บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

3.1 น้ำยาและสารเคมี

3.1.1 BCA assay kit (Pierce, Rockford, USA)

3.1.2 IEF pH gradient strip 7.3 cm. pH 3-10 (GE Healthcare, Sweden)

3.1.3 Trypsin sequencing-grade (Promega, USA)

3.1.4 น้ำยาและสารเคมีอื่น ๆ ใช้ของบริษัทต่าง ๆ คือ Sigma (USA), Fluka (USA), GE Healthcare (Sweden), Carlo Erba (Italy), Merck (Germany)

3.2 น้ำยาง

น้ำยางจะเก็บจากขั้วของลูกขนุนที่พบได้ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา โดยจะทำการเก็บเก็บใส่ในขวดแก้วปากกว้างที่สะอาด เมื่อเก็บเสร็จแล้วจะนำน้ำยางมาเก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

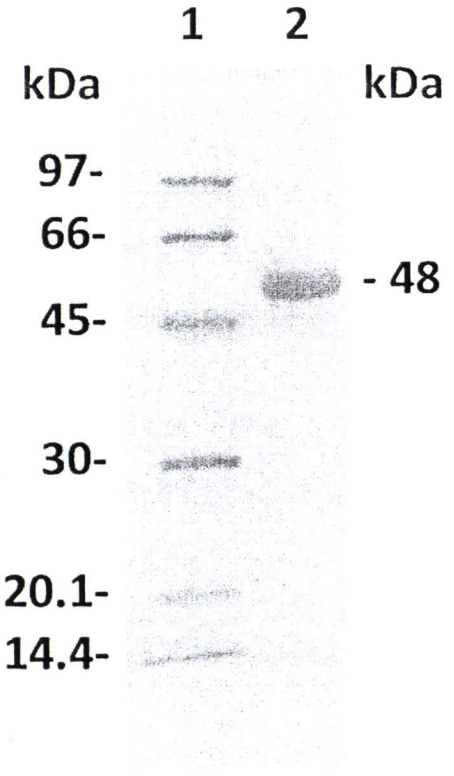
3.3 แบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบการมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดมีสายพันธุ์มาตรฐานตาม Standard American Type Culture Collection (ATCC) strains คือ gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 และ gram-negative coccus: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923

3.4 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

น้ำยางที่เก็บได้จากส่วนขั้วของลูกขนุน นำมาปั่นแยกด้วยเครื่อง high speed centrifuge หลังจากปั่นนำส่วนน้ำที่ได้มา dialysis ด้วย 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5 แล้วนำไปปั่นด้วย high speed centrifuge จะได้ส่วนตะกอนแยกออกจากส่วนน้ำใส นำส่วนใสไปทำให้บริสุทธิ์ (purify) ด้วย cation exchange chromatography โดยใช้ step gradient salt elution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0-0.5 M ใน 25 mM Tris-HCl pH 8.8 หลังจากนั้นนำส่วนโปรตีนที่สกัดในความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 0 M ไป purify ต่อด้วย anion exchange chromatography (Q sepharose) โดยใช้ step gradient salt elution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ในช่วง 0-0.5 M ใน buffer 25 mM Tris-HCl pH 8.8 โดยโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียออกมาที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.4 M และโปรตีนที่ได้เมื่อแยกด้วย 12.5% gel SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli, 1970) พบว่า fraction ของโปรตีนที่ได้ประกอบด้วยแถบโปรตีน (protein bands) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 48 kDa (ดังแสดงในรูปที่ 1) จากวิธี purify โปรตีนข้างต้นจะได้โปรตีนออกฤทธิ์คิดเป็น 1.446% หรือ 6.204 mg ของโปรตีนจากน้ำยางทั้งหมด (429.114 mg) (แสดงในตารางที่ 1) เนื่องจากโปรตีน

ที่ออกฤทธิ์เป็นโปรตีนที่มีขนาด 48 kDa และมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้จึงเรียกโปรตีนนี้ว่า "antimicrobial protein 48 kDa" หรือ "AMP48"



รูปที่ 1 โปรตีนขนาด 48 kDa ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เมื่อแยกด้วยเทคนิค 12.5% gel SDS-PAGE หลังจาก purify โปรตีนจากน้ำยางของต้นขนุนด้วยเทคนิค ion exchange chromatography

ตารางที่ 1 แสดงขั้นตอนการ purify โปรตีนจากน้ำยางของขนุนและ % yield ที่ได้

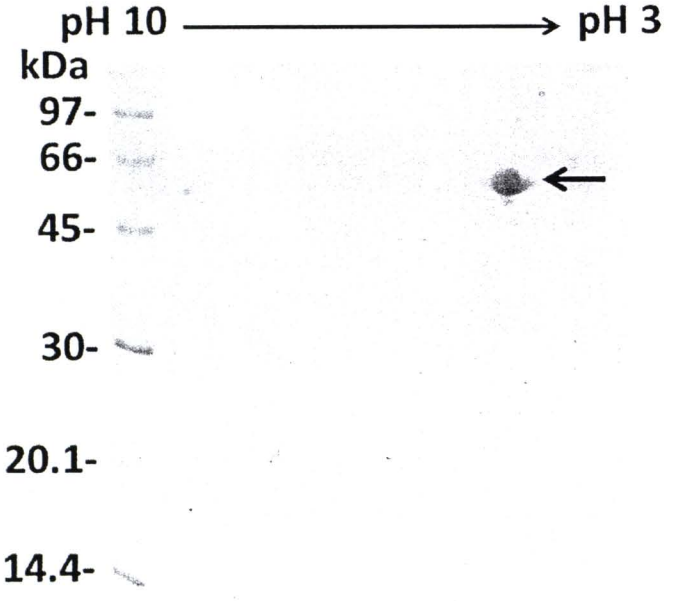
ขั้นตอนการ purify	โปรตีนทั้งหมด (mg)	Yield (%)
1. โปรตีนจากน้ำยางทั้งหมด	429.114	100
2. Dialysis ด้วย 25 mM sodium acetate buffer, pH 4.5	157.500	36.704
2. SP sepharose cation exchange chromatography	66.700	15.544
3. Q sepharose anion exchange chromatography (AMP48 fraction)	6.204	1.446

3.5 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยน้ำยา BCA assay kit ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ นำสารละลายโปรตีน 0.1 ml ผสมกับสารละลาย BCA working reagent 2 ml นำไป incubate ที่ 37 ^{o}C นาน 30 นาที หาความเข้มข้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 562 nm โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.6 Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE)

โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 μg นำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตามประจุใน first dimension โดยใช้ pH gradient strip pH 3-10 ยาว 7 cm และทำการแยกโปรตีนตามขนาด melecular weight อีกครั้งใน second dimension ด้วย 12.5% gel SDS-PAGE แล้วย้อมโปรตีนด้วย colloidal Coomassie brilliant blue G-250 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ImageMasterTM 2D Platinum software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) พบว่าโปรตีนที่ขนาด molecular weight 48 kDa มีเพียงหนึ่ง subunit และมีค่า isoelectric point (pI) ประมาณ 4.2 (แสดงดังรูปที่ 2)



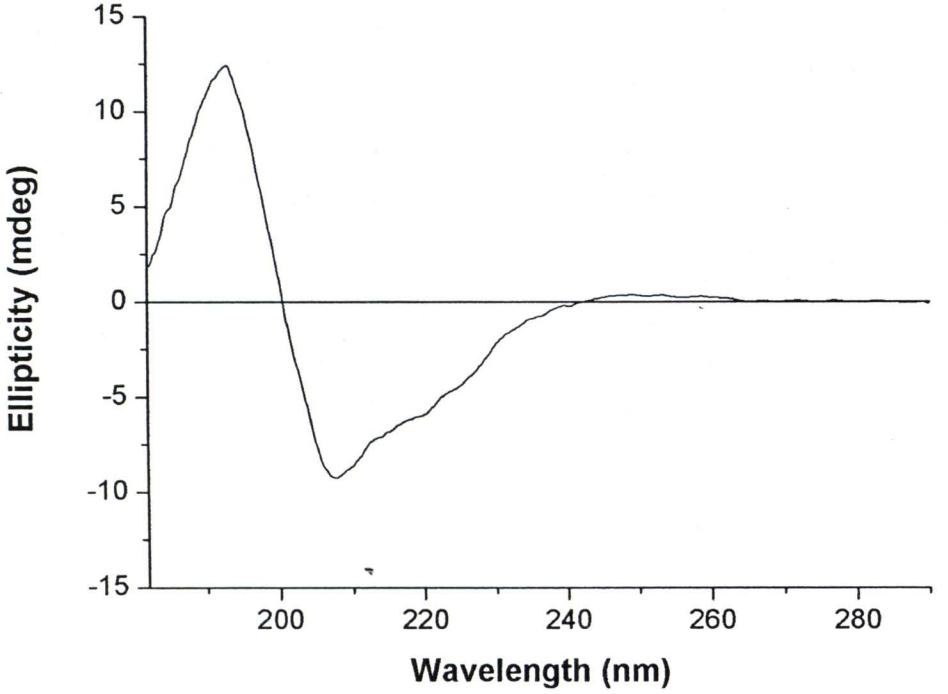
รูปที่ 2 ผล 2D gel electrophoresis ของโปรตีน AMP48 จากยางขนุนที่ทำให้บริสุทธิ์ มีค่า pI ประมาณ 4.2 (ดังลูกศรชี้)

3.7 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค peptide mass fingerprinting (PMF)

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ออกฤทธิ์โดยการตัด spot ของโปรตีน AMP48 ที่ได้จาก 2D gel electrophoresis ในข้อ 3.6 นำไปย่อยด้วย enzyme trypsin วิเคราะห์ PMF ด้วย MALDI-TOF MS ณ หน่วยบริการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร พบว่าโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียไม่มี peptide mass ที่เหมือนกับโปรตีนใน databases ต่าง ๆ

3.8 ศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีนออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy (CD spectroscopy)

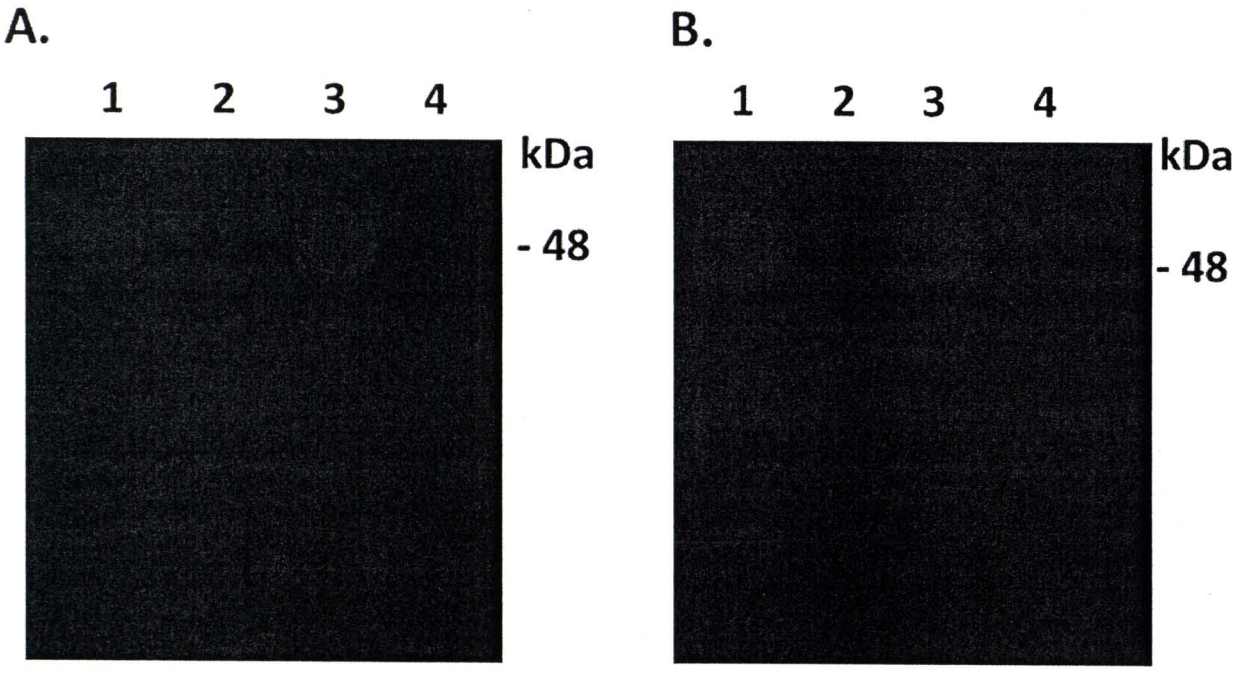
โครงสร้าง secondary structure หรือโปรตีน folding ของโปรตีน AMP48 ศึกษาโดยใช้เทคนิค circular dichroism spectroscopy ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter (Japan) โดยใช้โปรตีนความเข้มข้น 1.6 mg/ml ใช้ speed 20 nm/min, 2 nm bandwidth, 100 mdeg sensitivity, average response time of 2 s และ optical path length เท่ากับ 0.2 mm ผล CD spectrum แสดงในรูปที่ 3 และทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย K2D program (Andrade และคณะ, 1993) พบว่าโปรตีนนี้ประกอบด้วย α-helix ประมาณ 61.9%, β-sheet 6.09%



รูปที่ 3 CD spectra ของโปรตีน AMP48

3.9 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ protease ด้วยวิธี zymography

คุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ protease ของโปรตีน AMP48 ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ Shimokawa และคณะ (2002) โดยใช้ gelatin และ casein เป็น substrate เริ่มจากผสม substrate แต่ละชนิด ความเข้มข้น 1 mg/ml ลงใน 12.5% gel SDS-PAGE แล้วแยกโปรตีน AMP4 ด้วย SDS-PAGE ที่มี substrate แต่ละชนิด ในสภาวะที่มีและไม่มี reducing agent (2-mercaptoethanol) และในสภาวะที่มีการต้มและไม่ต้มตัวอย่าง หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-HCl pH 8.8 ที่ประกอบด้วย 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3, 0.025% Triton X-100 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้น incubate ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 25 mM Tris-HCl pH 8.8 ที่ประกอบด้วย 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ 37 °C แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 คุณสมบัติเป็น protease สังเกตได้จากแถบโปรตีนจะไม่ติดสี (zymography) จากการทดลองพบว่าโปรตีน AMP48 สามารถย่อยได้ทั้ง gelatin และ casein (รูปที่ 4) โดยย่อย gelatin ได้ดีกว่า casein นอกจากนี้พบว่า reducing agent ไม่มีผลต่อคุณสมบัติการเป็น protease ของโปรตีน แต่ความร้อน (~95 °C) สามารถทำลายคุณสมบัติของโปรตีนได้



รูปที่ 4 คุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ protease ของโปรตีน AMP48 ด้วยเทคนิค zymography ใช้ substrate ชนิด gelatin (A) และ casein (B) โดยนำตัวอย่างโปรตีน AMP48 ผสมกับ SDS sample buffer ที่ไม่ได้เติม (lanes 1 และ 2) และเติม 2-mercaptoethanol (lanes 3 และ 4) และในสภาวะที่มีการต้มตัวอย่างหลังจากผสม sample buffer ที่ 95 °C นาน 5 นาที (lanes 2 และ 4) เปรียบเทียบกับไม่ได้ต้มตัวอย่าง (lanes 1 และ 3)

3.10 ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)

3.10.1 วิธี broth twofold microdilution

สารสกัดที่ได้จะนำมาทดสอบการมีฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth twofold microdilution สามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด tryptic soy broth ให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1 x 10^3 CFU/ml และใส่เชื้อ (100 µl) ลงในสารสกัดโปรตีน AMP48 ที่เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ (100 µl) เสร็จแล้วนำไปเลี้ยงที่ 37 °C เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วนำมาให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือ Minimal inhibitory concentration (MIC)ของ บันทึกหน่วยเป็นความเข้มข้นของสารโปรตีนสกัด

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าได้เชื้อ Minimal bactericidal concentration (MBC) ได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหาร trypticase soy agar ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลอง (ตารางที่ 2) พบว่าสารสกัดโปรตีน AMP48 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ชนิด *P. aeruginosa* ATCC 27853 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 2.2 mg/ml และสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ที่ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 8.8 mg/ml) โดยสารสกัดโปรตีน AMP48 ไม่สามารถยับยั้และฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923

ตารางที่ 2 Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของโปรตีน AMP48

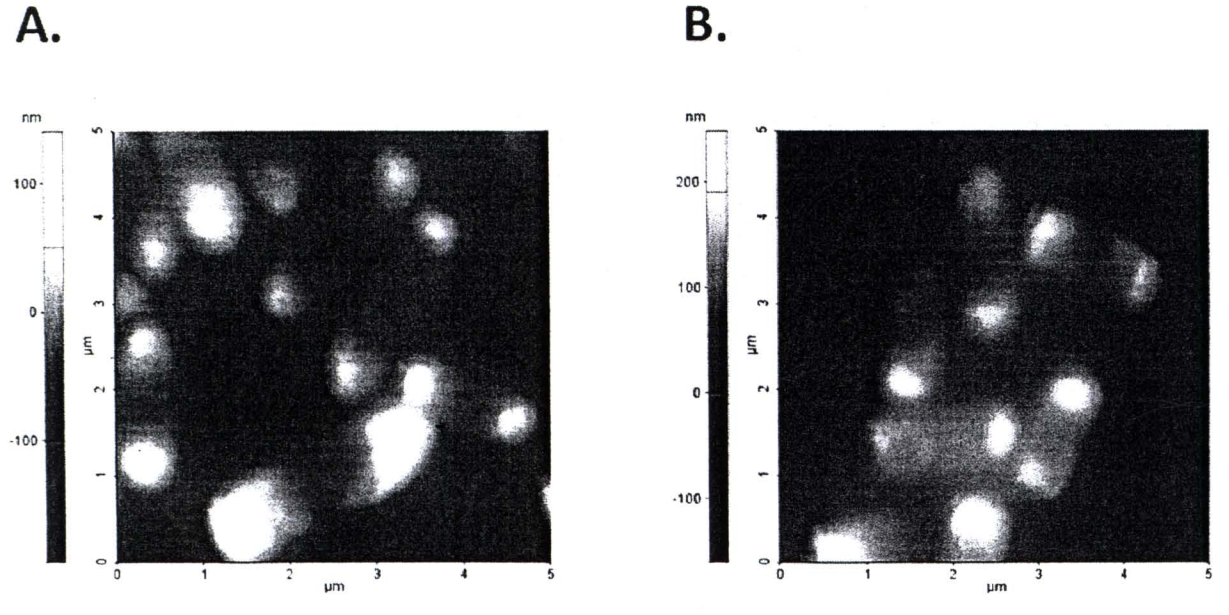
แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	**ความเข้มข้นของโปรตีน AMP48 (mg/ml)**	
	MIC	**MBC**
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	2.2	8.8
Escherichia coli ATCC 25922	No activity	No activity
Staphylococus aureus ATCC 25923	No activity	No activity

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ หอสมุดแห่งชาติ

3.10.2 AFM imaging และ force measurements

ศึกษาผลของสารสกัดโปรตีน AMP48 ต่อขนาดและรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียโดยใช้เทคนิค atomic force microscopy (AFM) ซึ่งสามารถทำได้โดยนำเซลล์แบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* ATCC 27853 ในขั้นตอนที่ 3.10.1 ที่เติมสารสกัดความเข้มข้น 1.1 mg/ml ปริมาณ 10 µl หยดบน mica discs ขนาด 9.9 mm (PELCO®, TED PELLA Inc., Redding, CA, USA) ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปศึกษาพื้นผิวและขนาดของแบคทีเรียด้วยเครื่อง Park XE-70 atomic force microscopy (Park Systems Inc, Suwan, South Korea) โดยใช้โปรแกรมวัดคือ XEP 1.7.56 software วัดโดยใช้ true non-contact mode ใช้ scan speed 0.5 µm/s และ scan size เท่ากับ 5 x 5 μm^2 ประมวลผลเป็นรูปภาพด้วยโปรแกรม XEI 1.7.6 software ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะทำการเปรียบเทียบระหว่างขนาดและรูปร่างของแบคทีเรียในสภาวะที่เติมสารสกัดโปรตีน AMP48 กับสภาวะที่ไม่มีการเติมสารสกัดโปรตีน โดยการวัดจะวัดตัวอย่างละ 40 เซลล์แบคทีเรีย หรือ 10 microscopic fields ขนาดของแบคทีเรียที่วัดได้ในแต่ละ condition จะมีการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล (normality distribution test) โดยใช้สถิติ Shapiro-Wilk statistic (Shapiro และ Wilk, 1965) หลังจากนั้นข้อมูลที่ได้ระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบคทีเรียที่เติมและไม่เติมสารสกัดโปรตีนจะนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้ Student's *t* test ของชุดโปรแกรม SPSS (windows version 11.5.0)

ผลการทดลองพบว่าเซลล์แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ในสภาวะที่เติมสารสกัดโปรตีน AMP48 มีขนาดและรูปร่างลดลงกว่าแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) (แสดงในรูปที่ 5) โดยแบคทีเรียที่เติมสารสกัดโปรตีนมีขนาดเฉลี่ย 0.668 ± 0.035 x 1.735 ± 0.069 µm และแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการเติมสารสกัดมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 0.915 ± 0.036 µm x 3.019 ± 0.038 µm



รูปที่ 5 ภาพพื้นผิว (surface) ของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 เมื่อวิเคราะห์ด้วย AFM เปรียบเทียบในสภาวะที่ไม่เติม (A) และเติมสารสกัดโปรตีน AMP48 (B)