การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน Shrimp Ovarian Peritrophin Domain A (SOP-A) จาก *Fenneropenaeus merguiensis*

Characterization of the Shrimp Ovarian Peritrophin Domain A (SOP A) protein from *Fenneropenaeus merguiensis*

สุจรรยา อนุชาญ

Sujunya Anuchan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Molecular Biology and Bioinformatics
Prince of Songkla University
2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน Shrimp Ovarian Peritrophin Domain A (SOP-A) จาก *Fenneropenaeus merguiensis*

ผู้เขียน นางสาวสุจรรยา อนุชาญ

สาขาวิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

.....กรรมการ

(ดร.สุดารัตน์ กรึงไกร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวสุจรรยา อนุชาญ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุจรรยา อนุชาญ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน Shrimp Ovarian Peritrophin Domain A (SOP-A) จาก *Fenneropenaeus merguiensis*
ผู้เขียน นางสาวสุจรรยา อนุชาญ
สาขาวิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

Shrimp Ovarian Peritrophin (SOP) เป็นโปรตีนที่พบจำนวนมากใน cortical rod คาดว่าทำหน้าที่ในการป้องกันไข่กุ้งจากสิ่งอันตรายภายนอกทันทีหลังจากที่กุ้งวางไข่ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *SOP* ของกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguiensis*) ประกอบด้วย domain A จะเริ่มตั้งแต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-80 ซึ่งจะประกอบด้วยกรดอะมิโน cysteine จำนวนมากและเป็นลักษณะสำคัญที่พบในเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) หลายชนิด domain B ประกอบด้วยกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 81-329 ของยีน *Fm-SOP* นอกจากนั้นได้โคลนยีนบริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 182-275 เรียกว่า SOP-B1 ซึ่งจะเป็นส่วน chitin binding sequence ของ *Fm-SOP* การทดลองนี้ได้ทำการผลิตโปรตีนลูกผสม SOP-A พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาด 9 kDa โปรตีนลูกผสม SOP-B และ SOP-B1 มีขนาด 38.5 และ 18.0 kDa ตามลำดับ และโปรตีนลูกผสม *Fm*-SOP (Full length) มีขนาด 37 kDa หลังจากนั้นนำโปรตีน SOP-A ไปทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลชีพด้วยวิธี liquid growth inhibition assay พบว่าโปรตีน SOP-A มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Vibrio harveyi, Candida albicans* และ *Fusarium oxysporum* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration) เท่ากับ 3.8, 31.1, 31.1, 63.3 และ 1.6 μM ตามลำดับและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration) เท่ากับ 3.8, 63.3, 31.1, 63.3 และ 1.6 μM ตามลำดับ และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 พบว่ามีความสามารถในการทำให้ *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutinate) และมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ไคติเนสโดยจากการหาค่า chitinase activity ของโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 พบว่า 1 หน่วยของเอนไซม์ไคติเนสมีความสามารถเปลี่ยน colloidal chitin เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว มีค่าเท่ากับ 0.48, 7.64, 6.22 และ 3.50 units/mg protein นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสพบว่าเอนไซม์ trypsin ถูกยับยั้งด้วยโปรตีน SOP-A และ โปรตีน SOP-B1 เอนไซม์ chymotrypsin ถูกยับยั้ง

ด้วยโปรตีน SOP-B และ โปรตีน SOP-B1 และเอนไซม์ subtilisin A ถูกยับยั้งด้วยโปรตีน *Fm*-SOP และ SOP-B จากการศึกษาความคงตัวของโปรตีน SOP-A พบว่าโปรตีน SOP-A มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. aureus* ลดลงเมื่อบ่มโปรตีนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

Thesis Title	Characterization of the Shrimp Ovarian Peritrophin Domain A (SOP-A) protein from *Fenneropenaeus merguiensis*.
Author	Miss Sujunya Anuchan
Major Program	Molecular Biology and Bioinformatics
Academic Year	2013

ABSTRACT

Shrimp ovarian peritrophin (SOP), a major protein in cortical rods, plays a role in egg protection after spawning. In previous study, sequence of *SOP* gene from *Fenneropenaeus merguiensis* (*Fm-SOP*) was composed of domain A and domain B. The *SOP* domain A contains amino acid sequences between 1-80 of *Fm*-SOP. The domain A had six conserved cysteines which have been found in many antimicrobial peptides. The *SOP* domain B contains amino acid sequences between 81-329 of *Fm-SOP*. The chitin binding domain was between 182-275 of *Fm-SOP* (*SOP-B1*). SOP-A, SOP-B, SOP-B1 and *Fm*-SOP recombinant proteins were produced in this study. The molecular weight of purified SOP-A, SOP-B, SOP-B1 and *Fm*-SOP were about 9, 38.5, 18 and 37 kDa, respectively. Antimicrobial activity of SOP-A protein was investigated by liquid growth inhibition assay. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of SOP-A against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli, Vibrio harveyi, Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* were 3.8, 31.1, 31.1, 63.3 and 1.6 μM, respectively. Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of SOP-A against *S. aureus*, *E. coli, V. harveyi, C. albicans* and *F. oxysporum* were 3.8, 63.3, 31.1, 63.3 and 1.6 μM, respectively. Four purified proteins were able to agglutinate *V. harveyi in vitro* and displayed a chitinase activity. The purified protein also displayed proteinase inhibitory activity. Trypsin was inhibited by SOP-A and SOP-B1 while chymotrypsin was inhibited by SOP-B and SOP-B1. In addition subtilisin A was inhibited by *Fm*-SOP and SOP-B. Moreover, the stability of SOP-A protein was tested and its antimicrobial activity decrease after incubation at 50 °C for 5 h.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ในการให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ ด้านการค้นคว้าข้อมูล การทำวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ รวมไปถึงคำแนะนำเกี่ยวกับการใช้ชีวิตในระหว่างการศึกษา ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย รวมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ดร. สุดารัตน์ กรึงไกร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย รวมถึงทุนสนับสนุนนักศึกษาระดับบัณฑิต ทุนผู้ช่วยสอน (TA) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ นายเจือ อนุชาญ และคุณแม่ นางเฟื้อ อนุชาญ และพี่ๆ สมาชิกในครอบครัวทุกท่านสำหรับการสนับสนุนและเป็นกำลังใจสำคัญในการศึกษาตลอดมา ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน สำหรับความรู้ที่ท่านถ่ายทอดมาให้ ขอขอบพระคุณ พี่ตั๊ก ปัญชลิกา, พี่ซายน์ รภัทภร และ พี่หลิง มลวดี ที่ช่วยสอนเทคนิคในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอบคุณสมาชิกห้อง Lab BT310 ทุกๆท่าน สำหรับคำแนะนำ ความช่วยเหลือและกำลังใจทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ในที่นี้สำหรับมิตรภาพและกำลังใจที่มีให้เสมอมา

สุจรรยา อนุชาญ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	27
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	28
วัสดุ	28
อุปกรณ์	31
วิธีการ	32
3. ผลการทดลอง	39
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	46
5. สรุป และข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	61
ประวัติผู้เขียน	68

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	9
2.	ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ	19
3.	ส่วนประกอบของโพลิอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)	33
4.	ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลชีพ	35
5.	ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของโปรตีน SOP-A	40
6.	ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของโปรตีน SOP-A เมื่อบ่มที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกับเชื้อ *S. aureus*	45
7.	ค่า MIC ของโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1	47

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	ตำแหน่งของ Domain A และ Domain B บนลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Shrimp Ovarian Peritrophin	2
2.	ข้อมูลการ Alignment ของ deduced amino acid sequence ของ *Fm*-SOP (no. AY775291) กับ SOP sequences อื่น ๆ	6
3.	การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST-SOP-A ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 และการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE	39
4.	ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้แบคทีเรีย *V. harveyi* เกิด agglutination	41
5.	ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส	43

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

APS	=	ammonium persulfate
µl	=	microlitre
µg	=	microgram
%	=	percent
β	=	beta
bp	=	base pair
BSA	=	Bovine serum albumin
cfu	=	colony-forming unit
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
GST	=	Glutathione-s-transferase
kDa	=	kilodalton
LB	=	Luria Bertaini
mg	=	milligram
min	=	minute(s)
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
M	=	Molar
MH	=	Mueller Hinton
nm	=	nanometer
OD	=	optical density
PBS	=	phosphate buffer saline
pH	=	-Log hydrogen ion concentration
rpm	=	revolutions per minute
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N,N,N',N'-tetrametyl-ethylenediamine
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethyl) aminoethane hydrochloric acid

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

U	=	unit (s)
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume

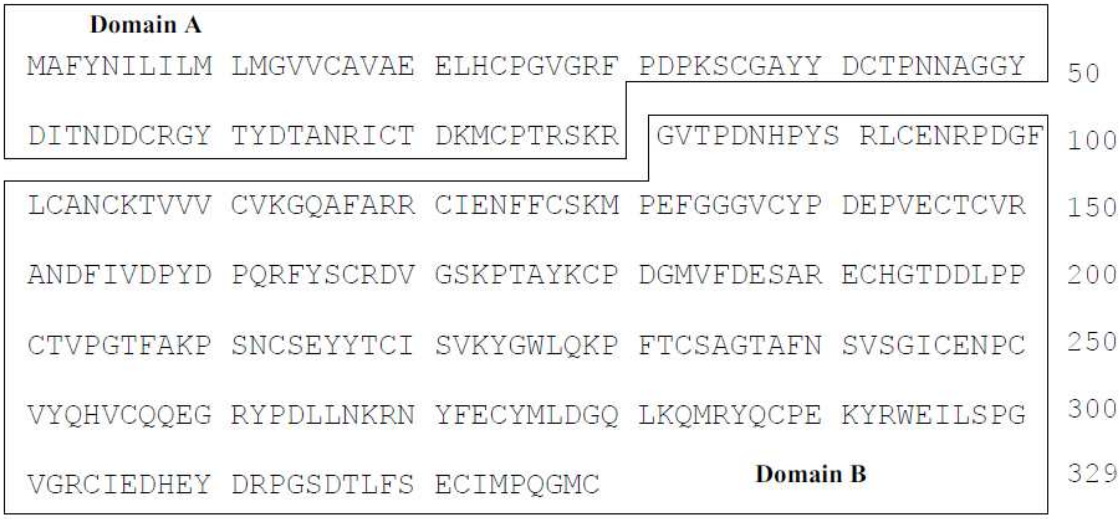
บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เปปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptide, AMPs) เป็นเปปไทด์ที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติสามารถต่อต้านการติดเชื้อได้ โดยทั่วไป AMPs จะมีขนาดเล็กและสามารถยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัสได้ (ปิติ, 2551) AMPs ที่ค้นพบส่วนใหญ่เป็น cysteine-rich AMPs ซึ่งจะพบมากในพวก arthropods และ invertebrates (Dimarcq *et al*., 1998) ในสัตว์จำพวกกุ้งซึ่งไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immune system ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจะเป็นแบบ innate cellular และ humoral immune responses (Bachere, 2000) การสร้าง AMPs จึงเป็นกลไกหนึ่งที่กุ้งใช้ในการต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรค ตัวอย่างของ AMPs ที่มีการศึกษาใน Penaeid shrimps ได้แก่ Anti-lipopolysaccharide factor (ALFs), Crustins, Penaeidins และ Stylicins (Rolland *et al.,* 2010) กลไกการทำงานของ AMPs ต่อการต้านจุลชีพยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีรายงานว่า AMPs เป็น effector ของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเพื่อใช้ในการจับกับโมเลกุลของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น Stylicins เป็น AMPs ที่พบใน *Litopenaeus stylirostris* มีความสามารถในการจับกับ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและมีความสามารถในการจับและเกิด agglutination ของแบคทีเรีย *Vibrio penaeicidae* (Rolland *et al*., 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษากลไกการทำงานของ Rhamp ซึ้งเป็น cysteine-rich AMPs จากต่อมน้ำลายของ *Rhipicephalus haemaphysaloides* พบว่ามีคุณสมบัติเป็น Proteinase inhibitor ต่อ chymotrypsin และ elastase (Zhang *et al*., 2011b) ซึ่งพวกจุลชีพก่อโรคจะใช้เอนไซม์โปรตีนเนสเพื่อบุกรุกเข้าไปใน host cell และป้องกันระบบภูมิคุ้มกันของ host ดังนั้นการมีคุณสมบัติเป็น Proteinase inhibitor จะช่วยป้องกันการบุกรุกของจุลชีพก่อโรคได้ (Armstrong, 2001)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนเพื่อดูการทำงานของโปรตีนในกุ้งพบว่ามียีนที่น่าสนใจคือ Shrimp ovarian peritrophin (*SOP*) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักใน jelly layer (JL) และ cortical rods (CRs) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันอันตรายของไข่กุ้งจากสิ่งแวดล้อมภายนอกทันทีหลังจากที่กุ้งมีการวางไข่ มีการแยกครั้งแรกจากรังไข่ของ *Penaeus semisulcatus* (Khayat *et al*., 2001) จากการศึกษาลักษณะพบว่าสามารถจับกับไคตินได้และ homologous กับ insect peritrophin (Tellam *et al*., 1999) ต่อมาได้มีการแยก SOP ในรังไข่

ของ *Marsupenaeus japonicus* (Kim *et al*., 2004) และใน hemocytes ของ *Fenneropenaeus chinensis* (*Fc*) พบว่าโปรตีน *Fc*-SOP จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกใน hemocytes, หัวใจ, กระเพาะ, ลำไส้ และ gill และมีคุณสมบัติสามารถจับกับไคตินและแบคทีเรียแกรมลบได้และคาดว่ามีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน (Du *et al*., 2006) สำหรับยีน *SOP* ใน *Fenneropenaeus merguiensis* (*Fm*) พบว่ามีความเหมือนกับยีน *SOP* ในกุ้งชนิดอื่นๆประมาณ 50% และมีส่วนของ peritrophin-A domains ที่มีความสามารถในการจับกับไคตินได้ ด้านปลาย N ของลำดับกรดอะมิโนโปรตีน *Fm*-SOP ประกอบด้วย cysteines จำนวน 6 ตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะ disulfide ได้ซึ่งเป็นส่วนที่แตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของยีน *SOP* ที่พบในกุ้งชนิดอื่นๆ และที่ตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 80-81 จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ furin (subtilisin-like endoprotease) ทำให้เกิดการแยกเป็น 2 domain คือ domain A เริ่มจากตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1-80 และ domain B เริ่มจากตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 81-329 ดังรูปที่ 1.



รูปที่ 1 ตำแหน่งของ Domain A และ Domain B บนลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Shrimp ovarian peritrophin (*Fm*-SOP)

Figure 1 Region of Domain A and Domain B on amino acid sequence of *Fm*-SOP

จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสม *Fm*-SOP ที่ผลิตใน *E. coli* พบว่ามีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ไคติเนสและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Loongyai *et al*., 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน *Fm*-SOP ในส่วนของ Domain B คือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 81-329 ของยีน *Fm-SOP* โปรตีนที่ผลิตได้มีขนาด 38.5 kDa และสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Vibrio harveyi* และ *Fusarium oxysporum* ที่

ความเข้มข้น 0.78, 7.01 และ 12.98 μM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการแบ่งย่อยส่วนของ domain B ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน 182-275 ของยีน *Fm-SOP* ได้โปรตีนขนาด 18 kDa และมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้น 1.11 และ 26.1 μM ตามลำดับ (นรีรัตน์, 2555)

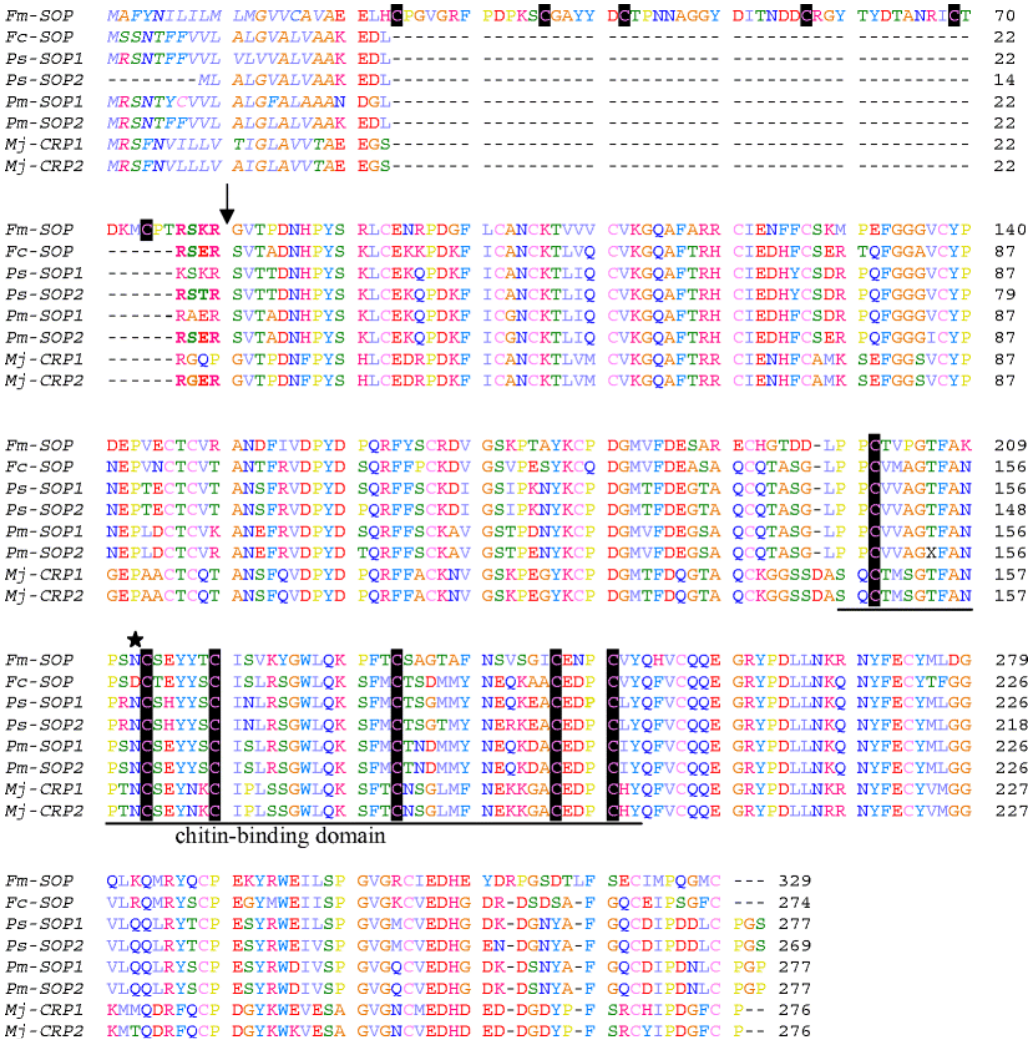
ในงานวิจัยชิ้นนี้ต้องการจะศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน *Fm*-SOP โดยศึกษาในส่วนของ domain A (SOP-A) คือตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1-80 ของยีน *Fm*-SOP ซึ่งเป็นส่วนที่แตกต่างจากยีน SOP ที่พบในกุ้งชนิดอื่นและประกอบด้วย cysteine-rich domains ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่พบใน AMPs หลายชนิดอาทิ เช่น defensin, penaeidin, และ drosomycin เป็นต้น (Dimarcq *et al*., 1998) จึงคาดว่าน่าจะมีคุณสมบัติที่สำคัญในการเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ นอกจากนั้นได้นำส่วนของ SOP domain B ได้แก่ SOP-B ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 81-329 และ SOP-B1 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 182-275 ดังรูปที่ 1 โดยจะทำการผลิตโปรตีนลูกผสมและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่ผลิตได้เพื่อความเข้าใจในกลไกออกฤทธิ์ต้านจุลชีพเพื่อประยุกต์ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ต่อไป

บทตรวจเอกสาร

1. Shirmp ovarian peritrophin-like protein (SOP)

Shirmp cortical rods (CRs) ประกอบด้วยโปรตีน 70-75% และคาร์โบไฮเดรต 25-30% (Lynn and Clark, 1987) Shrimp ovarian peritrophin (SOP) มีการแยกครั้งแรกในรังไข่ของ *P. semisulcatus* (Khayat *et al*., 2001) พบโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโน 250 ตัวมีขนาด 29 kDa ประกอบด้วย cysteine-rich domains ซึ่งเหมือนกับ domain ที่พบใน insect intestinal peritrophins (Tellam *et al*., 1999) ในโปรตีน peritrophin 44 จาก *Lucilia cuprina* (Elvin *et al*., 1996) และในโปรตีน tachycitin ที่มีคุณสมบัติต้านจุลชีพและสามารถจับกับไคติน (chitin binding activity) ซึ้งพบใน hemocytes ของ horseshoe crab (Kawabata *at el*., 1996) การแสดงออกของยีน *SOP* ในรังไข่ของ *P. semisulcatus* สามารถพบได้ในทุกระยะของการสร้างไข่ แต่ใน hepatopancrease พบการแสดงออกในระยะ vitellogenic ในขณะที่โปรตีน SOP ในรังไข่พบในระยะ vitellogenic และ late vitellogenic แต่ไม่พบใน hepatopancrease จากการศึกษาด้วยเทคนิค Immunofluorescence พบการกระจายของ SOP ใน cytoplasm และ cortical rods ของ vitellogenic oocytes ในระยะ late vitellogenic ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า SOP ถูกสร้างโดย oocyte โปรตีน SOP มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนสามารถจับกับไคตินได้ (Khayat *et al*., 2001) ต่อมาได้มีการแยก SOP ในรังไข่ของ *M. japonicus* โดยทำการแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนจาก cortical rod และสร้าง cDNA โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนจากปลาย N ของโปรตีน พบว่า cDNA มีความคล้ายกับ Shirmp ovarian peritrophin ใน *P. semisulcatus (*Kim *et al*., 2004) มีการศึกษา peritrophin-like protein จาก *F. chinensis* พบว่าโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 274 ตัว โปรตีนมีขนาด 30.6 kDa ภายในโครงสร้างประกอบด้วย signal peptide ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 1-20 มี peritrophin A-like domain จำนวน 4 domain ซึ่งมี 3 domain เป็น chitin-binding domain โดยมี 2 domain ประกอบด้วย 6 cysteine และอีก 1 domain ประกอบด้วย 4 cysteine โปรตีน *Fc*-SOP มีความเหมือนกับ peritrophin-like และ cortical rod protein ที่พบในกุ้งชนิดอื่นจากการศึกษา phylogenetic พบว่า peritrophin แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. peritrophin-like protein จากกุ้ง 2. peritrophin จาก diptera insect และ 3. peritrophin จาก siphonaptera insect การแสดงออกของโปรตีน *Fc*-SOP จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกใน hemocytes, หัวใจ, กระเพาะ, ลำไส้ และ gill แต่ไม่พบการแสดงออกใน hepatopancreas ส่วนในรังไข่พบการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive expression) จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนพบว่าสามารถจับกับ *Escherichia coli* และไคตินได้จึงคาดว่าน่าจะมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (Du *et al*., 2006) สำหรับการศึกษายีน *SOP* ใน *F.*

merguiensis พบว่าโปรตีนมีกรดอะมิโนจำนวน 329 ตัวมีขนาด 37 kDa มี N-glycosylation 1 ตำแหน่ง อยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 212 จากการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน *Fm*-SOP พบว่ามีความเหมือนกับ *SOP* ในกุ้งชนิดอื่นๆประมาณ 50% (ดังรูปที่ 2) และมีส่วนของ peritrophin-A domains ที่มีความสามารถในการจับกับไคตินได้ ทางด้านปลาย N ของลำดับกรดอะมิโนโปรตีน *Fm*-SOP ประกอบด้วย signal peptide ขนาด 19 กรดอะมิโนและต่อด้วยเปปไทด์ขนาด 61 กรดอะมิโน ซึ่งประกอบด้วย cysteines จำนวน 6 ตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะ disulfide ได้ซึ่งเป็นส่วนที่แตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของกุ้งชนิดอื่นๆ และที่ตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 80-81 จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ furin (subtilisin-like endoprotease) ทำให้เกิดการแยกเป็น 2 domain การแสดงออกของยีน *Fm-SOP* จะมีการแสดงออกสูงสุดในระยะแรกของการสร้างไข่ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีนมีการแสดงออกสูงสุดในระยะปลายของการสร้างไข่ การผลิตโปรตีนลูกผสม *Fm*-SOP ในเซลล์แมลง (Sf9 cell) โปรตีนที่ผลิตได้มี 2 ขนาดคือ 36 และ 43 kDa ส่วนการผลิตโปรตีนลูกผสมใน *E. Coli* พบว่าได้โปรตีนขนาด 37 kDa จากการศึกษาคุณสมบัติในการจับกับไคตินพบว่าโปรตีนลูกผสมที่ผลิตในเซลล์แมลง (Sf9 cells) และใน *E. coli* มีคุณสมบัติการจับกับไคตินได้ นอกจากนี้โปรตีนลูกผสม *Fm*-SOP ที่ผลิตจาก *E. coli* มีความสามารถเป็นเอนไซม์ไคติเนส และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* และ *S. aureus* โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้ (MIC) คือ 2.4 และ 15.7 μM ตามลำดับ (Loongyai *et al.*, 2007) มีการศึกษาการผลิตโปรตีนในส่วนของ Domain B โดยมีการแบ่งย่อยเป็นสองส่วนในการศึกษาคือ SOP-B และ SOP-B1 ซึ่ง SOP-B เป็นส่วนของ Domain B ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 81-329 ของยีน *Fm*-SOP และ SOP-B1 คือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 182-275 ของยีน *Fm*-SOP พบว่าได้โปรตีน SOP-B และ SOP-B1 ที่มีขนาด 38.5 และ 18 kDa ตามลำดับ และศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีนพบว่า SOP-B สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus, V. harveyi* และ *F. oxysporum* ที่ความเข้มข้น 0.78, 7.01 และ 12.98 μM ตามลำดับ ส่วนโปรตีน SOP-B1 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้น 1.11 และ 26.1 μM ตามลำดับ (นรีรัตน์, 2555)



รูปที่ 2 ข้อมูลการ Alignment ของ deduced amino acid sequence ของ *Fm*-SOP (no. AY775291) กับ SOP sequences อื่น ๆ จาก *Fenneropenaeus chinensis* (*Fm-SOP*, no. AAZ66371), *Penaeus semisulcatus* (*Ps-SOP1*, no. AAF34331; *Ps-SOP2*, no. AAF34332), *Penaeus monodon* (*Pm-SOP1*, no. AAM44049; *Pm-SOP2*, no. AAM44050), และ *Marsupenaeus japonicas* (*Mj-CRP1*, no. BAD83703; *Mj-CRP2*, no. BAD83704) (Loongyai *et al.*, 2007)

Figure 2 Alignment of the deduced amino acid sequence of *Fm*-SOP (no. AY775291) with other SOP sequences from *Fenneropenaeus chinensis* (*Fm-SOP*, no. AAZ66371), *Penaeus semisulcatus* (*Ps-SOP1*, no. AAF34331; *Ps-SOP2*, no. AAF34332), *Penaeus monodon* (*Pm-SOP1*, no. AAM44049; *Pm-SOP2*, no.AAM44050), and *Marsupenaeus japonicas* (*Mj-CRP1*, no. BAD83703; *Mj-CRP2*, no. BAD83704) (Loongyai *et al.*, 2007)

2. เปปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptide, AMPs)

AMPs เป็นสารประกอบที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immune) เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียและเชื้อราสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดย AMPs ที่ค้นพบส่วนใหญ่เป็น cysteine-rich AMPs ซึ่งจะพบมากในพวก arthropods และ invertebrates (Dimarcq *et al*., 1998) AMPs สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1. Linear peptide สามารถแยกได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น แมลง, ไส้เดือน, กบ และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเปปไทด์เหล่านี้จะมีความยาว 12-25 กรดอะมิโนตัวอย่าง AMPs ในกลุ่มนี้ได้แก่ dermaseptins, caerin, magainin, insect cecropins เป็นต้น กลุ่มที่ 2. Specific Residue-Rich Peptide เป็นเปปไทด์ที่มีปริมาณหนึ่งหรือสองกรดอะมิโนที่เป็นกรดอะมิโนหลักหลัก เช่น indolicidin มี tryptophan เป็นหลัก PR เป็น proline-arginine rich peptide และ histatins มี histidine เป็นหลัก กลุ่มที่ 3. Cysteine-rich peptide เป็น AMPs ที่ประกอบไปด้วย cysteine เป็นกรดอะมิโนหลักซึ่ง AMPs ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งจะประกอบด้วย disulfide bridges มี 2 family ที่เป็นตัวแทนคือ ceropins และ defensins (Yount *et al*., 2006)

AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น **Gomesin** เป็น cysteine-rich peptide แยกได้จาก hemocytes ของแมงมุม *(Acanthoscurria gomesiana*) มีขนาด 2.27 kDa ประกอบด้วย 18 กรดอะมิโน มีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ (Silva *et al*., 2000) **Maximin 1,2,3,4,5** และ **Maximins H1,H2,H3,H4** แยกได้จากเมือกที่ผิวหนัง ของ *Bombina maxima* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Lai *et al*., 2002) **Scarabaecin** เป็น antifungal peptide แยกได้จากด้วงแรด (*Oryctes rhinoceros*) มีขนาด 4.08 kDa ประกอบด้วย 66 กรดอะมิโน มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและมีคุณสมบัติในการจับกับไคตินด้วย (Tomie *et al*., 2003) **Microplusin** แยกได้จาก hemolymph ของ cattle tick (*Boophilus microplus*) เป็น cysteine-rich AMPs มีฤทธิ์ต้าน *M. luteus* (Fogaca *et al*., 2004) **Armadillidin** แยกได้จาก hemocytes ของ wood louse (*Armadillidium vulgare*) มีขนาด 5.25 kDa เป็น glycine-rich AMPs สามารถยับยั้ง *B. megaterium* (Herbiniere *et al*., 2005) **Potamin** แยกได้จาก *Solanum tuberosum* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่เป็นเชื้อก่อโรคในพืชและมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ chymotrypsin, trypsin และ papain (Kim *et al*., 2005) **Grahamin 1** และ **Grahamin 2** แยกได้จากเมือกที่ผิวหนังของ *Rana graham* สามารถยับยั้ง *B. dysenteriae S. aureus, E. coli* และ *C. albican* (Xu *et al*., 2006) **Aurelin** แยกได้จาก mesoglea ของ scyphoid jellyfish (*Aurelia aurita*) มีขนาด 4.29 kDa สามารถยับยั้ง *E. coli* (Ovchinnikova *et al*., 2006) **Ixosin** แยกได้จาก salivary glands ของ hard tick (*Ixodes sinensis*) มีขนาด 2.87 kDa สามารถยังยั้ง *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* (Yu *et al*., 2006) **Syphaxin** แยกได้จากเมือกที่ผิวหนัง

ของ *Leptodactylus syphax* สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* (Dourado *et al*., 2007) **Ixosin-B** แยกได้จากต่อมน้ำลายของ hard tick *(Ixodes sinensis)* มีฤทธิ์ต้าน *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* (Liu *et al.,* 2008) **Arasin 1** ประกอบด้วย 37 กรดอะมิโน แยกได้จาก hemocyte ของปูแมงมุม (*Hyas araneus*) เป็น proline-arginine-rich AMPs สามารถยับยั้ง *Listonella anguillarum*, *E. coli* และ *Corynebacterium glutamicum* (Stensvag *et al*., 2008) **Odorranain-NR** แยกได้จากเมือกที่ผิวหนังของ *Odorrana grahami* ประกอบด้วย 23 กรดอะมิโน สามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Che *et al*., 2008) **Amolopins** แยกได้จากผิวหนังของ *Amolops loloensis* ประกอบด้วย 18 กรดอะมิโนสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. aureus* และ *Bacillus pumilus* (Wang *et al*., 2008) **Rhamp** เป็น cysteine-rich peptide แยกได้จากต่อมน้ำลายของ tick (*Rhipicephalus haemaphysaloides*) มีขนาด 8 kDa สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* และ *E. coli* และมีคุณสมบัติเป็น proteinase inhibitor โดยสามารถยับยั้งการทำงานของ chymotrypsin และ elastase ได้ (Zhang *et al*., 2011b) **Lumbricin-PG** แยกได้จากเมือกที่ผิวหนังของไส้เดือน (*Pheretima guillelmi*) สามารถยับยั้ง *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* (Li *et al*., 2011) โดยค่า MIC ของ AMPs ทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น ได้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
Gomesin	*Acanthoscurria gomesiana*	**Gram-positive Bacteria**		Silva *et al*., 2000
		Aerococcus viridians	0.8-1.6	
		Bacillus megaterium	0.2-0.4	
		Micrococcus luteus	0.4-0.8	
		Listeria monocytogenes	0.8-1.6	
		Staphylococcus epidermidis	0.8-1.6	
		Staphylococcus haemolyticus	0.8-1.6	
		Staphylococcus saprophyticus	0.8-1.6	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli	0.8-1.6	
		Salmonella thyphimurium	0.8-1.6	
		Fungi		
		Alternaria brassicola	0.4-0.8	
		Fusarium oxysporum	0.4-0.8	
		Fusarium culmorum	0.4-0.8	

ตารางที่ 1: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
		Neurospora crassa	0.4-0.8	
		Nectria haematococca	0.2-0.4	
		Trichoderma viride	0.4-0.8	
		Yeast		
		Candida albicans	0.15-0.3	
		Cryptococcus neoformans	0.8-1.6	
Maximin 1,2,3,4,5	*Bombina maxima*	**Gram-positive Bacteria**		Lai *et al*., 2002
		Staphylococcus aureus	2.7-19.5	
		Bacillus pyocyaneus	1.5-19.5	
		Bacillus megaterium	0.9-19.5	
		Bacillus dysenteriae	0.9-12	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli	0.9-19.5	
		Klebsiella pneumoniae	3.1-15	

ตารางที่ 1: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
		Fungi		
		Candida albicans	1.2-15	
Maximins	*Bombina maxima*	**Gram-positive Bacteria**		Lai *et al*., 2002
H1,H2,H3,H4		*Staphylococcus aureus*	2-10	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli	9-20	
		Fungi		
		Candida albicans	2-6	
Scarabaecin	*Oryctes rhinoceros*	**Fungi**		Tomie *et al*., 2003
		Pyricularia oryzae	16.0	
		Rhizoctonia solani	32.0	
		Botrytis cinerea	4.0	
Microplusin	*Boophilus microplus*	**Gram-positive Bacteria**		Fogaca *et al*., 2004
		Micrococcus luteus	0.38-0.76	

ตารางที่ 1: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)		References
Armadillidin	*Armadillidium vulgare*	**Gram-positive Bacteria**			Herbiniere *et al*., 2005
		Bacillus megaterium	0.5-1.25		
Potamin	*Solanum tuberosum*	**Fungi**			Kim *et al*., 2005
		Candida albicans	100		
		Rhizoctonia solani	100		
Grahamin 1,2	*Rana grahami*	**Gram-positive Bacteria**	Grahamin 1	Grahamin 2	Xu *et al*., 2006
		Staphylococcus aureus	2.5	2.5	
		Gram-negative Bacteria			
		Escherichia coli	7.5	5.0	
		Bacillus dysenteriae	1.25	2.50	
		Fungi			
		Candida albicans	7.5	7.5	
Aurelin	*Aurelia aurita*	**Gram-negative Bacteria**			Ovchinnikova *et al*., 2006
		Escherichia coli	7.66		

ตารางที่ 1: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
Ixosin	*Ixodes sinensis*	**Gram-positive Bacteria**		Yu *et al*., 2006
		Staphylococcus aureus	3.7	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli	30	
		Fungi		
		Candida albicans	7.5	
Ixosin-B	*Ixodes sinensis*	**Gram-positive Bacteria**		Liu *et al.,* 2008
		Staphylococcus aureus	2.5	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli	15	
Syphaxin	*Leptodactylus syphax*	**Gram-positive Bacteria**		Dourado *el al*., 2007
		Staphylococcus aureus	14.6	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli	3.6	

ตารางที่ 1: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
		Fungi		
		Candida albicans	7.5	
Arasin	*Hyas araneus*	**Gram-positive Bacteria**		Stensvag *et al*., 2008
		Corynebacterium glutamicum	0.8	
		Gram-negative Bacteria		
		Listonella anguillarum	6.3	
		Escherichia coli	12.5	
Odorranain-NR	*Odorrana grahami*	**Gram-positive Bacteria**		Che *et al*., 2008
		Staphylococcus aureus	9.375	
		Gram-negative Bacteria		
		Bacillus dysenteriae	37.50	
		Fungi		
		Candida albicans	18.750	

ตารางที่ 1: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
Amolopins	*Amolops loloensis*	**Gram-positive Bacteria**		Wang *et al.*, 2008
		Bacillus pumilus	75.0	
		Staphylococcus aureus	37.5	
Rhamp	*Rhipicephalus*	**Gram-negative Bacteria**		Zhang *et al.*, 2011
	haemaphysaloides	*Pseudomonas aeruginosa*	0.5	
		Salmonella typhimurium	0.5	
		Escherichia coli	0.5	
Lumbricin-PG	*Pheretima guillelmi*	**Gram-positive Bacteria**		Li *et al.*, 2011
		Staphylococcus aureus	5.0	
		Gram-negative Bacteria		
		Pseudomonas aeruginosa	2.5	
		Escherichia coli	20	
		Fungi		
		Candida albicans	10	

เปปไทด์ต้านจุลชีพ (AMPs) ในกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์ที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ประกอบด้วย 2 ระบบหลักคือ 1. ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (Cellular immunity) เป็นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดโดยอาศัยกระบวนการ 3 แบบคือ การกลืนสิ่งแปลกปลอมด้วยวิธี phagocytosis, การสร้าง nodule (Nodule formation) และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (Encapsulation) 2. ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) ได้แก่ Prophenoloxidase, AMPs (Bachere, 2000; Bachere *et al*., 2004) จะเห็นได้ว่าการสร้าง AMPs เป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันการบุกรุกของจุลชีพก่อโรคต่างๆ โดยมีการศึกษา AMPs ในกุ้งได้แก่ **penaeidins** แยกได้ครั้งแรกจาก haemocytes ของ *L. vannamei* มีขนาด 5.5-6.6 kDa โครงสร้างทางด้านปลาย N ประกอบด้วย proline rich domain และด้านปลาย C ประกอบด้วย 6 cysteine residues (Destoumieux *et al*., 1997) มีการผลิตโปรตีนลูกผสม penaeidin (Pen-2 และ Pen-3) ในยีสต์ *S. cerevisiae* และศึกษาคุณสมบัติพบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา (Destoumieux *et al*., 1999) จากการศึกษา localization ของ penaeidins พบว่าถูกสร้างและเก็บไว้โดย haemocytes และถูกปล่อยออกมาเมื่อมีการบุกรุกของจุลชีพก่อโรค นอกจากนี้ยังมีความสามารถจับกับไคติน (Destoumieux *et al*., 2000) และยังมีคุณสมบัติทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio* เกาะกลุ่ม (Munoz *et al*., 2004) ปัจจุบัน penaedins ถูกพบในกุ้งหลายชนิดได้แก่ *L. vannamei, L. setferus* (Gross *et al*., 2001) *L. stylirostris* (Munoz *et al*., 2004) *Penaeus japonicas* (Rojtinnakorn *et al*., 2002) *F. chinensis* (Kang *et al*., 2004) และ *P. monodon* (Supungul *et al*., 2004) ในปี 2005 Chiou และคณะได้รายงาน penaeidin-like AMPs จาก hemocytes ของ *P. monodon* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 55 ตัว มี Proline rich domain ที่ปลาย N และ 6 cysteine residues ที่ปลาย C และมีความเหมือนกับ penaeidins ของ *L. vannamei* 50% มีคุณสมบัติในการยับยั้ง *E. coli, V. harveyi, V. alginolyticus* และ *Aerococcus viridians* และมีฤทธิ์ต้านเชื้อราสามารถยับยั้ง *Fusarium pisi* และ *F. oxysporum* (Chiou *et al*., 2005) ในปี 2004 Cuthbertson และคณะได้พบ penaeidin (Pen-4) ซึ่งเป็น class ใหม่ในกุ้ง *L. setiferus* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราและพบว่า proline rich domain ของ Pen-4 มีความจำเพาะกับแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่ไม่พบใน penaeidin อื่นๆ ใน *L. vannamei* (Cuthbertson *et al*., 2004) และใน ปี 2007 Kang และได้พบ penaeidin 5 ใน *F. chinensis* ซึ่งเป็น class ใหม่และได้ผลิตโปรตีนลูกผสม *Fenchi*PEN5 ใน *P. pastoris* พบว่ามีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Kang *et al*., 2006)

crustins เป็น cysteine rich AMPs ที่ homologues กับ carcinin ที่พบใน shore crab (*Carcinus maenas*) มีขนาด 11.5 kDa (Relf *et al*., 1999; Brockton *et al*., 2007) crustins ถูกพบในกุ้งหลายชนิดได้แก่ *L. vannamei* (Bartlett *et al*., 2002; Vargas-Albores *et al*., 2004), *L. setiferus* (Bartlett *et al*., 2002), *P. monodon* (Supungul *et al*., 2004), *M. japonicas* (Rattanachai *et al*., 2004), *F. chinensis* (Zhang *et al*., 2007) ประกอบด้วย 12 cysteine residues และ whey-acidic-protein domain (WAP) มีคุณสมบัติเป็น proteinase inhibitors (Vargas-Albores *et al*., 2004; Chen *et al*., 2010) และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก (Bartlett *et al*., 2002; Zhang *et al*., 2007; Amparyup *et al*., 2008b)

Anti-Lipopolysaccharide Factor (ALFs) โปรตีนขนาดเล็กมีคุณสมบัติจับกับ lipopolysacharide (LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบพบครั้งแรกใน horseshoe crabs (Aketagawa *et al*., 1986; Morita *et al*., 1985; Muta *et al*., 1987) มีการพบใน hemocytes ของ *P. monodon* (Supungul *et al*., 2002), *L. setiferus* (Gross *et al*., 2001) และ *F. chinensis* (Liu *et al*., 2005) และมีการผลิตโปรตีนลูกผสม ALF*Pm*3 ในยีสต์ *Pichia pastoris* และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่ผลิตได้พบว่าโปรตีนลูกผสม ALF*Pm*3 สามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ (Somboonwiwat *et al*., 2005)

ในปี 2010 Rolland และคณะได้พบ AMPs family ใหม่ชื่อว่า **Stylicins** เป็น AMPs ที่แยกได้จาก *L. stylirostris* ประกอบด้วย 82 กรดอะมิโนประกอบด้วย proline rich region ที่ปลาย N และ cysteine rich region ที่ปลาย C ซึ่งเหมือนกับ penaeidins แต่ลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน โปรตีนลูกผสม stylicins มีคุณสมบัติในการยับยั้ง *Vibrio* sp. ค่า MIC เท่ากับ 40-80 μM และยับยั้ง *F. oxysporum* ค่า MIC เท่ากับ 2.5 μM และมีคุณสมบัติในการ agglutinate ต่อ *V. penaeicidae* และสามารถจับกับ LPS ได้ (Rolland *et al*., 2010) นอกจากนี้ยังมีพบเปปไทด์ต้านเชื้อรา (antifungal peptide) จาก haemolymph ของกุ้ง *P. vannamei* (PvHCt) และ *P. stylirostris* (PsHCt1 และ PsHCt2) (Destoumieux-Garzon *et al*., 2001) โดยค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้ง ทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น ได้แสดงในตารางที่ 2

สำหรับการศึกษาโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น AMPs ที่พบจาก *F. merguiensis* ได้แก่ในปี 2007 Rittidach และคณะ ได้แยกโปรตีน lectin จาก haemolymph มีความสามารถในการทำให้แบคทีเรียเฉพาะสายพันธุ์ Vibrio เกาะกลุ่มซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้ง จึงคาดว่าอาจจะมีบทบาทในการป้องกันโรคของกุ้ง (Rittidach et al, 2007) และในปี 2009 Mai และ Hu ได้ผลิตโปรตีนลูกผสม lysozyme พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีฤทธิ์ยับยั้ง *V. alginolyticus, Vibrio parahemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* (Mai and Hu, 2009) เช่นเดียวกับโปรตีนลูกผสม *Fm*-

SOP พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *V. harveyi* และ *S. aureus* โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้ (MIC) คือ 2.4 และ 15.7 μM ตามลำดับ (Loongyai *et al.*, 2007) นอกจากนี้โปรตีนลูกผสม SOP ในส่วนของ domain B ก็มีคุณสมบัติเป็นต้านจุลชีพ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus, V. harveyi* และ *F. oxysporum* ได้เช่นกัน (นรีรัตน์, 2555)

ตารางที่ 2: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)		References
Penaeidins	*Litopenaeus vannamei*	**Gram-positive Bacteria**	Pen-2	Pen-3a	Destoumieux *et al*., 1999
(Pen-2, Pen-3a)		*Aerococcus viridians*	1.25-2.5	0.3-0.6	
		Micrococcus luteus	2.5-5	1.25-2.5	
		Bacillus megaterium	2.5-5	2.5-5	
		Staphylococcus aureus	>20	>40	
		Gram-negative Bacteria			
		Escherichia coli 363	> 40	5-10	
		Vibrio harveyi	>40	>40	
		Fungi			
		Nectria haematococca	1.25-2.5	1.25-2.5	
		Neurospora crassa	2.5-5	1.25-2.5	
		Alternaria brassicola	2.5-5	2.5-5	
		Fusarium oxysporum	5-10	5-10	
		Botrytis cinerea	5-10	5-10	
		Yeast			
		Candida albicans	>20	>20	

ตารางที่ 2: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
Penaeidin 4 (Pen-4)	*Litopenaeus setiferus*	**Gram-positive Bacteria**		Cuthbertson *et al*., 2004
		Aerococcus viridians	1.9-2.92	
		Micrococcus luteus	1.9-2.92	
		Bacillus megaterium	>50	
		Staphylococcus aureus	>50	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli 363	22-33	
		Fungi		
		Fusarium oxysporum	0.84-1.26	
		Botrytis cinerea	4.38-6.57	
		Penicillium crustosum	1.26-1.9	
Penaeidin 5 (*Fenchi*PEN5)	*Fenneropenaeus chinensis*	**Gram positive Bacteria**		Kang *et al*., 2007
		Staphylococcus aureus	6.25	
		Micrococcus luteus	0.78	
		Bacillus thuringiensis	1.56	
		Bacillus cereus	1.56	

ตารางที่ 2: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
		Bacillus subtilis	6.25	
		Bacillus megaterium	6.25	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli	25	
		Klebsiella pneumonia	3.13	
		Fungi		
		Fusarium solani	3.13	
		Gloeosporium album	6.25	
		Verticillium adhliae	3.13	
		Fusarium oxysporum	3.13	
		Colletetrichum lagenarium	>30	
Penaeidin-like AMP	*Penaeus monodon*	**Gram-negative Bacteria**		Chiou *et al.,* 2005
		Escherichia coli	<1	
		Vibrio harveyi	<1	
		Vibrio alginolyticus	<1	

ตารางที่ 2: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
		Gram-positive Bacteria		
		Aerococcus viridians	20	
		Fungi		
		Fusarium pisi	5	
		Fusarium oxysporum	10	
Crustin (Crustin*Pm1*)	*Penaeus monodon*	**Gram-positive Bacteria**		Supungul *et al*., 2008
		Aerococcus viridians	50-100	
		Bacillus megaterium	6.25-12.50	
		Micrococcus luteus	25-50	
		Staphylococcus aureus	3.13-6.25	
		Streptococcus iniae	3.13-6.25	
		Staphylococcus haemolyticus	50-100	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli 363	50-100	

ตารางที่ 2: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
Crustin (rCruFc)	*Fenneropenaeus chinensis*	**Gram-positive Bacteria**		Zhang *et al*., 2007
		Staphylococcus aureus	2	
		Bacillus subtilis	8	
		Micrococcus luteus	4	
		Bacillus megaterium	2	
		Bacillus cereus	4	
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli	32	
		Vibrio harveyi	>64	
Crustin-like AMP (rCrus-like*Pm*)	*Penaeus monodon*	**Gram-positive Bacteria**		Amparyup *et al*., 2008b
		Staphylococcus aureus	5-10	
		Staphylococcus haemolyticus	2.5-5	
		Aerococcus viridians	0.312-0.625	
		Bacillus megaterium	1.25-2.5	
		Micrococcus luteus	2.5-5	

ตารางที่ 2: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
		Gram-negative Bacteria		
		Escherichia coli 363	2.5-5	
		Vibrio harveyi	2.5-5	
		Klebsiella pneumonia	10-20	
Anti-lipopolysaccharide factor (ALF*Pm3*)	*Penaeus monodon*	**Gram-negative Bacteria**		Somboonwiwat *et al*., 2005
		Enterobacter cloacae	3.12-6.25	
		Erwinia carotovora	1.56-3.12	
		Escherichia coli 363	0.095-0.19	
		Klebsiella pneumonia	3.12-6.25	
		Salmonella thyphimurium	6.25-12.5	
		Vibrio alginolyticus	0.39-0.78	
		Vibrio anguillarum	0.78-1.56	
		Vibrio harveyi	0.78-1.56	
		Vibrio penaeicida	25-50	

ตารางที่ 2: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
		Gram-positive Bacteria		
		Aerococcus viridians	1.56-3.12	
		Bacillus megaterium	0.19-0.39	
		Micrococcus luteus	1.56-3.12	
		Staphylococcus aureus	50-100	
		Fungi		
		Fusarium oxysporum	1.56-3.12	
		Botrytis cinerea	3.12-6.25	
		Penicillium crustosum	12.5-25	
Stylicins	*Litipenaeus stylirostris*	**Gram-positive Bacteria**		Rolland *et al*., 2010
		Staphylococcus aureus	> 160	
		Gram-negative Bacteria		
		Vibrio splendidus	80	
		Vibrio penaecidae	40	
		Vibrio nigripulchritudo	80	
		Escherichia coli 363	> 160	

ตารางที่ 2: ค่า MIC ของ AMPs ที่มีการศึกษาในกุ้งชนิดต่างๆ (ต่อ)

AMPs	Source	Microorganisms	MIC (μM)	References
		Fungi		
		Fusarium oxysporum	2.5	
PvHCt	*Penaeus vannamei*	**Fungi**		Destoumieux-Garzon
		Alternaria brassicola	3.15-6.25	*et al*., 2001
		Fusarium culmorum	6.25-12.5	
		Fusarium oxysporum	6.25-12.5	
		Nectria haematococca	3.15-6.25	
		Neurospora crassa	25-50	
		Tricoderma viridae	3.15-6.25	

วัตถุประสงค์

1. เตรียมโปรตีนลูกผสม Shrimp ovarian peritrophin domain A (SOP-A) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21
2. ศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีนลูกผสม SOP-A ที่ผลิตได้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับโปรตีน SOP ในส่วนของ full length (*Fm*-SOP) และ domain B (SOP-B และ SOP-B1)
3. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนลูกผสม *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 โดยศึกษาความสามารถในการทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่ม, ความสามารถในการเป็นเอนไซม์ไคติเนส และ ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส
4. ทดสอบความคงตัวของโปรตีน SOP-A ต่ออุณหภูมิ

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	BDH
Acetic acid	J.T. Baker
Acrylamide	Fluka
Ammonium persulfate	Fluka
Bis-acrylamide (N, N'-methylene diacrylamide)	Sigma
β-mercaptoethanol	Merck
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Brilliant blue R	Sigma
Bromophenol blue	Fluka
Calcium chloride dehydrate	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck
Copper (II) sulphate	Ajax Finechem
Dithiothreitol (DTT)	USB
Dinitrosalicylic acid	Fluka
Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)	Merck
Folin ciocalteus 's reagent	CARLO ERBA
Glucose	Fluka
Glycine	BDH
Guanidine hydrochloride	Sigma
Hydrochloric acid	Merck

สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Methanol	LABSCAN
N, N'-methylene-bis-acrylamide	Merck
N, N, N', N'-Tetramethylethylene Diamine (TEMED)	USB
Mueller Hinton	DIFCO
Phenol	BDH
Potassium dihydrogen phosphate	Fluka
Sodium carbonate	Fisher scientific
Sodium chloride	LAB SCAN
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Ajax Finechem
Sodium phosphate	Ajax Finechem
Sodium tartrate	Ajax Finechem
Sulfuric acid	LAB SCAN
Triton X-100	USB
Tris base	Fisher
Tryptone	HIMEDIA
Yeast Extract	BD

1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Ampicillin	Sigma
Chymotrypsin	Sigma
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	USB
Low Molecular Weight Caribration Kit	Amersham Biosciences
Lysozyme	Sigma
N-Acetyl-DL-pheyl-alanine-β-naphtyl ester	Sigma
N_{α}-Benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide	Sigma
hydrochloride	Sigma
N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide	Sigma
Proteinase K	Sigma
Subtilisin A	Sigma
Thrombin	Sigma
Trypsin	Merck

2. แบคทีเรีย

Escherichia coli สายพันธุ์ BL 21(DE3) มีลักษณะ Genotype: F-, *omp*T, *hsd*SB, (r_B^- ,m_B), *gal, dcm* (DE3) บริษัท Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3. ดีเอ็นเอพาหะ

pGEX-4T-1 บริษัท Amersham Biosciences**,** Uppsala**,** Sweden

อุปกรณ์

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น 2200 C SCS (ยี่ห้อ Precisa)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 (ยี่ห้อ Mettler Toledo)
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (ยี่ห้อ Labline)
เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex-2 GENIE (ยี่ห้อ Scientific Industries)
เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Power Supply รุ่น 1000/500 (ยี่ห้อ Bio Rad)
เครื่องผลิตคลื่นเสียงความถี่สูง (ยี่ห้อ Sonics)
เครื่องวัดพีเอช (ยี่ห้อ Denver instrument)
เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำ (ยี่ห้อ Bio-Active)
เครื่อง microplate reader (ยี่ห้อ Bio-Tek instrument)
ตู้ดูดควัน (ยี่ห้อ FLEXLAB)
ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (ยี่ห้อ SANYO)
ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (ยี่ห้อ SANYO)
ตู้เลี้ยงเชื้อแบบอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง (ยี่ห้อ Binder)
ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar air flow (ยี่ห้อ NUAIRE)
ตู้อบเครื่องแก้ว (ยี่ห้อ Labline)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (ยี่ห้อ Hirayama)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (ยี่ห้อ Mammert)

วิธีการ

1. การเตรียมโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A เพื่อการทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลชีพ

1.1 การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน GST-SOP-A ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-SOP-A ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 เลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่มี Amplicilin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงจากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียนั้น 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว 2xYT ที่มี Amplicilin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตรบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.4-0.6 จึงกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการสร้างโปรตีนด้วยสารละลาย 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyronoside) บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงแยกเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์ที่ได้บนน้ำแข็ง หลังจากนั้นเติม Lysis buffer (50 mM Na_2PO_4 pH 8.0, 300 mM NaCl และ 10 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที โดยทำบนน้ำแข็งตลอดเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (soluble protein) และตะกอน (insoluble protein) แยกออกจากกัน นำมาทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

1.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมีเอสดีเอส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10%(w/v) SDS, 20%(v/v) glycerol, 10%(v/v) β-mercaptoethanol และ 0.1% (w/v) Bromophenol blue) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้ววางบน

น้ำแข็งทันที การเตรียม SDS Gel ซึ่งมีส่วนผสมดังตารางที่ 3 โดยเทส่วนผสมของชั้น Separating Gel ระหว่างแผ่นกระจกปริมาตร 3 ใน 4 ของความสูงของกระจก ใช้น้ำกลั่นเติมบนผิวหน้าเจลเพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เทน้ำกลั่นทิ้งและซับให้แห้ง เทส่วนผสมของชั้น Stacking Gel ลงจนเต็ม เสียบหวีลงบนแผ่นกระจกให้ไม่มีฟองอากาศ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีจากนั้นดึงหวีออก นำเจลไปประกอบกับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส เติมสารละลายตัวอย่างลงในแต่ละช่องของเจลใช้ Tris-glycine buffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 192 mM glycine และ 0.1%(w/v) SDS) สำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชม. นำไปย้อมด้วยสี Coomassie blue (0.2%(w/v) coomassie blue R-250, 50%(v/v) methanol, 7%(v/v) acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกด้วย Destain 1 (50%(v/v) methanol และ 7%(v/v) acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ Destain 2 (5%(v/v) methanol และ 7.5%(v/v) acetic acid) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 3: ส่วนประกอบของโพลีอะคลิลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ส่วนประกอบ	Separating Gel 12% (ml)	Stacking Gel 4% (ml)
H_2O	1.7	2.1
30% Acrylamide mix	2.0	0.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	-
1.0 M Tris (pH 6.8)	-	0.38
10% SDS	0.05	0.03
10% APS	0.05	0.03
TEMED	0.002	0.003
Total	5.0	3.0

1.3 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1975)

เตรียมสารละลาย BSA (Bovine Serum Albumin) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้นเป็น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายโปรตีนที่ต้องการหาปริมาณโดยทำการเจือจางเป็น 1:1,000 จากโปรตีนเริ่มต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสายละลาย A ประกอบด้วย Copper tartrate carbonate solution

(0.1%(w/v) $CuSO_4.5H_2O$, 2%(w/v) $NaCO_3$, 1%(w/v) Sodium tartrate); 5%(w/v) SDS และ 0.8 M NaOH อัตราส่วน 1:2:1 ตามลำดับ หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย B ประกอบด้วย 2 N Folin ciocateus's reagent และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 ตามลำดับหลอดละ 0.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ BSA

1.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-SOP-A ด้วย colloidal chitin

เตรียม colloidal chitin โดยนำ Chitin powder ปริมาณ 5 กรัม เติมลงใน 60 มิลลิลิตร ของ 32% HCl จากนั้นคนที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน เติม 95% Ethanol ปริมาตร 2 ลิตร จากนั้นคนที่ 25 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำไปปั่นตกตะกอนความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วล้าง colloidal pellet ด้วยน้ำกลั่น จนมี pH 7.0

นำตะกอนโปรตีน (insoluble protein) มาล้างด้วย Washing buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0 และ 1% Triton x 100) ในอัตราส่วน 1 กรัม : 20 มิลลิลิตร ล้างหลายครั้งจนตะกอนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนแล้วนำตะกอนมาละลายด้วย Buffer D (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 5M Guanidium HCl) ในปริมาณที่ทำให้ตะกอนละลายหมด จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมา Dialysis ด้วย PBS (10 mM NaH_2PO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, 2.7 mM KCl และ 140 mM NaCl, pH 7.4) เพื่อ refolding โปรตีน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาทีจากนั้นนำส่วนใสไปบ่มกับ colloidal chitin อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย Binding buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS) 2-3 ครั้งจากนั้นนำมาชะด้วย elution buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

1.5 การตัด GST ออกด้วย Thrombin

การเตรียมสารละลาย Thrombin โดยนำ Thrombin (1U/µl) ปริมาณ 80 ไมโครลิตร มาผสมกับ PBS ปริมาณ 920 ไมโครลิตร จากนั้นนำโปรตีนบริสุทธิ์ GST-SOP-A มาบ่มกับ Glutathione sepharose 4B resin (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสออก ล้างเม็ด beads ด้วย PBS 2-3 ครั้งหลังจากนั้นเติมสารละลาย Thrombin แล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 5

นาที เก็บส่วนใสไว้ ส่วนใสที่ได้จะประกอบไปด้วยโปรตีน SOP-A และ Thrombin แยกโปรตีน SOP-A ออกโดยนำส่วนใสที่ได้ไปบ่มกับ colloidal chitin เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย washing buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS) 2-3 ครั้งจากนั้นนำมาชะด้วย elution buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

2. การทดสอบคุณสมบัติต้านจุลชีพของโปรตีน SOP-A

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923*, B. megaterium, M. luteus, Enterococcus faecalis* แบคทีเรียแกรมลบคือ *V. harveyi* (สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้ง)*, E. coli* ATCC 25922*, Enterobacter cloacae, Salmonella* Typhimurium*, P. aeruginosa* (แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา) เชื้อรา *F. oxysporum (*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา) และยีสต์ *C. albicans* (แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา) เลี้ยงในอาหารตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4: ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลชีพ

เชื้อ	อาหาร
Enterobacter cloacae	Mueller Hinton broth (MHB)
Escherichia coli	Mueller Hinton broth
Pseudomonas aeruginosa	Mueller Hinton broth
Salmonella Typhimurium	Mueller Hinton broth
Vibrio harveyi	Saline peptone water
Bacillus megaterium	Mueller Hinton broth
Enterococcus faecalis	Mueller Hinton broth
Micrococus luteus	Mueller Hinton broth
Staphylococcus aureus	Mueller Hinton broth
Candida albicans	Potato dextrose broth (PDB)
Fusarium oxysporum	Potato dextrose broth

2.1 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของเชื้อแบคทีเรีย

ใช้วิธี liquid growth inhibition assay (Blond *et al*.,2002; Kang *et al*., 2006) เริ่มจากเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MHB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงจากนั้นถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ค่า O.D. $_{600}$ เท่ากับ 0.1 (ปริมาณเชื้อเท่ากับ 2.5 x 10^5cfu/ml) แล้วนำเชื้อ 90 ไมโครลิตร มาบ่มกับ 10 ไมโครลิตรของโปรตีนที่ dilution ต่างๆ แบบ serial 2-fold dilution บ่มใน 96 well plate ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วัดค่า microbial growth ที่ O.D. $_{630}$ ด้วยเครื่อง microplate reader จะได้ค่าต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) หลังจากนั้นนำเชื้อที่ความเข้มข้นที่ไม่มีการเจริญเติบโต ปริมาตร 5 ไมโครลิตรมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง (nutrient agar) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมงเพื่อหาค่าต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)

2.2 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของเชื้อยีสต์

เริ่มจากเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตรลงในอาหารใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ค่า O.D.$_{600}$ เท่ากับ 0.1 (ปริมาณเชื้อเท่ากับ 2.5 x 10^5cfu/ml) แล้วนำเชื้อ 90 ไมโครลิตร มาบ่มกับ 10 ไมโครลิตรของโปรตีนที่ dilution ต่างๆ แบบ serial dilution บ่มใน 96 well plate ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดค่า microbial growth ที่ O.D.$_{630}$ ด้วยเครื่อง microplate reader จะได้ค่าต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) หลังจากนั้นนำเชื้อที่ความเข้มข้นที่ไม่มีการเจริญเติบโต ปริมาตร 5 ไมโครลิตรมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมงเพื่อหาค่าต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MFC)

2.3 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของเชื้อรา

เริ่มจากบ่มเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ 25 องศาเซลเซียส จนเชื้อราสร้างสปอร์ (ประมาณ 3-5 วัน) จากนั้นใส่ Glass bead 15-20 เม็ดในจานเพาะเชื้อแล้วเขย่าเพื่อให้สปอร์

หลุดออกมาแล้วเติม 0.85%(w/v) Normal saline solution ประมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วดูด spore suspension ใส่หลอดทดลองแล้วนำไปนับจำนวนสปอร์ด้วย Hematocytometer แล้วปรับจำนวนสปอร์ให้มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ $8x10^3$ spores/ml ด้วยอาหารเหลว จากนั้นดูดเชื้อ 50 ไมโครลิตรมาบ่มกับ 50 ไมโครลิตรของสารละลายโปรตีนที่ dilution ต่างๆ แบบ serial dilution บ่มใน 96 well plate ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดูการเจริญเติบโต (microbial growth) ภายใต้กล้องสเตอริโอ จะได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ (MIC) จากนั้นนำเชื้อในหลุมที่ไม่มีการเจริญเติบโต มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (MFC)

3. การทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีน

3.1 การวัดความสามารถในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่ม (Agglutination) ของแบคทีเรียแกรมลบ

เพื่อดูความสามารถของโปรตีนในการทำให้เกิดการ agglutination ของแบคทีเรียแกรมลบ *in vitro* (Rolland *et al*., 2010) โดยในงานวิจัยชิ้นนี้จะใช้เชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคในกุ้งมาใช้ในการทดสอบ โดยนำ 20 ไมโครลิตรของ *V. harveyi* bacteria fresh cells ($1x10^8$ cells/ml) มาผสมกับ 10 ไมโครลิตรของ 1 mg/ml ของโปรตีน (SOP-A, SOP-B, SOP-B1 และ *Fm*-SOP) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูการเกิดการเกาะกลุ่มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้โปรตีน GST เป็นกลุ่มควบคุม

3.2 การวัดการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส (Chitinase activity)

Chitinase activity คือการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จาก colloidal chitin โดยเริ่มจากนำโปรตีนบริสุทธิ์ (*Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1) ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับ 1% colloidal chitin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่เวลา 5, 10, และ 15 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมสารละลาย dinitrosalic acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปต้ม 15 นาที จากนั้นวางบนน้ำแข็ง 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Loongyai *et al*., 2007, Folders *et al*., 2001) ซึ่งหนึ่งหน่วยเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในช่วง $O.D._{550}$ เท่ากับ 0.001 หน่วยต่อนาที

3.3 การวัดความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส (Proteinase inhibition activity)

เพื่อดูความสามารถของโปรตีนในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase ได้แก่ chymotrypsin, proteinase K, subtilisin A และ trypsin โดยนำโปรตีนบริสุทธิ์ (SOP-A, SOP-B, SOP-B1 และ *Fm*-SOP) ที่ความเข้มข้น 0.125-1 mg/ml มาบ่มกับเอนไซม์ chymotrypsin, proteinase K, subtilisin A และ trypsin ความเข้มข้น 3, 3.45, 3.67 และ 5 nM ตามลำดับ ใน 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 buffer ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสับสเตท ลงไป ได้แก่ N-Acetyl-DL-phenyl-alanine-β-naphtyl ester (147.3 mM) สำหรับ chymotrypsin, N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (0.10 mM) สำหรับ Proteinase K และ Subtilisin A, N_{α}-Benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide hydrochloride (146.8) สำหรับ Trypsin แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติม 50%(v/v) acetic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เพื่อวัดค่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Amparyup *et al*., 2008a; Wang *et al*., 2009)

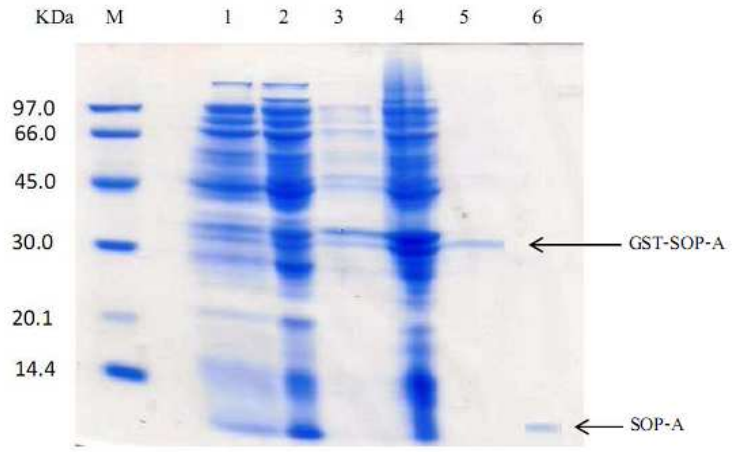
4. การทดสอบความคงตัวของโปรตีนต่ออุณหภูมิ

นำโปรตีนบริสุทธิ์ มาบ่มที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง (นรีรัตน์, 2555) จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติต้านจุลชีพ ต่อเชื้อ *S. aureus*

บทที่ 3
ผลการทดลอง

1. การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนและการทำบริสุทธิ์ของโปรตีนลูกผสม GST-SOP-A ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21

เมื่อนำยีน SOP domain A มาโคลนเข้าพลาสมิด pGEX แล้วนำไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-SOP-A ด้วย 1mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyronoside) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 และทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-SOP-A พบว่าโปรตีน GST-SOP-A มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39 kDa และเมื่อตัด GST ออกด้วย Thrombin แล้วพบว่าได้โปรตีน SOP-A มีขนาดประมาณ 9 kDa (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST-SOP-A ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 และการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย 12 % SDS-PAGE, แถว M: Low molecular weight standard marker, แถว 1: non induced soluble protein, แถว 2: induced soluble protein, แถว 3: non induced insoluble protein, แถว 4: induced insoluble protein, แถว 5: โปรตีน GST-SOP-A บริสุทธิ์, แถว 6: โปรตีน SOP-A บริสุทธิ์

Figure 3 Expression and purification of the recombinant protein from *E.coli* BL21 (DE3) cells harboring pGEX-SOP-A; lane M: molecular weight markers, lane1: non induced soluble protein, lane 2: induced soluble protein, lane 3: non induced insoluble protein, lane 4: induced insoluble protein, lane 5: purified GST-SOP-A, lane 6: purified SOP-A.

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของโปรตีน SOP-A

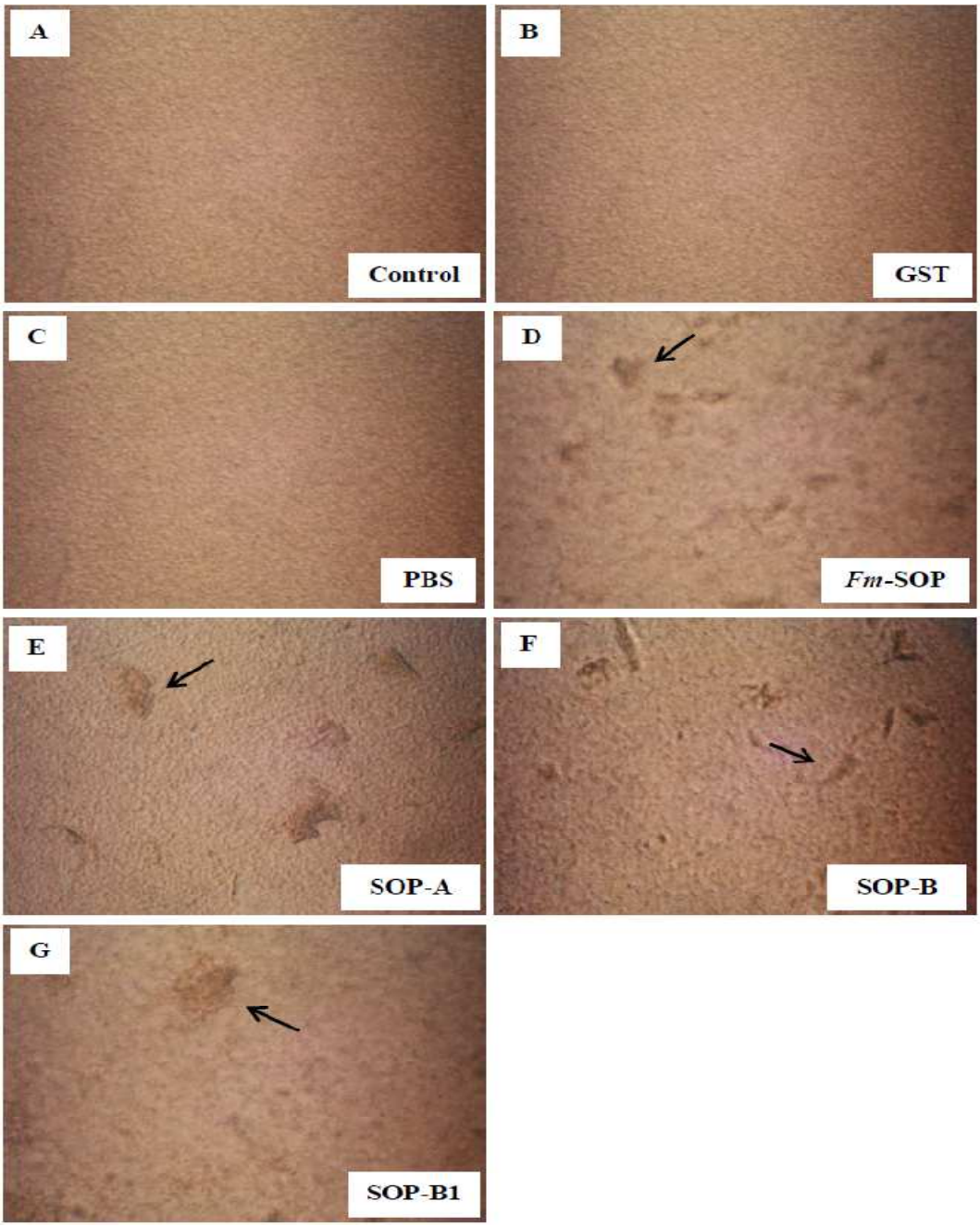
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A ที่ความเข้มข้น 0.5-63.3 μM โดยการหาค่า MIC และ MBC พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *V. harveyi*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *F. oxysporum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.1, 31.1, 3.8, 63.3 และ 1.6 μM ตามลำดับและค่า MBC เท่ากับ 63.3, 31.1, 3.8, 63.3 และ 1.6 μM ตามลำดับส่วนเชื้ออื่นที่เหลือไม่สามารถยับยั้งได้ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของโปรตีน SOP-A และยา Vancomycin และ Amphotericin B

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	SOP-A		Vancomycin		Amphotericin B	
	μM		μM		μM	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
แบคทีเรียแกรมลบ						
Enterobacter cloacae	>100	>100	-	-	-	-
Escherichia coli	31.1	63.3	$3.45x10^{-4}$	$6.9x10^{-4}$	-	-
Pseudomonas aeruginosa	>100	>100	-	-	-	-
Salmonella Typhimurium	>100	>100	-	-	-	-
Vibrio harveyi	31.1	31.1	$6.9x10^{-4}$	$6.9x10^{-4}$	-	-
แบคทีเรียแกรมบวก						
Bacillus megaterium	>100	>100	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	>100	>100	-	-	-	-
Micrococus luteus	>100	>100	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	3.8	3.8	$3.45x10^{-4}$	$6.9x10^{-3}$	-	-
ยีสต์						
Candida albicans	63.3	63.3	-	-	$1.29x10^{-4}$	$2.7x10^{-4}$
เชื้อรา						
Fusarium oxysporum	1.6	1.6	-	-	$1.08x10^{-3}$	$1.08x10^{-3}$

3. การวัดความสามารถในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ

จากการนำโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A มาทดสอบประสิทธิภาพการทำให้เกิด agglutination ของเชื้อ *V. harveyi* เปรียบเทียบกับโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-B และ SOP-B1 โดยใช้โปรตีน GST เป็นโปรตีนควบคุม โดยการนำโปรตีนมาบ่มกับเชื้อ *V. harveyi* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาดูผลการเกิดการเกาะกลุ่มภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าโปรตีนทั้งสี่ชนิดสามารถทำให้เชื้อ *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่มได้ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การทดสอบความสามารถในการทำให้แบคทีเรีย *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่ม, **A**: *V. harveyi* cells, **B:** *V. harveyi* cells + GST, **C:** *V. harveyi* cells + PBS, **D**: *V. harveyi* cells + *Fm*-SOP, **E**: *V. harveyi* cells + SOP-A, **F**: *V. harveyi* cells + SOP-B, G: *V. harveyi* cells + SOP-B1, **ลูกศร**: แสดงการเกิด agglutination

Figure 4 Agglutination assay of recombinant proteins; **A**: *V. harveyi* cells, **B:***V. harveyi* cells + GST, **C:***V. harveyi* cells + PBS, **D**: *V. harveyi* cells + *Fm*-SOP, **E**: *V. harveyi* cells + SOP-A, **F**: *V. harveyi* cells + SOP-B, G: *V. harveyi* cells + SOP-B1.

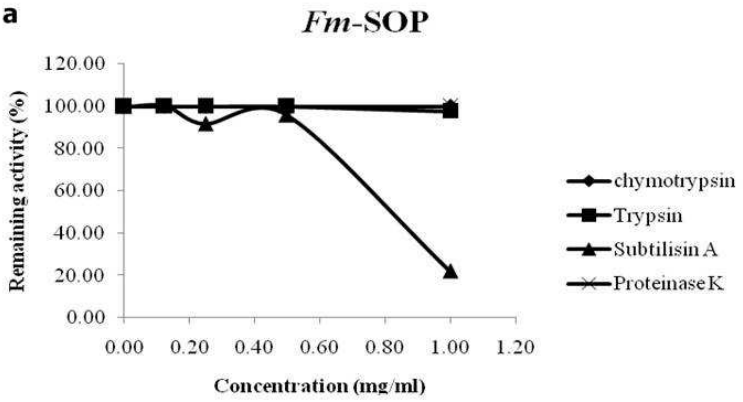
4. การวัดการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส (Chitinase activity) ของโปรตีน

จากการวัดการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสของโปรตีนบริสุทธิ์ *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-Bและ SOP-B1 พบว่ามีความสามารถในการเปลี่ยน colloidal chitin เป็นโมเลกุลเดี่ยว มีค่าเท่ากับ 0.48, 7.64, 6.22 และ 3.50 units/mg protein

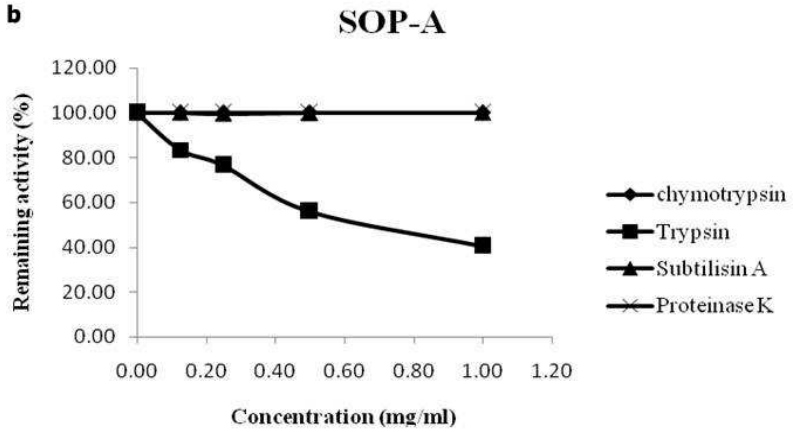
5. การวัดความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส (Proteinase inhibition activity)

จากการนำเอนไซม์โปรตีนเนส มาบ่มกับโปรตีนบริสุทธิ์ *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 แล้วดูการทำงานของเอนไซม์ พบว่า โปรตีน *Fm*-SOP มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ subtilisin A (รูปที่ 5a) โปรตีน SOP-A สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin (รูปที่ 5b) โปรตีน SOP-B สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ chymotrypsin และ subtilisin A (รูปที่ 5c) ส่วนโปรตีน SOP-B1 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ chymotrypsin และ trypsin (รูปที่ 5d)

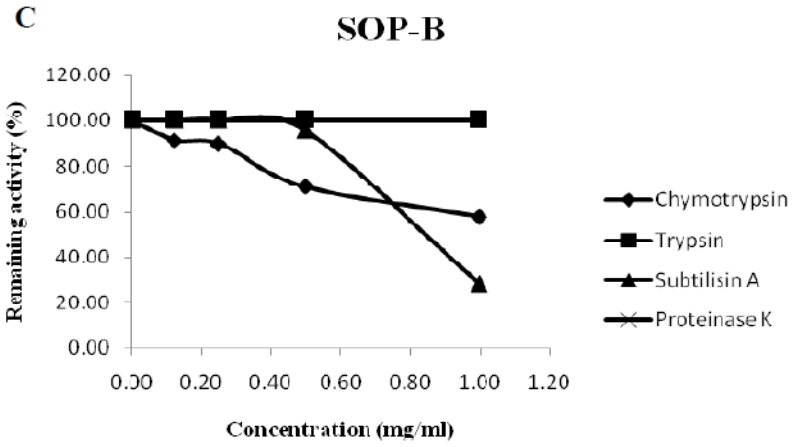
a

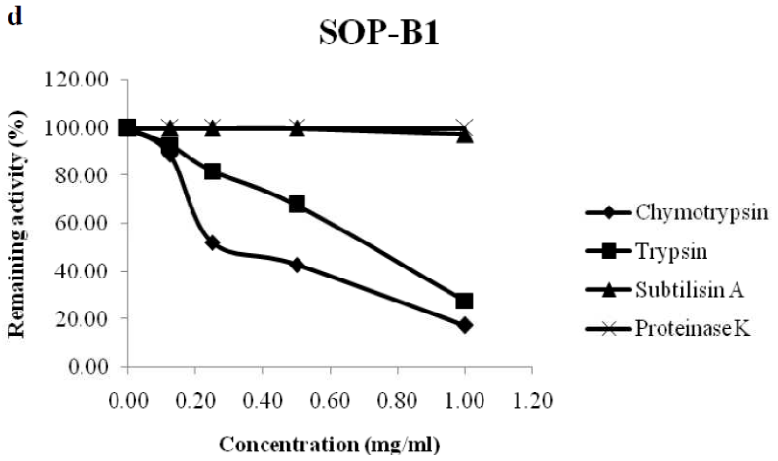

Fm-SOP
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
Remaining activity (%)
0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20
Concentration (mg/ml)
chymotrypsin
Trypsin
Subtilisin A
Proteinase K

b


SOP-A
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
Remaining activity (%)
0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20
Concentration (mg/ml)
chymotrypsin
Trypsin
Subtilisin A
Proteinase K

C


SOP-B
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
Remaining activity (%)
0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20
Concentration (mg/ml)
Chymotrypsin
Trypsin
Subtilisin A
Proteinase K



รูปที่ 5 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส, **a**: *Fm*-SOP, **b**: SOP-A, **c**: SOP-B, **d**: SOP-B1

Figure 5 Analysis of proteinase inhibitory activity of recombinant proteins, **a**: *Fm*-SOP, **b**: SOP-A, **c**: SOP-B, **d**: SOP-B1

6. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของโปรตีน SOP-A ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

จากการนำโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A มาบ่มที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบประสิทธิ์ภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* พบว่าโปรตีนมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. aureus* ลดลงเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6: ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของโปรตีน SOP-A เมื่อบ่มที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ กับเชื้อ *S. aureus*

อุณหภูมิ (°C) /เวลา (ชม.)	MIC (μM)	MBC (μM)
25/1	3.8	3.8
25/3	3.8	3.8
25/5	3.8	3.8
37/1	3.8	3.8
37/3	3.8	3.8
37/5	3.8	3.8
50/1	3.8	3.8
50/3	3.8	3.8
50/5	7.8	7.8

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A และการทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลชีพ

จากข้อมูลยีน *SOP* เส้นเต็ม (Full length) จากกุ้งแชบ๊วย (*Ferneropeneaeus merguiensis*) พบว่าลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Domain A มีความแตกต่างจากยีน *SOP* ที่พบในกุ้งชนิดอื่นและมีตำแหน่งที่เป็น cysteines rich domain อยู่ด้วย ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่พบในเปปไทดีต้านจุลชีพ (Loongyai *et al*., 2007) ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้นำยีน *SOP* ในส่วนของ Domain A มาผลิตโปรตีนใน *E. coli* ซึ่งเป็นระบบที่ผลิตโปรตีนได้ง่ายและปริมาณมาก โดยโปรตีน SOP-A ที่ผลิตได้อยู่ในรูป inclusion body เมื่อนำมาทำบริสุทธิ์และตัด GST tag ออกแล้วพบว่าได้โปรตีน SOP-A มีขนาดประมาณ 9 kDa

จากการทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A โดยวิธี liquid growth inhibition assay พบว่าโปรตีนมีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ เช่นเดียวกับส่วน Full length (*Fm*-SOP) (Loongyai *et al*., 2007) และ Domain B (นรีรัตน์, 2555) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า cysteines rich domain ที่พบในยีน SOP ของกุ้งแชบ๊วย มีบทบาทในการต้านจุลชีพของโปรตีนเช่นเดียวกับ cysteines rich domain ที่พบใน antimicrobial peptide อื่นๆ ตัวอย่างเช่น penaeidins เป็น cysteines rich peptide ที่พบในกุ้งมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Destoumieux *et al*, 2000) Snakin1 พบในมันฝรั่ง สามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคในพืช (Segura *et al*., 1999) Tachycin พบใน hemocytes ของ horseshoe crab (Iwanaga *et al*., 1998)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพของโปรตีน SOP-A กับ Full length (*Fm*-SOP) และ Domain B (SOP-B และ SOP-B1) โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อต่างๆ ดังตารางที่ 7 พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของโปรตีน SOP-A ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 3.8 μM ซึ่งมีประสิทธิภาพน้อยกว่า SOP-B และ SOP-B1 ที่มีค่า MIC เท่ากับ 0.78 และ 1.11 μM (นรีรัตน์, 2555) ตามลำดับ แต่มีประสิทธิภาพมากกว่า *Fm*-SOP ที่มีค่า MIC เท่ากับ 15.67 μM (Loongyai *et al*., 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับ AMPs อื่นๆ ที่มีการศึกษาในกุ้ง พบว่าโปรตีน SOP-A มีประสิทธิภาพดีกว่าโปรตีนลูกผสม penaeidins (Pen-2 และ Pen-3a) จากกุ้ง *L. vannamei* (Destoumieux *et al*., 1999) ซึ่งมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* มากกว่า 20 μM และโปรตีนลูกผสม rLs-stylicin1 จาก *L. stylirostris* ซึ่งมีค่า MIC มากกว่า 160 μM (Rolland *et al*, 2010) นอกจากนี้โปรตีน SOP-A ยังมีประสิทธิภาพดีกว่าโปรตีน ALF*Pm3* ที่พบในกุ้ง *P. monodon* ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 50-100 μM (Somboonwiwat *et al*, 2005)

ตารางที่ 7: ค่า MIC ของโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1

เชื้อที่ทดสอบ	***Fm*-SOP**[*]	**SOP-A**	**SOP-B**[**]	**SOP-B1**[**]
	µM	µM	µM	µM
	MIC	MIC	MIC	MIC
แบคทีเรียแกรมลบ				
Enterobacter cloacae	>20	>100	>25	>55
Escherichia coli	>20	31.1	>25	>55
Pseudomonas aeruginosa	>20	>100	>25	>55
Salmonella Typhimurium	>20	>100	>25	>55
Vibrio harveyi	2.38	31.1	7.01	26.1
แบคทีเรียแกรมบวก				
Bacillus megaterium	>20	>100	>25	>55
Enterococcus faecalis	-	>100	>25	>55
Micrococus luteus	>20	>100	>25	>55
Staphylococcus aureus	15.67	3.8	0.78	1.11
ยีสต์				
Candida albicans	>20	63.3	>25	>55
เชื้อรา				
Fusarium oxysporum	-	1.6	12.98	25

* ข้อมูลจากการศึกษาของรุ้งใหญ่และคณะ (Loongyai *et al*., 2007)

**ข้อมูลจากการศึกษาของนรีรัตน์ (นรีรัตน์, 2555)

ประสิทธิภาพของโปรตีน SOP-A ในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* มีค่า MIC เท่ากับ 31.1 µM ซึ่งมีประสิทธิภาพน้อยกว่าโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-B และ SOP-B1 เมื่อเปรียบเทียบ AMPs ในกุ้งอื่นๆพบว่าโปรตีน SOP-A มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *V. harveyi* ดีกว่าโปรตีนลูกผสม penaeidins (Destoumieux *et al*., 1999) ซึ่งมีค่า MIC มากกว่า 40 µM แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าโปรตีน ALF*Pm3* ที่มีค่า MIC เท่ากับ 0.78-1.56 µM (Somboonwiwat *et al*, 2005) โปรตีน rCrus-likePm จาก *P. monodon* ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 2.5-5 µM (Amparyup *et al*, 2008b)

ประสิทธิภาพของโปรตีน SOP-A ในการยับยั้ง *F. oxysporum* มีค่า MIC เท่ากับ 1.6 µM ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าโปรตีน *Fm*-SOP ที่มีค่า MIC มากกว่า 20 µM

(Loongyai *et al*, 2007) โปรตีน SOP-B และโปรตีน SOP-B1 ที่มีค่า MIC เท่ากับ 12.98 และ25 μM ตามลำดับ (นรีรัตน์, 2555) เมื่อเปรียบเทียบ AMPs ในกุ้งอื่นๆพบว่าโปรตีน SOP-A มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *F. oxysporum* ดีกว่าโปรตีนลูกผสม penaeidins ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 5-10 μM (Destoumieux *et al*., 1999) โปรตีนลูกผสม rLs-stylicin1 มีค่า MIC เท่ากับ 2.5 μM (Rolland *et al*, 2010) โปรตีน ALF*Pm3* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56-3.12 μM (Somboonwiwat *et al*, 2005)

นอกจากนี้โปรตีน SOP-A ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli และ C. albicans* ในขณะที่โปรตีน *Fm*-SOP, SOP-B และ SOP-B1 ไม่สามารถยับยั้งได้ โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 31.11 μM ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าโปรตีนลูกผสม penaeidins ซึ่งมีค่า MIC มากกว่า 40 μM (Destoumieux *et al*., 1999) โปรตีนลูกผสม rLs-stylicin1 มีค่า MIC มากกว่า 160 μM (Rolland *et al*, 2010) แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าโปรตีน ALF*Pm3* มีค่า MIC เท่ากับ 0.095-0.19 μM (Somboonwiwat *et al*, 2005) โปรตีน rCrus-likePm จาก ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 2.5-5 μM (Amparyup *et al*, 2008b) ส่วนค่า MIC ของโปรตีน SOP-A ต่อเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 63.3 μM ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าโปรตีนลูกผสม rLs-stylicin1 มีค่า MIC มากกว่า 100 μM (Rolland *et al*, 2010)

4.2 การวัดความสามารถในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ

จากผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่าโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 สามารถทำให้แบคทีเรีย *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่มได้ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่า AMPs ที่พบในกุ้งมีความสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มได้แก่ โปรตีน Penaeidins จาก *L. stylirostris* สามารถทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio* เกิดการเกาะกลุ่มได้ (Munoz *et al*., 2004) โปรตีน Stylicins เป็น AMPs ที่พบใน *L. stylirostris* มีความสามารถในการจับกับ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและมีความสามารถในการจับและทำให้แบคทีเรีย *Vibrio penaeicidae* เกิดการเกาะกลุ่มได้ (Rolland *et al*., 2010) และโปรตีน lectin ที่แยกได้จาก hemolymph ของ *F. merguiensis* ก็มีความสามารถในการทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio* เกิดการเกาะกลุ่มได้เช่นเดียวกัน (Rittidach *et al*., 2007) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง ด้วยเหตุนี้จึงคาดว่าโปรตีนใช้ความสามารถในการทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มเป็นกลไกในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *V. harveyi*

4.3 การวัดการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส (Chitinase activity) ของโปรตีน

จากการหาค่า chitinase activity ของโปรตีนบริสุทธิ์ *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 พบว่าโปรตีน SOP-A มีค่า chitinase activity สูงที่สุด ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* จึงส่งผลให้โปรตีน SOP-A มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ดีกว่าโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-B และ SOP-B1 จึงสามารถสรุปได้ว่าความสามารถในการเป็นเอนไซม์ไคติเนสของโปรตีนเป็นกลไกที่ช่วยให้โปรตีนสามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* เช่นเดียวกับโปรตีน tachycitin ที่พบใน horseshoe crab (Iwanaga *et al*., 1998) และ scarabaecin ใน rhinoceros beetle (Tomie *et al*., 2003)

4.4 การวัดความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส (Proteinase inhibition activity)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าพวกจุลชีพก่อโรคต่าง ๆ จะใช้เอนไซม์โปรตีนเนสในการบุกรุกเข้าสู่ host cell และหลบหลีกอันตรายจากภูมิคุ้มกันของ host ด้วยเหตุนี้ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสจะช่วยป้องกันการบุกรุกและการแพร่กระจายของพวกจุลชีพก่อโรคได้ (Armstrong, 2001) ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสด้วยและพบว่าโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสด้วยแสดงให้เห็นว่ากลไกการยับยั้งเชื้อของโปรตีนทั้งสี่ตัวเกิดจากความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสเช่นเดียวกับโปรตีน Rhamp ที่พบในต่อมน้ำลายของ *Rhipicephalus haemaphysaloides* ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ chymotrypsin และ elastase (Zhang *et al*., 2011b) โปรตีน Ixodidin เป็น AMPs ที่แยกได้จาก hemocytes ของ *Boophilus microplus* มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ chymotrypsin และ elastase (Fogaca *et al,* 2004) และจากผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin อาจมีบทบาทในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของโปรตีน SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 ทำให้โปรตีนทั้งสามตัวนี้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าโปรตีน *Fm*-SOP ซึ่งไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ เช่นเดียวกับโปรตีน Potide-G ที่พบใน potato tubers *(Solanum tuberosum*) ที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ก็มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin เช่นเดียวกัน (Kim *et al*., 2006) และจากการทดสอบประสิทธิภาพ

การยับยั้ง *S. aureus* ของโปรตีนลูกผสม plectasin เมื่อบ่มโปรตีนด้วยเอนไซม์ trypsin พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ลดลง (Zhang *et al*, 2011a) ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ trypsin มีผลต่อการทำงานของโปรตีน นอกจากนี้ในงานวิจัยชิ้นนี้ยังพบว่า Domain B อาจมีบทบาทต่อความสามารถในการทำให้โปรตีน *Fm*-SOP มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ subtilisin A

4.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของโปรตีน SOP-A ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

จากการนำโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* นั้นจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของโปรตีนลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มากกว่า 3 ชั่วโมง ชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลทำให้โปรตีน SOP-A มีประสิทธิภาพลดลงเช่นเดียวกับโปรตีน SOP-B ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (นรีรัตน์, 2555) และจากการทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนลูกผสม plectasin ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่อุณหภูมิต่าง ได้แก่ 30, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Zhang *et al*, 2011a) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้เช่นกัน อย่างไรก็ตามผลการทดลองในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าโปรตีน SOP-A ยังสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิของร่างกายมนุษย์ (37 องศาเซลเซียส) และ อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม Shrimp ovarian peritrophin domain A (SOP-A) เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพและกลไกในการออกฤทธิ์โดยศึกษาเปรียบเทียบกับโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-B และ SOP-B1 สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. เมื่อนำยีน SOP domain A มาโคลนเข้าพลาสมิด pGEX แล้วนำไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-SOP-A ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 และทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-SOP-A พบว่าโปรตีน GST-SOP-A มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39 kDa และเมื่อตัด GST ออกด้วย Thrombin แล้วพบว่าได้โปรตีน SOP-A มีขนาดประมาณ 9 kDa

2. การทดสอบความสามารถในการต้านจุลชีพพบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A สามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli*, *V. harveyi*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *F. oxysporum* เมื่อเทียบกับโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-B และ SOP-B1 พบว่า โปรตีน SOP-A มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ดีกว่าโปรตีนทั้งหมดโดยมีค่า MIC น้อยที่สุดแต่ยังมีประสิทธิภาพน้อยกว่ายา Amphotericin นอกจากนั้นโปรตีน SOP-A ยังสามารถยับยั้ง *E. coli* และ *C. albicans* ซึ้งโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-B และ SOP-B1 ไม่สามารถยับยั้งได้

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดเกาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ *V. harveyi* ของโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 พบว่าโปรตีนทั้งสี่ชนิดสามารถทำให้แบคทีเรีย *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่มได้

4. การวัดการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสของโปรตีน *Fm*-SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1 โดยการหาค่า chitinase activity ของโปรตีน พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.48, 7.64, 6.22 และ 3.50 units/mg protein ตามลำดับ จะเห็นว่าโปรตีน SOP-A มีค่า chitinase activity สูงกว่าโปรตีนทั้งสามชนิด ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum*

5. การวัดความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส พบว่าโปรตีน *Fm*-SOP มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ subtilisin A โปรตีน SOP-A สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin โปรตีน SOP-B สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ chymotrypsin และ subtilisin A ส่วนโปรตีน SOP-B1 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ chymotrypsin และ trypsin

6. การทดสอบประสิทธิภาพการคงตัวของโปรตีน SOP-A ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กับเชื้อ *S. aureus* พบว่าเมื่อนำโปรตีน SOP-A มาบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งและการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ลดลง

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองนี้จะเห็นว่าโปรตีน SOP-A มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ทำให้ต้องเลือกใช้เวกเตอร์ pGEX-4T ซึ่งมี GST tag ที่มีขนาดใหญ่กว่าโปรตีน SOP-A ทำให้ช่วยลดฤทธิ์ของโปรตีนและผลิตใน *E. coli* ได้แต่ต้องมีขั้นตอนการตัด GST Tag ออกจึงทำให้การผลิตโปรตีน SOP-A ค่อนข้างยุ่งยากและได้ปริมาณน้อยและเพิ่มต้นทุนการผลิต เพราะฉะนั้นถ้าจะนำไปประยุกต์ใช้ควรหาระบบอื่นในการ Expression protein เช่นผลิตในยีสต์ *Pichia pastoris* หรือ *S. cerevisiae*

2. โปรตีน SOP-A สามารถยับยั้ง *V. harveyi* และ *F. oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งได้จึงอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งแต่ยังเป็นการทดลองระดับ *in vitro* จึงต้องมีการทดลองในระดับ *in vivo* ต่อไป

รายการเอกสารอ้างอิง

นรีรัตน์ เสียมใหม. 2555. คุณสมบัติการต้านจุลชีพของ Shrimp Ovarian Peritrophin Domain B (SOP B). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปิติ อ่ำพายัพ. 2551. การศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพ GWAP จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon.* รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สกว.

Aketagawa, J., Miyata, T., Ohtsubo, S., Nakamura, T., Morita, T., Hayashida, H., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T. and Shimonishi, Y. 1986. Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. The Journal of biological chemistry. 261: 7357-7365.

Amparyup, P., Donpudsa, S. and Tassanakajon, A. 2008a. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. Developmental and Comparative Immunology. 32: 1497-1509.

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

Armstrong, P.B. 2001. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. TRENDS in Immunology. 22(1): 47-52.

Bachere, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. Aquaculture. 191: 71-88.

Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. and Romestand, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunological Reviews. 198: 149-168.

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.

Blond, A., Cheminant, M., Garzon, D.D., Milazzo, I.S., Peduzzi, J., Goulard, C. and Rrbuffat, S. 2002. Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured

core of the native marcrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. European Journal of Biochemistry. 269(24): 6212-6222.

Brockton, V., Hammond, J.A. and Smith, V.J. 2007. Gene characterization, isoforms and recombinant expression of carcinin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. Molecular Immunology. 44: 943-949.

Che, Q., Zhou, Y., Yang, H., Li, J., Xu, X. and Lai, R. 2008. A novel antimicrobial peptide from amphibian skin secretions of *Odorrana grahami*. Peptides. 29: 529-535.

Chen, S., Xin-Jun, D., Wen-Teng, X., Hong-Wei, Z., Xiao-Fan, Z. and Jin-Xing, W. 2010. Molecular cloning and characterization of three crustins from the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis.* Fish & Shellfish Immunology 28: 517-524.

Chiou, T.T., Wu, J.L., Chen, T.T. and Lu, J.K. 2005. Molecular cloning and characterization of cDNA of penaeidin-like antimicrobial peptide from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Marine Biotechnology. 7: 119-127.

Cuthbertson, B.J., Bullesbach, E.E., Fievet, J., Bachere, E. and Gross, P.S. 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the atlandtic white shrimp (Litopenaeus setiferus) exhibits taeget specificity and an independent proline-rich-domain function. Biochemical Journal. 381: 79-86.

Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, A.V., Rodriguez, J. and Bachere, E. 1997. Penaeidins, A new family of antimicrobial peptide isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda).The Journal of Biological Chemistry. 272: 28398-28406.

Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.M., Van Dorsselaer, A. and Bachere., E. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. European Journal of Biochemistry. 266: 355-346.

Destoumieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M. and Bachere, E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science. 113: 461-469.

Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P.and Bachere, E. 2001. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp

hemocyanin in response to microbial challenge. The Journal of Biological Chemistry. 276: 47070-47077.

Dimarq, J.-L., Bulet, P., Hetru, C. and Hoffmann, J. 1998. Cycteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. Biopolymers 47: 465-477.

Dourado, F.S., Leite, J., Silva, L.P., Melo, J.A.T. Bloch, C.Jr. and Schwartz, E.F. 2007. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus syphax*. Toxicon. 50: 572-580.

Du, X.J., Wang, J.X., Liu, N., Zhao , X.F., Li, F.H. and Xiang, J.H. 2006. Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). Molecular Immunology. 43: 1633-1644.

Elvin, C.M., Vuocolo, T., Pearson, R.D., East, I.J., Riding, G.A., Eisemann, C.H. and Tellam, R.L. 1996. Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina* cDNA and deduced amino acid sequences. The Journal of Biological Chemistry. 271: 8925-8935.

Fogaca, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P. and Daffre, S. 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. Developmental & Comparative Immunology. 28: 191-200.

Folders J., Algra J., Roelofs MS., Loon LCV., Tommassan J. and Bitter W. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. Journal of Bacteriology. 183(24): 7044-7052.

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*. Developmental & Comparative Immunology. 25: 565-577.

Herbinierea, J., Varniera, C.B., Grevea, P., Strubb, J.M., Frerec, J., Dorsselaerb, A.V. and Martina, G. 2005. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). Developmental and Comparative Immunology. 29: 489-499.

Iwanaga S., Kawabata S. and Muta T. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. The Journal of Biochemistry. 123: 1-15.

Kang, C.J., Xue, J.F., Liu, N., Zhao, X.F. and Wang, J.X. 2006. Characterization and express of a new subfamily member of peneaidin antimicrobial peptide (penaeidin5) from *Fenneropenaeus chinensis*. Molecular Immunology. 44: 1535-1543.

Kang, C.-J., Wang, J.-X, Zhao, X.-F., Yang, X.-M., Shao, H.-L. and Xiang, J.-H. 2004. Molecular cloning and expression analysis of the *ch*-penaedin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish & Shellfish Immunology. 16: 513-525.

Kawabata, S., Nagayama, R., Hirata, M., Shigenaga, T., Agarwala, KL., Saito ,J., Nakajima, H., Takagi, T. and Iwanaga, S. 1996. Tachycitin, a small granular component in horseshoe crab hemocytes, is an antimicrobial protein with chitin-binding activity. The Journal of Biochemistry. 120: 1253-1260.

Khayat, M., Babin, P.J., Funkenstein, B., Sammar, M., Nagasawa, H., Tietz, A. and Lubzens, E. 2001. Molecular characterization and high expression during oocyte development of a shrimp ovarian cortical rod protein homologous to insect intestinal peritrophins. Biology of Reproduction. 64: 1090-1099.

Kim, M. H., Park, S.C., Kim, J.Y., Lee, S.Y., Lim, H.T., Cheong, H., Hahm, K.S. and Park, Y. 2006. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety ‘‘Golden Valley’’. Biochemical and Biophysical Research Communications. 346: 681-686.

Kim, Y.K., Kawazoe, I., Tsutsui, N., Jasmani, S., Wilder, M.N. and Aida, K. 2004. Isolation and cDNA cloning of ovarian cortical rod protein in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Zoological Science. 21: 1109-1119.

Kim, Y.K., Park, S.C., Kim, M., Lim, H., Park, Y. and Hahm, K. 2005. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. Biochemical and Biophysical Research Communications. 330: 921-927.

Lai, R., Zheng, Y.T., Shen, J.H., Liu, G.J., Liu, H., Lee, W.H., Tang, S.Z. and Zhang, Y. 2002. Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima.* Peptides 23: 427-435.

Li, W., Li,S., Zhong, J., Zhua, Z., Liu, J., Wang, W. 2011. A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, *Pheretima guillelmi* (Michaelsen). Peptides. 32: 1146-1150.

Liu, F., Liu, Y., Li, F., Dong, B. and Xiang, J. 2005. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Marine Biotechnology. 7: 600-608.

Liu, Z., Liu, H., Liu, X. and Wu, X. 2008. Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixaodes sinensis.* Comparative Biochemistry and Physiology. 149: 557-561.

Loongyai, W., Avarre, J.C., Martine, C., Lubzens, E. and Chotigeat, W. 2007. Isolation and functional characterization of a new shrimp ovarian peritrophin (SOP) from the ovary of *Fenneropenaeus merguiensis*. Marine Biotechnology. 9: 624-637.

Lynn, J.W. and Clark, W.H.Jr. 1987. Physiological and biochemical investigation of the egg jelly release in *Penaeus aztacus*. Biological Bulletin 173: 451-460.

Mai, W.J. and Hu, C.Q. 2009. Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguiensis.* Molecular Biology Reports. 36: 1587-1595.

Morita, T., Ohtsubo, S., Nakamura, T., Tanaka, S., Iwanaga, S., Ohashi, K. and Niwa, M. 1985. Isolation and biological activities of Limulus anticoagulant (anti-LPS factor), which interacts with lipopolysaccharides (LPS). The Journal of biological chemistry 97: 1611-1620.

Munoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D. and Bachere, E. 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. Cellular and Molecular Life Sciences. 61: 961-972.

Muta, T., Miyata, T., Tokunaga, F., Nakamura, T. and Iwanaga, S. 1987. Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. The Journal of biological chemistry 101: 1321-1330.

Ovchinnikova, T.V., Balandin S.V., Aleshina, G.M., Tagaev, A.A., Leonova, Y.F., Krasnodembsky, E.D., Men'shenin, A.V. and Kokryakov, V.N. 2006. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish Aurelia aurita with structural features of defensins and channel-blocking toxins. Biochemical and Biophysical Research Communications. 348: 514-523.

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 maenas. European Journal of Biochemistry. 264: 350-357.

Rittidach, W., Paijit, N. and Utarabhand, P. 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis* hemolymph. Biochimica et Biophysica Acta. 1770: 106-114.

Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Itami, T., Takahashi, Y. and Aoki, T. 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. Fish & Shellfish Immunology. 13: 69-83.

Rolland, J.L., Abdelouahab, M., Dupont, J., Lefevre, F., Bachere, E. and Romestand, B. 2010. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Molecular Immunology. 47: 1269-1277.

Segura, A., Moreno, M., Madueno, F., Molina, A. and Garcia-Olmedo, F. 1999. Snakin-1, a Peptide from potato that is active against plant pathogens. Molecular Plant-Microbe Interactions 12: 16-23.

Silva, P.I., Daffre, S. and Bulet, P. 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. The Journal of Biological Chemistry. 275: 33464-33470.

Somboonwiwat, W., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G. and Bachere, E. 2005. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Developmental and Comparative Immunology. 29: 841-851.

Stensvaga, K., Hauga, T., Sperstada, S.V., Rekdalb, Q., Indrevollc, B. and Styrvolda, O.B. 2008. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from

the spider crab, *Hyas araneus*. Developmental and Comparative Immunology 32: 275-285.

Supungul, P., Klinbunga S., Pichyangkura, R., Jitrapakdee S., Hirono I., Aoki T. and Tassanakajon, A. 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Marine Biotechnology. 4: 487-494.

Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. 2004. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. Diseases of Aquatic Organisms. 61: 123-135.

Tellam, R.L., Wijffels, G. and Willadsen, P. 1999. Peritrophic matrix proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29: 87-101.

Tomie, T., Ishibashi, J., Furukawa, S., Kobayashi, S., Sawahata, R., Asaoka, A., Tagawa, M. and Yamakawa, M. 2003. Scarabaecin, a novel cysteine-containing antifungal peptide from the rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 307: 261-266.

Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., Jimenez-Vega, F. and Avila-villa, A. 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. Comparative Biochemistry and Physiology. 138: 415-422.

Wang, A., Wang, J., Hong, J., Feng, H., Yang, H., Yu, X., Ma, Y. and Lai, R. 2008. A novel family of antimicrobial peptides from the skin of *Amolops loloensis.* Biochimie. 90: 863-867.

Wang, Z.H., Zhao, X.F. and Wang, J.X. 2009. Characterization, kinetics, and possible function of Kazal-type proteinase inhibitors of Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis.* Fish & Shellfish Immunology. 26: 885-897.

Xu, X., Li, J., Han, Y., Yang, H., Liang, J. Lu, Q. and Lai, R. 2006. Two antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana graham*. Toxicon. 47: 459-464.

Yount, N.Y., Bayer, A.S., Xiong, Y.Q. and Yeaman, M.R. 2006. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. Biopolymer 84: 435-458.

Yu, D., Sheng, Z., Xu, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Rees, H.H. and Lai, R. 2006. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis.* Peptides. 27: 31-35.

Zhang, J., Li, F., Wang, Z. and Xiang, J. 2007. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of Biotechnology. 127(4): 605-614.

Zhang, J., Yang, Y., Teng, D., Tian, Z., Wang, S. and Wang, J. 2011a. Expression of plectasin in *Pichia pastoris* and its characterization as a new antimicrobial peptide against *Staphyloccocus* and *Streptococcus*. Protein Expression and Purification. 78: 189-196.

Zhang, H., Zhang, W., Wang, X., Zhou,Y., Wang, N. and Zhou, J. 2011b. Identification of cysteine rich antimicrobial peptide from salivary glands of the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. Peptide. 32: 441-446.

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	2.5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	2.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 2xYT ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	16	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 การเตรียม lysis buffer (pH 8.0)

Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	0.6	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	1.75	กรัม
Tris-HCl	0.12	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.4 การเตรียม 1 M IPTG

ชั่ง IPTG 2.38 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.5 การเตรียม 1 M Tris-HCl1 ลิตร

ชั่ง Tris-HCl 121.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ตามต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.6 การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ชั่ง EDTA 186.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.7 การเตรียม Buffer A, สำหรับ GST-SOP-A protein

1 M Tris-HCl, pH 7.5	5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA, pH 8.0	1	มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้งหมดมาผสมกันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.8 การเตรียม Washing buffer สำหรับ GST-SOP-A protein

1 M Tris-HCl, pH 8.0	5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA, pH 8.0	0.2	มิลลิลิตร
Triton X-100	1	มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้งหมดมาผสมกันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.9 การเตรียม Buffer D สำหรับ GST-SOP-A protein 100 มิลลิลิตร

Tris-HCl	0.6	กรัม
Guanidium	47.76	กรัม
EDTA	0.186	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.10 การเตรียม Binding buffer

2% SDS	40	มิลลิลิตร
1M Tris-HCl pH 6.8	12	มิลลิลิตร

นำสารละลายมาผสมกันจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 60 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.11 การเตรียม Elution buffer

2% SDS	4	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	1.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.8	มิลลิลิตร

นำสารละลายมาผสมกันจากนั้นเติม 10% SDS 1.2 มิลลิลิตร

1.12 การเตรียมสารละลาย PBS, pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

Sodium chloride (NaCl)	8.0	กรัม
Potassium chloride (KCl)	0.2	กรัม
Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1.44	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.24	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

2.1 การเตรียม 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 18.17 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย hydrochloric acid ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียม 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 12.10 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย Hydrochloric acid ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียม 30% acrylamide-bisacrylamideปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง acrylamide 29 กรัม และ N,N'-methylene-bis acrylamide 1 กรัม ละลาย bis-acrylamideด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เติม acrylamide จนละลายหมด ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเตรียม 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5 การเตรียม 10% Ammonium persulphate (APS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่ง 0.1 กรัม APS ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

2.6 การเตรียม 2X sample buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

10% SDS	4	มิลลิลิตร
Glycerol	2	มิลลิลิตร
1M Tris-HCl (pH 6.8)	1.2	มิลลิลิตร
1M DTT	2	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.002	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.7 การเตรียม Tris-glycine buffer ปริมาตร 1 ลิตร

SDS	1	กรัม
Glycine	14.42	กรัม
Tris-base	3.03	กรัม

ชั่ง Trisและ Glycine ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตรจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 แล้วเติม SDS ลงไปแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

2.8 การเตรียมสารละลาย Staining ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Coomassie blue R-250 2 กรัม ละลายใน 95% methanol 525 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.9 การเตรียมสารละลาย destaining I ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 95% Methanol 526 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.10 การเตรียมสารละลาย destaining II ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 95% Methanol 5.26 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียมสารละลายสำหรับ Lowry

3.1 การเตรียม Copper Tartrate carbonate solution (CTC) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Na_2CO_3	20	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	1	กรัม
Na-tatrate	2	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ antimicrobial

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Saline peptone water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Tryptone	1.5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	1.5	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ LB+2% (w/v) NaCl agar ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Tryptone	1	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	2.5	กรัม
Agar	1.5	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth

Beef Extract	2	กรัม
Acid Hydrolysate of Casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

Stock น้ำมันฝรั่ง	80	มิลลิลิตร
D-Glucose	8	กรัม
น้ำกลั่น	320	มิลลิลิตร
Agar	6	กรัม

นำมาละลายให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Stock น้ำมันฝรั่ง	20	มิลลิลิตร
D-Glucose	2	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.6 การเตรียม Stock น้ำมันฝรั่ง

นำมันฝรั่งปอกเปลือกแล้วน้ำหนัก 1 กิโลกรัม มาต้มในน้ำ 1 ลิตร ต้มพอสุก จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวเอาแต่น้ำ แล้วนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4.6 การเตรียม 0.85% (w/v) Normal saline solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Sodium Chloride (NaCl) 0.85 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.7 การเตรียม 10 mg/ml Amphotericin B

ชั่งยา Fungizone 21.8 mg มาละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่าน Millipore เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ Chitinase activity

5.1 การเตรียม Dinitrosalicylic acid reagent solution

Dinitrosalicylic acid	1	กรัม
Phenol	0.2	กรัม
NaOH	1	กรัม
Na_2SO_3	0.05	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ทดสอบ Proteinase inhibitor

6.1 การเตรียม 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 0.61 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย Hydrochloric acid ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ

6.2 การเตรียม 50% (v/v) acetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวง Acetic acid 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมลงในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ไม่ต้องนำไปฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุจรรยา อนุชาญ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5410220098

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2551

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. Anuchan, S., Phongpaijit, S. and Chotigeat, W. 2013. Antimicrobial activity of Shrimp Ovarian Peritrophin Domain A (SOP-A) Recombinant protein from *Fenneropenaeus Merguiensis* (Oral presentation). 18th National Genetics Conference. Ambassador Hotel, Sukhumvit, Bankok, Thailand, July 17-19, 2013. pp. 115-118.