์ เมื่อเพปไทด์เคลื่อนที่เข้ามาใกล้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เพปไทด์จะสามารถทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ นำไปสู่การแทรกตัวของเพปไทด์และทำลายเชื้อได้ เพปไทด์บางชนิดมีผลในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอนไซม์ กรดนิวคลีอิกหรือสารภายในเซลล์ (Li et al., 2012) อย่างไรก็ตามเพปไทด์ด้านจุลชีพส่วนใหญ่มักมีเป้าหมายอยู่ที่การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งกลไกในการทำงานของเพปไทด์ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์มีผู้เสนอไว้หลายรูปแบบ ดังต่อไปนี้

- แบบจำลองบาร์เรล-สเตฟว์ (Barrel-stave model)

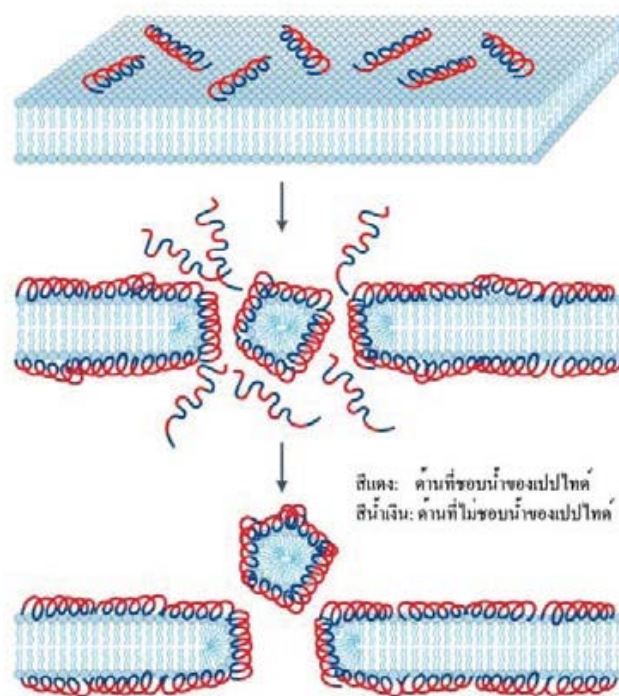
แบบจำลองนี้อาศัยคุณสมบัติความเป็น amphipathicity ของเพปไทด์ด้านจุลชีพ โดยเพปไทด์จะใช้กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำจับกับ phospholipid bilayer จากนั้นใช้ส่วนของกรดอะมิโนที่ชอบน้ำหรือมีประจุบวกแทรกตัวผ่านชั้นลิพิดไบเยอร์ของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เกิดรูและเกิดการรั่วไหลของไอออนและสารโมเลกุลเล็กต่าง ๆ ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด



รูปที่ 2.1 กลไกการทำงานของเพปไทด์ด้านจุลชีพในลักษณะของแบบจำลองบาร์เรล-สเตฟว์ (Brogden, 2005)

- แบบจำลองคาร์เปท (Carpet model)

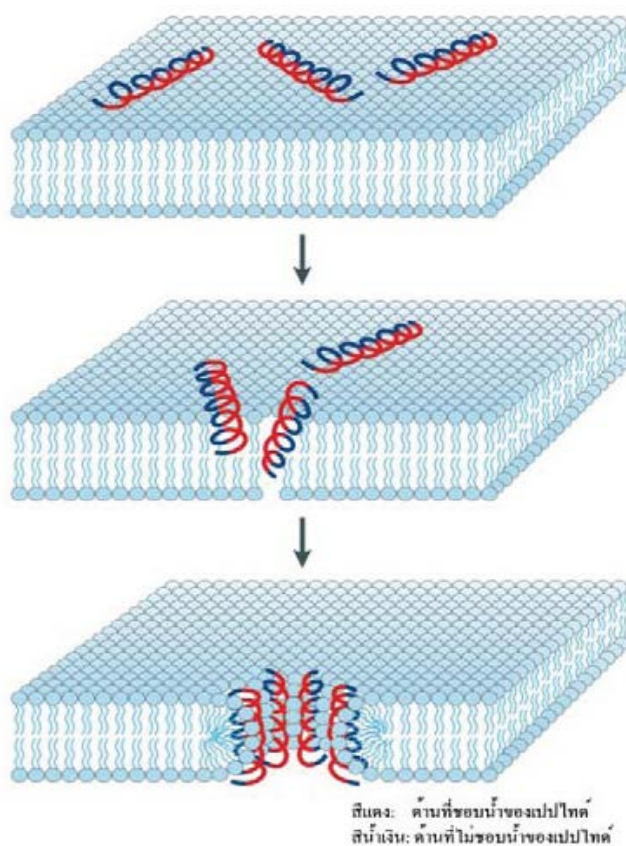
เป็นแบบจำลองที่อาศัยการสะสมของเพปไทด์ด้านจุลชีพปกคลุมเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียในลักษณะขนานกับเยื่อหุ้มเซลล์คล้ายกับการปูพรม โดยเพปไทด์จะเรียงตัวด้านกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำให้อยู่ชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดรูที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียส่งผลให้ส่วนประกอบต่างๆ ที่สำคัญภายในเซลล์หลุดออกมานอกเซลล์



รูปที่ 2.2 กลไกการทำงานของเพปไทด์ด้านจุลชีพในลักษณะของแบบจำลองคาร์เปท (Brogden, 2005)

- แบบจำลองโทรอยด์ล (Toroidal model)

แบบจำลองแบบโทรอยด์ลนี้มีลักษณะคล้ายกับแบบจำลองบาร์เรล-สเตฟว์ คือ เพปไทด์ จะจับที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ และเหนี่ยวนำให้ส่วนที่เป็นไขมัน (lipid head group) ของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการงอตัวเข้าหากัน เกิดเป็นช่องว่างขึ้น โดยช่องว่างนี้จะมีผนัง ผนังด้วยส่วนของเพปไทด์ที่แทรกตัวเข้ามา



รูปที่ 2.3 กลไกการทำงานของเพปไทด์ด้านจุลชีพในลักษณะของแบบจำลองโทรอยด์ล (Brogden, 2005)

2.4 แหล่งที่มาของเพปไทด์ด้านจุลชีพ

เพปไทด์ด้านจุลชีพเป็นส่วนประกอบหรือโปรตีนที่ถูกกระตุ้นขึ้นมาในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิดในแมลงและสัตว์ต่าง ๆ ซึ่งมีหน้าที่ในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีกลไกอื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ก็มี การยอมรับว่าเพปไทด์ประจวบควมมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต เพปไทด์ด้านจุลชีพสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ เพปไทด์ด้านจุลชีพที่ได้จากแมลง, สัตว์, พืช และแบคทีเรีย (Maróti et al., 2011)

2.4.1 เพปไทด์ด้านจุลชีพจากแมลง

เพปไทด์ด้านจุลชีพจากแมลงเป็นเพปไทด์ที่มีประจวบควม สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 4 กลุ่ม (Papagianni, 2003)

1) Cecropins ประกอบด้วยกรดอะมิโน 31-39 ตัว และมีโครงสร้างแบบ amphipathic alpha-helical มักพบในแมลงที่อยู่ในอันดับ *Lepidoptera* (ผีเสื้อและผีเสื้อกลางคืน) และ *Diptera* (แมลงวัน) cecropin สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ โดยจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและเรียงตัวขนานไปกับพื้นผิวของเซลล์ คล้ายกลไกการทำงานของบาร์เรล-สเตฟวี ซึ่งยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก, เชื้อรา, โปรโตซัว และปรสิต (Vizioli and Salzet, 2002) ตัวอย่างเพปไทด์ในกลุ่มนี้ เช่น andropin แยกได้จากแมลงหวี่ *Drosophilla* (Samakovlis et al., 1991) และ moricin แยกได้จากตัวหนอนไหม *Bombyx mori* (Hara and Yamakawa, 1995) เป็นต้น

2) Insect defensins พบได้ทั่วไปในแมลง แม้ว่าจะมีชื่อที่คล้ายกับ defensins ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่ามี polypeptide ที่คล้ายคลึงกัน (White, Wimley and Selsted, 1995) defensins ชนิดนี้เป็นเพปไทด์ที่มีประจวบควม มีกรดอะมิโน 38-43 ตัว มีกรดอะมิโนชนิดที่อื่น 6 ตัว ที่สร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่มีความเสถียรต่อโครงสร้างแบบ beta-sheet มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว (Bulet et al., 1999; Vizioli and Salzet, 2002; Dimarcq et al., 1998)

3) Cationic proline-rich peptides (2-4 kDa) มีความคล้ายกับเพปไทด์ด้านจุลชีพบางชนิด เช่น PR-39, Bac-5 และ Bac-7 เป็นกลุ่มที่มีโปรตีนจำนวนมาก ตัวอย่างของเพปไทด์

ต้านจุลชีพในกลุ่มนี้ เช่น apidaecin และ abaecin ที่พบในผึ้ง (Casteels et al., 1989) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ส่วนกลไกการทำงานยังไม่มีควา
 แน่ชัด เพปไทด์อีกชนิดที่พบในแมลงหวี่ *Drosophilla* คือ drosocin (Bulet et al., 1993)

4) Glycine-rich peptides มีขนาดประมาณ 8-30 kDa เพปไทด์ที่พบในกลุ่มนี้ เช่น coleopteracin (18% glycine residue), hemiptericin (15% glycine residue) และ hymenoptaecin (20% glycine residue) (Hoffmann, 1995) เป็นต้น

2.4.2 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากสัตว์

ในสัตว์มีการผลิตเพปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิด ซึ่งเป็นด่านป้องกันการติดเชื้อจากจุลินทรีย์อยู่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจง หรือในบางกรณี ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบหรือการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ โดยเพปไทด์เหล่านี้จะมีความแตกต่างกันทั้งในด้านขนาด องค์ประกอบ กลไกในการทำงาน และความจำเพาะต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น polymorphonuclear leukocytes, macrophage และ mucosal epithelia cells เป็นต้น (Brogden, 2003) เช่น magainin 1 และ 2 ที่ค้นพบในผิวหนังของกบ *Xenopus laevis* (Boman, 1991) และ cathelidins ที่สกัดได้จาก neutrophilic granules และ epithelia cells ของสัตว์ เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปลา, นก, สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมไปถึงมนุษย์ (Cézard et al., 2011)

2.4.3 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากพืช

พืชได้มีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะออกมาป้องกันการรุกรานของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในด้านโครงสร้างของพืช (structural defenses) ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อผ่านเข้าสู่พืชได้โดยง่าย เช่น การสร้างแว็กซ์ (wax) และคิวติน (cutin) เคลือบผิวใบด้านบนนอก และทางชีวเคมี (biochemical defenses) ผ่านระบบ systemic acquired resistance (SAR) ที่จะกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนหรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งสามารถต้านทานได้ทั้งบริเวณที่ถูกบุกรุกโดยตรง (local resistance) และบริเวณที่ไม่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค (systemic resistance) (Maróti et al., 2011)

ระบบภูมิคุ้มกันของพืชสามารถผลิตเพปไทด์ต้านจุลชีพได้หลายชนิด เช่น defensins, thionins และ lipid transfer proteins (Sels et al., 2008) โดยเพปไทด์จะถูกขับ

ออกมา และสามารถโจมตีเชื้อโรคได้ก่อนที่จะเกิดการติดเชื้อ โดยยีนที่มีการแสดงออกของเพปไทด์ด้านจุลชีพมักจะอยู่ที่ดอก เมล็ด และเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการติดเชื้อได้ง่าย (Maróti et al., 2011) เพปไทด์ด้านจุลชีพในพืชส่วนใหญ่มีคุณลักษณะที่คล้ายคลึงกันคือ มีประจุบวก และมีซิสทีไนน้อยจำนวนมาก สำหรับการสร้างพันธะไดซัลไฟด์เพื่อให้เกิดโครงสร้างแบบ beta-sheet (Pelegrini et al., 2011) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และ/หรือ เชื้อราได้ โดยเพปไทด์ที่ค้นพบในพืชตัวแรกคือ purothionin ที่ได้จาก wheat flour, *Triticum aestivum* ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชได้ เช่น *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas campestris* และ *Corynebacterium michiganense* (Jones and Mak, 1983)

2.4.4 เพปไทด์ด้านจุลชีพจากแบคทีเรีย

เพปไทด์ด้านจุลชีพที่สร้างจากแบคทีเรียมีอยู่หลากหลายชนิด รวมไปถึงเพปไทด์ด้านจุลชีพที่สร้างจากไรโบโซมของแบคทีเรียที่เรียกว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) ซึ่งสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวกหลายสปีชีส์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น แบคเทอริโอซินมีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) โดยแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแคบและมีความเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบมักจะมีขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยชนิดกว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) ได้รับความสนใจมากที่สุด แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกจากแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* คือ โคลิซิน (colicins) เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ (20 kDa) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน (Papagianni, 2003) แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบอีกชนิดหนึ่งคือ ไมโครซิน (microcin) ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก เช่น นินซิน (nisin) ซึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* ประกอบด้วยเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 34 ตัว สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด รวมไปถึงกลุ่มที่ก่อโรคด้วย (อรอนงค์ พริ้งสุลกะ, 2550) และเพดิโอซิน PA-1/AcH (pediocin PA-1/AcH) สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* ซึ่งแบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย มักนำไปใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร การนำ

แบคทีเรียโอซินไปใช้ในอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียจากสารเคมีเพื่อเป็นทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค

2.5 เพปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์ทะเลกลุ่ม crustacean

เพปไทด์ต้านจุลชีพของสัตว์ทะเลในกลุ่ม crustacean เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก มักพบในเลือด (hemocytes) (Rosa and Barracco, 2010) เป็นสารประกอบที่เป็นภูมิคุ้มกันพื้นฐานของร่างกาย (innate immunity) ที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่บุกรุกเข้ามาในร่างกาย เนื่องจากแหล่งที่อยู่ของ crustacean อาศัยอยู่ในน้ำและปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้อยู่ตลอดเวลา จึงมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอมด้วยกลไกหลัก ๆ 2 กลไก คือ กลไกการป้องกันตัวเองโดยเซลล์ (cellular immunity) เป็นกลไกการป้องกันเกิดจากกิจกรรมของเม็ดเลือด (hemocytes) เซลล์ฮีมาโตปอยติก (haematopoietic cells) และเซลล์จับกิน (phagocytes) ที่กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ อีกกลไกหนึ่งคือ กลไกการป้องกันตัวเองโดยสารน้ำ (humoral immunity) ในสัตว์ทะเลกลุ่ม crustacean นี้กลไกการป้องกันตัวเองโดยสารน้ำนั้นเกิดจากการแสดงออกของสารในซีรัมหรือพลาสมาที่สามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือจุลินทรีย์ได้ เช่น เลคติน หรือแอกกลูตินิน (lectin หรือ agglutinin) และสารต้านจุลชีพ (antimicrobial compound) (Rosa and Barracco, 2010; Ellis et al., 2011)

สารต้านจุลชีพในสัตว์ทะเลกลุ่ม crustacean เป็นสารประกอบโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่บุกรุกเข้ามาในร่างกาย ซึ่งในสัตว์น้ำชนิดหนึ่ง ๆ สามารถแยกเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีกลไกในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด มีรายงานการวิจัยเป็นจำนวนมากที่ค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์ทะเลจำพวก crustacean โดยเริ่มจากการศึกษาในปู shore crab, *Carcinus maenas* และค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพชื่อว่า 6.5 kDa proline-rich antimicrobial peptide ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminus คล้ายคลึงกับ bactenecin-7 ซึ่งเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Schnapp, Romeo and Smith, 1996) ต่อมา Khoo และคณะ (1999) พบเพปไทด์ขนาดเล็กชื่อว่า Callinectin ในเลือดของ blue crab, *Callinectes sapidus* และพบว่าสามารถต้านเชื้อ *Escherichia coli* ได้ ซึ่งในภายหลังได้มีการศึกษาและรายงานลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ต้านจุลชีพ Callinectin (Noga et al., 2011) นอกจากนี้ยังได้มีการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ชื่อว่า Penaeidin ซึ่งสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อรา (Destoumieux

et al., 1997) โดย Penaeidin นั้น มีส่วนที่เป็น proline-rich domain ทั้งทางด้านปลาย N-terminal และ C-terminal ซึ่งภายในโดเมนดังกล่าวจะประกอบด้วยซิสทีอีน 6 ตัว ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาและแยก cDNA เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Penaeidin จากเม็ดเลือดของกุ้ง Pacific White Shrimp, *L. vannamei* และ Atlantic White Shrimp, *L. setiferus* (Gross et al., 2001) และในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Supungul et al., 2002) ต่อมา มีรายงานการค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพ Crustin ซึ่งแยกได้จากเม็ดเลือดของปู *C. maenas* (Relf et al., 1999) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ และมีการค้นพบ Crustin ในกุ้งและปูอีกหลายชนิดเช่น *L. vannamei* และ *L. setiferus* (Bartlett et al., 2002), *P. monodon* (Amparyup et al., 2008a; Amparyup et al., 2008b; Supungul et al., 2008) และ kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* (Rattanachai et al., 2004) และในปู spider crab, *Hyas araneus* (Sperstad et al., 2009), swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Yue et al., 2010), chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Mu et al., 2010; 2011) นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ต้านจุลชีพ antilipoplysaccharide factor (ALF) ในกุ้งและปูหลายชนิด (Somboonwivat et al., 2005; de la Vega et al., 2008; Wang et al., 2011) และจากการสกัดเซลล์เม็ดเลือดของปู spider crab, *Hyas araneus* ได้ค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีโพรลีน และอาร์จินีนจำนวนมาก มีชื่อว่า arasin-1 (Stensvåg et al., 2008) Scygonadin เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่สกัดได้จากส่วนประกอบของน้ำเชื้อ (seminal plasma) ของปูทะเล *Scylla serrata* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium glutamicum* และ *Aeromonas hydrophila* (Wang et al., 2007)

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสร้างห้องสมุด (Expressed Sequence Tag, EST) จากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล *Scylla paramamosain* ในประเทศไทย พบเปปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น anti-lipoplysaccharide factor (Imjongjiraket al., 2007; 2011a), crustin (Imjongjiraket et al., 2009), arasin และ glycine-rich antimicrobial peptide (Imjongjiraket al., 2011b) นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ต้านจุลชีพซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ bactenecin จึงเรียกชื่อว่า bactenecin-like Sp (bacSp) ซึ่งภายในโมเลกุลประกอบด้วยโพรลีนเป็นจำนวนมาก มีน้ำหนักโมเลกุล 4645 ดาลตันและมีค่า pI 12.63 เปปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp มีความคล้ายกับยีน bactenecin 7 ในวัว และ 6.5 kDa proline-rich antimicrobial peptide ในปู *Carcinus maenas* 64% และ 62% ตามลำดับ โดยจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าปลายด้าน N-terminus

ของโปรตีน bacSp ประกอบด้วยโพลีโพรตีนอยู่เป็นจำนวนมาก (มีปริมาณโพลีโพรตีน 42.50% ในเพปไทด์ทั้งหมด) และเพปไทด์ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

2.6 ยีนเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacterenecin

Bactenecin เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพในกลุ่มที่มีโพลีโพรตีนและอาร์จินีนจำนวนมาก (Raj and Edgerton, 1995) มีลักษณะโครงสร้างแบบ β -hairpin และมีพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุล 1 พันธะ ซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เพปไทด์ต้านจุลชีพในกลุ่ม bacterenecin ที่มีการรายงานพบมี 2 ชนิด คือ Bac 5 และ Bac 7 (Lee et al., 2009) โดย Bac 5 เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่อยู่ในโมเลกุลประกอบด้วยหมู่อะมิโน 43 ตัว พบได้ใน bovine neutrophil โดยด้าน N-terminal มีอาร์จินีนอยู่เป็นจำนวนมาก (Zanetti, Gennero and Romeo, 1995) ส่วน Bac 7 เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่ค้นพบใน bovine neutrophil ภายในสายของเพปไทด์มีโพลีโพรตีนและอาร์จินีนอยู่จำนวนมาก และมีขนาด 7 กิโลดาลตัน (Scocchi, Romeo and Zanetti, 1994)

จากรายงานการวิจัยของ Schnapp และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลำดับอะมิโนคล้ายกับ bacterenecin-7 ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดของปู Shore crab, *C. maenas* พบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สกัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดของปูแสมมีความคล้าย 60% กับ bacterenecin-7 ซึ่งเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

2.7 เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ต้องการเกลือในการเจริญไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วง 15-42 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ที่ pH ค่อนข้างกว้างคือ 4.8-11 แต่ pH ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 7.6-8.6 นอกจากนี้ โซเดียมคลอไรด์เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 0.5-8% ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2-3% (Lee et al., 1990)

V. parahaemolyticus มีแหล่งธรรมชาติอยู่ในน้ำทะเลและน้ำกร่อย มักพบได้บ่อยในกุ้ง หอย ปู และปลาหลายชนิด การกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับฤดูกาล โดยในฤดูร้อน น้ำทะเลมีอุณหภูมิสูงขึ้นซึ่งเหมาะแก่การเจริญของเชื้อ จึงทำให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนและปนเปื้อนมากกว่าในฤดูหนาวซึ่ง *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อก่อโรค (pathogen) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษหรือโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) เนื่องมาจากการรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อ ซึ่งผู้ป่วยจะแสดงอาการ อูจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และอาจมีไข้ต่ำ (Su and Liu, 2007)

2.8 การนำเพปไทด์ต้านจุลชีพมาใช้ในอาหาร

ในปัจจุบันนี้ผู้บริโภคได้หันมาให้ความสำคัญและความเอาใจใส่ในด้านสุขภาพมากขึ้น และการหลีกเลี่ยงอาหารที่มีการใช้สารเคมีหรือวัตถุกันเสียสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาค้นคว้าว่าวัตถุกันเสียจากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารเคมี ที่มีความปลอดภัยต่ออาหารและผู้บริโภค (ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2012) แบคทีเรียโอซินเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพชนิดหนึ่งที่ผลิตโดยแบคทีเรีย มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด ซึ่งโดยส่วนใหญ่ถูกผลิตมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เช่น แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Pediococcus* และ *Lactococcus* ซึ่งถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) (รุ่งโรจน์ ศรีรักษา และคณะ, 2010) แบคทีเรียโอซินที่เป็นที่รู้จักและได้มีการนำมาใช้ในอาหาร ได้แก่ ไนซิน (nisin) เป็นแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* ซึ่งได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO นิยมนำไปใช้ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เนย อาหารกระป๋อง หรือเนื้อสัตว์ (ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2012) Hyicin 6382 เป็นแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Staphylococcus hyicin* 3682 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* (Fagundes et al., 2011) แลคโตเฟอริน (lactoferrin) เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพชนิดหนึ่งที่ค้นพบในนม น้ำลาย น้ำตา และเนื้อเยื่อต่าง ๆ หลายชนิด ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ในไวน์ (Enrique et al., 2007)

2.9 ระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นเทคนิคทางเลือกหนึ่ง สำหรับการผลิตโปรตีนที่ต้องการ โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ซึ่งโดยปกติแล้วโปรตีนจะถูกสังเคราะห์ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอยู่แล้ว การศึกษาโปรตีนต่าง ๆ เหล่านี้ อาจมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น โปรตีนในสิ่งมีชีวิตถูกผลิตออกมาปริมาณน้อย หรือต้องใช้เวลานานในการผลิตและสกัด แต่การผลิตโปรตีนโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม จะทำให้ได้โปรตีนที่ต้องการในปริมาณมากเพื่อตอบสนองความต้องการของอุตสาหกรรม ขั้นตอนแรกของการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนคือ เลือกดีเอ็นเอ (DNA) ที่ต้องการศึกษาแล้วนำมาเพิ่มปริมาณในระบบการแสดงออกของยีนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พืช หรือ แมลง สิ่งสำคัญในการเลือกเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ต่าง ๆ คือ คุณภาพของโปรตีน ความรวดเร็วในการผลิต และปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้ (Demain and Vaishnav, 2009)

ชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน

1. Bacteria

1.1 *Escherichia coli*

เป็นเซลล์ที่นิยมนำมาใช้มากที่สุดในการผลิตโปรตีนที่ไม่ต้องการกระบวนการ post-translation modification ของโปรตีน (Terpe, 2006) ซึ่งข้อดีของการใช้เซลล์ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน คือ เป็นเซลล์ที่ได้รับการศึกษาข้อมูลด้านพันธุกรรมและสรีรวิทยาามากเพียงพอสามารถใช้ได้กับ DNA ทั่วไป และสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ง่าย เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้เร็ว และได้ผลผลิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสูง (Swartz, 1996) เหมาะสำหรับการผลิตโปรตีนในเชิงพาณิชย์ แต่มีข้อจำกัดบางประการคือ หากมีการแสดงออกของยีนที่มากเกินไป (over expression) จะเกิดการรวมตัวของโปรตีนในรูปแบบ inclusion bodies ซึ่งจำเป็นต้องมีขั้นตอนการ refolding ของโปรตีนในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ อาจทำให้มีการสูญเสียโปรตีนได้ในปริมาณหนึ่ง

ในปัจจุบันมีเวกเตอร์จำนวนมากที่ใช้โปรโมเตอร์ซึ่งดัดแปลงมาจากส่วนของ lac operon เพื่อให้ยีนมีการแสดงออกและสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli* ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น ในชุดของเวกเตอร์ pET ซึ่งมี bacteriophage T7 promoter และส่วนของ lac operon ซึ่งมีการศึกษาและพัฒนาขึ้นโดย Studier และคณะ (1990) เป็นต้น การประยุกต์ใช้ lac operon ในงานพันธุวิศวกรรมสามารถใช้ Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้ทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนที่ต้องการได้ (Maniatis, Sambrook and Fritsch, 1982)

1.2 Bacillus

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Bacillus เช่น *B. subtilis*, *B. licheniformis* หรือ *B. brevis* เป็นเซลล์ที่นำมาใช้มากนอกเหนือจาก *E. coli* เนื่องจากมีข้อดีกว่า *E. coli* คือ สามารถผลิตโปรตีนได้มาก แต่ในขณะเดียวกันก็มีข้อเสียคือ มีการผลิตเอนไซม์ protease มาก ทำให้โปรตีนถูกทำลายอย่างรวดเร็ว (He, Bruekner and Doi, 1991)

2. Yeast

ยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์ที่ใช้ผลิตโปรตีนในกรณีที่ไม่สามารถผลิตโปรตีนได้ในเซลล์ *E. coli* ได้ เนื่องจากปัญหาที่เกี่ยวกับการ folding หรือต้องการกระบวนการ glycosylation ซึ่งเป็นกระบวนการ post-translation modification ของโปรตีน การผลิตโปรตีนโดยการใช้เซลล์ยีสต์จะให้ปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีนสูง ง่ายต่อการขยายกำลังการผลิตโดยไม่ลดปริมาณผลผลิต ควบคุมการแสดงออกของยีนได้ง่าย มีต้นทุนการผลิตต่ำ ไม่มี endotoxin และไม่ทำให้เกิดโรคในคน นอกจากนี้ยีสต์ยังอยู่ในรายการ genetic material ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US-FDA) ที่มีความปลอดภัยเพียงพอที่จะนำมาใช้ (Generally Recognized as Safe : GRAS) แต่ข้อจำกัดของยีสต์ คือ มีการแสดงออกของยีนต่ำ มี glycosylation สูง และมีความจำกัดในการเลือกใช้ genetic system อื่น ๆ (Demain and Vaishnav, 2009)

3. Filamentous fungi (molds)

เชื้อราที่มีเส้นใย เช่น *Aspergillus niger* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีความน่าสนใจในการนำมาใช้ในเทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ เนื่องจากความสามารถในการหลั่งโปรตีนออกมาได้มาก และมีกระบวนการ post-translation เช่น glycosylation (Demain and Vaishnav, 2009)

4. Insect cells

เซลล์แมลงมีกระบวนการ post translational modification ที่ซับซ้อนกว่าในเชื้อรา เวกเตอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแมลง คือ baculovirus ซึ่งเป็นไวรัสของเซลล์แมลงที่มีความน่าสนใจเนื่องจากไม่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคน และแมลง รวมทั้งยังมี strong promoter สำหรับควบคุมการสร้างโปรตีน (Knight, 1991)

5. Mammalian cells

การเลือกใช้ mammalian cells มักให้โปรตีนที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ถูกต้องทั้งชนิดของกรดอะมิโน และกระบวนการ post-translation เซลล์ที่นำมาใช้มาก คือ Chinese Hamster Ovary (CHO) (Swartz, 1996) ข้อดีของการใช้เซลล์ชนิดนี้ คือ โปรตีนที่ได้ส่วนใหญ่จะอยู่นอกเซลล์ และมีคุณภาพใกล้เคียงกับที่ผลิตในธรรมชาติ แต่ข้อเสียคือ มีต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตช้า ตายง่าย อาหารเลี้ยงเซลล์มีราคาแพง และมีระดับการแสดงออกของยีนต่ำ (Demain and Vaishnav, 2009)

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น SS-320 (บริษัท Tomy Seiki, ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 5310 (บริษัท Kubota, ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น MIKRO 22R (บริษัท Hettich, ประเทศเยอรมนี)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (ยี่ห้อ GFL, ประเทศเยอรมนี)
- เครื่องชั่งละเอียดตศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น ML 1602 (บริษัท Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- เครื่องชั่งละเอียดตศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น ML 204 (บริษัท Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- ตู้อบแห้ง (บริษัท WTB Binder, ประเทศเยอรมนี)
- เครื่องเขย่า (Shaker) Innova รุ่น 2000 (บริษัท New Brunswick Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- ไมโครปิเปตขนาด 0.2-2 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตขนาด 20-200 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตขนาด 100-1000 ไมโครลิตร

- เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาความร้อน (Hotplate Stirrer) รุ่น LMS-1003 (บริษัท Daihan Labtech, ประเทศเกาหลี)
- เครื่อง Electrophoresis รุ่น Hoefer mini VE (บริษัท Amersham Pharmacia Biotech, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Power supply รุ่น Power Station 300, 220 V (บริษัท Cabinet International, ประเทศไต้หวัน)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 (บริษัท Eutech Instruments, ประเทศสิงคโปร์)
- Laminar Flow Cabinet รุ่น BTV-123 (บริษัท Dwyer Instrument, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (บริษัท United Instrument, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Heat Box รุ่น MD-MINI (บริษัท Major Science, ประเทศไต้หวัน)
- เครื่อง Microplate Reader รุ่น GO19065;UVM340 (บริษัท Biochrome, ประเทศอังกฤษ)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 (บริษัท Thermo Scientific)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น G560E (บริษัท Scientific Industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Acrylamide (บริษัท Bio Basic Inc., ประเทศแคนาดา)
- Ammonium persulphate (บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Agar Powder, Bacteriological (บริษัท Himedia, ประเทศอินเดีย)
- Bis-acrylamide (บริษัท Bio Basic Inc., ประเทศแคนาดา)
- Casein Tryptic Peptone (Tryptone) (บริษัท Scharlau, ประเทศสเปน)
- DNASE I (บริษัท Bio Basic Inc., ประเทศแคนาดา)
- Ethanol 95% (บริษัท ห้าอุตสาหกรรม, ประเทศไทย)
- Glycine (บริษัท Scharlau, ประเทศสเปน)
- Glacial acetic acid (บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี)
- Glycerol 99% (บริษัท Vivantis Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Imidazole (บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมนี)
- Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside, dioxide free (IPTG)
(บริษัท Fermentas, ประเทศแคนาดา)
- Kanamycin sulphate (บริษัท Bio Basic Inc., ประเทศแคนาดา)
- Lysozyme chloride form, Grade VI (from chicken white egg)
(บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมนี)
- Methanol (บริษัท Burdick & Jackson, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

- NNN'N'-tetramethyl-1,2-diaminoethane (TEMED) (บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
- Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (บริษัท Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Sodium chloride (บริษัท Analar, ประเทศอังกฤษ)
- Sodium hydroxide (บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
- Sodium dodecyl sulphate (บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
- Soybean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth) (บริษัท Himedia, ประเทศอินเดีย)
- Tris (บริษัท USB Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Triton X-100 (บริษัท USB Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- TCBS Agar (บริษัท Himedia, ประเทศอินเดีย)
- Urea (บริษัท USB Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Yeast extract (บริษัท Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta™(DE3)pLysS ที่มียีนเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp (pET28b-bacSp) (ได้รับความอนุเคราะห์จากดร. ปิติ อ่ำพ่ายพ์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) มาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB; 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.5) ปริมาตร 3 ml ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมงนำเซลล์ *E. coli* ที่ได้ 100 µl ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยง

เชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 ml ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และเขย่าที่ 250 rpm จนกระทั่งค่าวัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.6 แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาเติม Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์ *E. coli* ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าสารที่มีความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยทำการแบ่งเก็บเซลล์ 1 ml ในระหว่างการบ่มทุก 1 ชั่วโมงจนถึง 6 ชั่วโมง และที่ 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์มาวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นในแต่ละชั่วโมงด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ได้ โดยน้ำหนักโมเลกุลกับที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม GENETYX software (Software Development Inc.) และโปรแกรม SMART analysis (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) พบว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp มีน้ำหนักโมเลกุล 5730 ดาลตัน

3.3.2 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลโดยใช้ 20% (w/v) separating และ 5.0% (w/v) stacking gel (Laemmli, 1970) (ภาคผนวก ค) นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ผสมกับ 2x sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue, 100 mM DTT) (ภาคผนวก ข) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที โหลดโปรตีนตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานลงบนเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 mA เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย staining solution (0.1% coomassie brilliant blue R-250, 40% methanol, 10% acetic acid) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นเจลมา destain ด้วย destain solution (40% methanol, 10% acetic acid) จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน วัดระยะที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ และระยะทางที่ tracking dye เคลื่อนที่แล้วนำมาคำนวณ relative mobility

$$\text{Relative mobility} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ tracking dye เคลื่อนที่}}$$

นำ relative mobility ของโปรตีนที่คำนวณได้ ไปเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน

3.3.3 การสกัดแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดแยกโปรตีน โดยละลายตะกอนเซลล์ใน lysis buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mg/ml lysozyme, 50 µg/ml DNase, 5 µg/ml RNase) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกส่วนใส (soluble protein) และตะกอน inclusion bodies วิเคราะห์โปรตีนในส่วนของ soluble fraction และ inclusion bodies ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 3.3.2

3.3.4 การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำ inclusion bodies มาปั่นล้างด้วย washing buffer (1% triton X-100, 20 mM Tris, pH 8.0) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนใส ออก และละลายตะกอน inclusion bodies ที่เหลือด้วย 8 M Urea และปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใส (insoluble fraction) มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ Ni²⁺-NTA affinity chromatography (Qiagen, USA) เติม Ni-NTA His Bind resin ลงในสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน แล้วนำไปเขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 50 rpm เป็นเวลา 60 นาที นำสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนกับ Ni-NTA His Bind resin โหลดลงในคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น และชะโปรตีนด้วย elution buffer (10-250 mM imidazole; ภาคนพวง ข) 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ml เก็บสารละลายที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ทุก ๆ fraction เพื่อนำมาวิเคราะห์ผลด้วย SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการ refolding โดยกำจัดยูเรียออกโดยการ dialysis ด้วย dialysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง 3 ครั้ง นำสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์แล้วมาทำให้เข้มข้นมากขึ้นโดยใช้ ultrafiltration column โดยเปิดสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์แล้วใส่ลงใน Vivaspin® ultrafiltration column

(3 kDa MWCO) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 rpm เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลายส่วนบนซึ่งเป็นสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนไว้ที่ -20 °C

3.3.5 การหาปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์แล้วตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad, USA) และใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3.3.5.1 การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 และ 2 mg/ml ปริมาตร 20 µl ลงในหลอดทดลอง เติม dye reagent 1 ml ลงในหลอดทุกหลอด นำไปเขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีน (ภาคผนวก ง)

3.3.5.2 การหาปริมาณรีคอมบิแนนท์ bacSp

ปิเปตสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์แล้ว 20 µl ลงในหลอดทดลอง เติม dye reagent 1 ml นำไปเขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่อ่านได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน

3.3.6 การสร้างเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ด้านจุลชีพ bacSp

ทำการสังเคราะห์เพปไทด์ด้านจุลชีพ bacSp (synthetic peptide) โดยเทคนิค Fmoc (*N*-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl) แล้วแยกบริสุทธิ์โดยเทคนิค reverse-phase HPLC เพื่อนำไปตรวจสอบสมบัติทางชีวภาพเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ bacSp

3.3.7 การตรวจสอบสมบัติทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์ ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp

3.3.7.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ATCC10708 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลูกเชื้อโคลนเดี่ยวที่ได้ลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) 3 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) บนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน TSB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm จนได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 แล้วจึงนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ Poorbroth (1% tryptone 0.5% NaCl, pH 7.5) จนได้ปริมาณเชื้อ 10^5 cfu/ml จึงนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.7.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์โดยใช้วิธี broth microdilution assay (Imjongjirak et al., 2007) นำรีคอมบิแนนท์ bacSp บริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพโดยปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้ 80 μ l ตามข้อ 3.3.7.1 ลงใน 96-well microtiter plate และเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp ปริมาตร 20 μ l โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 22 μ M ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ ทำโดยละลายเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วเจือจางด้วยวิธี serial two fold dilution ด้วย 0.01% acetic acid buffer ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 500-15.6 μ M นำสารละลายเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp มาตรวจสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพโดยใช้วิธี broth microdilution assay โดยปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้ 90 μ l ลงใน 96-well microtiter plate และเติมสารละลายเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp ปริมาตร 10 μ l โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.56 μ M ใช้ 0.01% acetic acid buffer เป็นตัวควบคุม

นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) บนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ตรวจสอบค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วย microplate reader

3.3.7.3 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์

นำสารละลายใน 96-well microtiter plate มากระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ค่า MBC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด

3.3.8 ผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติการต้านจุลชีพ

นำรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp มาทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hajji และคณะ (2010) โดยแปรอุณหภูมิเป็น 4 ระดับ คือ 30 °C, 60 °C และ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที โดยนำรีคอมบิแนนท์ bacSp มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ส่วนเพปไทด์สังเคราะห์ bacSp นำมาเจือจางด้วยวิธี serial two fold dilution ให้มีความเข้มข้นในช่วง 500-15.6µM นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เช่นเดียวกัน หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพโดยใช้วิธี broth microdilution assay ตามข้อ 3.3.7

3.3.9 ผลของ pH ต่อคุณสมบัติการต้านจุลชีพ

นำรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp มาทดสอบผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อเสถียรภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hajji และคณะ (2010) โดยทำการเพาะเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลูกเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) 3 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) บนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน TSB บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm จนได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 แล้วจึงนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ Poor broth ที่

ได้ทำการแปรค่า pH ใว้ที่ 6.5, 7.5 และ 9 จนได้ปริมาณเชื้อ 10^5 cfu/ml เต็มรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์สังเคราะห์ bacSp แล้วตรวจสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพโดยใช้วิธี broth microdilution assay ตามข้อ 3.3.7

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์ bacSp

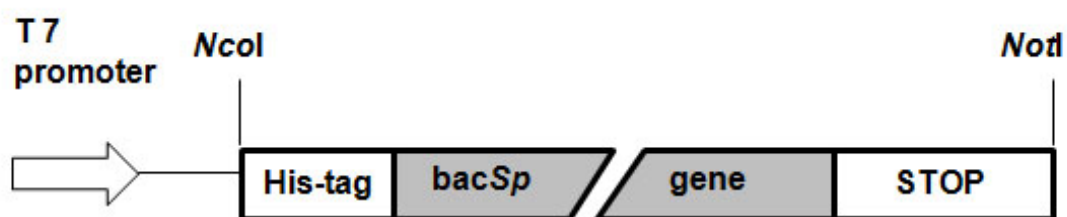
ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณยีน bacSp ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *NotI* นำยีน bacSp เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pET28b expression vector (Novagen, USA) (ภาคผนวก ง) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *NotI* ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pET28b-bacSp) ซึ่งจะถูกทำให้มีการแสดงออกเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacSp ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter ในเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta™(DE3)pLysS ได้โดยการเหนี่ยวนำด้วย IPTG โดยรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ได้จะเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว (hexa histidine tag) ทางด้านปลายอะมิโน (N-terminal) (รูปที่ 4.1) ซึ่งจะทำให้สามารถแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ bacSp ได้โดยใช้ Ni-metal affinity column chromatography (Imjongjirak et al., 2009)

จากการเหนี่ยวนำให้เซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* มีการแสดงออกของยีน bacSp เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์ bacSp โดยเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 rpm และแปรระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ โดยทำการเก็บเซลล์ทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง และเก็บเซลล์หลังจากเหนี่ยวนำที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ *E. coli* ที่ได้มาวิเคราะห์แถบโปรตีนในเซลล์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในแต่ละช่วงเวลาด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลที่ได้พบว่ามีแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 5000 ดาลตัน บนเจล SDS-PAGE (รูปที่ 4.2) ซึ่งมีความสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์ bacSp (5730 ดาลตัน) โดยพบว่าการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ bacSp ตั้งแต่ชั่วโมงแรกเป็นต้นไป โดยที่ไม่พบแถบโปรตีนนี้ใน *E. coli* ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG โดยระดับของการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น และพบว่าการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ bacSp มากที่สุด ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ภายหลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ในการเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์ bacSp ในการทดลองขั้นต่อไป

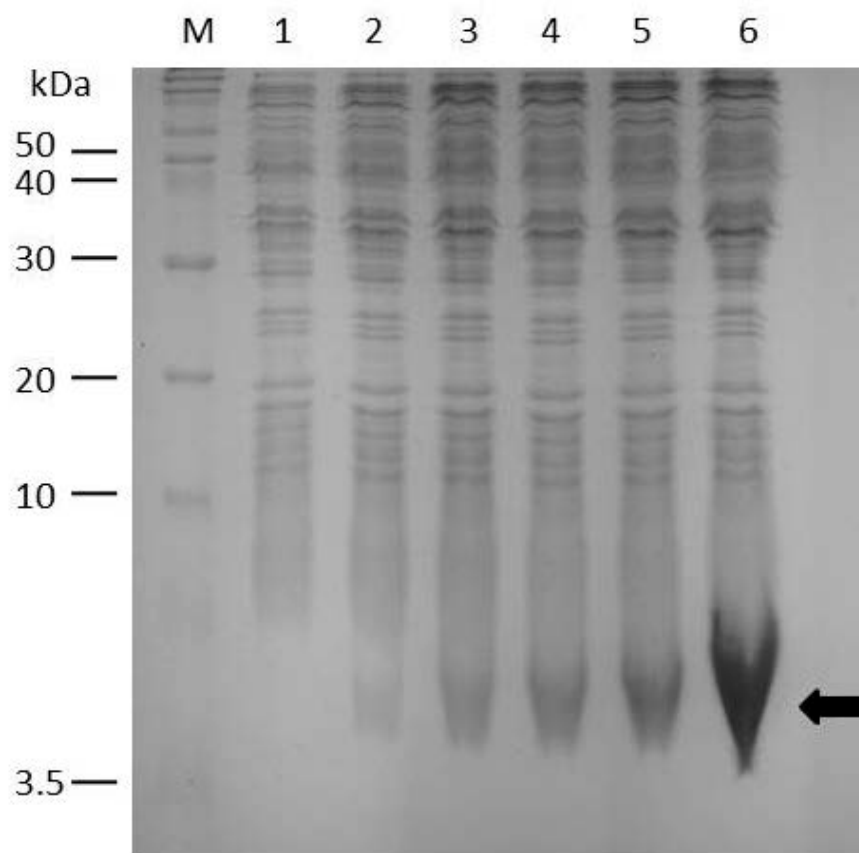
(A)

MRLWL~~LL~~VALAAV~~VPAAMP~~ASAGYFPGRPPFPRPFPRPPSRPFPRPPFPGPFPRPY~~PWR~~

(B)



รูปที่ 4.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b-bacSp (A) ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ด้านจุลชีพ bacSp ที่ได้จากปูทะเล (*Scylla paramamosain*) บริเวณที่ขีดเส้นใต้แสดง signal peptide (B) แผนภาพแสดงชิ้นส่วนของยีน bacSp ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ NotI (บริเวณที่แรเงา) และถูกเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิด pET28b โดยเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว (hexa histidine tag) (Imjongjirak et al., unpublished data)

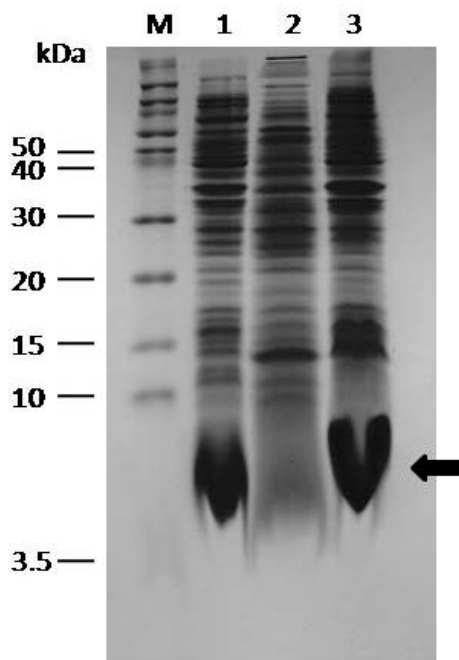


รูปที่ 4.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ bacSp เมื่อวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG บน 20% SDS-PAGE (ลูกศรแสดงตำแหน่งรีคอมบิแนนท์ bacSp)

- | | | |
|----------|---|--|
| Lane M | = | Protein marker |
| Lane 1 | = | แถบโปรตีนที่ได้จากเซลล์ <i>E. coli</i> ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG |
| Lane 2-5 | = | แถบโปรตีนที่ได้จากเซลล์ <i>E. coli</i> ที่ระยะเวลา 1-4 ชั่วโมง |
| Lane 6 | = | แถบโปรตีนที่ได้จากเซลล์ <i>E. coli</i> ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง |

4.2 การสกัดแยกรีคอมบิแนนท์ bacSp

เมื่อนำตะกอนเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์ bacSp เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง มาทำการแตกเซลล์ด้วยไลโซไซม์ และปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของโปรตีนที่ละลายน้ำ (soluble fraction) และส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion bodies) ออกจากกัน แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 5000 ดาลตัน ในส่วนของ inclusion bodies อย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp ส่วนใหญ่มีการแสดงออกอยู่ในส่วนของ inclusion bodies (รูปที่ 4.3)



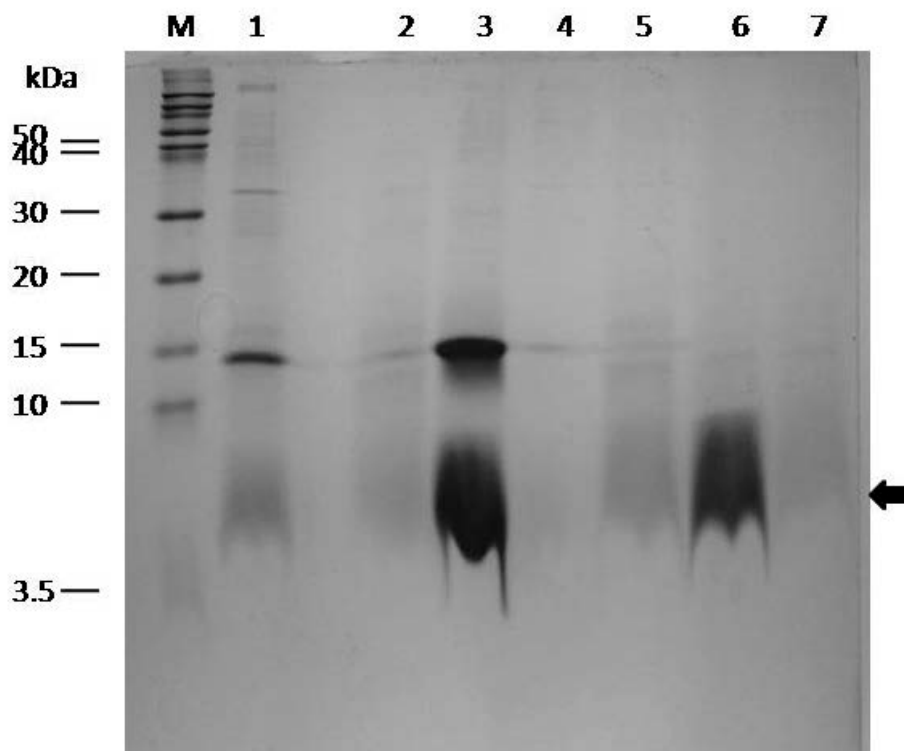
รูปที่ 4.3 แถบโปรตีนใน cell lysate ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG บน 20% SDS-PAGE (ลูกศรแสดงตำแหน่งรีคอมบิแนนท์ bacSp)

- | | | |
|--------|---|---|
| Lane M | = | Protein marker |
| Lane 1 | = | แถบโปรตีนที่ได้จากเซลล์ <i>E. coli</i> ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง |
| Lane 2 | = | cell lysate ในส่วนของ soluble fraction |
| Lane 3 | = | cell lysate ในส่วนของ inclusion bodies |

4.3 การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ bacSp

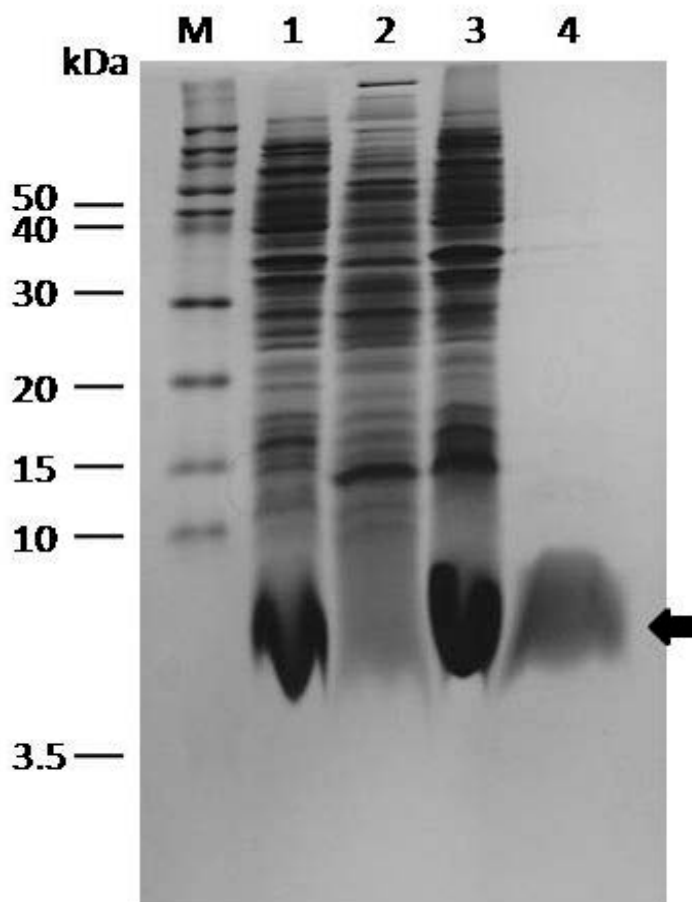
เนื่องจากรีคอมบิแนนท์ bacSp ส่วนใหญ่มีการแสดงออกอยู่ในส่วนของ inclusion bodies ดังนั้นจึงทำการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ bacSp จากส่วนของ inclusion bodies โดยนำมาละลายใน urea ที่ความเข้มข้น 8 M จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้มาแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-metal affinity column chromatography โดยอาศัยคุณสมบัติของ histidine (His-tag) ที่สามารถจับกับ Ni^{2+} ได้ เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนลงในคอลัมน์ จะทำให้โปรตีนที่มีส่วนของ histidine สามารถจับกับ Ni^{2+} ในคอลัมน์ ส่วนโปรตีนอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องจะไม่สามารถจับกับ Ni^{2+} ได้จึงหลุดออกมาจากคอลัมน์ ส่วนรีคอมบิแนนท์ bacSp จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer ซึ่งมีส่วนประกอบของ urea ที่ความเข้มข้น 8 M และ imidazole ที่ความเข้มข้น 10-250 mM โดย imidazole จะไปแทนที่ histidine ที่จับกับ Ni^{2+} ทำให้โปรตีนถูกชะหลุดออกมาจากคอลัมน์

จากการเก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์แล้วนำมาตรวจสอบแถบโปรตีนในแต่ ละแพรงค์ซ์ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์โดยนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย elution buffer ที่มี 100 mM imidazole จะปรากฏแถบของรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่มีความบริสุทธิ์อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.4) จากผลที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าสามารถแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ bacSp ได้โดยใช้ Ni-metal affinity column chromatography และเมื่อนำรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ได้ไป refolding โดยกำจัด urea และ imidazole ออกโดยการไดอะไลซิสใน 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้เข้มข้นมากขึ้น และวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วย 20% SDS-PAGE พบรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่มีขนาดประมาณ 5000 ดาลตัน (รูปที่ 4.5) และจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่แยกบริสุทธิ์โดยวิธี Bradford โดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าสามารถคำนวณความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์ bacSp ได้เท่ากับ 0.64 mg/ml โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ปริมาตร 1 ลิตร จะสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่แยกบริสุทธิ์แล้วได้เท่ากับ 3.4 mg ซึ่งจะนำรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ได้นี้ไปใช้ในการตรวจสอบสมบัติทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.4 รีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ด้วย 20% SDS-PAGE (ลูกศรแสดงตำแหน่งรีคอมบิแนนท์ bacSp)

Lane M	=	Protein marker
Lane 1	=	แถบโปรตีนที่ไม่จับกับ Ni-metal affinity column
Lane 2	=	แถบโปรตีนที่ถูกชะด้วย washing buffer
Lane 3	=	แถบโปรตีนที่ถูกชะด้วย elution buffer ที่มี 10 mM imidazole
Lane 4	=	แถบโปรตีนที่ถูกชะด้วย elution buffer ที่มี 20 mM imidazole
Lane 5	=	แถบโปรตีนที่ถูกชะด้วย elution buffer ที่มี 50 mM imidazole
Lane 6	=	แถบโปรตีนที่ถูกชะด้วย elution buffer ที่มี 100 mM imidazole
Lane 7	=	แถบโปรตีนที่ถูกชะด้วย elution buffer ที่มี 250 mM imidazole



รูปที่ 4.5 รีคอมบิแนนท์ bacSp ที่แยกบริสุทธิ์ด้วย Ni^{2+} -NTA affinity column chromatography และวิเคราะห์ด้วย 20% SDS-PAGE (ลูกศรแสดงตำแหน่งรีคอมบิแนนท์ bacSp)

- | | | |
|--------|---|---|
| Lane M | = | Protein marker |
| Lane 1 | = | แถบโปรตีนที่ได้จากเซลล์ <i>E. coli</i> ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง |
| Lane 2 | = | cell lysate ในส่วนของ soluble fraction |
| Lane 3 | = | cell lysate ในส่วนของ inclusion bodies |
| Lane 4 | = | รีคอมบิแนนท์ bacSp ที่แยกบริสุทธิ์และผ่านการ Refolding แล้ว |

4.4 การตรวจสอบสมบัติทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์สังเคราะห์ bacSp

จากการตรวจสอบ antimicrobial activity ของรีคอมบิแนนท์ bacSp ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี broth microdilution method โดยใช้สารละลายรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 22 μM นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) บนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงเมื่อตรวจสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วย microplate reader และนำสารละลายใน 96-well microtiter plate มากระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ผลที่ได้พบว่าปริมาณเชื้อที่เหลือรอดหลังจากทดสอบกับรีคอมบิแนนท์ bacSp คือ 4.09 log CFU/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุมที่พบว่ามีปริมาณเชื้ออยู่ที่ 5.12 log CFU/ml จึงแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ความเข้มข้น 22 μM สามารถลดการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้โดยสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ประมาณ 1 log CFU/ml

จากการตรวจสอบ antimicrobial activity ของเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp โดยใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp ที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.56 μM ตามลำดับนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) บนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบค่า minimal inhibitory concentration (MIC) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วย microplate reader ผลที่ได้พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC) อยู่ที่ 12.5 μM และจากการหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) คือ 12.5 μM

4.5 ผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติการต้านจุลชีพ

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อเสถียรภาพของรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp ทำได้โดยการนำเพปไทด์ต้านจุลชีพไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ 4 ระดับ ได้แก่ 30 °C, 60 °C และ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาตรวจสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพโดยใช้วิธี broth microdilution assay และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ผลที่ได้พบว่าปริมาณเชื้อที่เหลือรอดหลังจากทดสอบกับรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ แล้ว อยู่ในช่วงระหว่าง 4.09-4.33 log CFU/ml (ตารางที่ 4.1) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่พบว่ามีปริมาณเชื้ออยู่ที่ 5.12 log CFU/ml จึงแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp ยังคงมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงโดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้โดยสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ประมาณ 1 log CFU/ml

ตารางที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	Log CFU/ml
control	5.12
30 °C /30 min	4.09
60 °C /30 min	4.19
80 °C /30 min	4.33
121 °C /15 min	4.32

ส่วนเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp ที่นำมาเจือจางด้วยวิธี serial two fold dilution ให้มีความเข้มข้นในช่วง 500 – 1.56 μ M เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ 30 °C, 60 °C และ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที พบว่าค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 12.5 μ M (ตารางที่ 4.2) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp มีเสถียรภาพและยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ที่อุณหภูมิสูง

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของเพปไทด์สังเคราะห์ bacSp ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ	MIC (μM)	MBC (μM)
30 °C /30 min	12.5	12.5
60 °C /30 min	12.5	12.5
80 °C /30 min	12.5	12.5
121 °C /15 min	12.5	12.5

4.6 ผลของ pH ต่อคุณสมบัติการต้านจุลชีพ

การศึกษาผลของ pH ที่มีผลต่อเสถียรภาพของรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp ทำได้โดยการนำเพปไทด์ต้านจุลชีพไปทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Poor broth ที่ได้ทำการแปรค่า pH ที่ 6.5, 7.5 และ 9 ตรวจสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพโดยใช้วิธี broth microdilution assay และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ผลที่ได้พบว่าปริมาณเชื้อที่เหลือรอดหลังจากทดสอบกับรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ pH 6.5, 7.5 และ 9 อยู่ที่ 3.11, 3.95 และ 3.41 log CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการทดลองชุดควบคุมที่พบว่ามีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 4.54, 5.12 และ 5.06 log CFU/ml ตามลำดับ จึงแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp ยังคงมีเสถียรภาพที่ pH 6.5, 7.5 และ 9 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้โดยสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้อย่างน้อย 1 log CFU/ml

ตารางที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ pH ต่างๆ

pH	Log CFU/ml
Control, pH 6.5	4.54
pH 6.5	3.11
Control, pH 7.5	5.12
pH 7.5	3.95
Control, pH 9	5.06
pH 9	3.41

ส่วนเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp ที่นำมาเจือจางด้วยวิธี serial two fold dilution ให้มีความเข้มข้นในช่วง 500–15.6 μM เมื่อนำไปทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Poor broth ที่ได้ทำการแปรค่า pH ที่ 6.5, 7.5 และ 9 ผลที่ได้พบว่าที่ pH 6.5 และ 7.5 พบว่าค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 12.5 μM ในขณะที่ pH 9 ค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 25 μM จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์สังเคราะห์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp มีเสถียรภาพและยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ในช่วง pH 6.5-9 ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของเพปไทด์สังเคราะห์ bacSp ที่ pH ต่าง ๆ

pH	MIC (μM)	MBC (μM)
6.5	12.5	12.5
7.5	12.5	12.5
9	25	25

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากคุณสมบัติในการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จึงได้มีการนำเอาสารเพปไทด์ต้านจุลชีพมาประยุกต์ใช้ในอาหาร เพื่อช่วยชะลอการเสื่อมเสียของอาหาร ซึ่งเพปไทด์ต้านจุลชีพสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล *Scylla paramamosain* ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร โดยผลิตโปรตีนด้วยเทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ซึ่งการผลิตโปรตีนด้วยเทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเนื่องสามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ในปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) และหลักการควบคุมการแสดงออกของยีน (expression system)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ bacSp ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta™(DE3)pLysS โดยเมื่อเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนด้วย 1 mM IPTG และวิเคราะห์ผลด้วย SDS-PAGE พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์ bacSp ได้โดยพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 5000 ดาลตันซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์ bacSp และเมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้พบว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ถูกสร้างขึ้นใน *E. coli* มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อนำเซลล์ที่ได้มาทำการแตกเซลล์แล้วพบว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp ส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดอยู่ในส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ inclusion bodies ซึ่งสอดคล้องกับผลที่มีรายงานในงานวิจัยจำนวนมากที่พบว่าเมื่อเซลล์ *E. coli* มีการแสดงออกของยีนอย่างมาก (over expression) จะเกิดการรวมตัวของโปรตีนโดยอยู่ในรูปของ inclusion bodies (Choi, Keum and Lee, 2006)

มีรายงานวิจัยหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เพปไทด์ด้านจุลชีพใน *E. coli* เช่น การนำยีน Crus-likePm ในกุ้งกุลาดำมาศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL โดยใช้เวกเตอร์ pET28b และเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนโดยใช้ IPTG พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนส่วนใหญ่ถูกสร้างเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ Ni-NTA โครมาโตกราฟี และจากการตรวจสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบได้ (Amparyup et al., 2008a)

Imjongjirak และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของรีคอมบิแนนท์ CrusSp ที่ได้จากปูทะเล mud crab, *Scylla paramamosain* พบว่ารีคอมบิแนนท์ crustin ถูกสร้างเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำและทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ Ni-NTA โครมาโตกราฟีโดยรีคอมบิแนนท์ CrusSp ที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Aerococcus viridians* และ *Micrococcus luteus* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 0.625 และ 0.312 μM แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

Yedery และ Reddy (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์ Antilipopolsaccharide factor (ALF) ของปู indian mud crab ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta B (DE3) pLacI โดยพบว่าเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง รีคอมบิแนนท์โปรตีนจะถูกสร้างขึ้นและมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ และพบรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วน of inclusion bodies โดยรีคอมบิแนนท์ ALF สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 25-50 $\mu\text{g/ml}$

ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลจากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2012) ที่ได้ศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PtALF5 จาก eyestalk ของปู swimming crab, *Portunus trituberculatus* ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนผลิตขึ้นในส่วน of โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำและสะสมอยู่ในส่วน inclusion bodies และเมื่อวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูก

ผลิตขึ้นด้วย SDS-PAGE พบว่ามีขนาดของโมเลกุลใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *V. alginolyticus* และ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อราได้

อย่างไรก็ตามการที่โปรตีนส่วนใหญ่อยู่รวมกันในลักษณะของ inclusion bodies ในส่วนของ insoluble fraction ที่เดียวนั้นมีข้อดีเนื่องจากทำให้ง่ายต่อกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยเมื่อนำรีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Ni²⁺-NTAaffinity column chromatography โดยอาศัยคุณสมบัติของ His-tag ที่ติดอยู่กับรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งมักเกิดจะจับอยู่กับกรดอะมิโนฮิสทีดีนที่ปลายด้าน N-terminal ของโปรตีน ส่งผลให้โปรตีนอื่นๆ ที่ไม่จำเพาะหลุดออกมา จากนั้นเมื่อชะล้างคอลัมน์ด้วย elution buffer ที่มี imidazole ซึ่งจะเข้าไปจับกับคอลัมน์แทนกรดอะมิโนฮิสทีดีนของโปรตีนจึงทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนหลุดออกและมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacS p มาทำการศึกษสมบัติทางชีวภาพในเบื้องต้นพบว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร *V. parahaemolyticus* จากข้อมูลการศึกษาเพปไทด์ต้านจุลชีพในปูทะเลในประเทศไทย พบยีนของเพปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดในเลือดของปูทะเล และมีเพปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Vibrios ได้

Imjongjirak และคณะ (2007, 2011a, 2011b) ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ Antilipopolysaccharide factor (ALFSp, ALFSp2) และ Arasin-likeSp ที่พบในปูทะเล mud crab, *Scylla paramamosain* โดยพบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ของเพปไทด์เหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *V. harveyi* และ *V. anguillarum* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.39-25 μ M

จากรายงานวิจัยของ Morin และคณะ (2005) ที่ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของรีคอมบิแนนท์ indolicidin เปรียบเทียบกับเพปไทด์สังเคราะห์ indolicidin พบว่าค่า MIC และ MBC มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยค่า MIC ของเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่ 2 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MBC อยู่ที่ 6 $\mu\text{g/ml}$ เท่ากัน และค่า MIC ของเชื้อ *B. cereus* อยู่ที่ 4 และ 2 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MBC อยู่ที่ 6 และ 4 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยของ Wei และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของรีคอมบิแนนท์ Hal18 เทียบกับเพปไทด์สังเคราะห์ Hal18 โดยพบว่าค่า MIC ของเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ 20 และ 5 mM และค่า MIC ของเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่ 10 และ 1.25 mM ตามลำดับ

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์ด้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp มาตรวจสอบเสถียรภาพที่อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ต่อคุณสมบัติการด้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่ารีคอมบิแนนท์ bacSp มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ดี (121 °C, 15 นาที) และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นด่างได้ (pH 9) เช่นเดียวกับกับเพปไทด์ด้านจุลชีพสังเคราะห์ และความเสถียรของเพปไทด์ด้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp ต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าที่ pH 9 ค่า MIC และ MBC มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยมีค่าอยู่ที่ 25 μM

Wu และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาความคงทนต่ออุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างของเพปไทด์ด้านจุลชีพ Subpeptin JM4-A และ Subpeptin JM4-B ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* JM4 โดยได้นำเพปไทด์จุลชีพมาทดสอบที่อุณหภูมิในช่วง 20-120 °C เป็นเวลา 30 นาที และที่ pH ในช่วง 2-12 จากผลการศึกษาพบว่าเพปไทด์ด้านจุลชีพทั้งสองชนิดนี้ความเสถียรคงเดิมที่อุณหภูมิ 20-100 °C แต่ที่อุณหภูมิ 120 °C นั้นพบว่ามีความเสถียรลดลง 50% ความเสถียรของเพปไทด์ด้านจุลชีพทั้งสองชนิดนี้ต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่ามีความเสถียรอยู่ที่ pH 2-10 ได้ดี แต่ที่ค่า pH สูงกว่า 10 ขึ้นไปพบว่ามีความเสถียรลดลง

Mkrtchyan และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของเพปไทด์ต้านจุลชีพ acidocin LCHV ซึ่งเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine โดยศึกษาถึงความเสถียรของเพปไทด์ต้านจุลชีพต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง ผลที่ได้พบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ acidocin LCHV สามารถทนความร้อน

ความสามารถในการคงประสิทธิภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพในการทนความร้อนและทนต่อความเป็นกรด-ด่างซึ่งพบได้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ทำให้เพปไทด์ต้านจุลชีพมีความเหมาะสมและน่าสนใจสำหรับการนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารที่มีศักยภาพในการเพิ่มความปลอดภัยของอาหาร และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้ เช่น เพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดมีความสำคัญต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Xiraphi et al., 2008) ได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนเพปไทด์ต้านจุลชีพ bacSp ได้ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta™(DE3)pLysS
2. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์ bacSp โดยการเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง
3. รีคอมบิแนนท์โปรตีนส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดอยู่ในส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion bodies)
4. สามารถแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ bacSp ได้ด้วย Ni²⁺-NTA โครมาโตกราฟี โดยรีคอมบิแนนท์ bacSp ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer ที่มี 100 mM imidazole และมีความบริสุทธิ์อย่างชัดเจนเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE
5. สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ bacSp บริสุทธิ์ได้เท่ากับ 3.4 mg จากการเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ปริมาตร 1 ลิตร
6. รีคอมบิแนนท์ bacSp ที่ความเข้มข้น 22 µM สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ลงได้ประมาณ 1 log CFU/ml
7. เพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 12.5 µM
8. รีคอมบิแนนท์ bacSp และเพปไทด์ต้านจุลชีพสังเคราะห์ bacSp มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง (121 °C, 15 นาที) และที่ pH 6.5, 7.5 และ 9

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ณัฐพันธ์ ศุภกา. 2555. แบคทีเรียโอซินสังเคราะห์จากธรรมชาติสำหรับการถนอมอาหารเพื่อสุขภาพ.

Innomag 39 (223): 28-32.

รุ่งโรจน์ ศรีรักษา, ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม, อนุชิต มุ่งงาม และ เกษรินทร์ ศักดิ์วัฒนกุล. 2010. ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและคุณสมบัติการทนความร้อนของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากคีเฟอร์. โครงการประชุมวิชาการ เรื่อง ความงามตามธรรมชาติและสุขภาพดีผ่านวิถีวิทยาศาสตร์ หน้า 231-235.

สรศักดิ์ อินทรสุด. 2556. เปปไทด์ต้านจุลชีพ: โปรตีนจากธรรมชาติกับการประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อในอนาคต. Bulletin Chiang Mai Associated Medical Sciences 46.

อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. 2550. แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก (Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria) วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 23, 2:45-160.

ภาษาอังกฤษ

Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2008a. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Molecular Immunology 45: 1085-1093.

Amparyup, P., Donpuksa, S. and Tassanakajon, A. 2008b. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibit proteinase inhibitory and antimicrobial activities. Development and Comparative Immunology 32: 1497-1509.

- Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B. and Chavanieu, A. 1996. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. European Journal of Biochemistry 237: 575-583.
- Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S. and Warr, G.W. 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus Vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. Marine Biotechnology 4: 278-293.
- Boman, H.G. 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. Cell 65: 205-207.
- Brogden, K.A., Ackermann, M., McCray, P.B., Jr. and Tack, B.F. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. International Journal of Antimicrobial Agents 22: 465-478.
- Brogden, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. Nature Reviews 3: 238-250.
- Bulet, P., Dimarcq, J.L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A. and Hoffmann, J.A. 1993. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. Journal of Biochemistry 268: 14893-14897.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L. and Hoffmann, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects, structure and function. Development and Comparative Immunology 23: 329-344.
- Casteel, P., Ampe, C., Vaeck, M. and Tempst, P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybee. EMBO Journal 8: 2387-2391.

- Cézard, C., Silva-Pires, V., Mullié, C. and Sonnet, P. 2011. Antibacterial peptides: A review. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances pp. 926-937.
- Choi, J.H., Keum, K.C. and Lee, S.Y. 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chemical Engineering Science 61: 876-885.
- De la Vega, E., O' Leary, N.A., Shockey, J.E., Robalino, J., Payne, C., Browdy, C.L., Warr, G.W. and Grass, P.S. 2008. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. Molecular Immunology 45:1916-1925.
- Demain, A.L. and Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology Advances 27: 297-306.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsseleer, A., Rodriguez, J. and Bachère, E/ 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). Journal of Biochemistry 272: 28398-28406.
- Dimarcq, J.L., Bulet, P., Hetru, C. and Hoffmann, J. 1998. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. Biopolymers 47: 465-478.
- Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K. and Widdicombe, S. 2011. Immunological function in marine invertebrates: Response to environmental perturbation. Fish & Shellfish Immunology 30: 1209-1222.

- Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S. and Manzanares, P. 2007. Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. International Journal of Food Microbiology 118: 318-325.
- Fagundes, P.C., Ceotto, H., Potter, A., de Paiva Brito, M.A.V., Brede, D., Nes, I.F. and de Frire Bastos, M.C. 2011. Hyicin 3682, a bioactive peptide produced by *Staphylococcus hyicin* 3682 with potential applications for food preservation. Research in Microbiology 162: 1052-1059.
- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W. and Warr, G.W. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. Development and Comparative Immunology 25: 565-577.
- Hajji, M., Jellouli, K. Hmidet, N., Balti, R., Sellami-Kamoun, A. Nasri, M. 2010. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 37: 805–813.
- Hancock, R.E.W. and Lehrer, R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends Biotechnol 16: 82-88.
- Hara, S. and Yamakawa, M. 1995. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Biological Chemistry 270: 29923-29927.
- He, X.S., Bruekner, R. and Doi, R.H. 1991. The protease gene of *Bacillus subtilis*. Research in Microbiology 142: 797-803.

- Helmerhorst, E.J., Breeuwer, P., van't Hof, W., Wetering, E.W., Oomen, L.C., Veerman, E.C.I., Nieuw Amerongen, A.V. and Abee, T. 1999. The cellular target of histatin5 on *Candida albicans* is the energized mitochondria. Journal of Biological Chemistry 274: 7286-7291.
- Hoffmann, J.A. 1995. Innate immunity of insects. Current Opinion in Immunology 7: 4-10.
- Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A. and Sittipraneed, S. 2007. Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: Molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain. Molecular Immunology 44: 3195-3203.
- Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A. and Sittipraneed, S. 2009. Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. Molecular Biological Reports 36: 841-850.
- Imjongjirak, C., Amparyup, P. and Tassanakajon, A. 2011a. Molecular cloning, genomic organization and antibacterial activity of a second isoform of antilipopolysaccharide factor (ALF) from the mud crab, *Scylla paramamosain*. Fish & Shellfish Immunology 30: 58-66.
- Imjongjirak, C., Amparyup, P. and Tassanakajon, A. 2011b. Two novel antimicrobial peptides, arasin-like Sp and GRP Sp , from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria. Fish & Shellfish Immunology 30: 706-712.
- Jones, B.L. and Mak, A.S. 1983. The amino-acid sequence of a purothionin from *Triticum monococcum*, a diploid wheat. European Journal of Biochemistry 133: 621-625.

- Khoo, L., Robinette, D.W. and Noga, E.J. 1999. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, Hemocytes. Marine Biotechnology 1: 44-51.
- Knight, P. 1991. Baculovirus vectors for making proteins in insect cell. ASM News 57: 567-570.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lee, J.V. 1990. Vibrio, Aeromonas and Plesiomonas In: Parker, M.T. and Duerden, B.I.(eds.). Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th ed. Vol. II, pp. 514-527. Philadelphia: B.C. Decker.
- Lee, J.Y., Yang, S.T., Kim, H.J., Lee, S.K., Jung, H.H., Shin, S.Y. and Kim, J.I. 2009. Different modes of antibiotic action of homodimeric and monodimeric bactenecin, a cathelicidin-derived antibacterial peptide. BMP reports pp. 586-592.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y. and Su, Z. 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. Peptides 37: 207-215.
- Liu, Y., Cui, Z., Li, X., Song, C., Li, Q. and Wang, S. 2012. Molecular cloning, expression pattern and antimicrobial activity of a new isoform of anti-lipopolysaccharide factor from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. Fish & Shellfish Immunology 33: 85-91.

- Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F. 1982. Molecular cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, New York, USA.
- Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E. and Mergaert, P. 2011. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. Research in Microbiology 162: 363-374.
- Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Fujii, N., Miyajima, K., Yamada, K., Kirono, Y. and Anzai, K. 1997. Membrane permeabilization mechanism of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin 1, and its linear analog. Biochemistry 36: 9799-9806.
- Mkrtychyan, H., Gibbon, S., Heidelberger, S., Zloh, M. and Limaki, H.K. 2010. Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine. International Journal of antimicrobial agents 35: 255-260.
- Morin, K.M., Arcidiacono, S., Beckwitt, R. and Mello, C.M. 2005. Recombinant expression of indolicidin concatamers in *Escherichia coli*. Applied Genetic and Molecular Biotechnology
- Mu, C., Zheng, P., Wang, L., Zhang, H., Qiu, L., Gai, Y. and Song, L. 2010. Molecular characterization and expression of a crustin-like gene from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Development and Comparative Immunology 34: 734-740.
- Mu, C., Zheng, P., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H., Gai, Y. and Song, L. 2011. A novel type III crustin (CrusEs2) identified from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Fish & Shellfish Immunology 31: 142-147.

- Noga, E.J., Stone, K.L., Wood, A., Gordon, W.L. and Robinette, D. 2011. Primary structure and cellular localization of callinectin, an antimicrobial peptide from the blue crab. Development and Comparative Immunology 35: 409-415.
- Odell, E.W., Sarra, R., Foxworthy, M., Chapple, D.S. and Evans, R.W. 1996. Antibacterial activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. FEBS Letters 382: 175-178.
- Onaizi, S.A. and Leong, S.J. 2011. Tethering antimicrobial peptides: Current status and potential challenges. Biotechnology Advances 29: 67-74.
- Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. Biotechnology Advances 21: 465-499.
- Pelegriani, P.B., Sarto, R.P., Silva, O.N., Franco, O.L. and Grossi-de-Sa, M.F. 2011. Antimicrobial peptides from plants: What they are and how they probably work. Biochemistry Research International
- Raj, P.A. and Edgerton, M. 1995. Functional domain and poly-L-proline II conformation for candidacidal activity of bactenecin 5. FEBS Letters 368: 526-530.
- Rattanachai, A., Hirono, I., Ohira, T., Takahashi, Y. and Aoki, T. 2004. Cloning of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicas* crustin-like peptide cDNA and analysis of its expression. Fisheries Science 70: 765-771.
- Relf, J.M., Chisholm, J.R.S., Kemp, G.D. and Smith, V.J. 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5 kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenus*. European Journal of Biochemistry 264: 350-357.

- Rosa, R.D. and Barracco, M.A. 2010. Antimicrobial peptides in crustaceans. ISJ 7: 262-284.
- Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Engström Å. And Hultmark, D. 1991. The *andropin* gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. EMBO Journal 10: 163-169.
- Schnapp, D., Kemp, G.D. and Smith, V.J. 1996. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. European Journal of Biochemistry 240: 532-539.
- Scocchi, M., Romeo, D. and Zanetti, M. 1994. Molecular cloning of Bac-7, a proline- and arginine-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. FEBS Letters 352: 197-200.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P., De Bolle, M.F. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry 46: 941-950.
- Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W. and Cullor, J.J. 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. Journal of Biological Chemistry 267: 4292-4295.
- Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Guengen, Y., Boze, H., Moulin, G. and Bachère, E. 2005. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Development and Comparative Immunology 29: 841-851.

- Sperstad, S.V., Haug, T., Vasskog, T. and Stensvåg, K. 2009. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. Molecular Immunology 46: 2604-2612.
- Stenvåg, K., Haug, T., Sperstad, S.V., Rekdal, Ø., Bård, I. and Styrvold, O.B. 2008. Arasin-1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. Development and Comparative Immunology 32: 275-285.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods in Enzymology 185: 60-89.
- Su, Y.C. and Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiology 24: 549-558.
- Supungal, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Jitrapakdee, S., Hirano, I. and Aoki, T. 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Marine Biotechnology (NY) 4: 487-494.
- Supungal, P., Tang, S., Maneeruttanarungroj, C., Rimphanitchayakit, V., Hirano, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2008. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Development and Comparative Immunology 32: 61-70.
- Swartz, J.R. *Escherichia coli* recombinant DNA technology. 1996. In: Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. Washington DC. American Society of Microbiology Press. p. 1693-1711.

- Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbiology and Biotechnology 72: 211-223.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J. and Lehrer, R.I. 1998. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42: 2206-2214.
- Vizioli, J. and Salzet, M. 2002. Antimicrobial peptides from animal: focus on invertebrates. Trends in Pharmacological Sciences 23: 494-496.
- Wang, K.J., Huang, W.S., Yang, M., Chen, H.Y., Bo, J., Li, S.J. and Wang, G.Z. 2007. A male-specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, scygonadin, in *Scylla serrate*. Molecular Immunology 44: 1961-1968.
- Wang, L., Zhang, Y., Wang, L., Yang, J., Zhou, Z., Gai, Y., Qiu, L. and Song, L. 2011. A new anti-lipopolysaccharide afctor (*EsALF-3*) from *Eriocheir sinensis* with antimicrobial activity. African Journal of Biotechnology 10: 17678-17689.
- Wei, Q., Kim, Y.S., Seo, J.H., Jang, W.S., Lee, I.H. and Cha, H.J. 2005. Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculvoviral polyhrdrin in *Escherichia coli*. Applied and Enviromental Microbiology 71: 5038-5043.
- White, S.H., Wimley, W.C. and Selsted, M.E. 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. Current Opinion in Structural Biology 5: 521-527.

- Wu, S., Jia, S., Sun, D., Chen, M., Chen, Z., Zhong, J. and Huan, L. 2005. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. Current Microbiology 51: 292-296.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E. and Drosinos, E.H. 2008. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. Meat Science 80: 194-203.
- Yedery, R.D. and Reddy, K.R. 2009. Identification, cloning, characterization and recombinant expression of an anti-lipopolysaccharide factor from the hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. Fish & Shellfish Immunology 27: 275-284.
- Yue, F., Pan, L., Miao, J., Zhang, L. and Li, J. 2010. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of two antibacterial peptides: Crustin and anti-lipopolysaccharide factor in swimming crab *Portunus trituberculatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 156:77-85.
- Zanetti, M., Gennero, R. and Romeo, D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. FEBS Letters 374: 1-5.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria Bertani (LB) Agar

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 นำไปต้มให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Luria Bertani (LB) Broth

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 นำไปต้มให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3. Poor Broth (PB)

Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 นำไปต้มให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

4. Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) Agar (HIMEDIA)

TCBS agar	89	g
-----------	----	---

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. Tryptic Soy Broth (TSB) (HIMEDIA)

Tryptic soy broth	30	g
-------------------	----	---

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml นำไปต้มให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

1.1 50 mg/ml Kanamycin

ชั่งkanamycin 0.05 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่
อุณหภูมิ -20 °C

1.2 1 M Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

ชั่งIPTG 0.238 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่
อุณหภูมิ -20 °C

2. สารละลายสำหรับ Lysis buffer

2.1 10 mg/ml Lysozyme

ชั่งlysozyme 0.01 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่
อุณหภูมิ -20 °C

2.2 1 mg/ml DNase

ชั่งDNase 0.001 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่
อุณหภูมิ -20 °C

2.3 Tris EDTA

ผสมสารละลาย 10 mM Tris-HCl และสารละลาย 1 mM EDTA โดยละลาย Tris-HCl 0.12 g ในน้ำกลั่น และเติมสารละลาย 0.5 M EDTA 1 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 จากนั้น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 ml

3. สารละลายสำหรับการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน

3.1 10 mM imidazole Elution buffer

Urea	96.096	g
Sodium dihydrogen phosphate	1.38	g
Sodium chloride	3.508	g
Imidazole	0.136	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 200 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH

3.2 20 mM imidazole Elution buffer

Urea	96.096	g
Sodium dihydrogen phosphate	1.38	g
Sodium chloride	3.508	g
Imidazole	0.272	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 200 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH

3.3 50 mM imidazole Elution buffer

Urea	96.096	g
Sodium dihydrogen phosphate	1.38	g
Sodium chloride	3.508	g
Imidazole	0.681	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 200 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH

3.4 100 mM imidazole Elution buffer

Urea	96.096	g
Sodium dihydrogen phosphate	1.38	g
Sodium chloride	3.508	g
Imidazole	1.361	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 200 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH

3.5 250 mM imidazole Elution buffer

Urea	96.096	g
Sodium dihydrogen phosphate	1.38	g
Sodium chloride	3.508	g
Imidazole	3.4	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 200 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH

3.6 Dialysis buffer

Tris base	2.4	g
-----------	-----	---

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH

4. สารละลายสำหรับ SDS-PAGE

4.1 2 M Tris-HCl, pH 8.8

ชั่ง Tris base 24.2 g ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ด้วย HCl จากนั้นปรับ

ปริมาตรจนครบ 100 ml

4.2 1M Tris-HCl, pH 6.8

ซึ่ง Tris base 12.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ด้วย HCl จากนั้นปรับ ปริมาตรจนครบ 100 ml

4.3 10% SDS

ซึ่ง SDS 10 g ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 ml

4.4 1% bromophenol blue

ซึ่ง bromophenol blue 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่น คนจนกระทั่งละลายหมดปรับ ปริมาตรจนครบ 10 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4.5 10% ammonium persulfate

ซึ่ง ammonium persulfate 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1 ml เขย่า ให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

4.6 1 M Dithiothreitol (DTT)

ซึ่ง DTT 0.1542 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บที่ อุณหภูมิ -20°C

4.7 Working solution A

เตรียม 30% acrylamide และ 0.8% bis-acrylamide โดยซึ่ง acrylamide 29.2 g และ bis-acrylamide 0.8 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตร 100 ml เก็บที่ 4°C

4.8 Working solution B

2 M Tris-HCl	75	ml
10% SDS	4	ml
น้ำกลั่น	21	ml

4.9 Working solution C

1 M Tris-HCl	50	ml
10% SDS	4	ml
น้ำกลั่น	46	ml

4.10 2X Sample buffer (10 ml)

1 M Tris-HCl	0.9	ml
10% glycerol	2	ml
10% SDS	2	ml
0.1% bromophenol blue	2	ml
1M DTT	1	ml
น้ำกลั่น	21	ml

4.11 10X Running buffer

Tris	30	g
Glycine	144	g
SDS	10	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml เมื่อนำไปใช้ให้เจือจางในระดับความ

เข้มข้น 1:10 (1X)

4.12 Staining solution

Coomassie Brilliant Blue R-250	1	g
Methanol	450	ml
Glacial acetic acid	100	ml
น้ำกลั่น	450	ml

4.13 Destain solution

Methanol	100	ml
Glacial acetic acid	100	ml
น้ำกลั่น	800	ml

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

1. การเตรียม 20% Separating gel

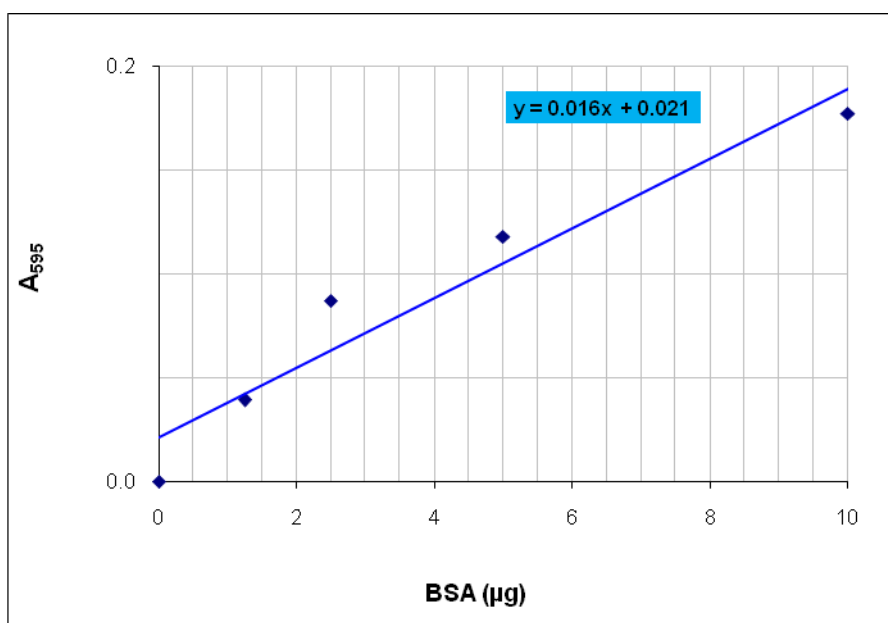
Working solution A	6.7	ml
Working solution B	2.5	ml
น้ำกลั่น	0.8	ml
10% ammonium persulphate	50	μ l
TEMED	5	μ l

2. การเตรียม 5% Stacking gel

Working solution A	0.67	ml
Working solution C	1	ml
น้ำกลั่น	2.3	ml
10% ammonium persulphate	30	μ l
TEMED	5	μ l

ภาคผนวก ง

กราฟโปรตีนมาตรฐานเพื่อเทียบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford



รูปที่ ง.1 กราฟโปรตีนมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนได้จากสูตร

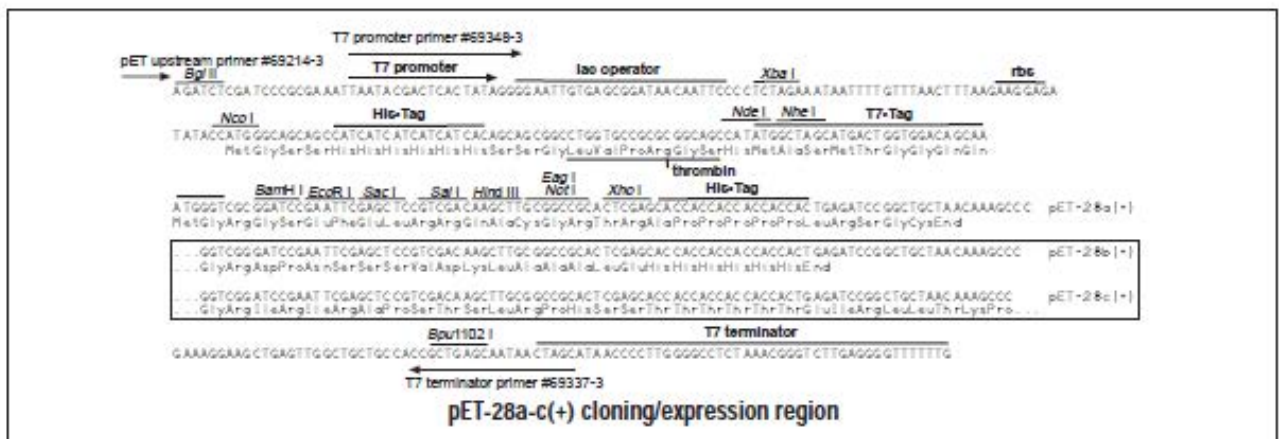
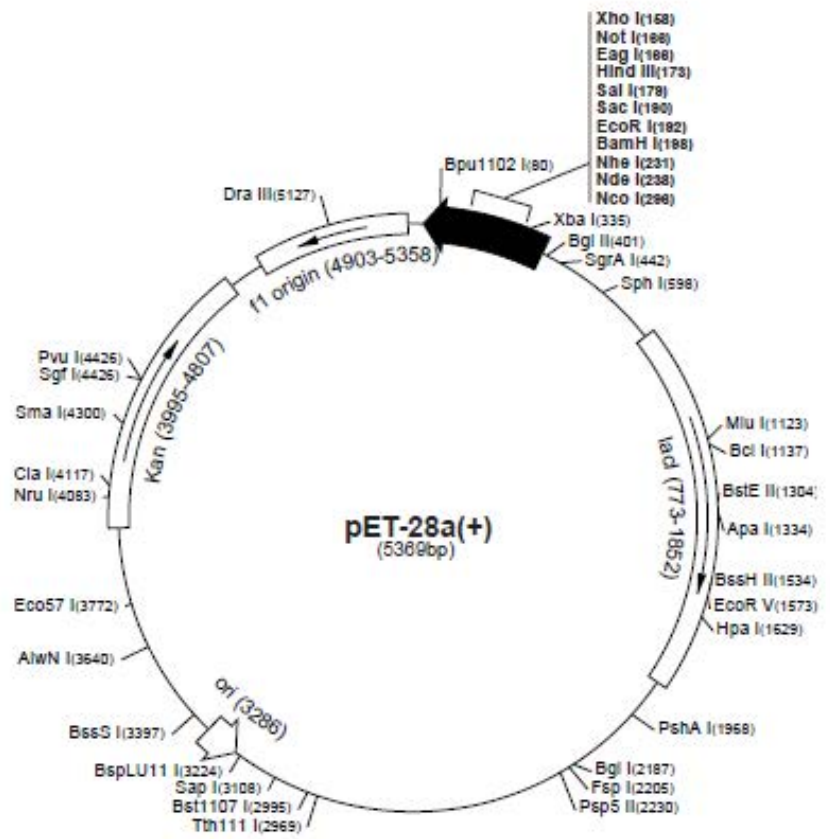
ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) = (ค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร - 0.021)/0.016

ภาคผนวก จ

Restriction Map of pET28(b)

pET-28a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His*Tag coding sequence	270-287
T7*Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปวันรัตน์ อ่ำไพพันธุ์ เกิดเมื่อวันที่ 21 ธันวาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

การนำเสนอผลงานวิชาการ

ปวันรัตน์ อ่ำไพพันธุ์, จันทรประภา อิมจงใจรัก. 2556. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเพปไทด์ต้านจุลชีพ bactenecin-likeSp. การประชุมเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 27. ใน การประชุมเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 27 (ภาคโปสเตอร์). วันที่ 28 กุมภาพันธ์-1 มีนาคม 2556 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.