

บทที่ 2

ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

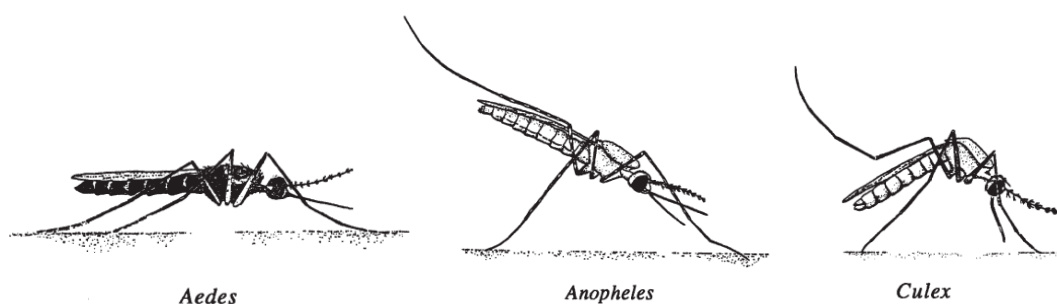
1. ยุง

1.1 ลักษณะทั่วไปของยุง

ยุงเป็นแมลงในวงศ์ Culicidae อันดับ Diptera มีขนาดประมาณ 4-6 มิลลิเมตร ส่วนหัว ออก และท้องมองเห็นได้อย่างชัดเจน มีปีก 1 คู่ และมีปากคล้ายวงยื่นไปด้านหน้า สามารถพบยุงได้เกือบทั่วโลกแต่พบมากในเขตร้อนชื้นและอบอุ่น ปัจจุบันพบว่าโลกนี้มียุงประมาณ 3,450 ชนิด ในจำนวนนี้มียุงที่เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญอยู่ 3 สกุล (ภาพที่ 2.1) ได้แก่ ยุงลาย (*Aedes*) มีสีดำ ขามีลายขาวสลับดำชัดเจน เพาะพันธุ์ในแหล่งน้ำขัง เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก (dengue) ยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) สังเกตได้จากการเกาะจะยักกันขึ้นเป็นปล่อง เพาะพันธุ์ในแหล่งน้ำที่ไหลช้าๆ เป็นพาหะนำโรคไข้มาลาเรีย (malaria) และยุงรำคาญ (*Culex*) มีสีน้ำตาล เพาะพันธุ์ในน้ำนิ่งหรือน้ำไหลที่เน่าเสีย เป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (filariasis) และโรคไข้สมองอักเสบ (Clements, 1992)

ภาพที่ 2.1

ยุงชนิดต่างๆ



ที่มา: ดัดแปลงจาก “Infectious Diseases and Arthropods (2 ed.)” by Goddard, 2008, Humana, p.32.

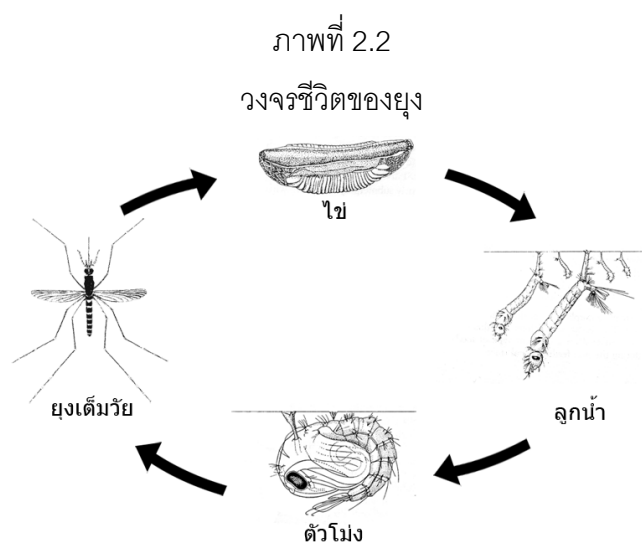
ยุงมีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) แบ่งเป็น 4 ระยะ คือ ไข่ (egg) ลูกน้ำ (larva) ตัวไหม (pupa) และยุงเต็มวัย (adult) ตามภาพที่ 2.2

ยุงตัวเมียจะวางไข่ในแหล่งน้ำหรือที่แฉะที่น้ำท่วมถึง แต่ครั้งยุงจะวางไข่ 50–500 ฟอง โดยปกติไข่ยุงจะฟักเป็นลูกน้ำภายใน 2-7 วัน หรืออาจมากกว่าขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ แต่ไข่ยุงบางสายพันธุ์สามารถทนสภาพแห้งแล้งได้นาน ถึงแม้ว่าจะขาดน้ำหลายเดือนหรือเป็นปีก็ยังสามารถฟักเป็นลูกน้ำได้เมื่อมีน้ำเพียงพอและสภาพแวดล้อมเหมาะสม เมื่อออกจากไข่ ลูกน้ำยุงจะมีขนาดเล็กมากและจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อลอกคราบ โดยลูกน้ำจะลอกคราบ 4 ครั้ง ก่อนจะกลายเป็นตัวไหม ในระหว่างนี้ลูกน้ำจะกินอาหารซึ่งมีลักษณะเป็นอนุภาคที่ลอยลอยอยู่ในน้ำ เช่น แบคทีเรีย ไดอะตอม สาหร่าย และอนุภาคสารอินทรีย์ที่เกิดจากการสลายตัวของเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ก่อนจะกลายเป็นตัวไหม เมื่อเข้าสู่ระยะตัวไหม ตัวไหมจะไม่กินอาหารแต่จะลอยอยู่บริเวณผิวน้ำเพื่อหายใจ ตัวไหมยังสามารถเคลื่อนที่ได้ซึ่งแตกต่างจากดักแด้ของแมลงชนิดอื่น ระยะนี้จะใช้เวลา 1-2 วัน จากนั้นจึงลอกคราบเพื่อกลายเป็นยุงตัวเต็มวัย ยุงเต็มวัยสามารถกระจายจากแหล่งน้ำเพาะพันธุ์เป็นรัศมี 1-2 กิโลเมตร ยุงตัวผู้มีอายุประมาณ 4-5 วัน และจะตายหลังจากที่ผสมพันธุ์แล้ว ในขณะที่ยุงตัวเมียมีอายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ หรือนานกว่านั้นขึ้นอยู่กับชนิดของยุงและสภาพแวดล้อม ยุงเต็มวัยมีปากสำหรับดูดกินน้ำหวานจากพืชเป็นอาหาร เฉพาะยุงตัวเมียที่จะดูดเลือดคนและสัตว์มีกระดูกสันหลังเพื่อนำโปรตีนในเลือดไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของไข่ในรังไข่ พฤติกรรมการกินอาหารนี้ทำให้ยุงสามารถแพร่เชื้อโรคหรือปรสิตต่างๆ สู่คนและสัตว์ได้ (Clements, 1992)

1.2 การควบคุมประชากรยุง

ตั้งแต่อดีตมีวิธีการมากมายเพื่อกำจัดยุงหรือควบคุมประชากรของยุงเพื่อลดความเสี่ยงในการติดเชื้อจากยุงที่เป็นพาหะ การควบคุมมีทั้งการควบคุมที่ตัวยุง หมายถึงการกำจัดยุงในระยะที่เป็นยุงเต็มวัย เช่น การฉีดพ่นด้วยสารเคมี เช่น dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงนิยมใช้กันทั่วโลก หรือยาฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphorus carbamate และ pyrethroid มักบรรจุในกระป๋องสเปรย์ นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในครัวเรือน เนื่องจากการใช้สารเคมีเป็นทางเลือกที่สะดวก หาซื้อได้ง่าย และสามารถกำจัดยุงได้อย่างรวดเร็ว สามารถลดความรำคาญจากยุงได้ทันทีทันใด แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถควบคุมได้ในระยะยาว ต้องใช้สารเคมีอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้การจะใช้สารเคมีควบคุมจำนวนยุงพาหะเพื่อป้องกันโรคติดต่อจะต้องทำเป็นบริเวณกว้างจึงจะได้ผล ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองทรัพยากร ก่อให้เกิดมลพิษ เกิด

ผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมถึงมนุษย์ด้วย และอาจทำให้ยุ่งเกิดการติดต่อสารเคมีตามมา (Hemingway & Ranson, 2000)



ที่มา: ดัดแปลงจาก “Infectious Diseases and Arthropods (2 ed.)” by Goddard, 2008, Humana, p. 52. และ “The Biology of Mosquitoes (1 ed. Vol. 1)” by Clements, 1992, Chapman & Hall, pp. xiii-xv.

การควบคุมประชากรยุงอีกแนวทาง คือ การควบคุมแหล่งเพาะพันธุ์ยุง หมายถึงการลดปริมาณยุงโดยป้องกันไม่ให้มีโอกาพัฒนาเป็นยุงเต็มวัย เช่น การรณรงค์ให้กำจัดแหล่งน้ำขังเพื่อกำจัดยุงลาย การปล่อยน้ำเน่าเสียที่ขังตามท่อระบายน้ำเพื่อควบคุมยุงรำคาญ และการใส่ทราย Abate® ลงในภาชนะที่มีน้ำขังเพื่อฆ่าลูกน้ำยุง วิธีการควบคุมดังกล่าวเป็นวิธีการที่ได้ผลดีก็ต่อเมื่อแต่ละครัวเรือนลงมือทำพร้อมกัน (Vreysen, Robinson, & Hendrichs, 2007) ด้วยสาเหตุเหล่านี้นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามที่จะหาแนวทางและวิธีการใหม่ๆ ในการควบคุมประชากรของยุงโดยไม่พึ่งพาสารเคมี สามารถควบคุมได้เป็นบริเวณกว้างเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง การควบคุมทางชีววิธี (biological control) คือ การอาศัยศัตรูตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตนั้นมา ซึ่งเป็นการควบคุมประชากรของยุงได้ในระยะยาวและเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงต่อยุงเท่านั้นโดยไม่ส่งผลข้างเคียงใดๆ ต่อทั้งมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม จึงไม่ทำให้ธรรมชาติเสียสมดุล การควบคุมทางชีววิธีโดยใช้จุลินทรีย์ (microbial control agent) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะสามารถผลิตเชื้อจุลินทรีย์ได้ในราคาถูก และไม่ส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อมอีกด้วย

2. แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้ทั่วไปในดิน สามารถสร้างสปอร์ได้ ในระหว่างการสร้างสปอร์แบคทีเรียจะผลิตโปรตีนซึ่งเป็นพิษต่อแมลงหลายชนิด (Schnepf et al., 1998) *B. thuringiensis* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2444 โดยซีเกทาเนะ อิชิวาตาริ นักชีววิทยาชาวญี่ปุ่น ต่อมาในปี พ.ศ. 2454 เอิร์นสท เบอร์ลินเนอร์ (Ernst Berliner) พบว่า *B. thuringiensis* ก่อโรคในหนอนผีเสื้อกลางคืน (*Plodia interpunctella*) หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2519 จึงค้นพบพลาสมิดใน *B. thuringiensis* ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสปอร์และการสร้างผลึก (crystal) ภายในเซลล์โดยแซคคาไรอันและคณะ (Cheng, 1984; Zakharyan et al., 1979) หลังจากนั้นมีการค้นพบ *B. thuringiensis* อีกหลายสายพันธุ์ ซึ่งผลิตโปรตีนสารพิษที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันทั้งความจำเพาะต่อแมลงและความรุนแรงในการออกฤทธิ์ ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำ *B. thuringiensis* ไปใช้ควบคุมประชากรแมลงอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถกำจัดแมลงที่ต้องการโดยไม่ทำอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นรวมทั้งมนุษย์ด้วย จึงปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้สารเคมี (Butko, 1996; Dean, 1984; Lemaux, 2008)

การประยุกต์ใช้ *B. thuringiensis* ในการควบคุมแมลงแบ่งเป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ การใช้ *B. thuringiensis* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร และการใช้ *B. thuringiensis* เพื่อควบคุมประชากรแมลงพาหะนำโรคในแหล่งชุมชน การผลิต *B. thuringiensis* ในเชิงพาณิชย์เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชเริ่มขึ้นในช่วงปี พ.ศ. 2463-2472 โดยผลิตเป็นสปอร์หรือผลึกของโปรตีนสารพิษสำหรับนำไปฉีดพ่นในแปลงปลูกเพื่อป้องกันแมลง ต่อมาในปี พ.ศ. 2528 บริษัท Plant Genetic Systems ได้พัฒนาต้นยาสูบที่ตัดแต่งพันธุกรรมเพื่อให้ทนต่อแมลงศัตรูพืช (transgenic tobacco) โดยการถ่ายยีนที่ผลิตโปรตีนสารพิษจาก *B. thuringiensis* เข้าสู่ต้นยาสูบ ทำให้ต้นยาสูบสามารถผลิตโปรตีนสารพิษเพื่อป้องกันแมลงได้ และหลังจากนั้นมีการดัดแปลงพันธุกรรมในลักษณะเดียวกันในพืชชนิดอื่น เช่น ข้าวโพด และฝ้าย (Lemaux, 2008; Vaeck, Reynaerts, & Hofte, 1987) จากการสำรวจพบว่าในปี พ.ศ. 2549 มีพื้นที่ปลูกข้าวโพดตัดแต่งพันธุกรรม 165,600 ตารางกิโลเมตร และฝ้ายตัดแต่งพันธุกรรม 115,900 ตารางกิโลเมตร ซึ่งคิดเป็น 11.1% และ 33.6% ของผลผลิตทั่วโลกของพืชทั้ง 2 ชนิด ตามลำดับ และยังพบว่าในช่วงเวลา 10 ปี (พ.ศ. 2539-2548) มีการใช้สารเคมีฆ่าแมลงในการปลูกข้าวโพดและฝ้ายลดลงถึง 35.6 ล้านกิโลกรัม แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการของสารพิษจาก *B. thuringiensis* ในการใช้ทดแทนสารเคมีในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม (Lemaux, 2008)

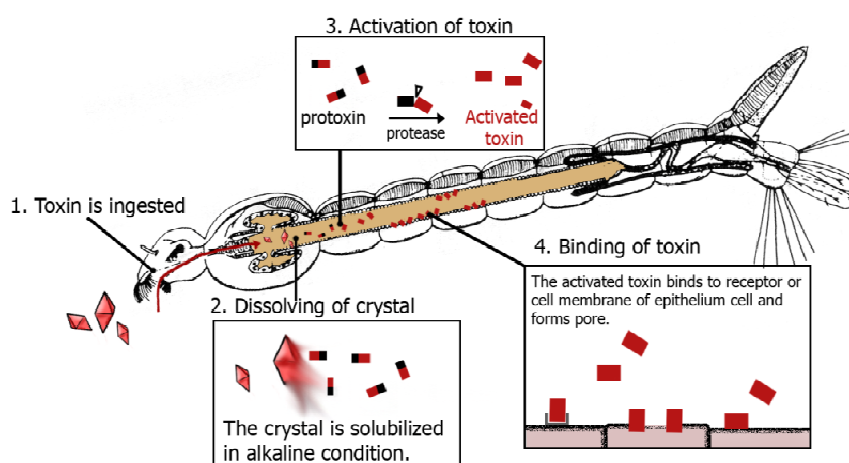
ในช่วงแรกนั้นเชื่อกันว่า *B. thuringiensis* เป็นพืชต่อหนอนผีเสื้อ (Lepidopteran larvae) เพียงอย่างเดียวจึงพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในทางการเกษตรเป็นหลัก จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2519 มีการค้นพบ *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* จากดินบริเวณแหล่งเพาะพันธุ์ยุงในประเทศอิสราเอล (Goldberg & Margalit, 1977) หลังจากศึกษาเพิ่มเติมพบว่าสามารถฆ่าหนอนแมลงวันและลูกน้ำยุงได้ (Dipteran larvae) แต่ไม่ฆ่าหนอนผีเสื้อ การค้นพบนี้นำไปสู่การนำ *B. thuringiensis* ไปใช้ควบคุมประชากรแมลงพาหะนำโรคในแหล่งชุมชน เช่น ยุง และแมลงวัน อย่างไรก็ตามการใช้ *B. thuringiensis* ในการควบคุมประชากรยุงยังมีข้อจำกัดเมื่อเทียบกับการใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช เนื่องจากการใช้ควบคุมประชากรยุงจะต้องใส่ *B. thuringiensis* ในแหล่งเพาะพันธุ์ยุงซึ่งมีบริเวณกว้างและมีความหลากหลายสูงขึ้นอยู่กับชนิดของยุง ทำให้มีข้อจำกัดในการผลิต *B. thuringiensis* ให้มีรูปแบบ (formulation) ที่เหมาะสมต่อการใช้งาน (Sushil, 2001)

3. โปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

ในระยะสร้างสปอร์ *B. thuringiensis* จะผลิตโปรตีนสารพิษขึ้นซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ Cry (Crytal toxin) และ Cyt (Cytolytic toxin) โปรตีนสารพิษที่ผลิตขึ้นมีโครงสร้างที่ยังไม่สามารถแสดงความเป็นพิษได้ (protoxin) มีลักษณะเป็นผลึกซึ่งเก็บไว้ในเซลล์ เมื่อตัวอ่อนของแมลงกินผลึกโปรตีน สภาวะที่เป็นต่างภายในกระเพาะจะทำให้ผลึกโปรตีนละลาย จากนั้นเอนไซม์โปรติเอสภายในกระเพาะแมลงซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มทริปซิน (trypsin-like protease) และกลุ่มไคโมทริปซิน (chymotrypsin-like protease) จะตัดบางส่วนของโมเลกุลโปรตีน เปลี่ยนให้โปรตีนมีโครงสร้างที่พร้อมจะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เป้าหมาย (active toxin) ต่อจากนั้นโปรตีนสารพิษจึงเข้าจับกับเซลล์เยื่อบุกระเพาะแมลงและทำให้เซลล์เสียหาย จนกระทั่งตัวอ่อนของแมลงตาย (ภาพที่ 2.3) (Li, Carroll, & Ellar, 1991; Li, Koni, & Ellar, 1996; Schnepf et al., 1998)

หลังจากการค้นพบ *B. thuringiensis* ครั้งแรก มีการค้นพบ *B. thuringiensis* อีกหลายสายพันธุ์ รวมทั้งพบโปรตีนสารพิษเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งคุณสมบัติหลากหลายทั้งความจำเพาะต่อแมลงและความรุนแรงในการออกฤทธิ์ แต่เนื่องจากในระยะแรกของการศึกษาโปรตีนสารพิษยังไม่มีหลักในการจำแนกชนิดของโปรตีนที่ค้นพบและไม่มีการตั้งชื่อโปรตีนสารพิษอย่างมีระบบ เช่น *icp* *cry* *kurhd1* Bta และ bt1 เป็นต้น ต่อมาจึงมีการแบ่งกลุ่มโปรตีนสารพิษและกำหนดเกณฑ์ในการ

ภาพที่ 2.3
กลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าแมลง



ที่มา: “The Biology of Mosquitoes (1 ed. Vol. 1)” by Clements, 1992, Chapman & Hall, p. 132.

ตัวอ่อนแมลงกินผลึกโปรตีน (1) ผลึกโปรตีนละลายในสภาวะด่างในกระเพาะ (2) โปรตีนถูกเอนไซม์โปรติเอสในกระเพาะตัดทำให้มีโครงสร้างที่พร้อมแสดงความเป็นพิษ (3) และโปรตีนสารพิษเข้าจับกับเซลล์กระเพาะและแสดงความเป็นพิษ (4)

ตั้งชื่อยีนของโปรตีนสารพิษขึ้นโดยใช้ความเป็นพิษต่อชนิดของแมลง (pathotype) เป็นเกณฑ์ โดยกำหนดให้ใช้ชื่อ Cry หรือ Cyt ตามด้วยเลขโรมันเพื่อแสดงถึงกลุ่มยีนของโปรตีนสารพิษ โปรตีน Cry มีความหลากหลายค่อนข้างมากสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือกลุ่ม CryI เป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera กลุ่ม CryII เป็นพิษต่อแมลงทั้งอันดับ Lepidoptera และ Diptera กลุ่ม CryIII เป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Coleoptera และ กลุ่ม CryIV เป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Diptera เมื่อมีการค้นพบยีนของโปรตีนสารพิษชนิดใหม่จะพิจารณาจัดเข้ากลุ่มตามความจำเพาะในการฆ่าแมลง และใช้ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ภาษาอังกฤษแสดงลำดับในการค้นพบโปรตีนสารพิษ เช่น CryIA CryIB และ CryIC ตามลำดับ ระบบการจัดจำแนกนี้เป็นความพยายามครั้งในการสร้างกฎเกณฑ์และเป็นแนวทางในการจำแนกโปรตีนสารพิษต่อไป เมื่อมีการศึกษาโปรตีนสารพิษมากขึ้นพบว่าโปรตีนหลายชนิดที่ค้นพบภายหลังว่าสามารถฆ่าแมลงในกลุ่มอื่นๆ ได้ด้วย เช่น โปรตีน CryIC ทราบภายหลังว่าสามารถฆ่าแมลงในอันดับ Diptera ได้ด้วย จึงทำให้ชื่อโปรตีน

ขัดแย้งกับความสามารถในการฆ่าแมลง ทำให้ต้องย้ายโปรตีนเหล่านี้ไปอยู่ในกลุ่มใหม่คือ CryV ซึ่งเป็นกลุ่ม Cry ที่มีความจำเพาะต่อแมลงแตกต่างจาก 4 กลุ่มที่กำหนดไว้ ต่อมาจึงเปลี่ยนไปใช้ระบบในการจำแนกชนิดโปรตีนสารพิษโดยแบ่งตามความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสารพิษ สร้างเป็นไฟโลเจเนติกทรี (phylogenetic tree) ชื่อยีนและโปรตีนประกอบด้วย 3 อันดับ อันดับแรก (primary rank) แบ่งโปรตีนสารพิษได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ Cry และ Cyt อันดับสอง (secondary rank) แสดงถึงลำดับของโปรตีน Cry และ Cyt เขียนด้วยตัวเลขอารบิกเรียงตามลำดับแทนเลขโรมันในระบบเก่า และอันดับสาม (tertiary rank) แสดงลำดับย่อยของโปรตีนสารพิษ Cry และ Cyt หมายเลขต่างๆ เขียนด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ตามด้วยตัวอักษรพิมพ์เล็ก โปรตีนสารพิษจาก *B. thuringiensis* จึงถูกเปลี่ยนเป็นชื่อระบบใหม่ ตัวอย่างเช่น โปรตีน CryIA เปลี่ยนเป็น Cry1A CryIIA เปลี่ยนเป็น Cry2A และ CryIVB เปลี่ยนเป็น Cry4B ส่วนโปรตีน CytA เปลี่ยนเป็น Cyt1 และ CytB เปลี่ยนเป็น Cyt2 เมื่อค้นพบโปรตีนชนิดใหม่ลำดับกรดอะมิโนจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีอยู่เดิม และเพิ่มในไฟโลเจเนติกทรี การจัดกลุ่มและตั้งชื่อจะพิจารณาความคล้ายคลึงกับโปรตีนสารพิษที่มีอยู่เดิม โดยดูจากตำแหน่งในไฟโลเจเนติกทรี (Crickmore et al., 1998) ตัวอย่างเช่น โปรตีน Cry ชนิดใหม่เมื่อเพิ่มในไฟโลเจเนติกทรีแล้วพบว่าอยู่ในกลุ่ม Cry4B จะได้ชื่อ Cry4B ต่อท้ายด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กถัดจากที่ใช้ในโปรตีน Cry4B อื่น หากมีโปรตีนชื่อ Cry4Ba และ Cry4Bb แล้ว จะชื่อเป็น Cry4Bc หากเพิ่มในไฟโลเจเนติกทรีแล้วอยู่นอกกลุ่ม Cry4B แต่อยู่ในกลุ่ม Cry4 จะได้ชื่อเป็น Cry4 ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ตัวถัดไป เช่น Cry4C เป็นต้น หรือหากเพิ่มในไฟโลเจเนติกทรีแล้วไม่อยู่ในกลุ่ม Cry หมายเลขใดเลย แสดงว่าเป็นโปรตีน Cry กลุ่มใหม่ จะตั้งชื่อว่า Cry ตามด้วยตัวเลขอารบิกตัวถัดไป เช่น Cry5 เป็นต้น

3.1 Crystal toxin

Crystal toxin หรือ Cry หมายถึง โปรตีนที่มีลักษณะเป็นผลึกผลิตจาก *B. thuringiensis* ในระหว่างสร้างสปอร์ซึ่งมีฤทธิ์เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย (target organism) หรือโปรตีนใดๆ ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Cry ที่ทราบแน่นอนแล้ว (Crickmore et al., 1998) โปรตีน Cry พบใน *B. thuringiensis* เกือบทุกสายพันธุ์ ปัจจุบันมีการค้นพบโปรตีน Cry มากกว่า 200 ชนิด ซึ่งแบ่งย่อยได้เป็น 60 กลุ่ม คือ Cry1-Cry60 (Crickmore et al., 2010) จากการศึกษาพบว่าโปรตีน Cry มีฤทธิ์เป็นพิษอย่างจำเพาะต่อแมลงหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผีเสื้อและผีเสื้อกลางคืน (Lepidopteran) กลุ่มแมลงปีกแข็ง (Coleopteran)

กลุ่มแมลงวันและยุง (Dipteran) และกลุ่มผึ้งและมด (Hymenopteran) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน Cry บางชนิดสามารถฆ่าพยาธิตัวกลม (Nemotode) ได้ด้วย (Crickmore et al., 1998)

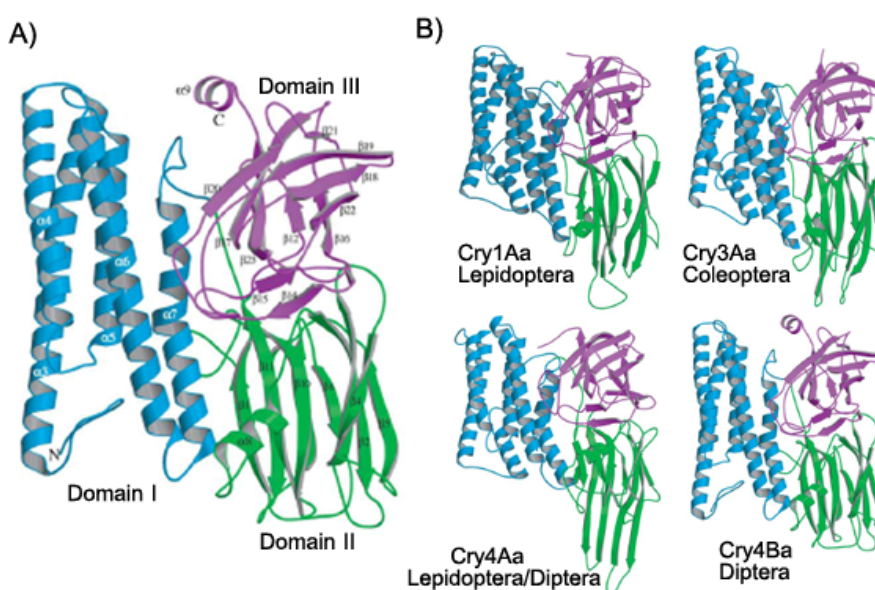
โปรตีน Cry มีมวลโมเลกุลประมาณ 60-130 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Cry แต่ละชนิดพบว่ามีความหลากหลายสูง แต่มีโครงสร้างสามมิติที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งให้เห็นว่าโปรตีน Cry ทุกชนิดน่าจะมีกลไกการทำงานคล้ายคลึงกัน โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Cry ประกอบด้วย 3 โดเมน (ภาพที่ 2.4A) โดเมน I มีโครงสร้างเป็นกลุ่ม α -helix โดเมนนี้ของโปรตีน Cry แต่ละชนิดค่อนข้างคล้ายกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้วพบว่าโครงสร้างของโดเมน I คล้ายคลึงกับโปรตีน colicin และ diphtheria toxin ซึ่งเป็นโปรตีนสารพิษที่ทำให้เกิดรูรั่ว (pore-forming toxin) จึงเชื่อว่าโดเมนนี้น่าจะมีหน้าที่ทำให้เกิดรูรั่วเช่นกัน (Boonserm, Davis, Ellar, & Li, 2005; Li et al., 1991) โดเมน II และ III ประกอบด้วย β -sheet และลูป (loop) เมื่อเปรียบเทียบโดเมน II และ III ระหว่างโปรตีน Cry1Aa ซึ่งเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อ Cry3Aa ซึ่งเป็นพิษต่อหนอนแมลงปีกแข็ง Cry4Aa ซึ่งเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อและลูกน้ำยุง และ Cry4Ba ซึ่งเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง จะเห็นว่ามีโครงสร้างและการจัดเรียงแตกต่างกันค่อนข้างมาก (ภาพที่ 2.4B) จากการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของโปรตีนอื่นๆ พบว่าโดเมน II และ III มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่จับกับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate-binding protein) เช่น vitelline lectin และส่วนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตของ xylanase U และ β -galactosidase จึงสันนิษฐานว่าโดเมนนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับความจำเพาะต่อแมลง โดยบริเวณลูปทำหน้าที่จับกับตัวรับ (receptor) บนเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (Boonserm et al., 2005; de Maagd, Bravo, Berry, Crickmore, & Schnepf, 2003)

จากการศึกษาเทียบเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีน Cry กับโปรตีนอื่น ทำให้เป็นที่ยอมรับกันว่าโปรตีน Cry มีกลไกในการทำงานโดยทำให้เกิดรูรั่วที่เซลล์กระเพาะของแมลงเป้าหมาย (Schnepf et al., 1998) ในการศึกษาโปรตีน Cry กลไกการทำงานของโปรตีน Cry1A มีการศึกษาค่อนข้างมาก พบโปรตีนที่สามารถจับกับ Cry1A ได้ (Cry1A binding protein) อย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีนในกลุ่ม cadherin (cadherin-like protein, CADR) โปรตีน aminopeptidase-N (APN) โปรตีน alkaline phosphatase (ALP) และ โปรตีนในกลุ่ม glycoconjugate 270 กิโลดาลตัน (270 kDa glycoconjugate, GCR) (ภาพที่ 2.5) ซึ่งแต่ละชนิดพบในหนอนผีเสื้อที่ต่างกัน ในหนอนใยสาหร่าย (*Manduca sexta*) พบโปรตีนที่สามารถจับกับ Cry1A ได้ 2 ชนิด คือ โปรตีน Bt-R₁ ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม cadherin และ โปรตีน APN จาก

การศึกษาพบว่าหลังจากโปรตีน Cry1A ละลายที่สภาวะต่างภายในกระเพาะและถูกตัดด้วย เอนไซม์โปรติเอสแล้ว โปรตีน Cry1A ที่พร้อมจะแสดงความเป็นพิษใช้บริเวณ loop ในโดเมน II เข้า จับกับโปรตีน Bt-R₁ จากนั้น Cry1A จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformational change) ทำให้เอนไซม์โปรติเอสตัดส่วน α -helix ที่ปลาย N ซึ่งอยู่ในโดเมน I ออก จากนั้นโปรตีน Cry1A จะ เกิดการเกาะกลุ่มกัน (oligomerization) แล้วจึงเข้าจับกับโปรตีน APN และแทรกส่วนของโดเมน I เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย (ภาพที่ 2.6) สำหรับกลไกของโปรตีน Cry ใน ลูกน้ำยังมีการศึกษาน้อยกว่าทำให้ยังไม่ทราบกลไกโดยละเอียด แต่จากโครงสร้างของโปรตีน Cry ที่คล้ายคลึงกันคาดว่าน่าจะมีกลไกการทำงานคล้ายคลึงกัน

ภาพที่ 2.4

โครงสร้างสามมิติของ Crystal toxin



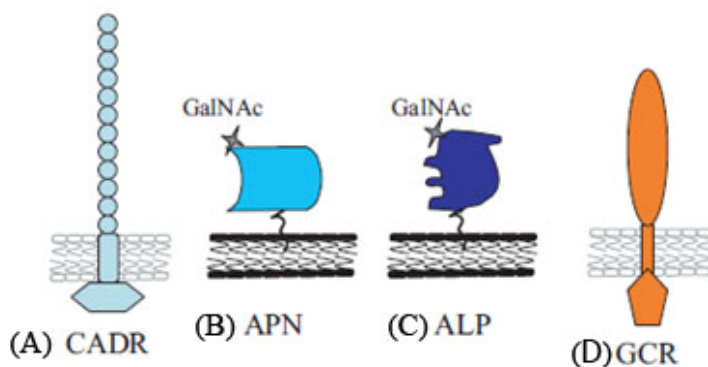
ที่มา: “Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications” by Boonserm, Davis, Ellar, & Li, 2005, Journal of Molecular Biology, 348(2), pp. 366-371.

A) แสดงโดเมนต่างๆ ของ Cry4Ba

B) การเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของ crystal toxin แต่ละชนิดที่มีความจำเพาะต่อแมลงที่ต่างกัน

ภาพที่ 2.5

โปรตีนที่สามารถจับกับโปรตีน Cry1A ได้

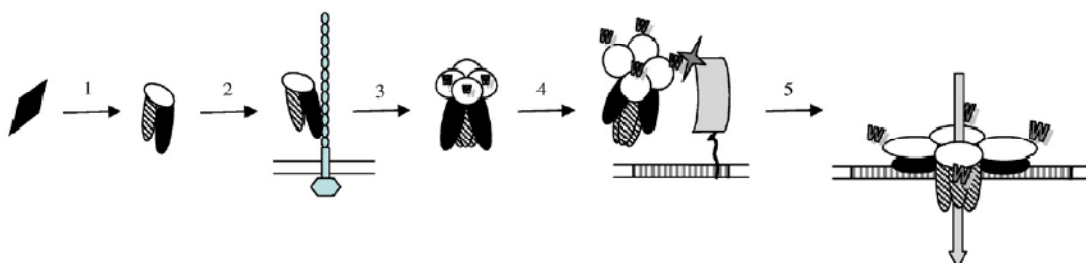


ที่มา: “Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control” by Bravo, Gill, & Soberón, 2007, Toxicon, 49(4), p. 427.

โปรตีนที่สามารถจับกับโปรตีน Cry1A ได้ พบในหนอนผีเสื้อ CADR: cadherin-like protein (A) APN: aminopeptidase-N (B) ALP: alkaline phosphatase (C) และ GCR : 270 kDa glycoconjugate (D)

ภาพที่ 2.6

การทำให้เกิดรูรั่วในเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน Cry



ที่มา: “Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control” by Bravo, Gill, & Soberón, 2007, Toxicon, 49(4), p. 430.

การเกิดรูรั่วในเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน Cry เริ่มจากผลึกโปรตีนละลายในสถานะที่เป็นผงและถูกตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส (1) โปรตีน Cry ที่มีโครงสร้างที่พร้อมแสดงความเป็นพิษเข้าจับกับตัวรับตัวแรกซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม cadherin (2) เอนไซม์โปรติเอสตัดปลาย N ในโดเมน I ของโปรตีนออก ทำให้เกิดการรวมตัวกัน (3) กลุ่มโปรตีน Cry ที่รวมตัวกันเข้าจับกับ APN ซึ่งเป็นตัวรับที่ 2 (4) และโปรตีน Cry ใช้โดเมน I แทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มทำให้เกิดรูรั่วขึ้น (5)

3.2 Cytolytic toxin

Cytolytic toxin หรือ Cyt หมายถึง โปรตีนที่มีลักษณะเป็นผลึกผลิตจาก *B. thuringiensis* ในระหว่างสร้างสปอร์ซึ่งมีฤทธิ์สลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) หรือโปรตีนใดๆ ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Cyt ที่ทราบแน่นอนแล้ว (Crickmore et al., 1998) โปรตีน Cyt พบใน *B. thuringiensis* บางสายพันธุ์เท่านั้น ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่เป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Diptera (Cheong & Gill, 1997; Juárez-Pérez, Guerchicoff, Rubinstein, & Delécluse, 2002; Promdonkoy, Chewawiwat, Tanapongpipat, Luxananil, & Panyim, 2003) ในปัจจุบันพบโปรตีน Cyt มากกว่า 30 ชนิด แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างโปรตีน Cyt สามารถแบ่งได้เพียง 2 กลุ่มเท่านั้น คือ Cyt1 และ Cyt2 แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cyt มีความหลากหลายน้อยกว่าโปรตีน Cry ในการทดสอบกับแมลง โปรตีน Cyt มีความเป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Diptera แต่เมื่อทดสอบในหลอดทดลองพบว่าสามารถทำให้เซลล์หลายชนิดเกิดการสลายตัว รวมทั้งสามารถทำให้ไลโปโซม (liposome) สลายตัวได้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน Cyt ไม่ต้องการตัวรับในการจับกับเซลล์ นอกจากนี้เมื่อผสมโปรตีน Cyt เข้ากับสารละลายลิพิด (lipid) ที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับไลโปโซมและบ่มทิ้งไว้ พบว่าโปรตีน Cyt สูญเสียความสามารถในการทำให้เซลล์สลายตัว ชี้ให้เห็นว่าลิพิดทำให้โปรตีน Cyt เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอย่างถาวร (irreversible conformational change) เมื่อจับกับลิพิด (Thomas & Ellar, 1983)

โปรตีน Cyt มีมวลโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน แต่ละชนิดมีลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติที่คล้ายคลึงกัน โครงสร้างสามมิติของโปรตีนมีเพียงโดเมนเดียว ประกอบด้วยโครงสร้าง β -sheet ล้อมรอบด้วย α -helix (ภาพที่ 2.7) ซึ่งไม่ปรากฏบริเวณที่ทำหน้าที่จับกับตัวรับ (Li et al., 1996) กลไกการทำงานของโปรตีน Cyt มีผู้เสนอไว้ 2 สมมุติฐาน คือ การทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Chow et al., 1989; Promdonkoy & Ellar, 2000) และการทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย (Butko, 2003) (ภาพที่ 2.8) ซึ่งทั้ง 2 แนวคิดนี้โปรตีน Cyt จะเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่ลิพิดโดยตรง แต่แตกต่างกันที่การทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์มีการแทรกตัวของโปรตีนเข้าสู่ชั้นลิพิดและประกอบกันเป็นโครงสร้างจำเพาะทำให้เกิดรูรั่วขึ้น ในขณะที่การลดแรงตึงผิวทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายโปรตีน Cyt จะจับกับพื้นผิวเยื่อหุ้มเซลล์แต่ไม่แทรกตัวในชั้นลิพิด การจับกันเป็นแบบสุ่มซึ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการบิดเบี้ยวหรือเกิดรูรั่วขึ้นชั่วคราว (Butko, 2003) จากงานวิจัยที่ผ่านมามีหลักฐานที่สนับสนุนความเป็นไปได้ของกลไกทั้ง 2 แบบ เช่น เมื่อทดลองติดฉลากกรดอะมิโนในบริเวณ β -sheet ด้วยสาร acrylodan ซึ่งเป็นสารที่เปลี่ยนแปลงตาม

สภาพความมีขั้ว (polarity sensitive) พบว่าส่วน β -sheet มีการแทรกตัวในชั้นลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าบริเวณดังกล่าวทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Promdonkoy & Ellar, 2000) ในขณะที่การวิเคราะห์โปรตีน Cyt ในสถานะที่มีลิพิดด้วยเทคนิค SDS-PAGE ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน Cyt เกาะกันแบบสุ่ม ไม่มีสัดส่วนที่แน่นอน เกิดเป็นโครงสร้างที่มีขนาดเล็ก 2-3 โมเลกุล จนถึงโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่มากจนไม่สามารถเคลื่อนผ่านเจลได้ ซึ่งการเกาะกันลักษณะนี้ไม่น่าทำให้จัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบจนสร้างรูรั่วได้ (Manceva, Pusztai-Carey, Russo, & Butko, 2005)

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง 2 ชนิด คือ Cry4Ba ซึ่งพบใน *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* มีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงลายและยุงก้นปล่องแต่ไม่เป็นพิษต่อยุงรำคาญ และ Cyt2Aa ซึ่งพบใน *B. thuringiensis* spp. *darmstadensis* เป็นพิษปานกลางต่อลูกน้ำยุงลาย ยุงก้นปล่อง และยุงรำคาญ ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้มีกลไกการทำงานต่างกันในการเข้าจับกับเซลล์เป้าหมาย โดย Cry4Ba ต้องอาศัยตัวรับในการจับกับเป้าหมาย ในขณะที่โปรตีน Cyt2Aa สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยตรง จากงานวิจัยพบว่าเมื่อให้ลูกน้ำยุงกินโปรตีนทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน โปรตีนสารพิษจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีขึ้นหลายเท่า แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cry4Ba และ Cyt2Aa สามารถเสริมฤทธิ์กันได้ (Promdonkoy, B., Promdonkoy, P., & Panyim, 2005)

ภาพที่ 2.7

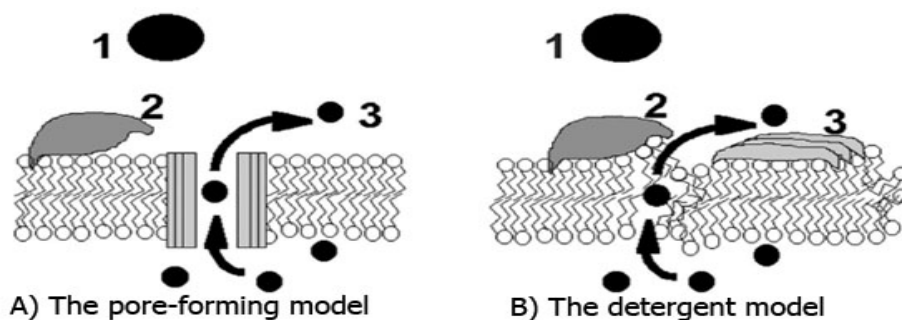
โครงสร้างสามมิติของ Cyt2Aa จาก *B. thuringiensis* ssp. *darmstadensis*



ที่มา: “Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and Implications for membrane pore formation.” by Li, Koni, & Ellar, 1996, *Journal of Molecular Biology*, 257(1), p. 136.

ภาพที่ 2.8

ภาพเปรียบเทียบกลไกการทำงานของโปรตีน Cyt ระหว่างแบบทำให้เกิดรูรั่วกับ
แบบสลายแรงตึงผิว



ที่มา: “Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses” by Butko, 2003, Applied and Environmental Microbiology, 69(5), p. 2420.

A) กลไกการทำงานของโปรตีน Cyt แบบทำให้เกิดรูรั่ว (the pore-forming model)

โปรตีน Cyt โครงสร้างที่พร้อมแสดงความเป็นพิษในสารละลาย (1) โปรตีน Cyt เข้าจับกับพื้นผิวลิพิด เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้างที่เป็นระเบียบเกิดรูรั่วขึ้น (2) ทำให้สารเคมีและไอออนต่างๆ ภายในเซลล์รั่วออกสู่ภายนอกทำให้แมลงตาย (3)

B) กลไกการทำงานของโปรตีน Cyt แบบสลายแรงตึงผิว (the detergent model)

โปรตีน Cyt2Aa ละลายในสารละลาย (1) โปรตีน Cyt เข้าจับกับพื้นผิวลิพิด เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและแผ่ไปบนเยื่อหุ้ม ทำให้พื้นผิวลิพิดเกิดความเสียหาย (2) สารเคมีและไอออนต่างๆ ภายในเซลล์รั่วออกสู่ภายนอกทำให้แมลงตาย (3)

4. การออกฤทธิ์เสริมกัน (synergism) ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง

การศึกษาในอดีตพบว่าโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจาก *B. thuringiensis* บางชนิด เมื่อให้ลูกน้ำยุงกินร่วมกับโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงอีกชนิดหนึ่ง จะทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงสูงขึ้นหลายเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โปรตีนสารพิษเพียงชนิดเดียว หรือเมื่อเปรียบเทียบกับผลกระทบแบบบวกกัน (additive effect) ของสารพิษแต่ละชนิด เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการออกฤทธิ์เสริมกัน (synergism) (Tabashnik, 1992) ตัวอย่างโปรตีนสารพิษจาก *B. thuringiensis* ที่สามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการฆ่าแมลง ซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอย่างชัดเจน เช่น Cry4Ba กับ Cyt1Aa สามารถเสริมฤทธิ์กันในการฆ่ายุงลาย (Crickmore, Bone, Williams, & Ellar, 1995) Cry11Aa กับ Cyt1Aa สามารถเสริมฤทธิ์กันในการฆ่ายุงรำคาญ (Chang, Yu, Dai, Law, & Gill,

1993; Khasdan, Ben-Dov, Manasherob, Boussiba, & Zaritsky, 2001) และยังพบว่าโปรตีนสารพิษ Cyt toxin นอกจากจะสามารถออกฤทธิ์เสริมกันกับ Cry11B ได้ (Wirth, Delécluse, Federici, & Walton, 1998) ยังสามารถออกฤทธิ์เสริมกับ binary toxin จาก *B. sphaericus* ซึ่งเป็นโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียต่างสายสายพันธุ์ได้ด้วย (Wirth, Federici, & Walton, 2000) และงานวิจัยเมื่อไม่นานนี้พบว่าโปรตีนสารพิษ Cry4Ba และ Cyt2Aa2 สามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการฆ่าลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ โดยที่โปรตีนผสม Cry4Ba และ Cyt2Aa2 ฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีขึ้นถึง 33.4 เท่า และฆ่าลูกน้ำรำคาญได้ดีขึ้นถึง 18.5 เท่า (Promdonkoy et al., 2005)

อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์เสริมกันของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงในระดับโมเลกุลยังไม่ทราบแน่ชัด กลไกที่น่าจะเป็นไปได้ซึ่งมีผู้เสนอไว้ เช่น เกิดจากโปรตีน Cyt ชักพาให้โปรตีน Cry อยู่รวมกันทำให้ความเข้มข้นของโปรตีน Cry บริเวณนั้นสูงขึ้นจึงมีโอกาสมากขึ้นที่จะเกาะกันและสร้างรูรั่วที่เซลล์เป้าหมาย หรืออีกกลไกหนึ่งที่เป็นไปได้ คือ โปรตีน Cyt ซึ่งสามารถจับกับเซลล์เป้าหมายได้โดยไม่ต้องอาศัยตัวรับ เข้าจับกับเซลล์เป้าหมายก่อนแล้วช่วยชักพาให้โปรตีน Cry จับกับผิวเซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้น หรือโปรตีน Cyt อาจทำหน้าที่เป็นตัวรับเทียมให้โปรตีน Cry เข้าจับเซลล์เป้าหมายได้ (Bravo et al., 2007; Promdonkoy et al., 2005)

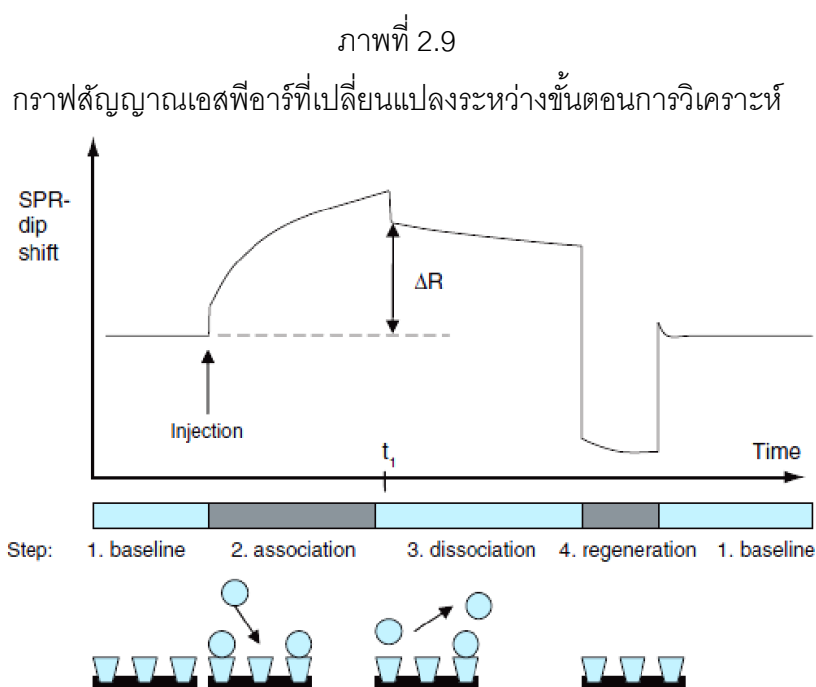
5. Surface plasmon resonance (SPR)

5.1 หลักการของ surface plasmon resonance

คลื่นผิวพลาสมอน (surface plasmons) คือ การสั่นของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นประจุที่ผิวรอยต่อระหว่างโลหะกับวัสดุไดอิเล็กทริก เทคนิคการกระตุ้นให้เกิดคลื่นผิวพลาสมอนที่นิยมใช้ทั่วไป ทำได้โดยจัดให้แสงโพลาไรซ์ในทิศทางที่เหมาะสมตกกระทบบนฟิล์มโลหะที่มุมตกกระทบบากกว่ามุมวิกฤติ โดยจัดให้ลำแสงทะลุผ่านปริซึมแก้วและปรับมุมตกกระทบบนของลำแสงตกกระทบบ จะทำให้สามารถปรับเวฟเวกเตอร์ (wave vector) ของลำแสงตกกระทบบจนมีค่าเท่ากับเวฟเวกเตอร์ของคลื่นผิวพลาสมอน ซึ่งก่อให้เกิดการสั่นพ้อง (resonance) ของคลื่นทั้งสองและเกิดการถ่ายโอนพลังงานจากโฟตอนของแสงไปยังคลื่นผิวพลาสมอน เรียกว่าปรากฏการณ์ surface plasmon resonance หรือเอสพีอาร์ (SPR) เนื่องจากพลังงานของแสงส่วนใหญ่ถ่ายทอดไปยังคลื่นผิวพลาสมอน ทำให้ความเข้มของแสงที่สะท้อนออกจากพื้นผิวโลหะมีค่าลดลงจนเกือบเป็นศูนย์ มุมตกกระทบบที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์

SPR เป็นมุมจำเพาะซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นแสงและคุณสมบัติของพื้นผิวที่แสงตกกระทบ (Homola, 2006; Schasfoort & Tudos, 2008)

มุมที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรโซแนนซ์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับดัชนีหักเหของสารที่อยู่บนพื้นผิวโลหะ เมื่อมีโมเลกุลของสารเกาะที่ผิวโลหะ ค่าดัชนีหักเหโดยรวมจะเปลี่ยนไป หลักการนี้ทำให้สามารถสร้างเครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลงดัชนีหักเหได้ โดยวัดจากคุณสมบัติของแสงสะท้อนที่เปลี่ยนแปลงไป วิธีการวัดการเปลี่ยนแปลงเรโซแนนซ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วัดจากมุมเรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไป (ภาพที่ 2.9) วัดจากความเข้มคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไป หรือวัดจากความยาวคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไป เป็นต้น (Shumaker-Parry & Campbell, 2004)



ที่มา: “Handbook of Surface Plasmon Resonance” by Schasfoort & Tudos, 2008, RSC Publishing, p. 5.

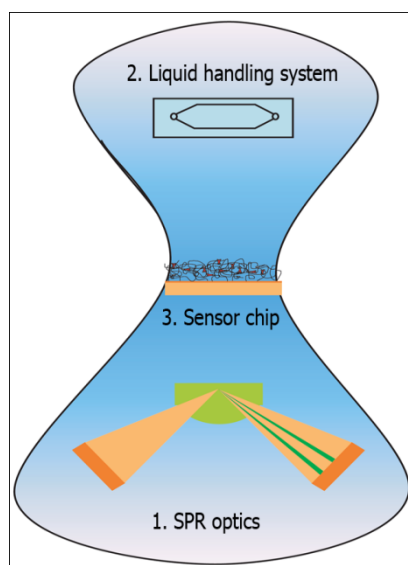
1. บัฟเฟอร์ที่อยู่ภายในระบบ พื้นผิวของไมมีโมเลกุลของสารตัวอย่างเกาะ สัญญาณเรโซแนนซ์คงที่
2. สารตัวอย่างถูกฉีดเพื่อวิเคราะห์ โมเลกุลของสารตัวอย่างยึดเกาะกับผิวโลหะ สัญญาณเรโซแนนซ์เพิ่มขึ้น
3. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ โมเลกุลของสารตัวอย่างที่ไม่จับหรือจับกับพื้นผิวเซนเซอร์ไม่แน่นหลุดออกเหลือเฉพาะโมเลกุลจับแน่น ΔR แสดงถึงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่เกิดขึ้นจากการจับของโมเลกุลสารตัวอย่างกับพื้นผิว
4. ล้างโมเลกุลที่จับกับพื้นผิวเซนเซอร์ออกเพื่อใช้วิเคราะห์ในรอบต่อไป

5.2 เครื่องเอสพีอาร์ (SPR instrument)

ในการวัดสัญญาณ SPR ที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเป็นเครื่องเอสพีอาร์หลากหลายรูปแบบที่มีประสิทธิภาพและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปเครื่องเอสพีอาร์จะมีส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน (ภาพที่ 2.10) คือ 1.ระบบแสง (SPR optics) 2. ระบบไหลเวียนสาร (liquid handling system) และ 3.ชิปเซนเซอร์ (sensor chip) รูปแบบของเครื่องเอสพีอาร์จะแบ่งตามเทคนิคการจัดแสงที่ใช้ในการวัดสัญญาณ SPR โดยรูปแบบการจัดแสงที่นิยมใช้มากที่สุดคือแบบเคร์ทซ์แมนน์ (Kretschmann configuration) ซึ่งใช้ปริซึมประกบกับแผ่นโลหะเพื่อรับแสงโพลาไรซ์และสะท้อนกลับไปยังตัวรับแสง ซึ่งสามารถแบ่งเป็นแบบย่อยๆ อีกหลายแบบ (Schasfoort & Tudos, 2008) โดยจะขอกกล่าวถึงแบบที่นิยมเพียง 3 แบบ ดังนี้

ภาพที่ 2.10

ส่วนประกอบหลัก 3 ส่วนของเครื่องเอสพีอาร์



ที่มา: “Handbook of Surface Plasmon Resonance” by Schasfoort & Tudos, 2008, RSC Publishing, p. 36.

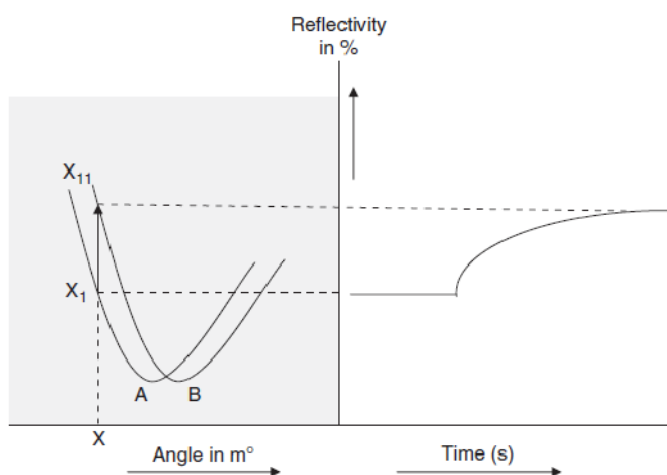
1. ระบบแสง (SPR optics)
2. ระบบไหลเวียนสาร (liquid handling system)
3. ชิปเซนเซอร์ (sensor chip)

5.2.1 เครื่องเอสพีอาร์แบบมุมคงที่ (fixed angle)

เครื่องเอสพีอาร์แบบมุมคงที่จะวัดสัญญาณจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแสงที่สะท้อนจากผิวโลหะ ตามภาพที่ 2.11 การวัดจะเริ่มจากการตั้งมุมเริ่มต้นเป็นมุม X เส้น A คือ เส้นการสะท้อนแสงขณะเริ่มต้น โดยจุดต่ำสุดของกราฟคือมุมเอสพีอาร์ จากนั้นเมื่อผ่านสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบโมเลกุลของสารที่สัมผัสกับผิวโลหะจะทำให้การสะท้อนแสงเปลี่ยนแปลงไปเป็นเส้น B จะเห็นว่าค่าการสะท้อนแสงที่วัดที่มุม X เปลี่ยนแปลงจาก X_1 ไปเป็น X_{11} ซึ่งเมื่อนำค่าที่วัดได้ไปวาดกราฟเทียบกับเวลาจะแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าสู่ระบบกับสัญญาณเอสพีอาร์ที่วัดได้ (Homola, 2006; Schasfoort & Tudos, 2008)

ภาพที่ 2.11

หลักการวัดของเครื่องเอสพีอาร์แบบมุมคงที่



ที่มา: “Handbook of Surface Plasmon Resonance” by Schasfoort & Tudos, 2008, RSC Publishing, p. 37.

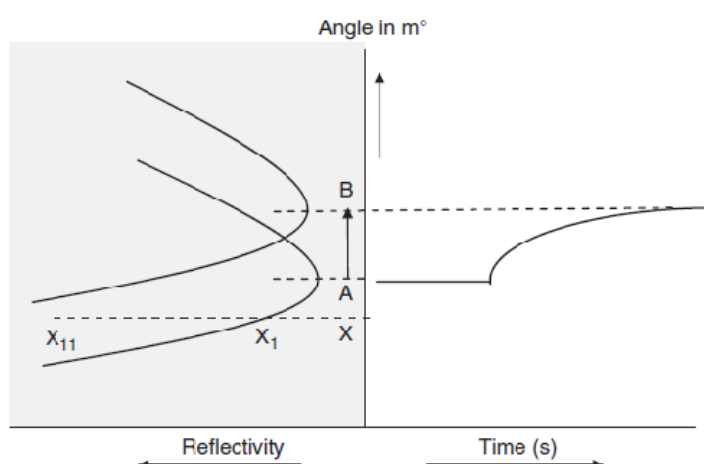
กราฟทางด้านซ้ายแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมุมกับเปอร์เซ็นต์การสะท้อนแสง เมื่อวัดการสะท้อนที่มุม X ขณะที่สัญญาณเอสพีอาร์เปลี่ยนแปลงจาก A ไปเป็น B ค่ากับเปอร์เซ็นต์การสะท้อนแสงที่วัดได้จะเปลี่ยนแปลงจาก X_1 ไปเป็น X_{11} ซึ่งเมื่อนำค่านี้ไปวาดกราฟเทียบกับเวลาในด้านขวาจะแสดงให้เห็นสัญญาณเอสพีอาร์ที่วัดได้

5.2.2 เครื่องเอสพีอาร์แบบสแกนมุม (angle scanning)

เครื่องเอสพีอาร์แบบสแกนมุมจะวัดสัญญาณจากการเปลี่ยนแปลงมุมเอสพีอาร์ที่เปลี่ยนแปลงไป ตามภาพที่ 2.12 การวัดจะเริ่มจากการตั้งมุมเริ่มต้นเป็นมุมเอสพีอาร์ (จุด A) จากนั้นเมื่อผ่านสารละลายตัวอย่างมุมเอสพีอาร์จะเปลี่ยนแปลงไป ระบบแสงจะมีการสแกน

ตำแหน่งมุมหามุมเอสพีอาร์ใหม่ (จุด B) เมื่อนำมุมที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ไปวาดกราฟเทียบกับเวลาจะแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างสารตัวอย่างกับสัญญาณเอสพีอาร์ที่วัดได้ (Homola, 2006; Schasfoort & Tudos, 2008)

ภาพที่ 2.12
หลักการวัดของเครื่องแบบเอสพีอาร์แบบสแกนมุม



ที่มา: “Handbook of Surface Plasmon Resonance” by Schasfoort & Tudos, 2008, RSC Publishing, p. 37.

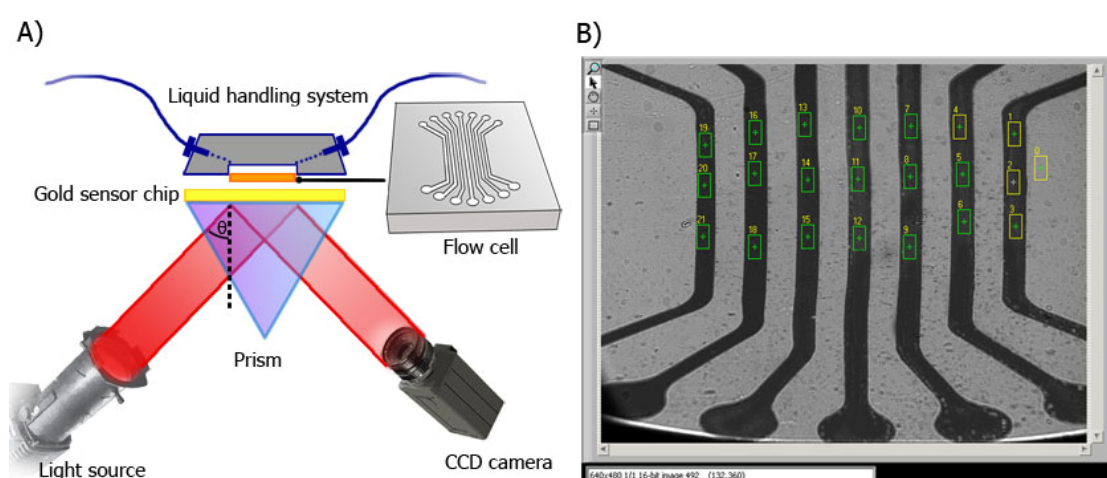
กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การสะท้อนแสงกับมุม ผังซ้าย จุด A คือมุมเอสพีอาร์เริ่มต้น จุด B คือ มุมเอสพีอาร์ใหม่ ซึ่งเมื่อนำไปวาดกราฟเทียบกับเวลาในผังขวาจะแสดงให้เห็นสัญญาณเอสพีอาร์ที่วัดได้

5.2.3 เครื่องเอสพีอาร์แบบภาพ (SPR imaging)

เครื่องเอสพีอาร์แบบภาพ คือ เครื่องวัดเอสพีอาร์แบบมุมคงที่ชนิดหนึ่งแต่จะแตกต่างกันตรงที่เครื่องแบบภาพใช้กล้องดิจิตอลชนิดที่ใช้อุปกรณ์ถ่ายเทประจุ (charge-coupled device, CCD) เป็นตัวรับแสง แทนเซนเซอร์รับแสง วิธีนี้ช่วยให้สามารถศึกษาตัวอย่างจำนวนมากได้พร้อมๆ กัน ซึ่งเป็นเครื่องแบบที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ตัวเครื่องเอสพีอาร์แบบภาพ มีส่วนประกอบตามภาพที่ 2.13A สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกปั๊มผ่านเข้ามาตามสายและไหลไปสัมผัสกับผิวทอง โดยมีแผ่นโฟลวเซลล์ (flowcell) เป็นตัวกำหนดบริเวณที่สารจะไหลผ่านผิวเซนเซอร์ แหล่งกำเนิดแสงจะฉายลำแสงไปยังผิวเซนเซอร์ และกล้องดิจิตอลชนิด CCD จะคอยจับภาพไว้ตลอดเวลา ในการวิเคราะห์ผลจะใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์กำหนดบริเวณที่จะนำมา

คำนวณการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแสง (ภาพที่ 2.13B) ดังนั้นสัญญาณที่วัดได้จากเครื่องเอสพีอาร์แบบภาพจึงเป็นสัญญาณเฉลี่ยจากพื้นที่ที่สนใจศึกษา (Homola, 2006; Schasfoort & Tudos, 2008)

ภาพที่ 2.13
องค์ประกอบของเครื่องเอสพีอาร์แบบภาพ



A) การจัดเรียงอุปกรณ์เชิงแสงของเครื่องเอสพีอาร์แบบภาพประกอบด้วยชิปทองคำที่ทำหน้าที่เป็นเซนเซอร์ ประกอบอยู่ระหว่างปริซึมกับระบบควบคุมการไหลของสารซึ่งมีฟลวเซลล์ (ภาพขยายด้านข้าง) กำหนดบริเวณที่สารตัวอย่างสัมผัสกับผิวเซนเซอร์ โดยมีแหล่งกำเนิดแสงส่องผ่านปริซึมและกล้องดิจิตอลแบบ CCD คอยรับสัญญาณที่สะท้อนจากชิปทองคำ

B) ภาพฟลวเซลล์จากกล้องดิจิตอลชนิด CCD กรอบสี่เหลี่ยมเล็ก คือ บริเวณที่ต้องการนำสัญญาณเอสพีอาร์ไปวิเคราะห์

6. การใช้เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนในการศึกษาโปรตีนสารพิษ

เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนนิยมใช้ในการศึกษาการจับกันของโมเลกุลยากับโมเลกุลเป้าหมายซึ่งใช้ในทางการแพทย์เป็นส่วนใหญ่ ส่วนในการศึกษาโปรตีนมักใช้ในการศึกษาการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน แม้ว่าปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้กับโปรตีนหลายชนิด แต่ในการศึกษาโปรตีนสารพิษมีผู้นำเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนมาใช้ในการศึกษาไม่มากนัก มีตัวอย่างงานวิจัย เช่น การศึกษากลไกการทำงานของโปรตีนสารพิษ melittin จากผึ้งซึ่งทำให้เกิดรูรั่วที่เซลล์ และโปรตีนสารพิษ magainin จากกบซึ่งทำให้เซลล์แตกโดยลดแรงตึงผิว การใช้เทคนิคเอสพีอาร์

ตรวจวัดสัญญาณและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทำให้ทราบว่าในระหว่างการจับกับพื้นผิวลิพิด ค่า K ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะในการจับกับพื้นผิวลิพิดของ melittin มีค่า 3.8×10^4 ต่อโมลาร์ และเพิ่มขึ้นเป็น 16.5×10^4 ต่อโมลาร์ การเปลี่ยนแปลงของค่า K นี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนเพื่อแทรกตัวเข้าสู่ชั้นลิพิด ในขณะที่ magainin มีค่า K ค่อนข้างคงที่ประมาณ 3×10^4 ต่อโมลาร์ แสดงว่า magainin ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อแทรกตัวเข้าสู่ชั้นลิพิด นอกจากนี้เมื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่งของ melittin พบว่าทำให้ไม่สามารถทำให้เกิดรูรั่วได้แต่สามารถทำให้เซลล์แตกได้โดยลดแรงตึงผิวแทน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนพบว่าค่า K ค่อนข้างคงที่ประมาณ 3.1×10^4 ต่อโมลาร์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับกลไกของการทำให้เซลล์เสียหายซึ่งได้กล่าวไว้ข้างต้น (Papo & Shai, 2003) แนวคิดนี้น่าจะสามารถนำมาประยุกต์ในการศึกษาถึงกลไกการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงได้ โดยใช้เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนวัดอันตรกิริยาของโปรตีนสารพิษ 2 ชนิด