

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

คุณสมบัติของโปรตีน Shrimp Ovarian Peritrophin domain A (SOP-A) ใน  
การยับยั้งจุลินทรีย์

**Characterization of Shrimp Ovarian Peritrophin domain A for  
antimicrobial activity**

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

(รหัสโครงการวิจัยSCI580618S)

คณะผู้วิจัย

รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ

นางสาวปัญชลิกา เดชะมาก

หน่วยงานต้นสังกัด สถาบันวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัย ด้วยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ในครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานการวิจัยมาโดยตลอด

วิไลวรรณ โชติเกียรติ

## บทคัดย่อ

Shrimp Ovarian Peritrophin เป็นโปรตีนที่พบใน jelly layer และ cortical rod ทำหน้าที่ในการป้องกันไข่กุ้งจากสิ่งอันตรายภายนอกทันทีหลังจากที่กุ้งวางไข่ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน SOP ของกุ้งแช่บัว (*Fenneropenaeus merguensis*) ประกอบด้วย 2 domain คือ domain A และ domain B ซึ่งในส่วนของ domain A จะเริ่มตั้งแต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-80 ของยีน *Fm-SOP* นั้น ประกอบด้วย cysteine-rich domains ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่พบใน antimicrobial peptide หลายชนิด การทดลองนี้ได้ทำการผลิตโปรตีนลูกผสม SOP-A พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 9 KDa หลังจากนั้นนำโปรตีนนี้ไปทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลชีพด้วยวิธี liquid growth inhibition assay พบว่าโปรตีน SOP-A มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Candida albicans* และ *Fusarium oxysporum* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) เท่ากับ 0.035 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.57 mg/ml และ 0.015 mg/ml ตามลำดับและเมื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของโปรตีนพบว่าโปรตีน SOP-A มีความสามารถในการทำให้ *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutinate) และมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์โคติเนสนอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส โดยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Trypsin และจากการศึกษาความคงตัวของโปรตีน SOP-A พบว่าโปรตีน SOP-A มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. aureus* ลดลงเมื่อต้มโปรตีนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

**คำสำคัญ:** ยีน โปรตีนลูกผสม กุ้ง ไข่ เพอริโทรฟิน

## Abstract

Shrimp ovarian peritrophin (SOP), a major protein in jelly layer and cortical rods, plays a role in egg protection after spawning. Previous study, sequence of *SOP* gene from *Fenneropenaeus merguensis* (*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 may inhibit microorganism. The molecular weight of purified SOP-A protein was about 9 kDa. Antimicrobial activity of SOP-A protein was investigate by liquid growth inhibition assay. Minimal Inhibition Concentration (MIC) of SOP-A with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* were 0.035 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.57 mg/ml and 0.015 mg/ml, respectively. The SOP-A protein was able to agglutinate *V. harveyi in vitro* and displayed a chitinase activity. Moreover, the SOP-A protein also displayed proteinase inhibitory activity against trypsin. In addition the stability of SOP-A protein was tested and found decrease antimicrobial activity after incubation at 50 °C for 5 h.

**Keywords:** gene recombinant protein shrimp ovarian peritrophin

## สารบัญ

	หน้า
บทนำ	10
วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย	12
วิธีวิจัยและอุปกรณ์	27
ผลการทดลอง	33
วิจารณ์การทดลอง	38
สรุปผลการทดลอง	42
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	39

## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
1. แสดงตำแหน่งของ Domain A และ Domain บนลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Shrimp ovarian peritrophin ( <i>Fm-SOP</i> )	11
2. แสดงข้อมูลการ Alignment ของ deduced amino acid sequence ของ <i>Fm-SOP</i>	15
3. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST-SOP-A ในแบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21 และการทำริสโทธีโปรตีนด้วย 12 % SDS-PAGE	33
4. แสดงผลการทดสอบความสามารถในการทำให้แบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> เกิด agglutination	35
5. แสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส	36

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ตารางแสดง AMPs ที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	18
2. ตารางแสดง AMPs ที่มีการศึกษาในกุ่มชนิดต่างๆ	24
3. แสดงส่วนประกอบของโพลีอะคลิลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)	29
4. แสดงค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของโปรตีน SOP-A	34
5. ค่า MIC ของโปรตีน <i>Fm</i> -SOP, SOP-A, SOP-B และ SOP-B1	38

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

APS	=	ammonium persulfate
$\mu$ l	=	microlitre
$\mu$ g	=	microgram
%	=	percent
$\beta$	=	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



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'-tetramethyl-ethylenediamine
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethyl) aminoethane hydrochloric acid
U	=	unit (s)
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume