

บทที่ 4

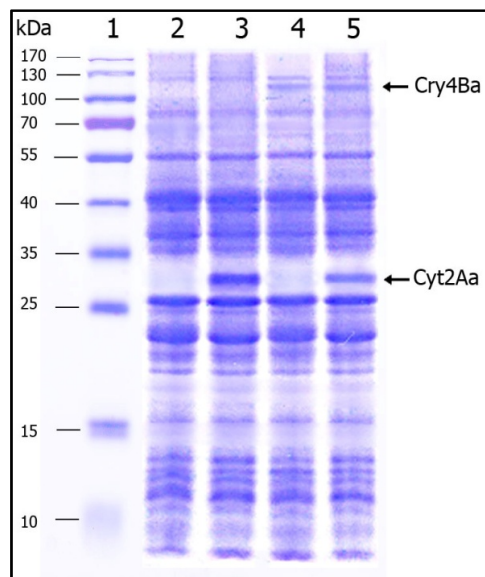
ผลของการวิจัย

1. การผลิตโปรตีนสารพิษ

หลังจากเลี้ยงเซลล์และชักนำให้สร้างโปรตีน 6 ชั่วโมง เมื่อนำเซลล์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าในเลนที่ 3 มีแถบโปรตีนขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนชักนำให้สร้างโปรตีนในเลนที่ 2 ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม ในเลนที่ 4 พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 130 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีน Cry4Ba และในเลนที่ 5 พบทั้งโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba

ภาพที่ 4.1

เจล SDS-PAGE แสดงโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* ที่ถูกชักนำให้สร้างโปรตีนสารพิษ



เลนที่ 1 protein marker

เลนที่ 2 โปรตีนจากเซลล์ *E. coli* เจ้าบ้าน

เลนที่ 3 โปรตีนจากเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด pBP1 ซึ่งมียีนผลิตโปรตีน Cyt2Aa

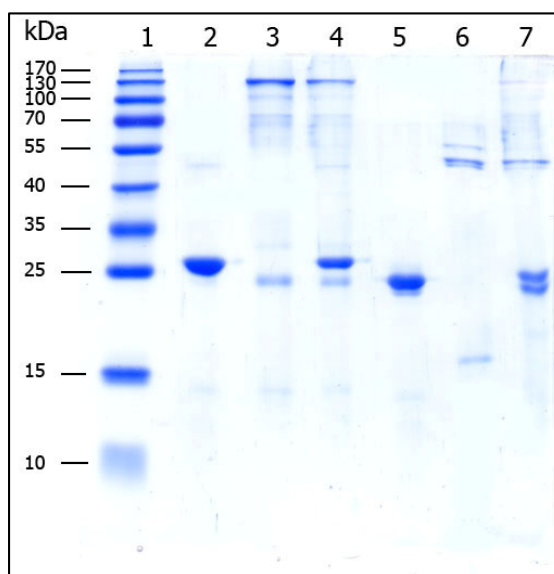
เลนที่ 4 โปรตีนจากเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด pBP2 ซึ่งมียีนผลิตโปรตีน Cry4Ba

เลนที่ 5 โปรตีนจากเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด pBP3 ซึ่งมียีนผลิตโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba

เมื่อปั่นแยกตะกอนโปรตีนและย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ได้ผลวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 4.2 เลน 2 3 และ 4 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ปั่นแยกได้มีขนาดตรงกับโปรตีนสารพิษที่ต้องการ ประมาณ 25 กิโลดาลตัน (Cyt2Aa) และประมาณ 130 กิโลดาลตัน (Cry4Ba) และมีความบริสุทธิ์เพียงพอ เลนที่ 5 6 และ 7 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนสารพิษถูกเอนไซม์ตัดทำให้มีขนาดเปลี่ยนแปลงไป เห็นได้จากโปรตีน Cyt2Aa ในเลนที่ 5 และ 7 มีขนาดลดลงเล็กน้อย และโปรตีน Cry4Ba ในเลนที่ 6 และ 7 มีขนาดลดลงเหลือประมาณ 50 กิโลดาลตัน สำหรับโปรตีน Cyt2Aa กลาย ทั้ง 8 ชนิด ได้ผลเช่นเดียวกับที่แสดงในภาพที่ 4.3 คือ มีขนาด 25 กิโลดาลตัน เท่ากับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม และมีการแสดงออกใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม

ภาพที่ 4.2

เจล SDS-PAGE แสดงโปรตีนสารพิษที่ได้จากการปั่นแยกและย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส



เลนที่ 1 protein marker

เลนที่ 2 โปรตีน Cyt2Aa

เลนที่ 3 โปรตีน Cry4Ba

เลนที่ 4 โปรตีนคู่ Cyt2Aa และ Cry4Ba ที่แสดงออกร่วมกัน

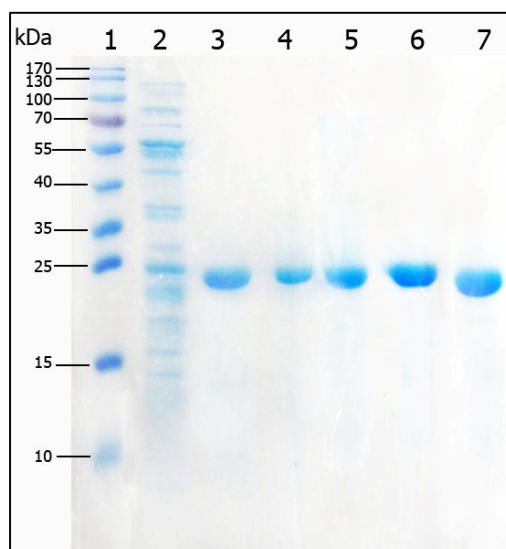
เลนที่ 5 โปรตีน Cyt2Aa หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

เลนที่ 6 โปรตีน Cry4Ba หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

เลนที่ 7 โปรตีนคู่ Cyt2Aa และ Cry4Ba หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ภาพที่ 4.3

เจล SDS-PAGE แสดงโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กลายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส



เลนที่ 1 protein marker

เลนที่ 2 โปรตีนจากเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด pBP1 ซึ่งมียีนผลิตโปรตีน Cyt2Aa

เลนที่ 3 โปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม

เลนที่ 4 โปรตีน Cyt2Aa V135A

เลนที่ 5 โปรตีน Cyt2Aa N145A

เลนที่ 6 โปรตีน Cyt2Aa I150A

เลนที่ 7 โปรตีน Cyt2Aa V197A

2. การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง Cyt2Aa และ Cry4Ba

2.1 การศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันด้วยการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง (mosquito-larvicidal assay)

การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของโปรตีนกลาย Cyt2Aa ร่วมกับ Cry4Ba มีวัตถุประสงค์คือ 1. เพื่อค้นหาโปรตีน Cyt2Aa กลายที่สามารถเสริมฤทธิ์กับ Cry4Ba ถึงแม้ว่าโปรตีน Cyt2Aa จะไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ เพื่อนำไปศึกษาต่อให้ละเอียดยิ่งขึ้นด้วยเทคนิคอื่นๆ และค้นหาโปรตีน Cyt2Aa กลายที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิมแต่ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ได้เพื่อระบุถึงกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง

จากผลการทดสอบกับลูกน้ำยุงในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่า โปรตีน Cyt2Aa กลายทั้ง 4 ชนิด ที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง เมื่อนำมาผสมกับโปรตีน Cry4Ba แล้ว

ทดสอบกับลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงใกล้เคียงกับโปรตีน Cry4Ba เพียงชนิดเดียว ซึ่งแสดงว่า Cyt2Aa กลายทั้ง 4 ชนิด ไม่สามารถเสริมฤทธิ์กับ Cry4Ba ได้ ในขณะที่โปรตีน Cyt2Aa กลายทั้ง 4 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงใกล้เคียงกับ Cyt2Aa ดั้งเดิม เมื่อทดสอบร่วมกับโปรตีน Cry4Ba พบว่ามีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงสูงขึ้นเมื่อเทียบกับโปรตีน Cyt2Aa กลายแต่ละชนิด และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับคู่ Cyt2Aa ดั้งเดิมกับ Cry4Ba และจากการคำนวณค่า synergism factor ตารางที่ 4.2 ค่าของคู่โปรตีน Cyt2Aa กลายมีค่าใกล้เคียงกับคู่ Cyt2Aa ดั้งเดิม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีการกลายไม่เกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 4.1

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) และยุงรำคาญ (*C. quinquefasciatus*) ของโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba

โปรตีนสารพิษ	LC ₅₀ (ng/ml)	
	<i>A. aegypti</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>
โปรตีนดั้งเดิม		
Cyt2Aa	344±64	232±121
Cry4Ba	142±39	>10000
Cyt2Aa + Cry4Ba	7±2.11	19±2.56
กลุ่ม Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง		
Cyt2Aa V135A	NT	NT
Cyt2Aa N145A	NT	NT
Cyt2Aa I150A	>10000	>10000
Cyt2Aa V197A	NT	NT
Cyt2Aa V135A + Cry4Ba	140±33	>20000
Cyt2Aa N145A + Cry4Ba	139±61	>20000
Cyt2Aa I150A + Cry4Ba	154±49	>20000
Cyt2Aa V197A + Cry4Ba	135±37	NT

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

โปรตีนสารพิษ	LC ₅₀ (ng/ml)	
	<i>A. aegypti</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>
กลุ่ม Cyt2Aa กลายที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ได้ใกล้เคียงกับ Cyt2Aa ดั้งเดิม		
Cyt2Aa V125A	332±50	245±97
Cyt2Aa T144A	347±52	239±104
Cyt2Aa Q149A	361±46	251±112
Cyt2Aa S194A	355±47	248±99
Cyt2Aa V125A + Cry4Ba	8±1.89	21±2.71
Cyt2Aa T144A + Cry4Ba	8±2.03	21±2.54
Cyt2Aa Q149A + Cry4Ba	7±1.51	19±2.12
Cyt2Aa S194A + Cry4Ba	8±2.26	20±2.33

LC₅₀ คือความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำให้ลูกน้ำยุงตาย 50% เป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของโปรตีนสารพิษ NT (non-toxic) หมายถึงที่ความเข้มข้นของโปรตีนสูงสุด 10000 นาโนกรัม สำหรับโปรตีนชนิดเดียว หรือ 20000 นาโนกรัม สำหรับคู่โปรตีนผสม ไม่ฆ่าลูกน้ำยุง

>10000 หมายถึงที่ความเข้มข้น 10000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดลูกน้ำยุงตายไม่ถึง 50% ทำให้ไม่สามารถคำนวณค่า LC₅₀

>20000 หมายถึงที่ความเข้มข้น 20000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีนผสม ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดลูกน้ำยุงตายไม่ถึง 50% ทำให้ไม่สามารถคำนวณค่า LC₅₀

ตารางที่ 4.2

ผลการคำนวณค่าระดับการเสริมฤทธิ์กัน (synergism factor) ของโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กลายกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงกับ Cry4Ba ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) และยุงรำคาญ (*C. quinquefasciatus*)

โปรตีนสารพิษ	LC ₅₀ (ng/ml)		synergism factor
	ค่าจากการทดลอง	ค่าจากการคำนวณ*	
<i>A. aegypti</i>			
Cyt2Aa + Cry4Ba	7±2.11	233	33.3
Cyt2Aa V125A + Cry4Ba	8±1.89	230	28.8
Cyt2Aa T144A + Cry4Ba	8±2.03	234	29.3
Cyt2Aa Q149A + Cry4Ba	7±1.51	238	34
Cyt2Aa S194A + Cry4Ba	8±2.26	237	29.6
<i>C. quinquefasciatus</i>			
Cyt2Aa + Cry4Ba	19±2.56	344	18.1
Cyt2Aa V125A + Cry4Ba	21±2.71	363	17.3
Cyt2Aa T144A + Cry4Ba	21±2.54	354	16.9
Cyt2Aa Q149A + Cry4Ba	19±2.12	371	19.5
Cyt2Aa S194A + Cry4Ba	20±2.33	367	18.4

* ค่า LC₅₀ จากการคำนวณ คำนวณด้วยวิธีการของ Tabashnik (1992) โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง Cyt2Aa ต่อ Cry4Ba 2 ต่อ 1 โดยมวล

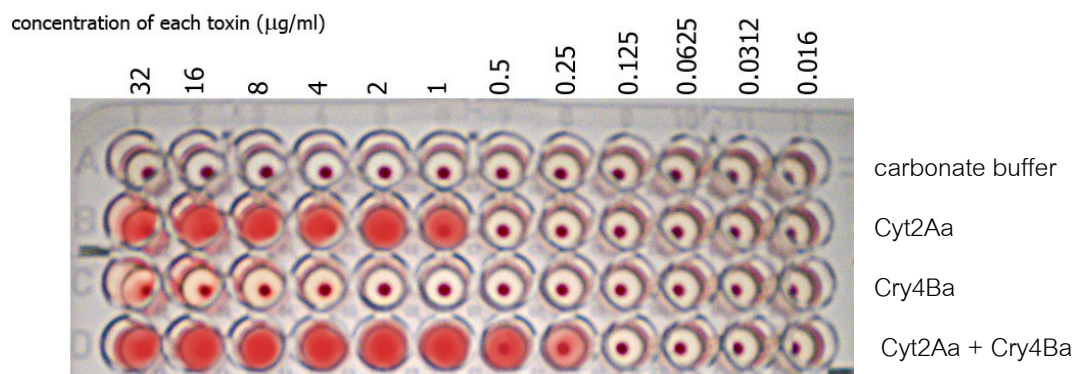
2.2 การศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันโดยวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity assay)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การสลายเม็ดเลือดแดงพิจารณาจากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของโปรตีนสารพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการสลายตัวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งหากเม็ดเลือดแดงเกิดการสลายตัวจะสังเกตเห็นได้จากสีแดงที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบแต่หากเม็ดเลือดแดงไม่เกิดการสลายตัวจะตกตะกอนสังเกตเห็นเป็นจุดที่กลางหลุมทดสอบ ความเข้มข้นต่ำแสดงว่ามีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงสูง ผลการวิเคราะห์การเสริมฤทธิ์กันด้วยวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์

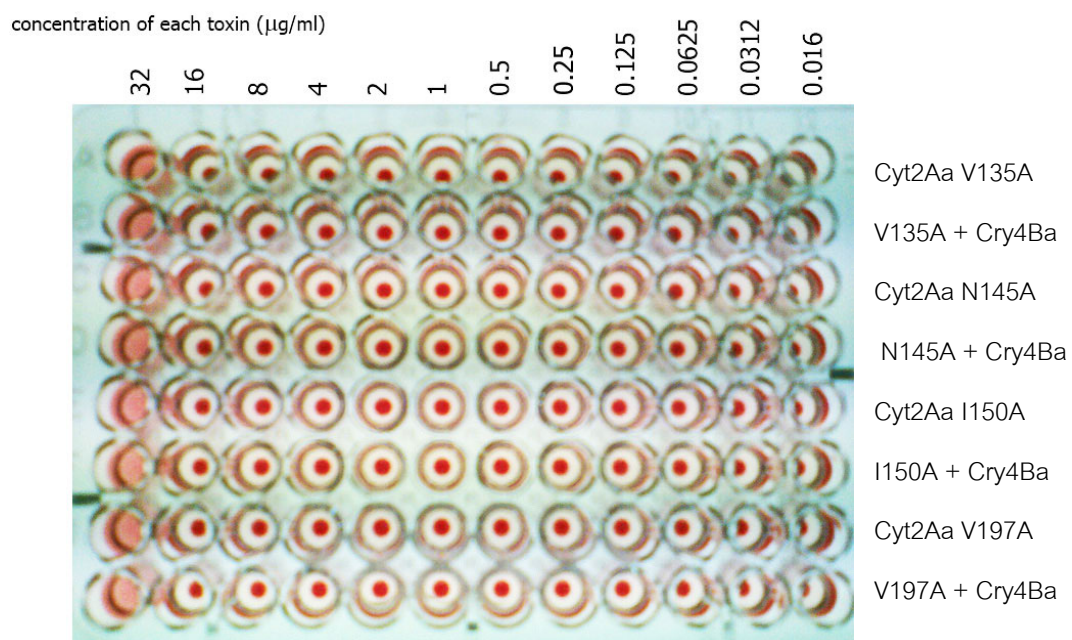
สลายเม็ดเลือดแดงแสดงในภาพที่ 4.4 ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่โปรตีน Cyt2Aa ดังเดิมทำให้เม็ดเลือดแดงสลายตัว คือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่โปรตีน Cry4Ba ที่ความเข้มข้นสูงสุด 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการสลายตัวเล็กน้อยเมื่อเทียบกับแถวที่ใส่บัฟเฟอร์คาร์บอนตเพื่อเป็นคอนโทรล (ภาพที่ 4.4A) แสดงว่าโปรตีน Cry4Ba ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงสลายตัว เมื่อผสมโปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยมวล พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนผสมที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการสลายตัวอย่างสมบูรณ์ คือ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.4A) ทำให้เม็ดเลือดแดงสลายตัวได้บางส่วน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนผสม Cyt2Aa กับ Cry4Ba สามารถสลายเม็ดเลือดได้ดีกว่าโปรตีน Cyt2Aa เพียงชนิดเดียวประมาณ 2 เท่า ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอาจมีการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba ในการสลายเม็ดเลือดแดง สำหรับโปรตีน Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การสลายเม็ดเลือดแดงแสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงที่ความเข้มข้นสูงสุด 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดการสลายตัวได้น้อยมาก (ภาพที่ 4.4B) ถือได้ว่าโปรตีน Cyt2Aa กลายที่กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงสลายตัว และถึงแม้ว่าจะผสมกับโปรตีน Cry4Ba ก็ยังคงไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงสลายตัวได้ (ภาพที่ 4.4B) จึงไม่พบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างโปรตีน Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงกับ Cry4Ba สำหรับโปรตีน Cyt2Aa กลายที่มีประสิทธิภาพในการลูกน้ำยุงใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดังเดิม การทดสอบฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงพบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่โปรตีน Cyt2Aa กลายกลุ่มนี้ทำให้เม็ดเลือดแดงสลายตัว คือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.4C) และเมื่อผสมกับโปรตีน Cry4Ba ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงสลายตัว คือ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.4C) ซึ่งใกล้เคียงกับผลของโปรตีน Cyt2Aa ดังเดิมและผลของโปรตีนผสม Cyt2Aa ดังเดิมกับ Cry4Ba (ภาพที่ 4.4A) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเสริมฤทธิ์ของโปรตีนในกลุ่มนี้น่าจะไม่แตกต่างจากการเสริมฤทธิ์ของโปรตีนผสม Cyt2Aa ดังเดิมกับ Cry4Ba คือประมาณ 2 เท่า

ภาพที่ 4.4

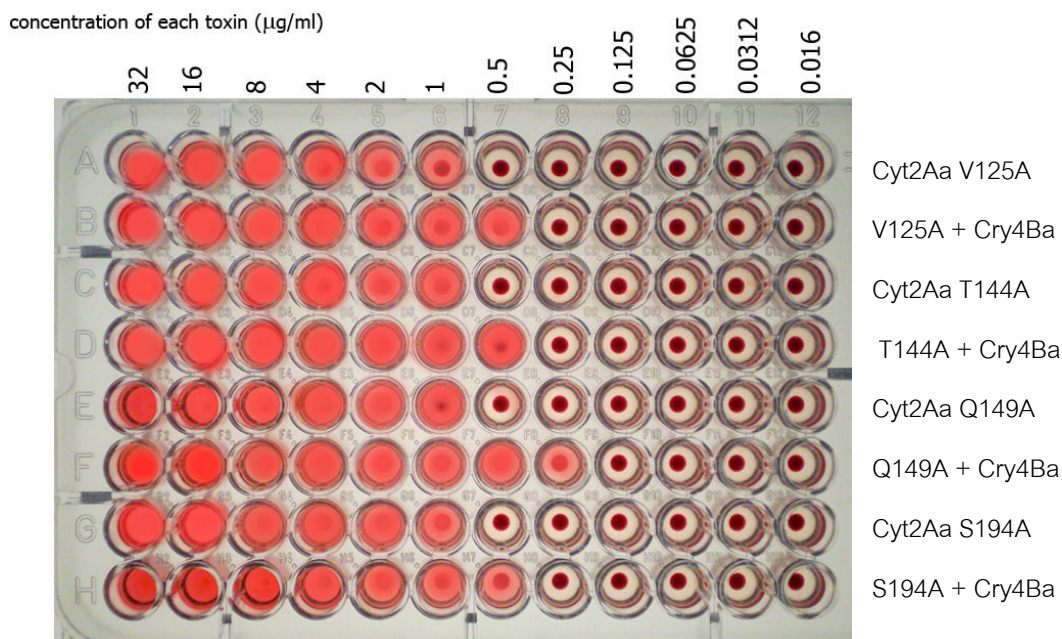
ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันด้วยวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดง



A) ผลวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงของโปรตีน Cyt2Aa ดังเดิมกับ Cry4Ba



B) ผลวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงของโปรตีน Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง กับ Cry4Ba



C) ผลวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงของโปรตีน Cyt2Aa กลายที่มีประสิทธิภาพในการลวกน้ำยุง ไกล่เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม กับ Cry4Ba

การทดสอบการเสริมฤทธิ์กันด้วยวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงใช้เม็ดเลือดแดง 1% ผสมกับโปรตีนสารพิษ ที่ให้ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.008-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับโปรตีนผสม Cyt2Aa กับ Cry4Ba ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 หลังจากนั้นบ่มไว้ 24 ชั่วโมง

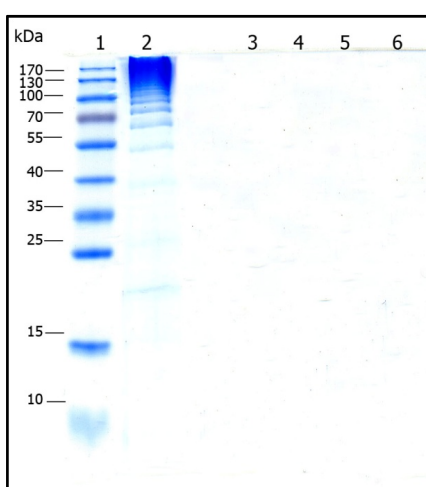
ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันด้วยวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงตัว สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง คือ โปรตีน Cyt2Aa กลายที่สูญเสีย ประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงจะสูญเสียฤทธิ์ในการสลายเม็ดเลือดแดงด้วย และเมื่อผสมกับ โปรตีน Cry4Ba ให้ผลทดสอบไม่แตกต่างจากผลของโปรตีนเพียงชนิดเดียวแสดงให้เห็นว่าไม่มีการ เสริมฤทธิ์กัน และกลุ่ม Cyt2Aa กลายที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงได้ใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิมก็สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้ใกล้เคียงกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม เมื่อ ทดสอบร่วมกับ Cry4Ba พบการเสริมฤทธิ์เกิดขึ้น ซึ่งระดับการเสริมฤทธิ์กันไม่แตกต่างจากการ เสริมฤทธิ์กันของโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิมกับ Cry4Ba ดังนั้นจึงไม่พบโปรตีน Cyt2Aa ไม่ฆ่าลูกน้ำ ยุงแต่สามารถเสริมฤทธิ์ได้และไม่พบโปรตีน Cyt2Aa กลายที่มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ แตกต่างจากโปรตีน Cyt2Aa เพื่อนำไปศึกษาด้วยวิธีการอื่นๆ ต่อไป

2.3 การศึกษาความสามารถในการจับกับไลโปโซมของโปรตีน Cyt2Aa กลาย

เนื่องจากการทดลองการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีน Cyt2Aa กลาย ไม่พบโปรตีนกลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการ ซึ่งคาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน Cyt2Aa จึงศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ว่าโปรตีนกลายที่คัดเลือกมาศึกษานั้นสามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้หรือไม่ โดยผสมโปรตีนกลายกับไลโปโซมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างและปั่นแยก นำตะกอนไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ผลการวิเคราะห์ในภาพที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า โปรตีน Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยังไม่สามารถจับกับไลโปโซมได้ (ภาพที่ 4.5A) แต่โปรตีน Cyt2Aa กลายที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำใกล้เคียงกับโปรตีนดั้งเดิม (ภาพที่ 4.5B) สามารถจับกับไลโปโซมและเกิดแถบโปรตีนเป็นลักษณะขั้นบันไดเช่นเดียวกับโปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม

ภาพที่ 4.5

ผลการทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน Cyt2Aa กลายกับไลโปโซม



A) ผลทดสอบการจับของโปรตีน Cyt2Aa กลายที่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยากับไลโปโซม

เลนที่ 1 protein marker

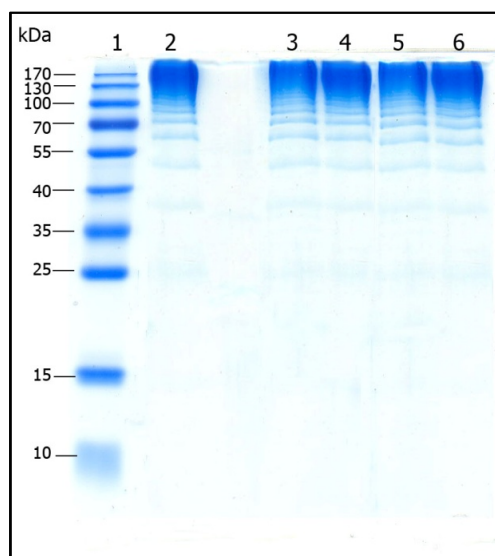
เลนที่ 2 โปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม ผสมไลโปโซม

เลนที่ 3 โปรตีน Cyt2Aa V135A ผสมไลโปโซม

เลนที่ 4 โปรตีน Cyt2Aa N145A ผสมไลโปโซม

เลนที่ 5 โปรตีน Cyt2Aa I150A ผสมไลโปโซม

เลนที่ 6 โปรตีน Cyt2Aa V197A ผสมไลโปโซม



B) ผลทดสอบการจับของโปรตีน Cyt2Aa กลายที่มีประสิทธิภาพในการลู่กล้วย ไกล่เคียงกับโปรตีนดั้งเดิมกับไลโฟโซม

เลนที่ 1 protein marker

เลนที่ 2 โปรตีน Cyt2Aa ดั้งเดิม ผสมไลโฟโซม

เลนที่ 3 โปรตีน Cyt2Aa V125A ผสมไลโฟโซม

เลนที่ 4 โปรตีน Cyt2Aa T144A ผสมไลโฟโซม

เลนที่ 5 โปรตีน Cyt2Aa Q149A ผสมไลโฟโซม

เลนที่ 6 โปรตีน Cyt2Aa S194A ผสมไลโฟโซม

3. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba

เนื่องจากการทดลองขั้นต้นในการค้นหาโปรตีน Cyt2Aa กลาย ไม่พบโปรตีน Cyt2Aa กลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการ การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba จึงมุ่งไปที่ Cyt2Aa ดั้งเดิมเพียงอย่างเดียว โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ช่วง คือ

3.1 ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่ในสารละลาย

การศึกษาอันตรกิริยาของโปรตีนสารพิษที่เกิดขึ้นในสารละลายทำโดยผสมโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa และ Cry4Ba แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค non-denaturing-PAGE และเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

3.1.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค non-denaturing-PAGE

เทคนิค non-denaturing-PAGE ใช้เพื่อการวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นของ Cyt2Aa หรือ Cry4Ba เพียงชนิดเดียวเปรียบเทียบกับคู่โปรตีนผสม Cyt2Aa กับ Cry4Ba ซึ่งหากโปรตีนสารพิษทั้ง 2 ชนิด มีอันตรกิริยาต่อกันน่าจะพบแถบโปรตีนในตำแหน่งที่แตกต่างจากตำแหน่งแถบโปรตีนของ Cyt2Aa หรือ Cry4Ba เพียงชนิดเดียว โปรตีนสารพิษที่นำมาวิเคราะห์ประกอบด้วยโปรตีนที่ยังไม่สามารถแสดงความเป็นพิษได้และโปรตีนที่พร้อมแสดงความเป็นพิษเพื่อวิเคราะห์อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งในช่วงก่อนที่โปรตีนสารพิษจะถูกตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากกระเพาะลูกน้ำยุงและหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์

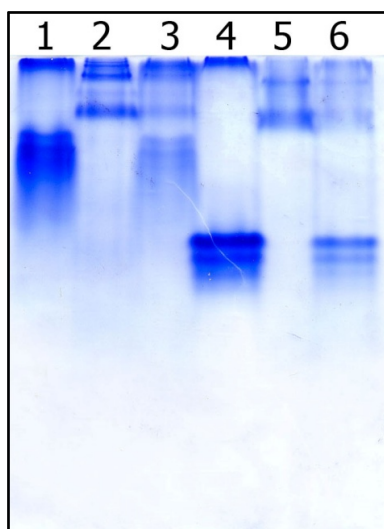
ผลการศึกษาด้วยเทคนิค non-denaturing-PAGE ในภาพที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่า รูปแบบของแถบโปรตีนในเลนที่ 3 ซึ่งเป็นโปรตีนผสม Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอสเหมือนกับรูปแบบแถบของโปรตีน Cyt2Aa ในเลนที่ 1 รวมกับรูปแบบของแถบโปรตีน Cry4Ba ในเลนที่ 2 เช่นเดียวกันกับโปรตีนผสม Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอสในเลนที่ 6 ซึ่งมีลักษณะแถบโปรตีนเหมือนกับรูปแบบของแถบโปรตีนในเลนที่ 4 และ 5 รวมกัน แสดงว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค non-denaturing-PAGE ไม่พบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba ที่ผสมกัน ทั้งโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอสและโปรตีนที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอสแล้ว

3.1.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี มีแนวคิดเช่นเดียวกับเทคนิค non-denaturing-PAGE คือ ถ้าโปรตีน Cyt2Aa มีอันตรกิริยากับ Cry4Ba แล้วเกิดการเกาะกลุ่มกันจะทำให้มีมวลเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ใช้ระยะเวลาที่แตกต่างจาก Cyt2Aa และ Cry4Ba ในการผ่านคอลัมน์ จากผลการวิเคราะห์ในภาพที่ 4.7 พบว่ามีสัญญาณเกิดขึ้น 3 ช่วง คือ แพรคชัน (fraction) ที่ 9 แพรคชันที่ 11-13 และแพรคชันที่ 15-17 เมื่อนำแพรคชันที่มีสัญญาณจากแต่ละตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.8 พบว่าแพรคชันที่ 11-13 คือโปรตีน Cry4Ba และแพรคชัน 15-17 คือ โปรตีน Cyt2Aa ส่วนแพรคชัน 9 ไม่พบโปรตีน เมื่อพิจารณาภาพที่ 4.7 เส้นสีดำคือสัญญาณที่วัดจากตัวอย่างคู่โปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่แสดงออกร่วมกัน จะเห็นว่าปรากฏสัญญาณทั้งที่แพรคชันที่ 11-13 และแพรคชัน 15-17 แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba อยู่แยกจากกัน และไม่พบอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนสารพิษทั้งคู่ในสารละลาย

ภาพที่ 4.6

ผลการวิเคราะห์ด้วย non-denaturing-PAGE ของโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa และ Cry4Ba



เลนที่ 1 โปรตีน Cyt2Aa ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส

เลนที่ 2 โปรตีน Cry4Ba ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส

เลนที่ 3 คู่โปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่แสดงออกร่วมกัน ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส

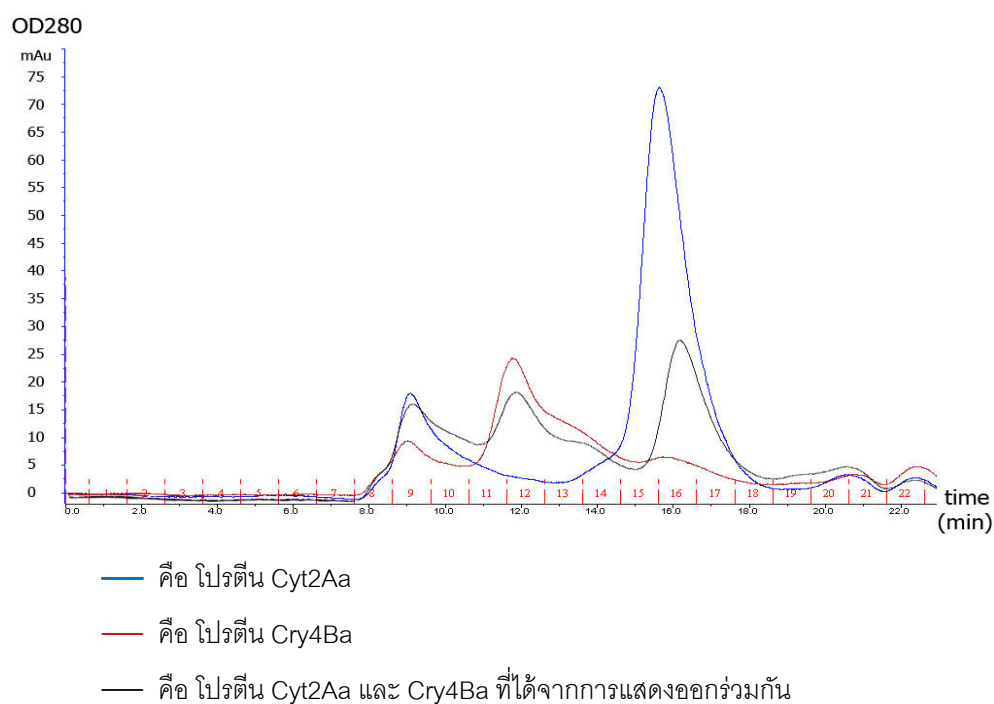
เลนที่ 4 โปรตีน Cyt2Aa ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส

เลนที่ 5 โปรตีน Cry4Ba ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส

เลนที่ 6 คู่โปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส

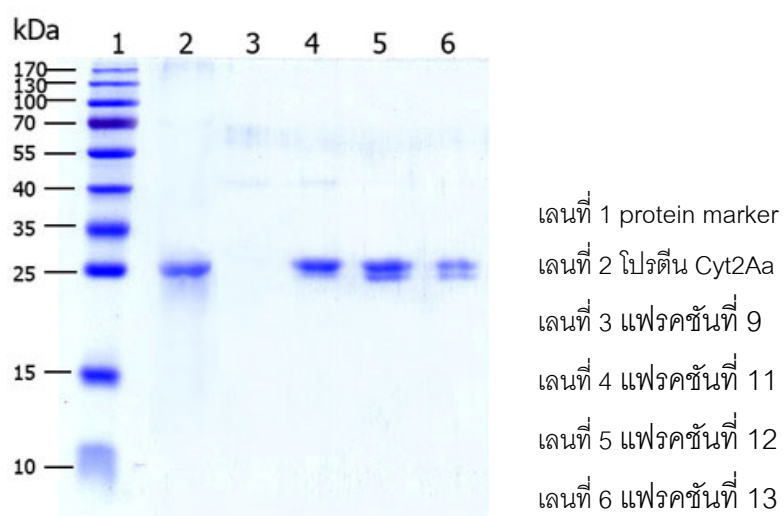
ภาพที่ 4.7

ผลการวิเคราะห์อันตรกิริยาในสารละลายของโปรตีนสารพิษด้วยเทคนิค
เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

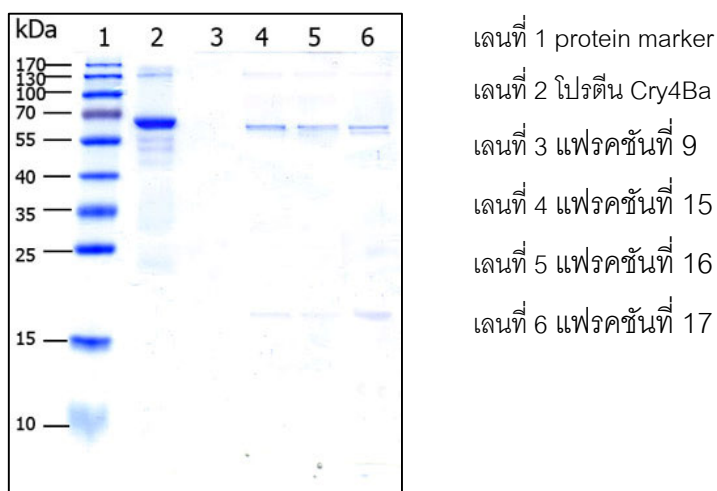


ภาพที่ 4.8

ผลการวิเคราะห์โปรตีนในแฟรคชันจากการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี



A) ผลการวิเคราะห์โปรตีนในแฟรคชันที่ 9 และ 11-13



B) ผลการวิเคราะห์โปรตีนในแฟรคชันที่ 9 และ 15-17

3.2 ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์

การศึกษาอันตรกิริยาของโปรตีนสารพิษที่เกิดขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์ใช้วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์อันตรกิริยาในสารละลาย คือ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค non-denaturing-PAGE และเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี แต่ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปที่พร้อมทำงานแล้วเท่านั้น โดยผสมโปรตีนสารพิษเข้ากับไลโปโซม จากนั้นจึงล้าง บั่นแยก และนำไปวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามเมื่อนำตัวอย่างที่ผสมกับไลโปโซมแล้วไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค non-denaturing-PAGE พบว่าตัวอย่างไม่สามารถเคลื่อนผ่านเจลโพลีอะครีลาไมด์ได้ จึงเปลี่ยนไปใช้เทคนิค SDS-PAGE แทน

3.2.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

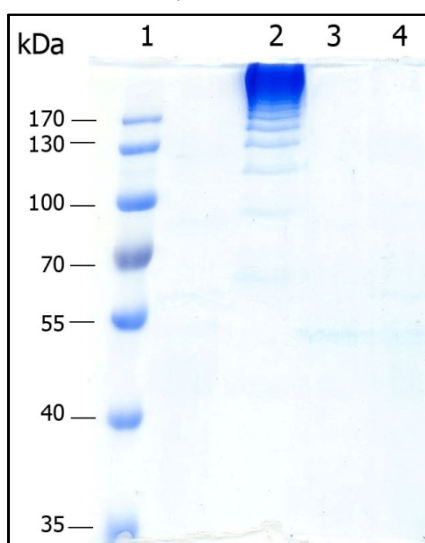
การที่ non-denaturing-PAGE ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนได้อาจเป็นเพราะโปรตีนจับตัวกับไลโปโซมเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่จนไม่สามารถผ่านเจลอะครีลาไมด์ได้ จึงพยายามใช้เทคนิค SDS-PAGE ซึ่งโดยปกติเทคนิคนี้จะทำลายอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนในขณะวิเคราะห์ ดังนั้นในการศึกษาจึงปรับเปลี่ยนวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพเพียงบางส่วนเท่านั้น โดยในการเตรียมตัวอย่างจะไม่เติม DTT และใช้เวลาต้มในน้ำเดือดเพียง 5 นาที

ผลจากเจล SDS-PAGE ในภาพที่ 4.9 แสดงให้เห็นแถบโปรตีนลักษณะขั้นบันไดในเลนที่ 2 แสดงว่าโปรตีน Cyt2Aa สามารถจับกับไลโปโซมได้ แต่ไม่ปรากฏแถบโปรตีนของ Cry4Ba ในเลนที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่าโปรตีน Cyt2Aa สามารถจับกับ

ไลโฟโซมได้ ส่วน Cry4Ba ไม่สามารถจับไลโฟโซมได้ และสำหรับเลนที่ 3 ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด และไลโฟโซม หาก Cyt2Aa มีอันตรกิริยาต่อ Cry4Ba น่าจะดึงดูดให้ Cry4Ba ติดอยู่บนไลโฟโซมและปรากฏเป็นแถบของ Cyt2Aa และ Cry4Ba แต่จากผลการทดลองไม่ปรากฏแถบโปรตีนใดๆ ในเลนที่ 3 เลย ซึ่งอาจเป็นเพราะโปรตีนในเลนนี้ไม่สามารถผ่านเจลอะคริลาไมด์ได้

ภาพที่ 4.9

ผลการวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีนสารพิษด้วย SDS-PAGE



เลนที่ 1 protein marker

เลนที่ 2 โปรตีน Cyt2Aa ผสมกับไลโฟโซม

เลนที่ 3 โปรตีน Cry4Ba ผสมกับไลโฟโซม

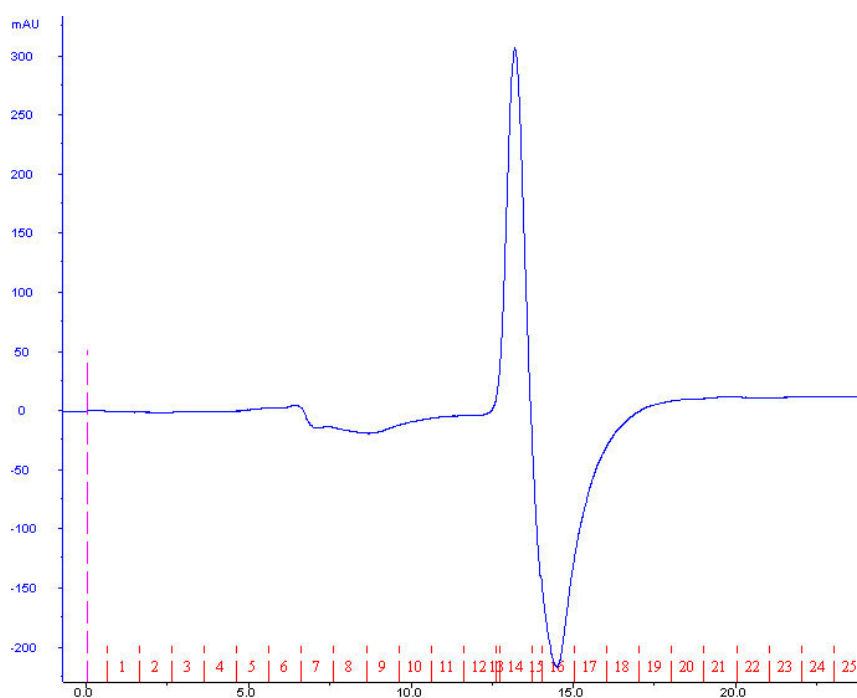
เลนที่ 4 คู่โปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่แสดงออกร่วมกัน ผสมกับไลโฟโซม

3.2.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี ใช้โปรตีนที่อยู่ในรูปพร้อมทำงานผสมกับไลโฟโซม แต่ก่อนนำไปวิเคราะห์จะแยกส่วนของไลโฟโซมออกโดยเติม TritonX100 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% แล้วปั่นแยกเพื่อนำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ของทุกตัวอย่างโปรตีนได้ผลในลักษณะเดียวกันซึ่งแสดงในรูปที่ในภาพที่ 4.10 เมื่อนำแฟรคชันที่มีสัญญาณของตัวอย่างโปรตีนไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าไม่มีโปรตีนใดๆ อยู่ แสดงว่าสัญญาณที่วัดได้เกิดจากสารอื่น และโปรตีนไม่สามารถผ่านจากคอลัมน์ได้

ภาพที่ 4.10

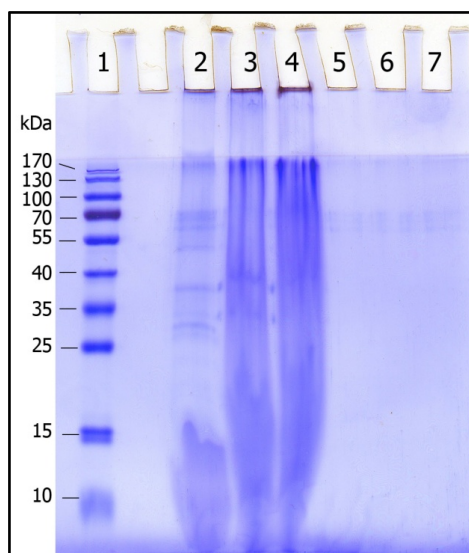
ผลการวิเคราะห์อันตรกิริยาบนเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีนสารพิษด้วยเทคนิค
เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี



การที่ไม่พบโปรตีนทุกชนิดในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี อาจหมายถึงโปรตีนทุกชนิดไม่สามารถจับกับไลโปโซมได้ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดลองที่ผ่านมาและงานวิจัยอื่นๆ ที่กล่าวไว้ข้างต้น หรืออาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนไม่ได้อยู่ในส่วนใสที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี จึงทดลองนำส่วนตะกอนไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ 8% ผลการวิเคราะห์ในภาพที่ 4.11 พบส่วนของตะกอนมีแถบโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับโปรตีน Cy2Aa ในเลนที่ 2 ส่วนเลนที่ 3 และ 4 มีลักษณะเป็นปื้น (smear) ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ขนาดได้ ในขณะที่เลน 5 6 และ 7 ซึ่งเป็นส่วนใสที่นำไปวิเคราะห์เทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีพบโปรตีน เมื่อพิจารณาหลุมใส่ตัวอย่างโปรตีนบริเวณ stacking gel จะเห็นว่าสามารถย้อมติดสีได้ ซึ่งอาจเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลได้จึงค้างอยู่ที่หลุมใส่ตัวอย่าง

ภาพที่ 4.11

ผลการวิเคราะห์ส่วนตะกอนและส่วนใสของสารผสมโปรตีนกับไลโฟโซม



เลนที่ 1 protein marker

เลนที่ 2 ส่วนตะกอนโปรตีน Cyt2Aa หลังผ่านการแยกลิพิดออก

เลนที่ 3 ส่วนตะกอนโปรตีน Cry4Ba หลังผ่านการแยกลิพิดออก

เลนที่ 4 ส่วนตะกอนโปรตีนคู่โปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่แสดงออกร่วมกัน หลังผ่านการแยกลิพิดออก

เลนที่ 5 ส่วนใสของโปรตีน Cyt2Aa

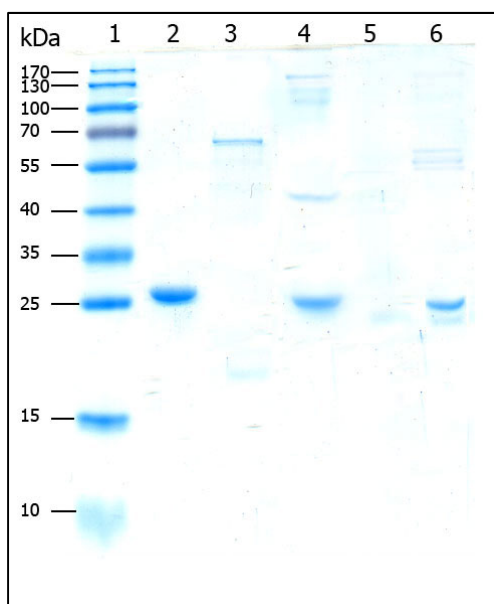
เลนที่ 6 ส่วนใสของโปรตีน Cyt2Aa

เลนที่ 7 ส่วนใสของโปรตีนคู่โปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba

เพื่อตรวจสอบว่าสารที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจล SDS-PAGE เป็นโปรตีนสารพิษหรือไม่ จึงทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง แล้วนำตะกอนโปรตีนไปละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากภาพที่ 4.12 ในเลนที่ 2 ปรากฏแถบโปรตีนขนาด ประมาณ 25 กิโลดาลตัน ซึ่งเท่ากับขนาดของโปรตีน Cyt2Aa และในเลนที่ 4 ปรากฏแถบโปรตีนขนาดประมาณ 25 และ 60 กิโลดาลตัน ซึ่งเท่ากับขนาดของโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba ตามลำดับ แต่ไม่พบแถบโปรตีนใดๆ ในเลนที่ 3 แสดงว่าตะกอนที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจล SDS-PAGE ในการทดลองก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 4.11) ในเลนที่ 2 เป็นตะกอน Cyt2Aa กับไลโฟโซม ในเลนที่ 4 เป็นตะกอนของ Cyt2Aa และ Cry4Ba กับไลโฟโซม ส่วนในเลนที่ 3 ตะกอนของไลโฟโซมเพียงอย่างเดียว

ภาพที่ 4.12

ผลการวิเคราะห์ส่วนตะกอนของสารผสมโปรตีนกับไลโปโซมหลังจากละลายในสารละลาย NaOH



เลนที่ 1 protein marker

เลนที่ 2 โปรตีน Cyt2Aa

เลนที่ 3 โปรตีน Cry4Ba

เลนที่ 4 ส่วนตะกอนโปรตีน Cyt2Aa ที่ละลายในสารละลาย NaOH

เลนที่ 5 ส่วนตะกอนโปรตีน Cry4Ba ที่ละลายในสารละลาย NaOH

เลนที่ 6 ส่วนตะกอนโปรตีนผสม Cyt2Aa กับ Cry4Ba ที่แสดงออกร่วมกันที่ละลายในสารละลาย NaOH

4. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน

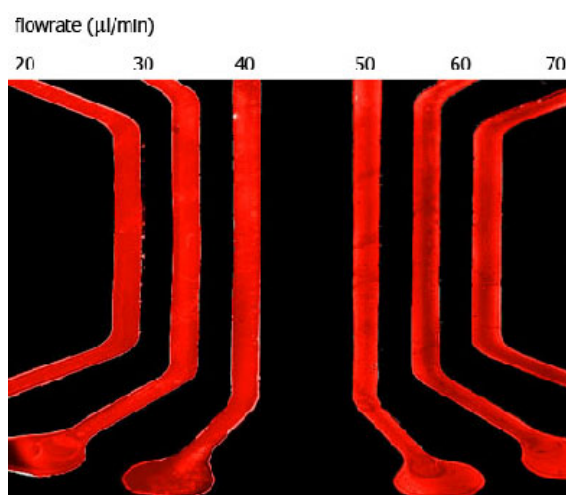
4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมผิวทอง

การเตรียมพื้นผิวทองทำโดยฉีดไลโปโซม 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผลจากการใช้ความเร็วในการไหลต่างๆ ในการเตรียมพื้นผิวลิพิดแสดงในภาพที่ 4.13 เมื่อใช้ความเร็วในการไหลสูงถึง 50 ไมโครลิตรต่อนาที พบว่าภาพผลต่างบริเวณขอบของโฟลวเซลล์สว่างกว่าตรงกลาง แสดงให้เห็นว่าพื้นผิวของลิพิดจะไม่สม่ำเสมอ ไลโปโซมเกาะบริเวณขอบ

ของช่องไหลมากกว่าตรงกลาง ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเร็วในการไหล 30 ไมโครลิตรต่อนาที ในการเตรียมพื้นผิวต่อไป เพื่อให้แน่ใจว่าจะได้พื้นผิวที่สม่ำเสมอ

ภาพที่ 4.13

ภาพผลต่างของพื้นผิวของเมื่อฉีดไลโปโซมด้วยความเร็วในการไหลต่างๆ

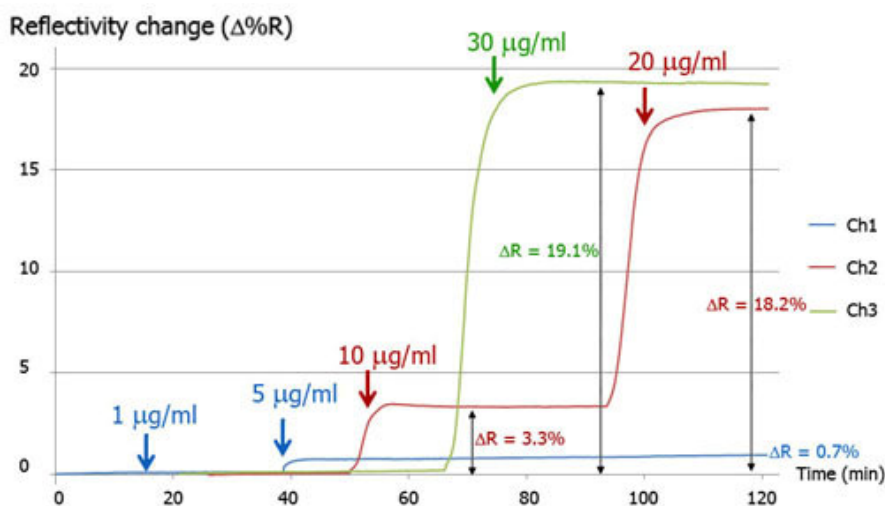


บริเวณที่สว่างแสดงถึงบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงดัชนีหักเหบนพื้นผิวซึ่งหมายถึงมีโมเลกุลเกาะที่ผิวของ

ผลของความเข้มข้นของไลโปโซมที่ใช้ในการเตรียมพื้นผิวในภาพที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไลโปโซม สัญญาณเอสพีอาร์ (ΔR) ที่วัดได้เพิ่มสูงขึ้นแสดงว่ามีไลโปโซมจับกับพื้นผิวของได้เพิ่มขึ้น จนกระทั่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไลโปโซมถึง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สัญญาณที่วัดได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แสดงว่าการเกาะกับพื้นผิวเริ่มอิ่มตัวที่ความเข้มข้นประมาณ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าผลการทดลองในการเตรียมพื้นผิวต่อไป เพื่อให้แน่ใจว่าจะได้พื้นผิวที่พิดที่แผ่คลุมเต็มผิวชิปของ

ภาพที่ 4.14

สัญญาณเอสพีอาร์ที่เกิดเมื่อฉีดไลโปโซมที่ความเข้มข้นต่างๆ บนผิวทองเปลว



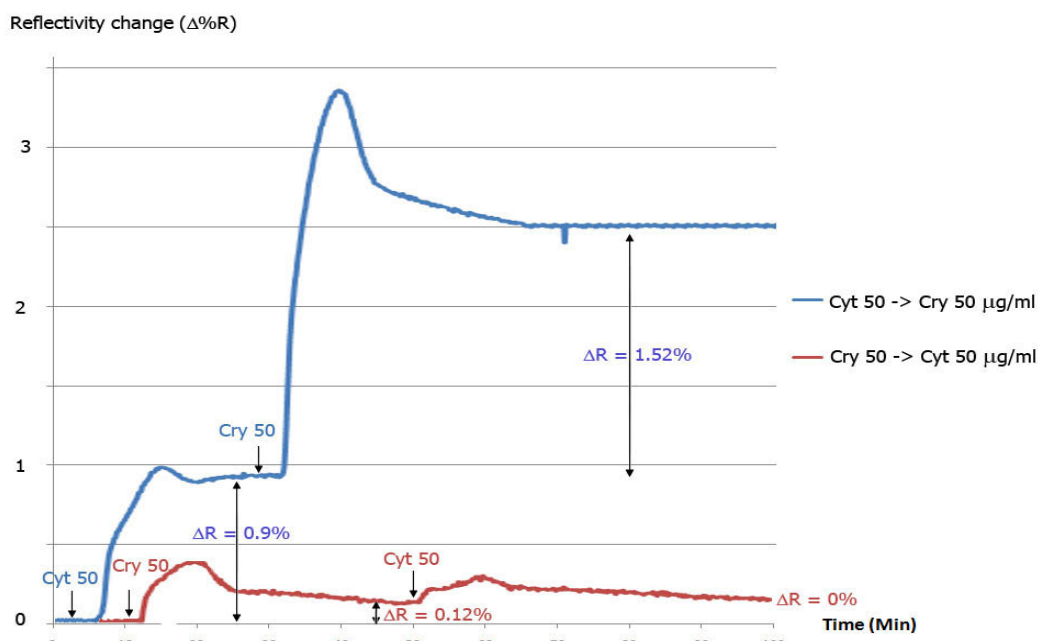
ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงสัญญาณที่วัดได้เมื่อฉีดไลโปโซมที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.2 การตรวจวัดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน

หลังจากเตรียมพื้นผิวทองด้วยไลโปโซมตามวิธีการข้างต้นแล้ว จึงเริ่มตรวจวัดอันตรกิริยาเบื้องต้นโดยฉีดโปรตีน Cyt2Aa ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วย Cry4Ba ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการฉีด Cry4Ba ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วย Cyt2Aa ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยฉีดสารด้วยความเร็วในการไหล 30 ไมโครลิตรต่อนาที ผลการทดลองในภาพที่ 4.15 แสดงให้เห็นว่าเมื่อฉีดโปรตีน Cyt2Aa เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนสามารถตรวจวัดสัญญาณได้ 0.9%R แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cyt2Aa สามารถจับกับพื้นผิวลิพิดได้ (เส้นสีฟ้า) และเมื่อฉีดโปรตีน Cry4Ba ไปยังพื้นผิวลิพิดที่มีโปรตีน Cyt2Aa เกาะอยู่ สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ 1.52%R ในขณะที่เมื่อฉีดโปรตีน Cry4Ba ไปยังพื้นผิวลิพิด (เส้นสีแดง) สามารถตรวจวัดสัญญาณได้เพียง 0.12%R แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cry4Ba จับกับพื้นผิวลิพิดได้น้อยมาก และการฉีดโปรตีน Cyt2Aa ตาม ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้จากการฉีดโปรตีน Cry4Ba ไปบนพื้นผิวลิพิดที่มี Cyt2Aa เกาะอยู่กับสัญญาณที่ได้จากการฉีดโปรตีน Cry4Ba บนพื้นผิวลิพิดโดยตรง จะเห็นว่าสัญญาณที่วัดได้จากการฉีดโปรตีน Cry4Ba ไปบนพื้นผิวลิพิดที่มี Cyt2Aa อยู่ก่อนสูงกว่าหลายเท่า แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cyt2Aa ซึ่งอยู่บนพื้นผิวลิพิดมีอันตรกิริยากับโปรตีน Cry4Ba ทำให้โปรตีน Cry4Ba สามารถจับกับพื้นผิวลิพิดได้ดีขึ้น

ภาพที่ 4.15

ภาพสัญญาณเอสพีอาร์ที่เกิดเมื่อฉีดโปรตีน Cyt2Aa ตามด้วย Cry4Ba และโปรตีน Cry4Ba ตามด้วย Cyt2Aa

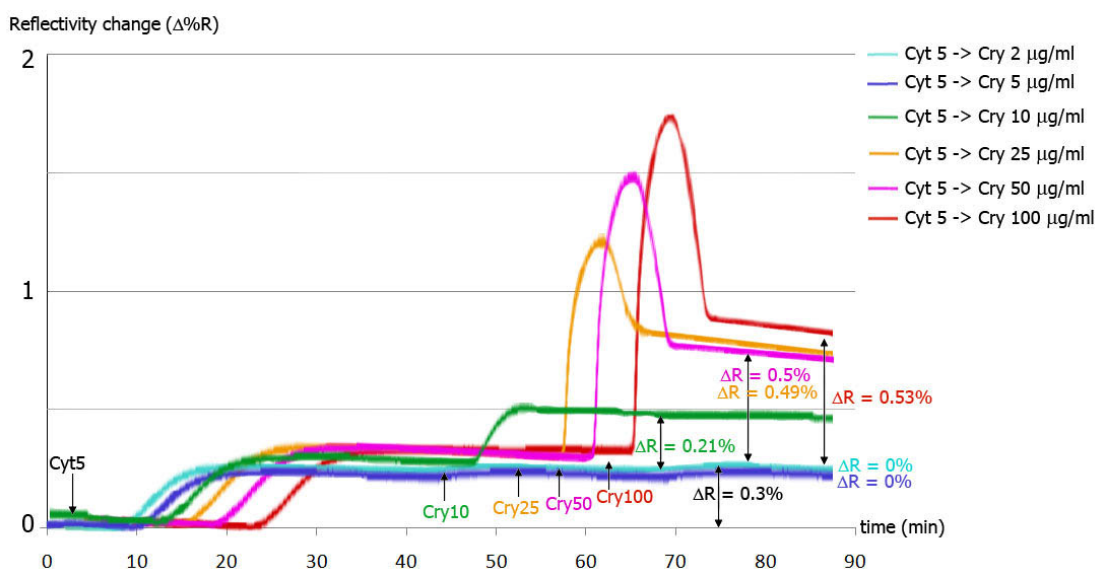


เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่าง Cyt2Aa และ Cry4Ba ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น จึงทดลองตรวจวัดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยฉีดโปรตีน Cyt2Aa ด้วยความเข้มข้นตั้งแต่ 1 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปบนพื้นผิวลิดก่อน ตามด้วยโปรตีน Cry4Ba ด้วยความเข้มข้นตั้งแต่ 2 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ตามภาพที่ 4.16 เนื่องจากที่ความเข้มข้นของ Cyt2Aa 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณใดๆ ได้ จึงไม่แสดงในภาพ

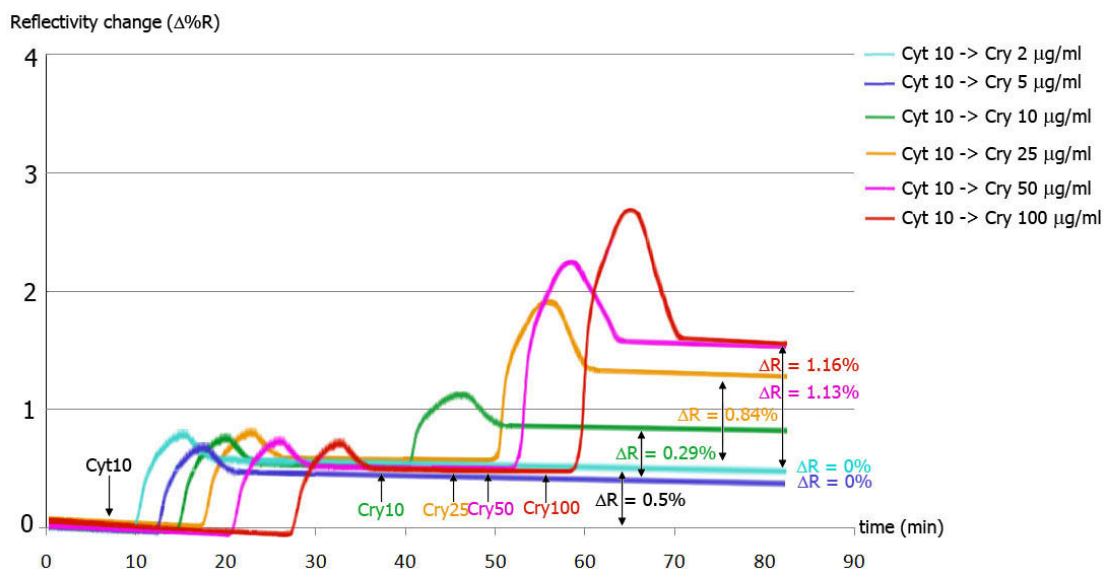
เทคนิคเส้นผิวพลาสมอนเริ่มตรวจวัดสัญญาณได้ที่ความเข้มข้นของโปรตีน Cyt2Aa ตั้งแต่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดสัญญาณได้เฉลี่ยประมาณ 0.3%R และเมื่อความเข้มข้นของ Cyt2Aa เพิ่มขึ้นเป็น 10 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สัญญาณเอสพีอาร์ที่วัดได้ก็เพิ่มขึ้นเป็น 0.5%R 0.75%R และ 1%R ตามลำดับ ในขณะที่สัญญาณจาก Cry4Ba เริ่มตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน Cry4Ba นอกจากนี้สัญญาณเอสพีอาร์เกิดขึ้นนี้ยังสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีน Cyt2Aa ด้วย

ภาพที่ 4.16

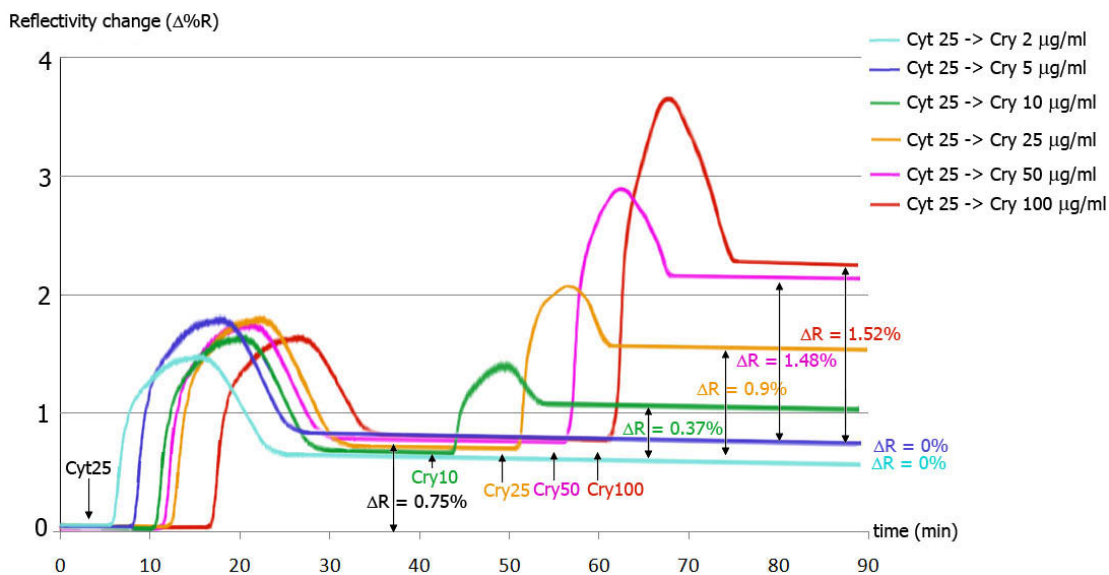
ภาพสัญญาณเอสพีอาร์ที่เกิดเมื่อฉีดโปรตีน Cyt2Aa ตามด้วย Cry4Ba ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตัวเลขที่ต่อท้ายเส้นกราฟแต่ละเส้นคือสัญญาณเอสพีอาร์ที่เพิ่มขึ้นหลังจากฉีดโปรตีน Cry4Ba



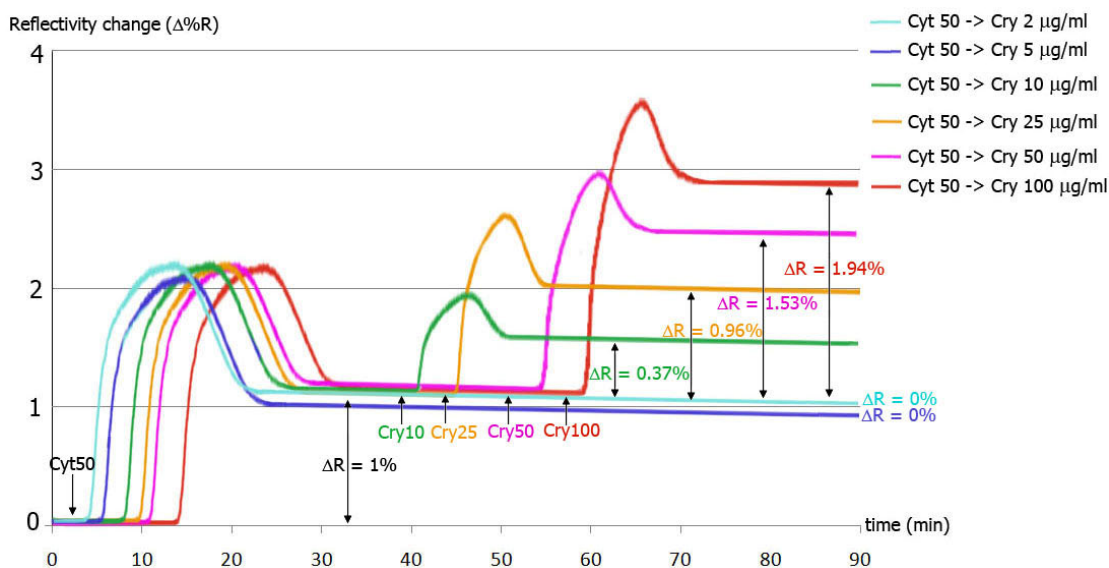
A) โปรตีน Cyt2Aa ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



B) โปรตีน Cyt2Aa ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



C) โปรตีน Cyt2Aa ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



D) โปรตีน Cyt2Aa ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองข้างต้น (ภาพที่ 4.15) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cry4Ba ไม่สามารถจับกับพื้นผิวลิพิดโดยตรงได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น (Boonserm et al., 2005; de Maagd et al., 2003) ซึ่งกล่าวว่าโปรตีน Cry ต้องอาศัยตัวรับในการจับกับพื้นผิวลิพิด ในการทดลองนี้เมื่อฉีดโปรตีน Cry4Ba ไปบนพื้นผิวที่มี Cyt2Aa เกาะอยู่พบว่าโปรตีน Cry4Ba สามารถจับกับพื้นผิวลิพิดได้ ซึ่งสัญญาณที่ตรวจวัดได้นี้แสดงถึงอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba เมื่ออยู่บนพื้นผิวลิพิด เมื่อนำสัญญาณเอสพีอาร์สรุปลงในตารางที่ 4.3 จะเห็นว่าสัญญาณเอสพีอาร์สูงสุด

ของโปรตีน Cry4Ba สัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีน Cyt2Aa ที่ฉีดไปบนพื้นผิวลิพิดก่อน กล่าวคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน Cry4Ba สัญญาณเอสพีอาร์ที่วัดได้จะสูงขึ้น แต่จะเริ่มคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน Cry4Ba ถึงระดับหนึ่ง ซึ่งความเข้มข้นที่สัญญาณจาก Cry4Ba เริ่มคงที่ สัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีน Cyt2Aa เห็นได้จากที่ความเข้มข้นของ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สัญญาณของ Cry4Ba คงที่ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เมื่อ Cyt2Aa เพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ความเข้มข้นที่สัญญาณเอสพีอาร์จาก Cry4Ba เริ่มคงที่ก็เพิ่มเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของสัญญาณเอสพีอาร์ Cry4Ba ต่อ Cyt2Aa จะพบว่าอัตราส่วนที่ทำให้สัญญาณเอสพีอาร์จาก Cry4Ba เริ่มคงที่หรืออิ่มตัว (saturate) มีค่าประมาณ 2-5 ต่อ 1 ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราส่วนระหว่างมวลโมเลกุลของ Cry4Ba (60 กิโลดาลตัน) ต่อ Cyt2Aa (29 กิโลดาลตัน) คือ ประมาณ 2 เช่นกัน

ตารางที่ 4.3

สัญญาณเอสพีอาร์ที่วัดได้จากการฉีดโปรตีน Cyt2Aa ตามด้วย Cry4Ba เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba ต่างๆ

Cyt conc. (µg/ml)	Reflectivity change ($\Delta\%R$)						
	Cyt	Cry 2 µg/ml	Cry 5 µg/ml	Cry 10 µg/ml	Cry 25 µg/ml	Cry 50 µg/ml	Cry 100 µg/ml
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
5	0.3	0	0	0.21	0.49 ^a	0.5 ^a	0.53 ^a
10	0.5	0	0	0.29	0.84	1.13 ^b	1.16 ^b
25	0.75	0	0	0.37	0.9	1.48 ^c	1.52 ^c
50	1.0	0	0	0.43	0.96	1.53	1.94

อักษรตัวยกแสดงถึงกลุ่มสัญญาณเอสพีอาร์ที่ใกล้เคียงกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cry จับกับพื้นผิวจนอิ่มตัว