

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1. วัสดุ

1.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตโปรตีนสารพิษ

แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตโปรตีนสารพิษดั้งเดิมประกอบด้วย *Escherichia coli* K12 JM109 ที่แต่ละโคลนได้รับพลาสมิด pBP1 ซึ่งมียีน *cyt2Aa* จาก *B. thuringiensis* ssp. *darmstadensis* pBP2 ซึ่งมียีน *cry4Ba* จาก *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* และ pBP3 ซึ่งมีทั้งยีน *cyt2Aa* และ *cry4Ba* (Promdonkoy et al., 2005) พลาสมิดทั้ง 3 สร้างขึ้นจาก พลาสมิด pBC* (ภาพที่ 3.1A) โดยตัดต่อยีน *cyt2Aa* และ *cry4Ba* เข้าสู่ MSC (multiple cloning site) ของพลาสมิด pBC* โดยมีการจัดเรียงยีนตามภาพที่ 3.1B เมื่อยีนถูกแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ (promoter) lacZ พลาสมิด pBP1 จะสร้างโปรตีน Cyt2Aa พลาสมิด pBP2 จะสร้างโปรตีน Cry4Ba และพลาสมิด pBP3 จะสร้างโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba ร่วมกัน

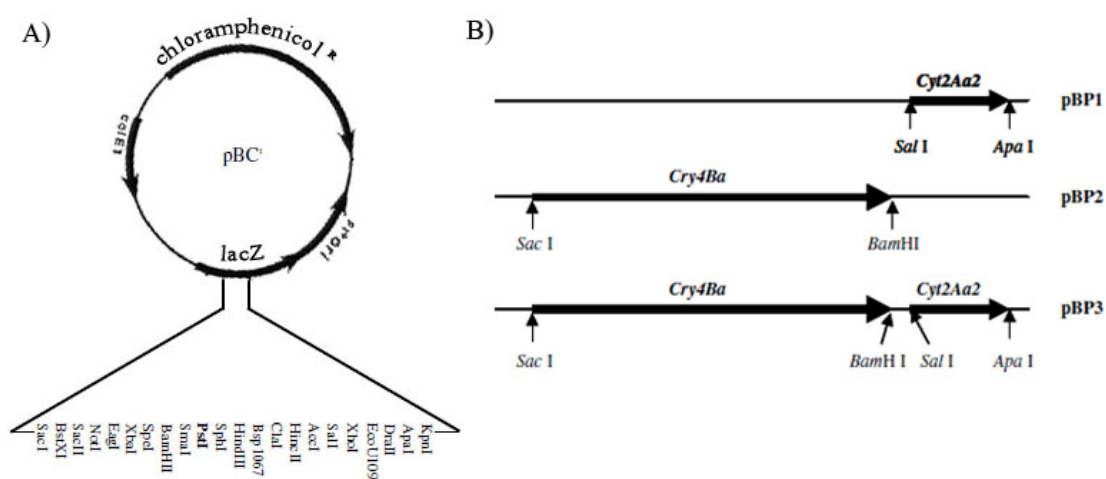
แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตโปรตีนสารพิษกลายประกอบด้วย *Escherichia coli* K12 JM109 ที่แต่ละโคลนได้รับพลาสมิด pGEM-*cyt2Aa* ซึ่งมียีนผลิตโปรตีน Cyt2Aa ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง V125A V135A T144A N145A Q149A I150A S194A และ V197A ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิศวกรรมจุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ซึ่งแต่ละโคลนเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยอื่นและได้รับการศึกษาถึงคุณสมบัติเบื้องต้นแล้วว่ามีสามารถในการละลายได้ใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม และสามารถตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอสเพื่อให้มีโครงสร้างที่พร้อมจะแสดงความเป็นพิษได้

1.2 ชิปเซนเซอร์

ชิปเซนเซอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นชิปรูปวงกลม (disc) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว เคลือบผิวด้วยทองคำหนา 20 นาโนเมตร ของบริษัท Ssens (ภาพที่ 3.3) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีโฟโตนิกส์ ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ และห้องปฏิบัติการวัสดุทางการแพทย์ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ภาพที่ 3.1

การสร้างพลาสมิด pBP1 pBP2 และ pBP3 จากพลาสมิด pBC*

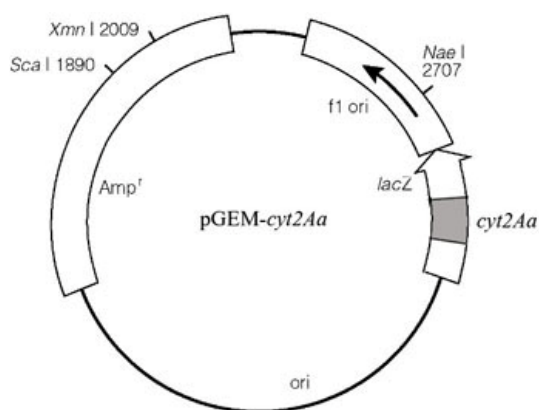


ที่มา: ดัดแปลงจาก “Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae” by Promdonkoy, B., Promdonkoy, P., & Panyim, 2005, Fems Microbiology Letters, 252(1), pp.122-123.

A) พลาสมิด pBC* ซึ่งมียีน *lacZ* ซึ่งมี multiple cloning site สำหรับแทรกยีนที่ต้องการแสดงออกผ่านโปรโมเตอร์ *lacZ* และมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล

B) การจัดเรียงของยีน *cyt2Aa* และ *cry4Ba* ใน multiple cloning site ของพลาสมิด pBC* โดยยีน *cyt2Aa* ใส่ไว้ระหว่างจุดตัด *SalI* กับ *ApaI* และยีน *cry4Ba* ใส่ไว้ระหว่างจุดตัด *SacI* กับ *BamHI* ซึ่งได้เป็น pBP1 pBP2 และ pBP3 ตามลำดับ

ภาพที่ 3.2
พลาสมิด pGEM-cyt2Aa



พลาสมิด pGEM-cyt2Aa ซึ่งมีโปรโมเตอร์ *lacZ* ในการแสดงออกของยีน และมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ยีน *cyt2Aa* กลายอยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ *lacZ*

ภาพที่ 3.3
ชิปเซนเซอร์



2. วิธีทดลอง

2.1 การผลิตโปรตีนสารพิษ

เลี้ยงเชื้อ *E.coli* ที่มียีนผลิตโปรตีนสารพิษลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) 3 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลิน (ampicillin) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อที่มีพลาสมิด pGEM-Cyt2Aa หรือ คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อที่มีพลาสมิด pBP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเซลล์แบบที่เร็ว 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตรทรงกรวย (erlenmeyer flask) ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลว LB 500 มิลลิลิตร มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ คลอแรมเฟนิคอล

เข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่า OD₆₀₀ ได้ 0.5-0.6 จึงชักนำให้เซลล์สร้างโปรตีนสารพิษโดยเติม Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วเลี้ยงต่ออีก 6 ชั่วโมง

ปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่เลี้ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์พีบีเอส พีเอช 7.4 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) amplitude: 60% Pulse on/off: 9 วินาที เป็นเวลา 3 นาที โดยแช่หลอดทดลองไว้ในน้ำแข็ง ตลอดเวลาที่เครื่องทำงาน จากนั้นปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนตะกอนไปล้างในสารละลายโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่มี TritonX100 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) 40 มิลลิลิตร แล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงอีก 2 นาที ปั่นแยกตะกอนเซลล์และเติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อล้างตะกอนแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยจะล้างโปรตีนทั้งหมด 3 ครั้ง เมื่อล้างโปรตีนแล้วจึงนำตะกอนโปรตีนไปละลายในสารละลายบัฟเฟอร์พีบีเอส (PBS, phosphate buffer saline) พีเอช 7.4 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เก็บโปรตีนไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ผสมโปรตีนกับ sample loading buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl พีเอช 6.8 เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ dithiothreitol (DTT) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ SDS 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) bromophenol blue 0.02% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และกลีเซอรอล (glycerol) 50% (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วต้มสารละลายโปรตีนในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงใส่สารละลายโปรตีนในเจล SDS polyacrylamide 10% จ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นย้อม polyacrylamide gel ด้วยสารละลาย Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 โดยเปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของแถบโปรตีนกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

2.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (non-denaturing-PAGE)

ผสมโปรตีนกับกับ non-denaturing sample loading buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl พีเอช 6.8 เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ bromophenol blue 0.02% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และกลีเซอรอล (glycerol) 50% (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วจึงใส่สารละลายโปรตีนใน เจล polyacrylamide ซึ่งองค์ประกอบต่างๆ เหมือนกับเจล SDS polyacrylamide แต่ไม่มีส่วนผสมของ SDS ในเจล จ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นย้อม polyacrylamide gel ด้วยสารละลาย Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250

2.4 การทำให้โปรตีนสารพิษพร้อมจะแสดงความเป็นพิษ (toxin activation)

เนื่องจากกลไกการทำงานตามธรรมชาติของโปรตีนสารพิษจะถูกละลายในสารละลายที่มีค่าพีเอชสูงตามด้วยการย่อยของเอนไซม์โปรติเอสภายในกระเพาะลูกน้ำยุง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองทั้งในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) ดังนั้นสำหรับการศึกษาในหลอดทดลองจึงต้องทำให้โปรตีนสารพิษพร้อมแสดงความเป็นพิษก่อน โดยละลายตะกอนของโปรตีนสารพิษในบัฟเฟอร์คาร์บอนेट พีเอช 10.5 ที่มี DTT 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง จากนั้นย่อยโปรตีนสารพิษด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ 2% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ของน้ำหนักโปรตีนสารพิษ สำหรับโปรตีน Cyt2Aa ใช้เอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ส่วน Cry4Ba ใช้เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติม phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) ให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

2.5 การศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba

ในการทำลองนี้ต้องการทดสอบความสามารถในการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีนสารพิษ 2 ชนิด คือ Cyt2Aa และ Cry4Ba โดยนำโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง 2 ชนิด มาผสมกันและนำไปทดสอบกับลูกน้ำยุง โดยผลของการเสริมฤทธิ์กันนิยามวัดเป็นจำนวนเท่าของผลกระทบแบบบวกกัน (additive effect) หรือเรียกว่า synergism factor แต่อย่างไรก็ตามค่าผลกระทบแบบบวกกันนั้นไม่สามารถวัดได้จากการทดลองเมื่อมีการเสริมฤทธิ์กันเกิดขึ้น ค่าผลกระทบแบบบวกกันนี้จึงต้องใช้การคำนวณจากประสิทธิภาพของโปรตีนเดี่ยวแต่ละชนิดที่ผสมกันและสัดส่วนที่นำมาผสมกันแทน ด้วยสมการในข้อ 2.5.3 แล้วจึงนำค่าที่ได้จากการคำนวณไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง แต่วิธีการคำนวณนี้ใช้การคำนวณจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายครึ่งหนึ่งหรือ

50% lethal concentration (LC_{50}) จึงอาจมีข้อจำกัดในการคำนวณจากค่าที่ได้จากการวัดผลด้วยเทคนิคทางชีวเคมีอื่นๆ ดังนั้นเพื่อให้ง่ายต่อการศึกษากลไกการออกฤทธิ์เสริมกันด้วยเทคนิคอื่นๆ การศึกษานี้จึงพยายามลดปัจจัยที่เกี่ยวข้องในกลไกการเสริมฤทธิ์กันลง กล่าวคือ ความสามารถในการฆ่าลูกน้ำของโปรตีน 2 ชนิด ที่ผสมกันเป็นผลมาจาก (1) ผลของ Cyt2Aa ที่มีต่อลูกน้ำ (2) ผลของ Cry4Ba ที่มีต่อลูกน้ำ และ (3) ผลของการเสริมฤทธิ์กันระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิด หากสามารถทำให้ไม่มีให้ผลของ Cyt2Aa และ Cry4Ba เข้ามาเกี่ยวข้อง ผลการฆ่าลูกน้ำจะเป็นผลมาจากการเสริมฤทธิ์กันเท่านั้น ซึ่งน่าจะสะดวกต่อการนำไปศึกษาต่อด้วยเทคนิคอื่นต่อไป ดังนั้นการศึกษานี้จึงพยายามวิเคราะห์หาโปรตีน Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำแต่สามารถเสริมฤทธิ์กับโปรตีน Cry4Ba ได้ นอกจากสมมุติฐานว่ากลไกการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีนสารพิษเกี่ยวข้องกับอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษทั้งคู่แล้ว ยังคาดว่ากลไกการเสริมฤทธิ์กันอาจเกี่ยวข้องกับตำแหน่งเฉพาะบางตำแหน่งของโปรตีนสารพิษ จึงพยายามค้นหาโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กลายที่ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ได้ โดยคัดเลือกจากโปรตีนกลายที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม

การศึกษากการออกฤทธิ์เสริมกันเริ่มจากคัดเลือกโปรตีน Cyt2Aa กลายที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียงตำแหน่งเดียว (single mutation) ซึ่งได้มีการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นแล้ว โดยแบ่งโปรตีนกลาย Cyt2Aa ที่คัดเลือกเป็น 2 กลุ่ม (ตารางที่ 3.1) คือ กลุ่มที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำ และกลุ่มที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม นำไปทดสอบการออกฤทธิ์เสริมกันกับ Cry4Ba เพื่อค้นหาโปรตีนกลาย Cyt2Aa ที่สามารถออกฤทธิ์เสริมกันกับโปรตีน Cry4Ba ดั้งเดิมได้จากกลุ่มที่ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำ และค้นหาโปรตีนกลายที่ไม่สามารถออกฤทธิ์เสริมกันกับโปรตีน Cry4Ba ดั้งเดิม จากกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำ การทดสอบการเสริมฤทธิ์กันจะใช้วิธีการ คือ ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำ และทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

ตารางที่ 3.1

โปรตีนกลาย Cyt2Aa ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุง

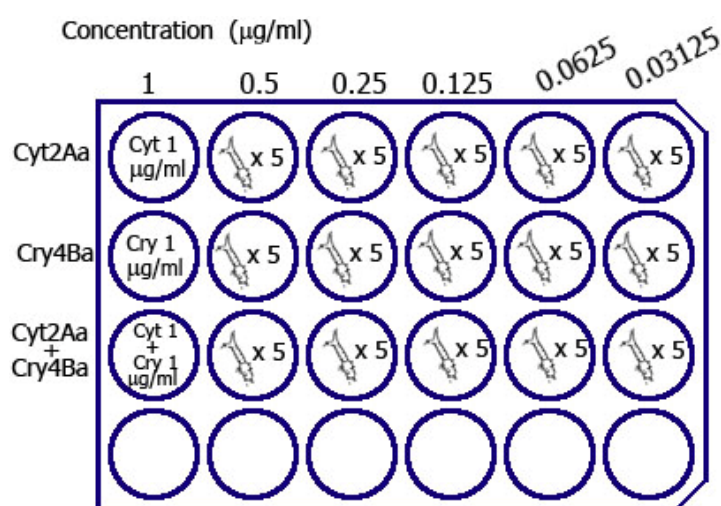
Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง	Cyt2Aa กลายที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม
V135A	V125A
N145A	T144A
I150A	Q149A
V197A	S194A

2.5.1 การศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่าง Cyt2Aa กับ Cry4Ba โดยทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง (mosquito-larvicidal assay)

ประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงของโปรตีนสารพิษทดสอบโดยเจือจางโปรตีนสารพิษแต่ละชนิดแบบ 2 เท่า (2-fold serial dilution) ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 เพื่อให้ได้ 6-8 ระดับความเข้มข้น กลุ่มที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงใช้ความเข้มข้นสูงสุด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับกลุ่มที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงใช้ความเข้มข้นสูงสุด 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายโปรตีนกลาย Cyt2Aa และ Cry4Ba ดั้งเดิมที่เจือจางแล้วอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ในจานหลุมแบบ 24 หลุม ที่มีลูกน้ำยุงอยู่หลุมละ 5 ตัว ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร โดยทดสอบกับลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) และลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ระยะที่ 2 (2nd instar) (ภาพที่ 3.4) แต่ละความเข้มข้นใช้ลูกน้ำยุง 4 หลุม หรือ 20 ตัว หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บผลการตายของลูกน้ำยุงหลังจาก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายครึ่งหนึ่ง (LC₅₀) ด้วยโปรแกรม Probit Analysis (Finney, 1971)

ภาพที่ 3.4

วิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง



การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงทดสอบในจานหลุม 24 หลุม แต่ละหลุมใส่ลูกน้ำยุง 5 ตัว ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนสารพิษแต่ละชนิดสูงสุด 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางแบบ 2 เท่า ในหลุมถัดไปทางขวาจนถึงความเข้มข้นต่ำสุด 0.03125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับโปรตีนผสมจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายรวมเป็น 2 เท่า และในกรณีทดสอบโปรตีน Cyt2Aa กลายที่ไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงจะใช้ความเข้มข้นโปรตีนสูงสุด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเจือจางจนได้ 8 ระดับความเข้มข้น

2.5.2 การทดสอบการออกฤทธิ์เสริมกันของโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba โดยวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity assay)

การทดสอบประสิทธิภาพในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกจะทดสอบกับเลือดคน 1% ในจานหลุมแบบ 96 หลุม โดยเจือจางโปรตีนแต่ละชนิดแบบ 2 เท่า ในสารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอนเนต พีเอช 10.5 เพื่อให้ได้ 12 ระดับความเข้มข้น เริ่มต้นที่ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วใส่โปรตีนกลาย ที่เจือจางแล้วอย่างละ 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม จากนั้นใส่สารละลายเม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มีสารพิษอยู่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บผลหลังจาก 24 ชั่วโมง

2.5.3 การคำนวณระดับของการออกฤทธิ์เสริมกัน

ระดับของการออกฤทธิ์เสริมกันสามารถคำนวณได้จากค่า LC_{50} ของโปรตีนสารพิษและอัตราส่วนของสารพิษ 2 ชนิดในของผสม ด้วยสมการ 1 และ 2 (Tabashnik, 1992)

สมการที่ 1 ใช้ในการคำนวณค่า $LC_{50(m)}$ ซึ่งเป็นค่าทางทฤษฎีของผลกระทบแบบบวกกันซึ่งจะเกิดขึ้นในกรณีที่สารพิษ 2 ชนิด ไม่มีการเสริมฤทธิ์กัน สมการที่ 2 ใช้คำนวณระดับการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีนสารพิษในของผสม แสดงด้วยค่า synergism factor ซึ่งเป็นสัดส่วนระหว่างค่า $LC_{50(m)}$ จากการคำนวณกับ $LC_{50(m)}$ จากการทดลอง กล่าวคือค่า synergism factor บ่งบอกว่าโปรตีนสารพิษผสมมีความรุนแรงขึ้นกี่เท่านั่นเอง

$$LC_{50(m)} = \left[\frac{r_{(a)}}{LC_{50(a)}} + \frac{r_{(b)}}{LC_{50(b)}} \right]^{-1} \quad (1)$$

$LC_{50(m)}$ คือ ความเข้มข้นของโปรตีนสารพิษผสมที่ทำให้ลูกน้ำตายครึ่งหนึ่ง

$LC_{50(a)}$ และ $LC_{50(b)}$ คือ ความเข้มข้นของโปรตีนสารพิษ a และ b ที่ทำให้ลูกน้ำตายครึ่งหนึ่ง

$r_{(a)}$ และ $r_{(b)}$ คือ อัตราส่วนของสารพิษ a และ b ในของผสม

$$\text{Synergism factor} = \frac{LC_{50(m)} \text{ จากการคำนวณ}}{LC_{50(m)} \text{ จากการทดลอง}} \quad (2)$$

2.6 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิคทางชีวเคมี

ในการศึกษานี้มีสมมุติฐานว่าการเสริมฤทธิ์กันระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba น่าจะเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทั้งสองในลักษณะใดลักษณะหนึ่งในระหว่างขั้นตอนการทำงานของโปรตีนสารพิษ ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำเพื่อตรวจสอบว่าแต่ละขั้นตอนในการทำงานของโปรตีนสารพิษมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba หรือไม่ ด้วยเทคนิคทางชีวเคมี โดยแบ่งช่วงของการศึกษาออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่ในสารละลายและช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์

2.6.1 ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่ในสารละลาย

ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่ในสารละลายเป็นช่วงที่ผลึกของโปรตีนละลายในสภาวะต่างแล้ว ในช่วงนี้ยังแบ่งเป็นอีก 2 ขั้นตอนย่อย คือ ก่อนที่โปรตีนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสและหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสจนอยู่ในรูปที่พร้อมทำงานซึ่งมีคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้อาจเกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์กัน การทดสอบทำโดยเจือจางโปรตีนสารพิษแต่ละชนิด ได้แก่ โปรตีน Cyt2Aa Cry4Ba และคู่โปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่แสดงออกร่วมกัน (co-expression) ในบัฟเฟอร์คาร์บอนเนต พีเอช 10.5 ให้ได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ทั้งโปรตีนที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์และโปรตีนที่ผ่าน

การตัดด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้วในการศึกษา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และเทคนิคเจลฟิเลเทรชันโครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography)

2.6.2 ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์

ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้นหลังจากโปรตีนสารพิษที่อยู่ในรูปที่พร้อมทำงานแล้วเข้าจับกับลิพิดที่มีลักษณะเป็นเยื่อหุ้ม (membrane) และมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนี้อาจทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์กันขึ้น ดังนั้นในการทดลองจึงทำเพื่อศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นหลังจากที่โปรตีนสารพิษจับกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว โดยจะใช้ไลโปโซมซึ่งเป็นอนุภาคของลิพิดที่มีการจัดเรียงตัวเป็นเยื่อ 2 ชั้น (lipid bilayer) แทนเยื่อหุ้มเซลล์ ไลโปโซมประกอบด้วย phosphatidyl ethanolamine cholesterol และ stearylamine ในอัตราส่วน 4:3:1 โดยโมล ภายในบรรจุบัพเฟอร์พีบีเอส พีเอส 7.4 หรือบัพเฟอร์คาร์บอเนต พีเอส 10.5 ปฏิกริยาระหว่างโปรตีนสารพิษกับไลโปโซมทำโดยผสมโปรตีนสารพิษที่อยู่ในรูปที่พร้อมทำงานเข้ากับไลโปโซมในอัตราส่วน 1:10 โดยมวล เมื่อผสมเข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 xg อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างตะกอนไลโปโซมที่ได้ด้วยบัพเฟอร์ชนิดเดียวกับที่บรรจุภายในไลโปโซม 3 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนไลโปโซมไปวิเคราะห์ด้วย PAGE และเทคนิคเจลฟิเลเทรชันโครมาโตกราฟี เช่นเดียวกัน

2.7 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน

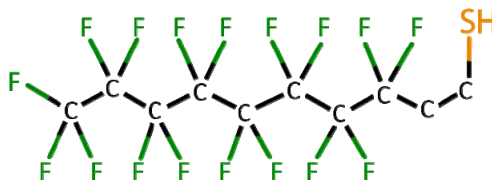
กลไกการทำงานของโปรตีนสารพิษประกอบไปด้วยหลายขั้นตอนต่อเนื่องกัน การศึกษาโปรตีนสารพิษระดับโมเลกุลจึงจำเป็นต้องแบ่งศึกษาเป็นช่วง ซึ่งแต่ละช่วงมักต้องใช้เทคนิคเฉพาะที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่เป็นการเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการทำปฏิกิริยา ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจึงเป็นเหมือนภาพนิ่งที่ขาดความต่อเนื่อง โดยเฉพาะข้อมูลในระหว่างการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษนี้จึงทดลองนำเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนหรือเอสพีอาร์มาใช้เพื่อวัดการจับกันระหว่างโปรตีนกับชั้นลิพิด และการจับกันระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa และ Cry4Ba โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงสัญญาณเอสพีอาร์ นอกจากนี้ยังพยายามพัฒนาเทคนิคนี้ให้เหมาะสมต่อการวัดอันตรกิริยาของโปรตีนสารพิษ ซึ่งจะช่วยให้สามารถตรวจติดตามและวัดผลได้ตามเวลาจริง (real-time) โดยมีขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

2.7.1 การเตรียมผิวทอง

เพื่อให้โปรตีนสารพิษสามารถจับกับพื้นผิวทองที่ใช้ในการตรวจวัดด้วยเทคนิค เอสพีอาร์จึงต้องเตรียมผิวทองให้มีลักษณะเป็นชั้นของลิพิดก่อน โดยใช้ไลโปโซมที่มีองค์ประกอบ เช่นเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิคทางชีวเคมี แต่มีการเติม perfluorodecanethiol (ภาพที่ 3.5) ซึ่งเป็นลิพิดที่มีหมู่ไธออล (thiol) ที่ปลายด้านหนึ่งของโมเลกุลลงในไลโปโซมเล็กน้อย (ภาพที่ 3.6A) เพื่อให้หมู่ไธออลทำหน้าที่ยึดเกาะกับพื้นผิวทอง เมื่อผ่านสารละลายไลโปโซมเข้าสู่เครื่อง เอสพีอาร์ ไลโปโซมจะจับกับผิวทองเกิดเป็นโครงสร้างชั้นของลิพิด โดยมีโมเลกุลของ perfluoro decanethiol ทำหน้าที่ค้ำยันชั้นของลิพิดให้ติดอยู่บนผิวทองได้ (ภาพที่ 3.6B) (Besenicar, Macek, Lakey, & Anderluh, 2006) แต่เนื่องจากวิธีการเตรียมพื้นผิวแบบนี้ยังไม่เคยใช้ร่วมกับ เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนมาก่อนจึงต้องทดลองปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของไลโปโซม และความเร็วในการไหลของสารละลายเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมพื้นผิวชั้นลิพิด

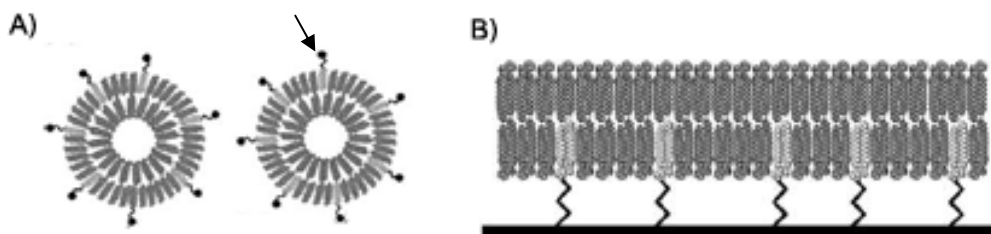
ภาพที่ 3.5

สูตรโครงสร้างของ perfluorodecanethiol



ภาพที่ 3.6

ไลโปโซมที่ใช้ในการเตรียมผิวทอง



ที่มา: ดัดแปลงจาก “Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions” by Besenicar, Macek, Lakey, & Anderluh, 2006, Chemistry and Physics of Lipids, 141(1-2), p. 172.

A) ไลโปโซมที่มีส่วนผสมของ perfluorodecanethiol ที่มีหมู่ไธออล (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้)

B) ผิวแผ่นทองคำที่มีชั้นลิพิดติดอยู่ โดยมี perfluorodecanethiol ทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะกับพื้นผิวทอง

2.7.2 การวัดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ

การวัดอันตรกิริยาของโปรตีนสารพิษเริ่มจากการผ่านสารละลายโปรตีน Cyt2Aa ที่ต้องการศึกษาเพื่อให้จับกับพื้นผิวลิพิด ข้อมูลจากงานวิจัยอื่นแสดงให้เห็นว่า Cyt2Aa สามารถจับกับลิพิดได้โดยตรง (Thomas & Ellar, 1983) จึงคาดว่าโปรตีน Cyt2Aa น่าจะจับกับพื้นผิวลิพิดบนฟิล์มทองและสามารถตรวจวัดการจับกันนี้ได้จากสัญญาณเอสพีอาร์ จากนั้นจึงผ่านสารละลายโปรตีน Cry4Ba ไปยังผิวทองที่มี Cyt2Aa ติดอยู่เพื่อวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน 2 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ โปรตีน Cyt2Aa ใช้ความเข้มข้น 1 2 5 10 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีน Cry4Ba ใช้ความเข้มข้น 2 5 10 25 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร