โครงการย่อย C
การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต้านเชื้อแคนดิด้าจากน้ำยางพารา

โครงการย่อย 3 นี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโสสกว. ประจำปี 2543 ภายใต้โครงการย่อย 3 เรื่องการวิจัยสารชีวเคมีที่มีมูลค่าสูงจากน้ำยางพารา) โดยคณะผู้วิจัยได้พบสารที่สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับน้ำยางพาราจากสารชีวเคมี ซึ่งอยู่ในส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยาง ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อในช่องปากหลายชนิดรวมทั้ง *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อราในช่องปาก (oral candidiasis) โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด และพบเบื้องต้นว่าสาร anti-candida สามารถทนความร้อนได้ดี และ มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 10 kD ดังนั้นโครงการนี้จึงเป็นการศึกษาโดยทำบริสุทธิ์พร้อมทั้งวิเคราะห์คุณสมบัติของสาร anti-candida ต่อ

อุปกรณ์และวิธีการ

a) แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

Reference strain *C. albicans*

b) วิธีทดสอบ

การทดสอบความสามารถของ โปรตีนยับยั้งแคนดิด้าที่เตรียมได้จากน้ำยางสด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแคนดิด้า ทำโดยการใช้ microdilution technique นำ B-serum หรือ B-serum ในรูปของสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกในช่วง ความเข้มข้น acetone 40-60 และ 60-80% จะถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ undilute, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 ใน microtiter plate (โดยใช้ serum B 100 μl เจือจางด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 μl ทำการเจือจาง serial dilution ปริมาตรสุดท้ายหลังการเตรียมเป็น 100 μl) จากนั้นเติมแบคทีเรียหรือเชื้อราที่เตรียมไว้ (ที่ความขุ่นมาตรฐาน Mac Farland 0.5 ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 10^5 – 10^7 ตัว/มล.) 50 μl ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ที่ บรรยากาศปกติ อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม. ในการทดสอบทุกครั้งต้องมี positive control (ประกอบด้วย เชื้อที่ทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ) และ negative control (ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น)

c) การอ่านผลการทดสอบ

หลุมที่มีความขุ่นเท่า positive control มีผลเป็น + หลุมที่มีความใสเท่า negative control มีผลเป็น – และ ค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ให้ผลเป็นลบเป็นค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ของเชื้อนั้นๆ

d) การหาค่า MIC

ทำโดยใช้ Reference Method ของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Document M27, No.25 โดยปิเปตอาหาร RPMI broth ปริมาตร 100 μl ลงในหลุมบนแผ่น U-microtiter plate นำสารละลาย antimicrobial ที่ต้องการทดสอบไปทำ

serial dilution 1:2 ที่หลุมดังกล่าวตามลำดับ แล้วเติมเชื้อ ที่ต้องการทดสอบความขุ่น 0.5 McFarland ปริมาตร 50 µl ลงไปในหลุมดังกล่าวทุกหลุม ยกเว้นหลุม control จะเติมอาหารแทนเชื้อ นำ plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 35 °C หรือ อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง หากมีการเจริญติบโตของเชื้ออาหารเหลวที่เลี้ยงจะมีความขุ่นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อ ในทางตรงกันข้ามหากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้ออาหารที่เลี้ยงจะไปร่งใส

e) การทดสอบ Inhibition

ใช้ loop เลือกโคโลนี *C. albicans* มา 4-5 โคโลนี จาก culture agar plate นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 35-37 °C ยกเว้น นาน 2-8 ชั่วโมง ปรับความขุ่นโดยใช้ sterile saline ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ทำการเตรียมสารสกัด โดยใช้ micropipette ดูดที่ต้องการทดสอบอย่างมา 10 µl หยดลงบนแผ่น sterile disk ซึ่งวางอยู่บนตะแกรงเหล็กที่อยู่ใน sterile petri dish (หยดลงตรงกลาง) ทำการInoculate เชื้อที่เตรียมได้ ลงใน SDA plate โดยวิธี streaking (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) แล้วใช้ Forceps คีบแผ่น disk ซึ่งมีสารตัวอย่างทดสอบอยู่ วางใน plate ที่มีเชื้อ incubate ที่ 35-37°C นาน 16-18 ชม. อ่านผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone โดยใช้ Vernier caliber

f) การเตรียม B-serum สารตัวอย่างจากน้ำยางสด

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆโดยใช้ภาชนะแช่น้ำแข็งช่วยในการเก็บน้ำยาง เพื่อป้องกันการแตกของอนุภาคลูทอยด์) ไปแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge (45,000g , 45 min) เพื่อแยกน้ำยางออกเป็นชั้นบนที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง ชั้นกลางหรือส่วนใสของ cytosol (C-serum) และ ชั้นก้นหลอด (bottom fraction, BF) ทำการสลายอนุภาคของ BF ด้วยการ Freeze-thaw ซ้ำหลายครั้งที่อณุหภูมิ -20°C สลับกับอุณหภูมิห้อง ปั่นแยกส่วนของเหลวที่ได้ (B-serum)

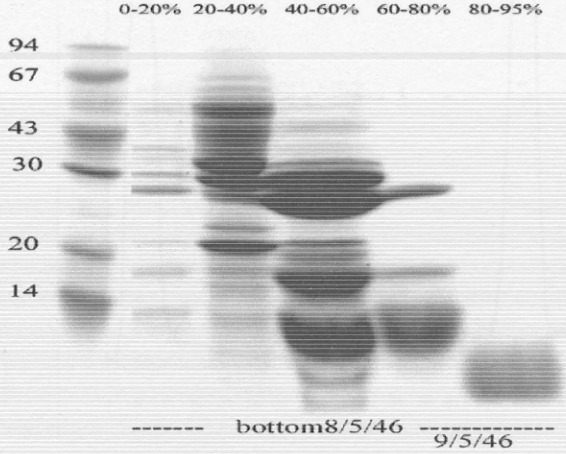
g) การทำบริสุทธิ์สาร anti-candida จาก B-serum

นำ B-serum ซึ่งเตรียมได้จากการนำ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสดไปผ่านการ freeze-thaw สลับกันหลายๆครั้งที่อุณหภูมิ -20°C และที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นแยกเอาส่วนใสของ B-serum ไปตกตะกอนอะซีโตน เลือกช่วงที่มี anti-candida activity สูงสุด ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 70-80% ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยแยกผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex G-25

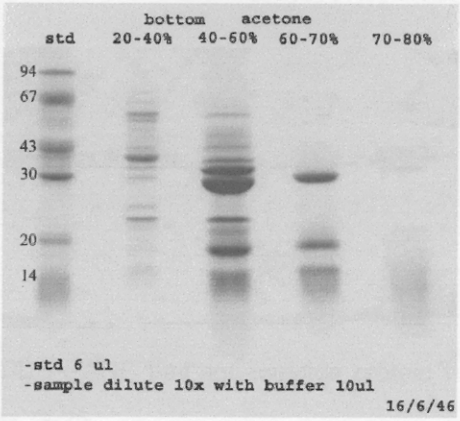
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

a) การทำบริสุทธิ์ และการวิเคราะห์มวลและกรดอะมิโนของ anti-candida protein

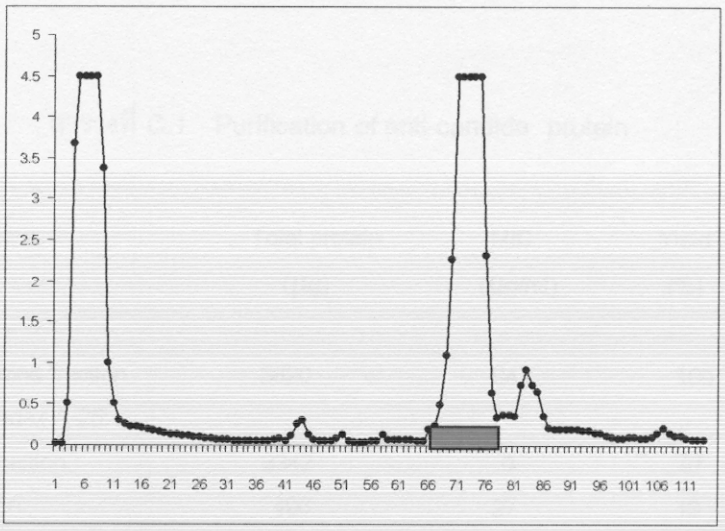
การทำบริสุทธิ์ anti-candida protein สามารถทำได้โดยการนำ bottom fraction ที่แยกได้หลังหารปั่นแยกน้ำยางสด ไปผ่านการทำ acetone fractionation ซึ่งพบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความอิ่มตัวระหว่าง 60-80% จะมี anti-candida activity (รูปที่ C.1) เมื่อนำ active fraction นี้ไปทำ acetone fractionation ซ้ำใช้ถี่ขึ้น ปรากฏว่าได้ active fraction ในช่วงความอิ่มตัวระหว่าง 70-80% (รูปที่ C.2) โดยให้ค่า MIC ประมาณ 64 μg/ml (ตารางที่ C.1) และหลังการนำไปวิเคราะห์โดย SDS-PAGE จะเห็นว่ามีแถบโปรตีนหลักเพียงแถบเดียว แต่เมื่อนำไปตรวจสอบโดยวิธี Mass Spec (รูปที่ C.3) พบว่ามีโปรตีนหลัก, peak height 10000 a.i.,ช่วง 4.721 kD และมีโปรตีนรองที่ช่วง 3.817 kD (4760 a.i.) และ 4866 kD (4000 a.i.) ปนอยู่ด้วย (รูปที่ C.4) จึงได้นำไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยผ่าน DEAE-Sephadex G-25 column (รูปที่ C.5) ได้ active fraction ที่ให้ค่า MIC 27 μg/ml เห็นโปรตีนเพียงแถบเดียวหลังการนำไปวิเคราะห์โดย SDS-PAGE และ เมื่อนำไปวิเคราะห์โดย Mass Spec(รูปที่ C.6) พบว่ามี peak โปรตีนหลัก peak height 25,000 a.i. ช่วง 4.717 kD และโปรตีนรอง peak height 7500 a.i. ช่วง 4.863 kD. จากผลนี้จึงซึ่งถือได้ว่า anti-candida protein ที่ได้มี น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4.717 kD.



รูปที่ C.1 SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้หลังการนำ bottom fraction ไปตกตะกอนด้วย acetone ช่วงความอิ่มตัว 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% และ 80-95% ตามลำดับ

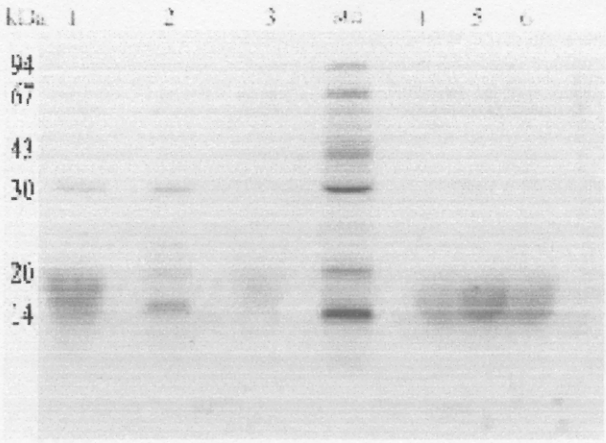


รูปที่ C.2 SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้หลังการนำ bottom fraction ไปตกตะกอนด้วย acetone ช่วงความอิ่มตัว 20-40%, 40-60%, 60-70% และ 70-80% ตามลำดับ



รูปที่ C.3 การนำ anti-candida protein ที่ได้จากการตกตะกอนช่วงความอิ่มตัวของ โปรตีน 70-80% ไปทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex G-25

= anti-candida fraction



รูปที่ C.4 SDS-PAGE ของ anti-candida protein ที่ได้หลังการทำบริสุทธิ์ผ่าน DEAE Sephadex G-25

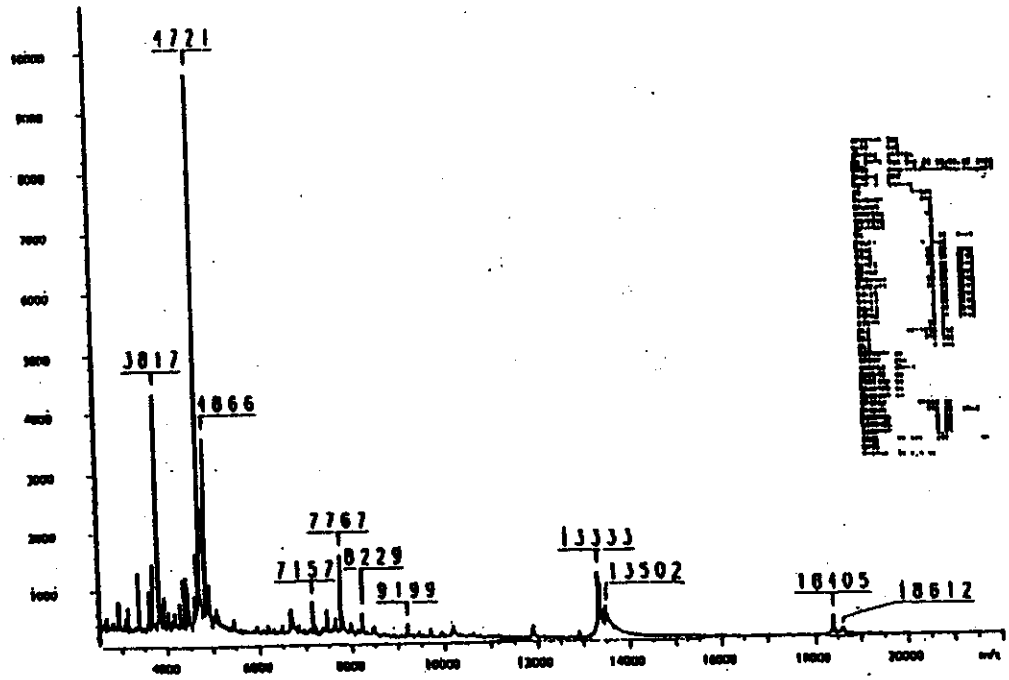
Lane ที่ 1 = anti-candida protein ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย acetone ช่วงความอิ่มตัว70-80%

Lane ที่ 2-3 = unbound fractions

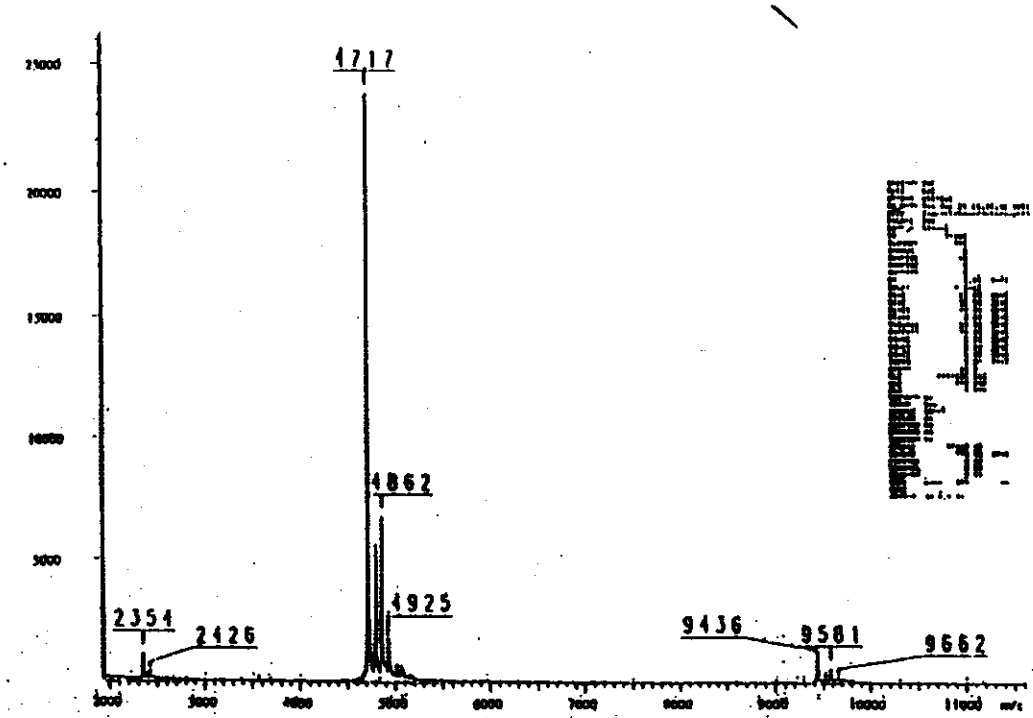
Lane ที่ 4-6= eluted peak fractions of anti-candida protein

ตารางที่ C.1 Purification of anti-candida protein

Sample	Total protein (µg)	MIC (µg/ml)	Yield (%)
70-80% acetone fraction	3820	64	100
DEAE-Sephadex A-25:			
Unbound fraction	3342	0	87
Eluted fraction	496	27	13



รูปที่ C. 5 Mass spectrum ของ anti-candida protein ที่ได้จากตะกอนที่ตกด้วย acetone ช่วง ความอิ่มตัว 70-80%



รูปที่ C. 6 Mass spectrum ของ purified anti-candida protein ที่ได้จาก peak fractionของคอลัมน์ DEAE-Sephadex G-25

โดยพบว่า anti-candida บริสุทธิ์มีค่า MIC ประมาณ 27 ug/ml และมีน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ด้วย Mass Spec (4.717 kD) ที่สอดคล้องกับ hevein (รูปที่ C.6) โดยผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของกรดอะมิโน (ตาราง C. 2) ของสาร anti-candida บริสุทธิ์ และ การเรียงตัวของกรดอะมิโนปลาย N-terminal ดังนี้ :

```
Anti-candida:  EQCGRQAGGKL---------- 11
               ***********
Hevein         EQCGRQAGGKLCPNNLCCSQYGWCGSSDDYCSPSKNCQSNCKG 43
```

(CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment)

ดังนั้นสาร anti-candida ที่พบใน B-serum ก็คือ hevein ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น chitin binding protein และได้พบว่ามี anti-fungal activity ต่อเชื้อราที่ทำลายพืชหลายชนิด (Archer, B.L. ,1960) โดยไปเกาะจับกับ chitin บน cell wall ของเชื้อ การค้นพบว่า hevein มีฤทธิ์ anti- Candida เป็นการค้นพบใหม่ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อราฉวยโอกาสที่ก่อโรคในคน

ตารางที่ C.2 Amino acid composition ของ anti-candida protein เมื่อปรียบเทียบกับ hevein

Amino acid (residue/mole)	Anti-candida	Hevein (Parijs et al., 1991)	Hevein (Archer, 1960)	Hevein (Walujono, 1975)
Ala	1	1.3	0.8	1
Cys	2	8	8	7.9
Asp	6.4	7.6	5.1	6.2
Glu	5.6	6	3.9	5.5
Phe	0	0.1	0	0
Gly	5	5.8	3.9	4.9
His	0.9	0.9	1.4	1.4
Ile	0.01	0.2	0	0
Lys	2.8	2.1	2.1	2
Leu	2	2.3	2.1	1.9
Met	0	0	0	0
Pro	2.1	2.5	2.1	1.9
Arg	0.9	1.2	1.9	1
Ser	3.4	3.5	5	3.7
Thr	0.9	1.1	0.9	0.9
Val	0	0.2	0.7	0
Try	0.9	1.1	1.9	1
Total	33.91	43.9	39.8	39.3

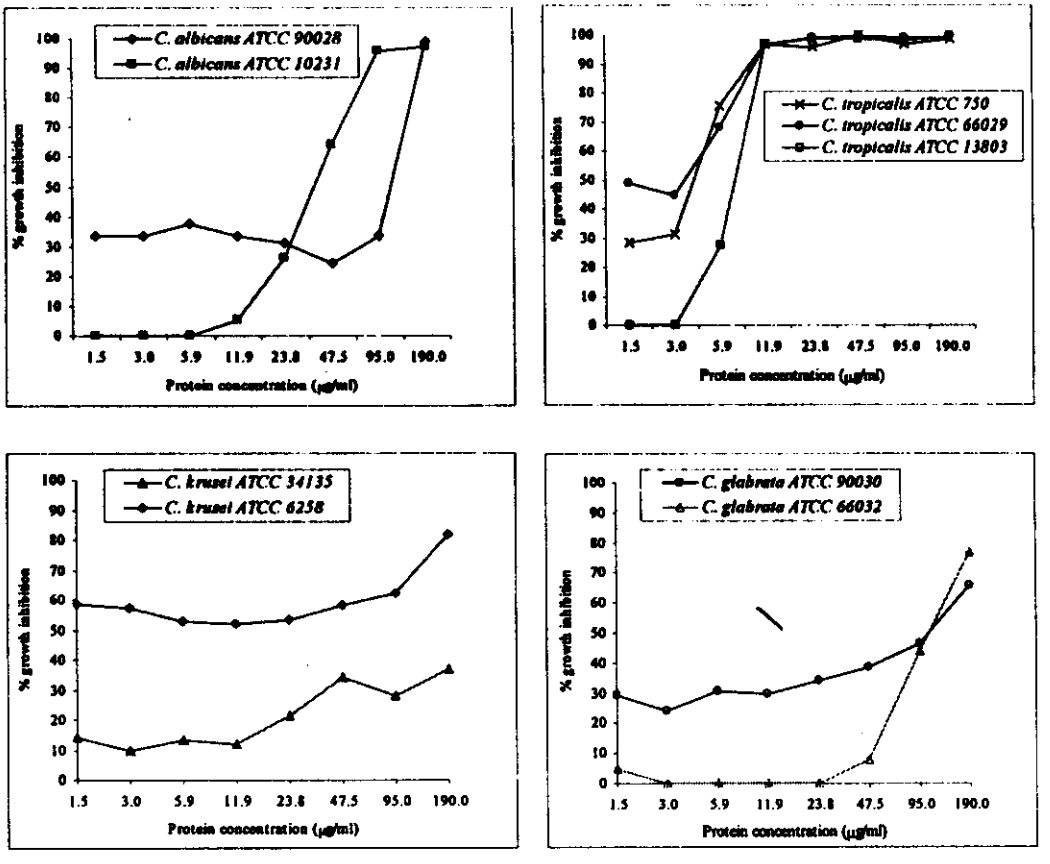
b) คุณสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งแคนดิด้าของ anti-candida protein (hevein)

การทดสอบดูการออกฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้ง candida หลายสายพันธุ์ คือ *C. albican, C. tropicalis, C. krusei* และ *C. glabrata* พบว่า hevein สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้ง candida ได้ทุกสายพันธุ์โดยสามารถยับยั้ง *C. tropicalis* > *C.albicans*> *C.glabrata*> *C. krusei* ตามลำดับ (รูปที่ C.7) และจากการนำ *C. tropicalis* ซึ่งมีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วย hevein ได้ดีที่สุด มาทดสอบการความสามารถในการถูกเหนี่ยวการเกาะกลุ่มด้วย hevein พบว่า จะต้องความเข้มข้นของ hevein ประมาณ 30 μg/ml ถึงจะสามารถเห็นการเกาะกลุ่มของ *C. tropicalis* และต้องอยู่ในสภาพที่มี Ca^{2+} ผสมอยู่ด้วย โดยหากใช้สารคีเลเตอร์จำพวกมี EDTA ผสมลงทำลายฤทธิ์ Ca^{2+} ก็จะไม่สามารถเห็นการเกาะกลุ่มของ *C. tropicalis* (รูปที่ C.8) ซึ่งแสดงว่า hevein สามารถเกาะจับกับผนัง chitin ของ candida นอกจากนั้นเมื่อนำ chitotriose ซึ่งเป็น trimer ของ N-acetylglucosamine ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ chitin ก็พบว่าน้ำตาล chitotriose มีอิทธิพลยับยั้งการฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ candida (ตารางที่ C.3) ผลที่ได้เสริมกลไกการออกฤทธิ์ของ hevein โดยผ่านการเกาะจับกับผนัง chitin ของ candida

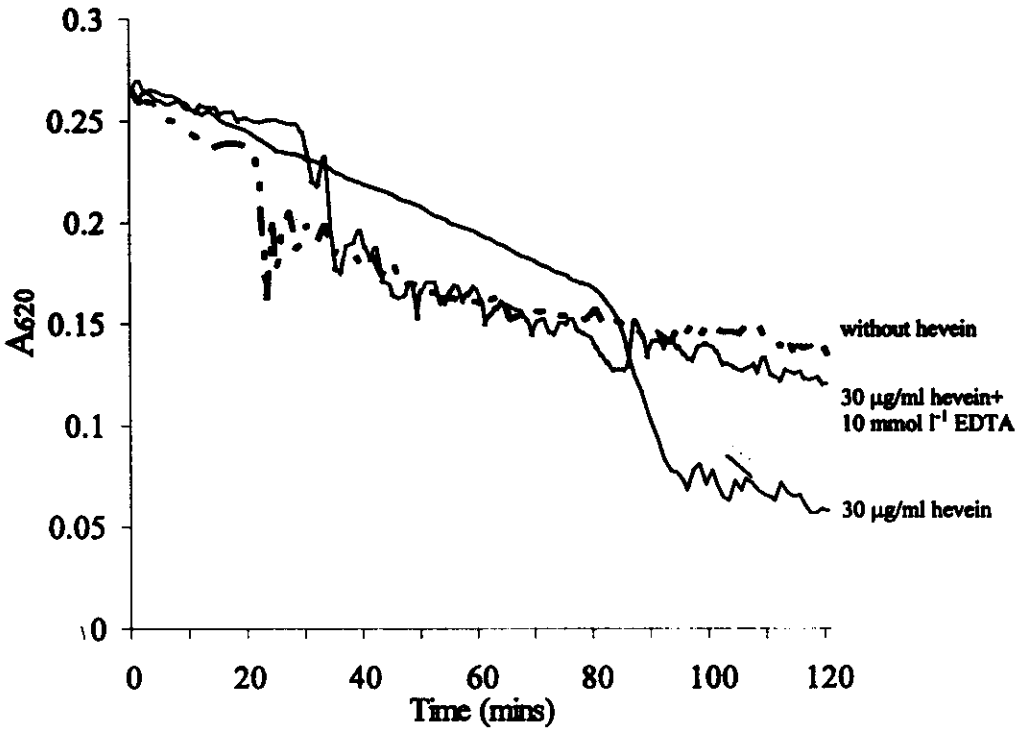
นอกจากนั้นยังพบว่า hevein มีคุณสมบัติที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีโดยสามารถทนต่ออุณหภูมิน้ำเดือดได้นานถึง 30 นาที (รูปที่ C. 9) และทนต่อสภาพ pH กรดและด่างได้ดี (รูปที่ C.10) พร้อมกับได้พบว่า hevein สามารถการยับยั้งการเจริญเติบโต (บริเวณโซนใส) ของ *C. tropicalis* ATCC 750 ได้ดีกว่า *C. albicans* ATCC 10231 (รูปที่ C.11)

ตารางที่ C.3 อิทธิพลของน้ำตาล chitotriose ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้ง candida

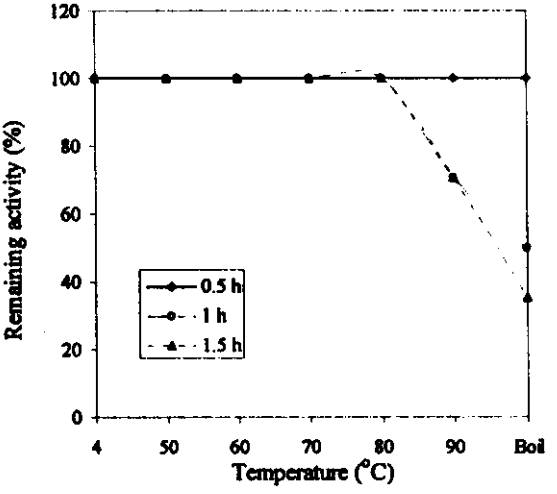
Treatment	Fungal growth inhibition (%)
Hevein Control	100
Hevein + Chitotriose (1 mM)	50
Hevein + Chitotriose (5 mM)	25
Hevein + Chitotriose (10 mM)	0



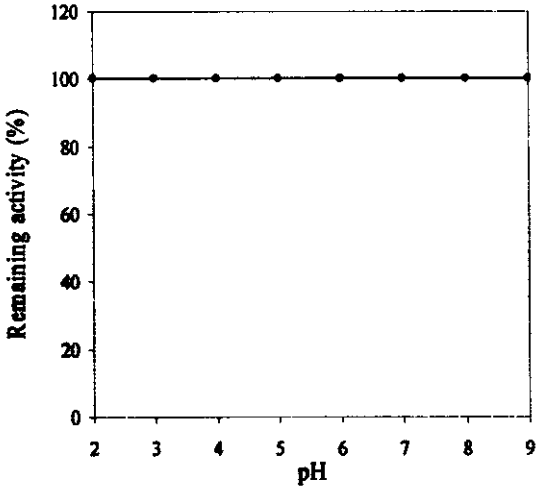
รูปที่ C.7 ฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ candida species ต่างๆ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่ง ปรากฏจาก hevein (Kanokwiroon et al, 2008, Appendix 7)



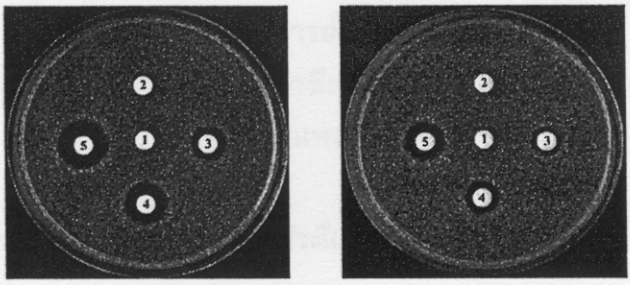
รูปที่ C.8 การเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของ candida โดย hevein ในบัฟเฟอร์ที่มี $CaCl_2$ 1.5 mM (Kanokwiroon et al, 2008, Appendix 7)



รูปที่ C.9 ความเสถียรของ hevein ที่อุณหภูมิต่าง ๆ



รูปที่ C.10 ความเสถียรของ hevein ที่ pH ต่าง ๆ



(A1) (A2)

รูปที่ C.11 (A) อิทธิพลของ hevein ในการยับยั้งการเจริญเติบโต (บริเวณโซนใส) ของ *C. tropicalis* ATCC 750 (A1) and *C. albicans* ATCC 10231 (A2) สารตัวอย่างใน dics 1 ประกอบด้วย 40 μl ของ Tris-HCl buffer , dics 2-5 ประกอบด้วย hevein ปริมาณ 1, 5, 10 and 30 μg ตามลำดับ (Kanokwiroon et al, 2008, Appendix 7)

References:

Archer, B.L. (1960) The protein of *Hevea brailiensis* latex 4. Isolation and characterization of crystaline Hevein. Biochem J. 75, 236240.

Kanokwiroon, K., Teanpaisarn, R., Wititsuwannakul, D., Hooper, A.B., Wititsuwannakul, R. (2008) Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. Mycoses (2008), doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01490.x (in press)

Parijs, J.V ., Broekaert, W.F., Goldstein, I..J.,Peumans, W. (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. Plata 183, 258-264.

Sritanyarat, W., Pearce, G., Siems, W.F., Ryan, C.A., Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul , D. (2005) Isolation and characterization of isoinhibitor of the potato inhibitor I family from the latex of the rubber tree, *Hevea brasiliensis*. Phytochemistry 67, 1644-1650.

Walujono, K., Acholma, R.A. and J.J. Beintema, J.J. (1975) Proceeding of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur, 518-531.