



การโคลนและศึกษาลักษณะของยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ในด้วงมูลสัตว์
Cloning and Characterization of Antimicrobial Peptide Gene from Dung beetle

โดย

นายมณฑล เลิศวรปรีชา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย
จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555
มหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ (antimicrobial peptide หรือ AMP) จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ พบว่ายีนที่โคลนได้มีขนาดยาว 382 คู่เบส ประกอบด้วย 1 ORF ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 80 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 10.18 kDa สายเปปไทด์มีประจุรวมเป็น +5.5 และมีกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic residue ทั้งหมด 47% การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก cDNA ที่ได้กับ AMP ที่พบในแมลงกลุ่มที่ใกล้เคียงกันมีค่าอยู่ระหว่าง 15 ถึง 96% โดยมีความคล้ายกับ coprisin ซึ่งเป็น AMP ที่พบใน *Copris tripartitus* มากที่สุด (96%) นอกจากนี้ยังคล้ายกับ AMP ที่พบในด้วงชนิดอื่น ๆ ได้แก่ defensin A ที่พบใน *Anomala cuprea* (36%), defensin B ที่พบใน *Anomala cuprea* (30%), rhinoceros defensin ที่พบใน *Oryctes rhinoceros* (20%), และ defensin-2 ใน *Pediculus humanus corporis* (15%) การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 7.8, 15.6 และ 31.25 µg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* มีค่ามากกว่า 500 µg/ml

คำสำคัญ: การโคลนยีน, แอนติไมโครเบียลเปปไทด์, ด้วงมูลสัตว์

Abstract

Nucleotides sequences analysis of DNA encoding antimicrobial peptide (AMP) cloned from dung beetle larva was performed in this study. The results revealed that the cloned cDNA had 382 bp in length, and comprised of one ORF encode for 80 amino acid residues that had a predicted molecular weight of 10.18 kDa. The properties of total amino acid residues analysis indicated that the net charge of this peptide was +5.5, and 47% of all amino acid residues were hydrophobic group. The nucleotide identity analysis to a related AMP gene demonstrated that the identity values ranging between 15 to 96%. The most identity was the coprisin (96%), follow by defensin A (36%), defensin B (30%) rhinoceros defensin (20%) and defensin-2 (15%). Antimicrobial activity testing of synthetic peptides indicated that it able to inhibit *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* at the minimal inhibitory concentration (MIC) of 7.8, 15.6 and 31.25 µg/ml respectively, while the MIC of *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* were more than 500 µg/ml.

คำสำคัญ: Gene cloning, Antimicrobial peptide, Dung beetle

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ได้ให้การสนับสนุนเครื่องมือและ
ห้องปฏิบัติการสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และการศึกษาครั้งนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีด้วยการสนับสนุน
เงินทุนวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555

ผู้วิจัย



มณฑล เลิศวรปรีชา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูปภาพ	vi
บทที่	
1. บทนำ	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3. วิธีวิจัย	8
4. ผลการทดลอง	12
5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	18
6. เอกสารอ้างอิง	19

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. AMP ที่พบในแมลง	4
2. primers ที่ออกแบบและเป้าหมายของยีนที่ใช้ในการศึกษา	9
3. องค์ประกอบและสภาวะการทำ PCR	10
4. องค์ประกอบและสภาวะการโคลนยีน	10
5. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ต่อแบคทีเรีย	17

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1. พฤติกรรมการวางไข่และการดำรงชีวิตของด้วงมูลสัตว์	3
2. วงจรชีวิตของด้วงมูลสัตว์ตั้งแต่การวางไข่และฝักออกเป็นตัว	4
3. กลไกการออกฤทธิ์ของ AMP ต่อแบคทีเรีย	6
4. หลักการของเทคนิค rapid amplification of cdna ends (RACE)	9
5. ตัวอย่างตัวอ่อนของด้วงมูลสัตว์ที่เก็บจากมูลโค	12
6. ผลการทำ RT-PCR จาก RNA ที่สกัดจากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ที่ฉีดด้วย LPS	12
7. ผลการโคลนยีนและทดสอบโคลนที่มี insert gene	13
8. Phylogenetic tree ของ DNA ที่โคลนได้จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์	14
9. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน	14
10. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน	15
11. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์	16

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียหลายชนิด เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขที่หลายประเทศให้ความสำคัญกับปัญหาดังกล่าวเป็นพิเศษ การดื้อยาต้านจุลชีพมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ปัจจัยที่สำคัญคือการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่รอบคอบ ทั้งทางการแพทย์และสัตวแพทย์ เช่นการใช้ยาต้านจุลชีพผสมอาหารสัตว์ เพื่อเร่งการเจริญเติบโตในปศุสัตว์ (Feed additive) เป็นปัจจัยที่สำคัญทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพให้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียกระตุ้นให้เกิดการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารสังเคราะห์และสารจากธรรมชาติที่สามารถนำมาใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพทั้งทางด้านการแพทย์และสัตวแพทย์ได้ ซึ่ง antimicrobial peptide (AMP) นับเป็นเป้าหมายหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจในการศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นยาต้านจุลชีพชนิดใหม่

AMP เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย รา ไวรัส รวมทั้ง AMP บางชนิดมีรายงานว่ามียุทธวิธีฆ่าเซลล์มะเร็งได้ด้วย (Izadpanah, et al., 2005) AMP จัดเป็นกลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ชนิดหนึ่งพบได้ทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ในกลุ่มแมลง (Gallo, et al., 2002; Izadpanah & Gallo, 2005; Reddy, et al., 2004) ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาพบ AMP ในแมลงและตัวอ่อนของแมลงหลายชนิด เช่น cecropin เป็น AMP ที่มีคุณสมบัติเป็น amphipathic peptide ขนาดประมาณ 3-4 KDa แยกได้ครั้งแรกจาก hemolymph ของหนอนไหม (giant silk moth; *Hyalophora cecropia*) (Hultmark, et al., 1983) รายงานการศึกษาหลายรายงาน แสดงให้เห็นว่า cecropin มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อได้ทั้งแบคทีเรีย โปรโตซัว และ ราหลายชนิด (Akuffo, et al., 1998; Boman, et al., 1981; Ekengren, et al., 1999; Hultmark, 1994; Hultmark, et al., 1982)

AMP มีอยู่หลายชนิดด้วยกัน สามารถจัดแบ่งกลุ่มของ AMP ได้หลายแบบ เช่น แบ่งตามกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มคือ (1) cecropin group, (2) insect-defensins group, (3) glycine-rich protein group, (4) proline-rich protein group และ (5) lysozymes group นอกจากนี้ AMP ยังสามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะของโครงสร้างของ peptides ได้เช่นกัน คือกลุ่ม linear α -helix peptides, กลุ่ม antiparallel β -sheets และกลุ่ม hairpin like β -sheets structure (Bulet, et al., 2005) ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาค้นพบ AMP แล้วประมาณ 800 กว่าชนิดในสิ่งมีชีวิตหลากหลายเช่น พืช แมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์มีกระดูกสันหลัง รวมทั้งในมนุษย์ด้วย (Izadpanah & Gallo, 2005; Reddy, et al., 2004) ในจำนวนนี้ AMP ที่แยกได้จากแมลงพบได้มากที่สุดประมาณ 200 ชนิด (Bulet & Stocklin, 2005)

ด้วงมูลสัตว์ (แมลงกุดจี่) เป็นแมลงปีกแข็งจำพวกด้วงแรด (scarab) พบแพร่กระจายได้ทั่วโลก มีประมาณ 7,000 ชนิด ทั่วโลก ด้วงมูลสัตว์เป็นแมลงที่มีวงจรชีวิตที่น่าสนใจ เนื่องจากวงจรชีวิตของด้วงด้วงจะสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรีย รา ไวรัส และ โปรโตซัว เป็นจำนวนมากในตลอดช่วงอายุตั้งแต่มีการวางไข่ ซึ่งตัวแก่จะมีการวางไข่ในก้อนมูลสัตว์ และฟักเป็นตัวอ่อนในมูลสัตว์นั้นโดยที่ตัวอ่อนไม่ถูกทำอันตรายจากเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาวะแวดล้อม ข้อสันนิษฐานประการหนึ่ง คือด้วงมูลสัตว์อาจจะสร้าง AMP ออกมาทำหน้าที่เป็นระบบภูมิคุ้มกันป้องกันตัวเองจากการติดเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมที่ตัวเองอาศัยอยู่ มีรายงานการศึกษาในด้วงในกลุ่ม carrion beetle เป็นแมลงปีกแข็งที่มีการวางไข่ลงในซากสัตว์ที่ตายแล้ว โดยตัวอ่อนจะกินซากสัตว์เหล่านั้นเป็นอาหาร ซึ่งเต็มไปด้วยแบคทีเรีย และราจำนวนมาก โดยที่ตัวอ่อนของด้วงใน

กลุ่มนี้ไม่มีการติดแบคทีเรีย หรือ ราที่ก่อโรค ผลการศึกษาพบว่าด้วงในกลุ่มนี้สามารถสร้าง AMP และหลัง AMP นั้นออกมาทางปากและทางทวารของด้วง และพบว่า AMP ที่หลังออกมามีผลยับยั้งการเจริญของ เชื้อ *vibrio fischerii* และ *Bacillus cereus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Hoback, et al., 2004)

ด้วงมูลสัตว์เป็นแมลงที่คนไทยโดยเฉพาะทางภาคอีสานรู้จักและนำมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นอาหารมนุษย์มาเป็นเวลานาน แต่รายงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ในด้านอื่น เช่น การศึกษาเพื่อหาสารออกฤทธิ์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ยังมีรายงานอยู่ค่อนข้างจำกัด ดังนั้นในการศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์สำคัญเพื่อค้นหา และโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้าง AMP ที่สร้างโดยแมลงในกลุ่มของด้วงมูลสัตว์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP ในด้วงมูลสัตว์กับฐานข้อมูลยีนจาก GenBank เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การศึกษาในเชิงลึก เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีน การศึกษาถึงประสิทธิภาพของ AMP ต่อแบคทีเรีย รา และไวรัส ต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของด้วงมูลสัตว์

ด้วงมูลสัตว์ (Dung beetles) หรือที่คนไทยรู้จักกันในชื่อ “แมลงกุดจี” เป็นแมลงปีกแข็งในกลุ่มเดียวกันกับด้วงแรด จัดอยู่ใน Order: *Coleoptera*, Family : *Scarabaeidae* มีอยู่หลาย species รายงานการศึกษาพบว่าทั่วโลกมีด้วงมูลสัตว์อยู่ประมาณ 4,500 species แพร่กระจายอยู่ตามแหล่งอาศัยต่างกันทั่วโลก โดยส่วนใหญ่มากกว่า 2,800 species พบแพร่กระจายอยู่ในแอฟริกา และแอฟริกาใต้ (Clarke, et al., 2007) ในขณะที่ในประเทศไทย มีรายงานการสำรวจในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา พบมีด้วงมูลสัตว์มากกว่า 100 species (Yupa, et al., 2006) ด้วงมูลสัตว์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามพฤติกรรมการวางไข่คือ (Clarke, et al., 2007)

1. Rollers ด้วงในกลุ่มนี้จะมีการปั้นมูลสัตว์เป็นก้อนกลม ๆ แล้วกลิ้งไปยังบริเวณที่ไกลออกไปจากกองมูลสัตว์ จากนั้นจะวางไข่ในก้อนมูลและชุดหลุมฝังก้อนมูลสัตว์นั้น
2. Tunnellers ด้วงมูลสัตว์ในกลุ่มนี้จะปั้นก้อนมูลสัตว์และจะชุดหลุมฝังตัวเองอยู่ภายใต้กองมูลสัตว์นั้น
3. Dwellers สำหรับด้วงมูลสัตว์ในกลุ่มนี้จะไม่ปั้นก้อนมูลสัตว์ แต่จะอาศัยอยู่ภายในกองมูลสัตว์นั้น (รูปที่ 1)

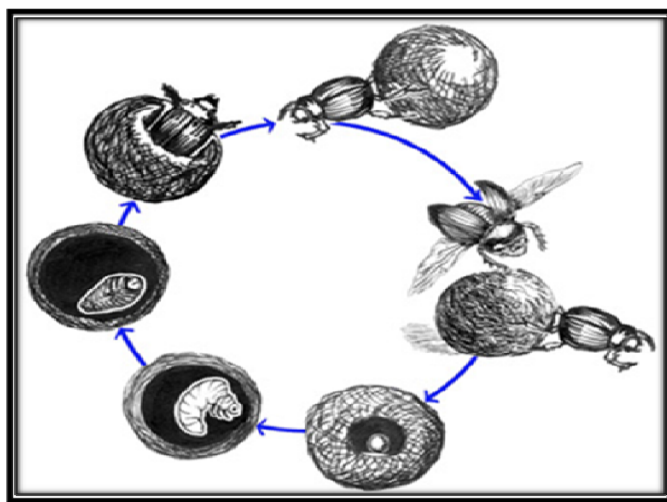


รูปที่ 1 พฤติกรรมของการวางไข่การดำรงชีวิตของด้วงมูลสัตว์

วงจรชีวิตของด้วงมูลสัตว์ ภายหลังจากที่ตัวเต็มวัยวางไข่ลงในก้อนมูลสัตว์แล้วตัวอ่อนจะฟักเป็นตัว หนอนภายในก้อนมูลสัตว์นั้น และจะกินมูลสัตว์เป็นอาหารจนกระทั่งเจริญเข้าสู่ระยะที่เป็นดักแด้ก่อนที่จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย และเจาะทะลุออกมาจากก้อนมูลสัตว์นั้น (รูปที่ 2) จะพบว่าวงจรชีวิตของด้วงมูลสัตว์จะสัมพันธ์ต่อเชื้อโรคหลายชนิดอยู่เกือบตลอดเวลาของช่วงชีวิตทั้งในระยะที่เป็นตัวอ่อนและตัวแก่โดยที่ตัวด้วงไม่เป็นอันตราย ข้อเสนอแนะประการหนึ่ง ที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจคือความสามารถสร้างสารจำพวก AMP ออกมาเพื่อปกป้องตัวเองจากสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก

2.2 การจัดแบ่งกลุ่มของ AMP

ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์จำพวกแมลงนั้นแตกต่างไปจากสัตว์ที่มีการพัฒนาอย่างสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง กลไกสำคัญอันหนึ่งที่แมลงใช้ในการป้องกันตัวเองจากการติดเชื้อ คือการสร้างสาร AMP ที่มีอยู่ด้วยกันหลากหลายชนิด (ตารางที่ 1)



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของตัวมูลสัตว์ตั้งแต่การวางไข่และฟักออกเป็นตัว

ตารางที่1 แสดง AMP ที่พบในแมลง หลายชนิด (Bulet & Stocklin, 2005)

Organism of origin	Name	Primary structure
<i>Hyalophora cecropia</i>	Cecropin A	KWKLFFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK*
<i>Sarcophaga peregrina</i>	Sarcotoxin IA	GWLKKIGKKIERVGGHTRDATIQGLGIAQQAAANVAATAR*
<i>Drosophila melanogaster</i>	Cecropin A	GWLKKIGKKIERVGGHTRDATIQGLGIAQQAAANVAATAR*
<i>Aedes aegypti</i>	Cecropin A	GGLKKLGKKLEGAGKRVFNAAEKALPVPVAGAKALRK
<i>Aedes albopictus</i>	Cecropin A1	GGLKKLGKKLEGVGGKRVFKAASEKALPVAVGICALGK
<i>Anopheles gambiae</i>	Cecropin A	GRLKKLGKKIEGAGKRVFKAASEKALPVPVAGVKAL*
<i>Bombyx mori</i>	Cecropin D	GNFFKDLEKMGQVRDAVISAAPAVDTLAKAKALGQ*
<i>Pachycondylas goeldii</i>	Ponericin G2	GWKDWLKKGKEWLKAKGPGIVKAALQAATQ
<i>Cerratitis capitata</i>	Ceratotoxin	SIGSAFKKALPVAKKIGKAALPIAKAALP
<i>Stomoxys calcitrans</i>	Stomoxyn	RGFRKHFNKLVKVKHTISETAHVAKDTAVIAGSGAAVVAAT*
<i>Pseudacanthothermes spiniger</i>	Spinigerin	HVDKKVADKVLKQLRIMRLRLRL

AMP เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 10 kDa มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย รา รวมทั้งไวรัสได้หลายชนิด (Izadpanah & Gallo, 2005; Lehrer, et al., 1999) ปัจจุบันมีการค้นพบ AMP ประมาณ 800 ชนิด โดยแยกได้จากทั้ง พืช สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Bulet & Stocklin, 2005) ทำให้สามารถจัดกลุ่ม ของ AMP ได้หลากหลายรูปแบบ เช่น แบ่งตามความยาวของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ แบ่งตามลักษณะของประจุของ AMP สามารถแบ่งออกได้เป็น cationic AMP และ

anionic AMP หรือแบ่งตามฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ เช่น AMP บางชนิดมีฤทธิ์ที่ค่อนข้างจำเพาะต่อแบคทีเรีย รา หรือ ไวรัส ในขณะที่บางชนิดจะออกฤทธิ์ได้กว้างขวางต่อเชื้อหลายชนิด (Reddy, et al., 2004; G. Wang, et al., 2009; Z. Wang, et al., 2004) นอกจากนี้หากแบ่งตามลักษณะของโครงสร้างของ AMP แล้วจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ

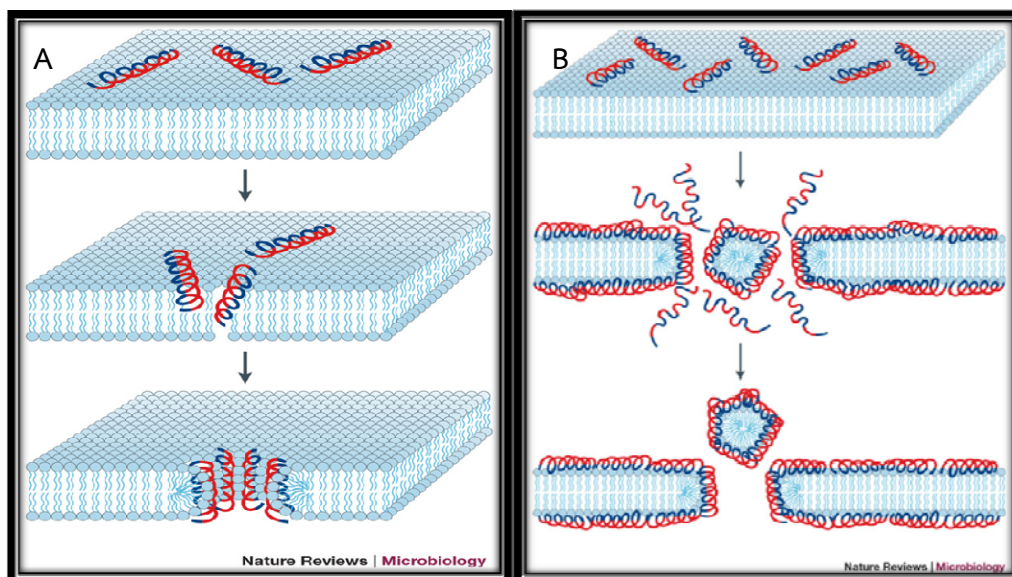
1. **α -Helix AMP** เปปไทด์ในกลุ่มนี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนเป็นสายยาวโดยจะไม่มี cysteine residue อยู่ในสายของเปปไทด์ มีขนาดยาวประมาณ 29-42 กรดอะมิโน ส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ได้ดีต่อแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ AMP ที่สำคัญในกลุ่มนี้ เช่น Cecropin-A ที่แยกได้จากหนอนไหม (giant silk moth; *Hyalophora cecropia*) และ Magainins แยกได้จาก secretion ของ African clawed frog (Bulet & Stocklin, 2005; Hultmark, et al., 1983; Reddy, et al., 2004)
2. **Cysteine rich AMP** เปปไทด์ในกลุ่มนี้จะมีส่วนของกรดอะมิโน cysteine กระจายอยู่ในสายของเปปไทด์ เปปไทด์ในกลุ่มนี้จะแยกได้จากแมลงเป็นส่วนใหญ่ เช่น Drosomycin แยกได้จาก *Drosophila melanogaster* และ Thanatin แยกได้จาก *Podisus maculiventris* เป็นแมลงในกลุ่มของมวนพิฆาต Thanatin เป็น AMP ที่มีการศึกษาพบว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาต่อไปเป็นยาต้านจุลชีพ เนื่องจากความเป็นพิษต่อ eukaryotic cell ค่อนข้างต่ำและออกฤทธิ์ได้อย่างกว้างขวางต่อเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug resistance) ด้วย (Bulet & Stocklin, 2005)
3. **Linear proline rich AMP** เปปไทด์ในกลุ่มนี้จะเป็นสายยาวประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 14-39 ตัว และจะมีลักษณะพิเศษ คือประกอบด้วย Proline ในสายของเปปไทด์ โดยส่วนใหญ่แล้วจะออกฤทธิ์ได้ดีในแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะกลุ่ม Enterobacteriaceae ตัวอย่างของเปปไทด์ในกลุ่มนี้ เช่น Cathelicidins (Bulet & Stocklin, 2005; Reddy, et al., 2004)

2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของ AMP

เนื่องจาก AMP ส่วนใหญ่แล้วเป็นสายเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติของ amphipathic เป็นโมเลกุลที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (polar and non-polar) อยู่ในสายเปปไทด์เดียวกันทำให้ AMP นั้นสามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่มีประจุเป็นลบได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการแทรกตัวผ่านสู่ชั้นไขมันของผนังเซลล์ได้ดีจากคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เป็นพวก non polar (Izadpanah & Gallo, 2005; Yang, et al., 2001) กลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญของ AMP นั้นเชื่อว่าเป็นการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์โดยตรงด้วยการทำให้เกิดรูที่ผนังเซลล์ จากรายงานการศึกษาใน magainins พบว่าเปปไทด์ชนิดนี้สามารถชักนำให้ liposome เกิดการรั่วได้ โดยเฉพาะ liposome ที่ประกอบด้วย phosphatidylglycerol ซึ่งเป็น lipid หลักในองค์ประกอบ cell membrane ของแบคทีเรีย (Ludtke, et al., 1996; Matsuzaki, et al., 1996) ในปัจจุบันมีโมเดลที่อธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ ของ AMP ไว้สองโมเดล คือ

1. **Barrel stave model** กลไกนี้อธิบายว่า AMP ที่โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็น cationic peptide จะจับกับ outer membrane ของแบคทีเรียที่มีประจุเป็นลบ แล้วส่วนของกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic group จะแทรกตัวเข้าไปใน membrane ของเซลล์โดยตรงทำให้เกิดเป็นรู (pore) ที่บริเวณของ membrane เป็นสาเหตุให้ content ต่าง ๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออกมาภายนอกทำให้เซลล์ตายในที่สุด (รูปที่ 3A) (Brogden, 2005; Guani-Guerra, et al.; Yang, et al., 2001)

2. **carpet model** กลไกนี้อธิบายว่า เปปไทด์จะจับเกาะอยู่ที่บริเวณ outer membrane ของแบคทีเรีย โดยการวางตัวขนานไปกับ outer membrane และจะแทรกตัวเข้าไปใน hydrophobic core ของ outer membrane ทำให้เกิดโครงสร้างของ outer membrane เสียสภาพไป เกิดเป็นรูรั่วให้องค์ประกอบและสารโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ไหลออกมาภายนอก และเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายในที่สุด รูปที่ 3B (Brogden, 2005; Guani-Guerra, et al.)



รูปที่ 3 กลไกการออกฤทธิ์ของ AMP ต่อแบคทีเรีย A) Barrel stave model B) carpet model (Brogden, 2005)

2.4 การใช้ประโยชน์จาก AMP

ความมุ่งหมายประการหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากให้ความสนใจศึกษา AMP ทั้งนี้เพื่อที่จะพัฒนาไปใช้เป็นยาต้านจุลชีพทดแทนยาต้านจุลชีพในปัจจุบันที่เริ่มพบปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก นอกจากประเด็นทางด้านการแพทย์แล้ว ปัญหาทางด้านสัตวแพทย์และการเกษตร เช่น การเลี้ยงสัตว์ การพัฒนา AMP จะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถแก้ปัญหการใช้ยาต้านจุลชีพผสมอาหารสัตว์เพื่อประโยชน์ในการเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์

มีรายงานการศึกษาในลูกสุกรหย่านม (weaned piglets) โดยการให้ AMP ผสมลงในอาหารสัตว์ ร่วมกับอาหารเสริม zinc methionine พบว่าลูกสุกรที่ได้รับอาหารเสริมดังกล่าวมีอัตราการป่วยด้วยอาการท้องเสียจากการติดเชื้อลดลง มีน้ำหนักตัวเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใช้ AMP และพบว่าระดับซีรั่ม Immunoglobulin G (IgG) ในสุกรเพิ่มสูงขึ้นแสดงให้เห็นถึงภาวะภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น (Wang, et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในการเลี้ยงไก่เนื้อ ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบการใช้ AMP ร่วมกับการใช้ยาต้านจุลชีพ avilamycin พบว่าการใช้ AMP ผสมในอาหารไก่นั้นช่วยเพิ่มน้ำหนักตัวในไก่ที่เลี้ยงได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการใช้ feed additive ใดๆ แม้ว่าการใช้ AMP ผสมในอาหารไก่ ให้ผลน้ำหนักตัวไก่ไม่แตกต่างจากการใช้ยา avilamycin แต่การใช้ AMP ผสมในอาหารสัตว์ช่วยให้ความสามารถในการกักเก็บสารอาหาร (nutrient retention) ในทางเดินอาหารในไก่ดีกว่า และยังพบว่าการใช้ AMP ช่วยลดการขับเชื้อในกลุ่ม

coliform ในทางเดินได้ดีกว่า (reduce intestinal and excreta coliforms) การใช้อาหารที่ผสมด้วยยา avilamycin (Choi, et al., 2013)

ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยการค้นพบ AMP ชนิดใหม่เพิ่มมากขึ้น เช่น ixosin เป็น AMP ที่แยกได้จากต่อมน้ำลายของเห็บ (*Ixodes sinensis*) พบว่ามีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ทั้ง แบคทีเรีย และยีสต์ (Yu, et al., 2006) ในกรณีของด้วงมูลสัตว์นั้นยังมีรายงานที่ค่อนข้างน้อย ซึ่งจากการศึกษาพบรายงานที่แสดงให้เห็นว่าแมลงในกลุ่มด้วงมูลสัตว์ก็สามารถที่จะสร้าง AMP ที่มีลักษณะคล้ายกับ defensin ได้หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยการฉีด เชื้อ *E. coli* เข้าไป และ AMP ที่สร้างนั้นมีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* (Jae-Sam Hwang, et al., 2009) นอกจากนี้ยังมี AMP อีกหลายชนิดที่กำลังทำการทดลองอยู่ในระดับห้องทดลอง (preclinical) และระดับคลินิก (clinical) เช่น P-113 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ histatin เป็น AMP ที่แยกได้จากน้ำลายของคน กำลังอยู่ในการศึกษาประสิทธิภาพการรักษา oral candidiasis ในระดับ clinical phase I และ II ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตัวยามีความสามารถลดการอักเสบที่เป็นผลจากการติดเชื้อ *Candida albicans* ได้ (Paquette, et al., 2002) หรือในกรณีของ heliomocin ซึ่งเป็น AMP ที่แยกได้จาก *Heliothis virescens* กำลังทำการทดลองในระดับของ pliclinical เพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อการติดเชื้อทั้งจากเชื้อราและแบคทีเรีย (Andres, et al., 2004)

นอกจากการประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และสัตวแพทย์แล้ว AMP บางชนิดที่แยกได้จากพืชยังนำมาประยุกต์ใช้ด้านการเกษตรและอาหาร เช่น ใช้ป้องกันโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา มีรายงานการศึกษาใน Penaeidin 4-1 เป็น AMP ที่แยกได้จากหญ้ากลุ่ม Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia homoeocarpa* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชได้เช่นกัน (Zhou, et al., 2011) สำหรับงานทางด้านอาหาร มีการศึกษาโดยใช้ Nisin ซึ่งเป็น polycyclic AMP ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 34 ตัว เป็นผลผลิตที่ได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* มาใช้ผสมในอาหารเพื่อวัตถุประสงค์ในการเก็บรักษาคุณภาพอาหาร (food preservative) (Delves-Broughton, 2005; Espitia, et al., 2012)

การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียยังคงเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและเศรษฐกิจโดยรวมของหลายประเทศทั่วโลก แม้ว่าบริษัทยาหลายแห่งได้พยายามทุ่มงบประมาณเพื่อการพัฒนาชนิดใหม่ ๆ แต่ก็ยังไม่ทันต่อการดื้อยาของแบคทีเรีย ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาแนวทางการพัฒนายาต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อให้ทันต่อปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพนับว่ามีความสำคัญ ซึ่งนอกจากการศึกษาเพื่อพัฒนาสายเคสจากกระบวนการทางเคมี การศึกษาเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ที่ได้จากธรรมชาติก็นับเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยหาค้นพบสารออกฤทธิ์ ซึ่งอาจจะมีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ได้จริงต่อไปในอนาคต สำหรับแนวทางสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ มุ่งเน้นไปที่การศึกษาเพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้าง AMP จากตัวอ่อนของด้วงมูลสัตว์ซึ่งเป็นแมลงที่พบได้มากในประเทศไทยในทั่วทุกภูมิภาค การศึกษานี้จะเป็นพื้นฐานสำหรับศึกษาต่อไปทั้งทางด้านประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งการโคลนยีนเพื่อการแสดงออกของโปรตีนต่อไป

บทที่ 3

วิธีวิจัย

3.1 ตัวอย่างดั่งมูลสัตว์

เก็บตัวอย่างดั่งมูลสัตว์โดยเลือกเก็บตัวอย่างอ่อนของดั่งมูลสัตว์ในเขตบริเวณฟาร์มเลี้ยงโค มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ตัวอย่างที่เก็บได้จะนำมาทำการเลี้ยงในกระบะดินเพื่อให้มีความใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมมากที่สุดก่อนที่จะนำมาทำการศึกษาต่อไป

3.2 การสกัด RNA

ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อของตัวอย่างอ่อนดั่งมูลสัตว์บริเวณรอบ ๆ ที่ฉีดยาด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* (JM109) นำมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด RNA สำเร็จรูป E.Z.N.A Tissue RNA Kit (OMEGA:USA) วิธีการสกัดดำเนินการตามขั้นตอนของชุดสกัด ตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้จะเก็บรักษาใน E.Z.N.A RNA-Lock reagent และเก็บรักษาในอุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะมีการนำมาศึกษาต่อไป

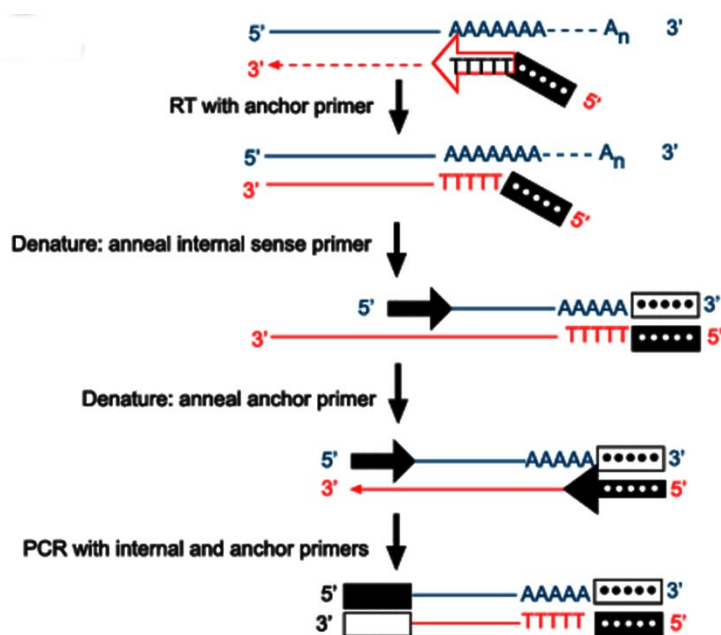
3.3 การสกัด lipopolysaccharide (LPS)

การสกัด lipopolysaccharide (LPS) ทำโดยใช้ชุดสกัด LPS (LPS extraction kit; Intron Biotechnolgy : Korea) โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ เพาะเลี้ยง *E. coli* ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ใน centrifuge tube ขนาด 50 ml ที่อุณหภูมิ 37°C โดยใช้ shaker water bath เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์ 5 ml ใส่ลงใน centrifuges tube 15 ml นำไปปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใส (supernatant) ทิ้งไป จากนั้นเติม lysis buffer (kit) 1 ml ผสมให้เข้ากันโดย vortex mixer แล้วเติม chloroform 200 µl ผสมให้เข้ากันโดย vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำไปปั่นที่ 13,000 rpm 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสประมาณ 400 µl ใส่ลงใน 1.5 ml micro centrifuge tube หลังจากนั้นเติม purification buffer (kit) 800 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 13,000 rpm 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป และเติม 70% ethanol นำไปปั่นล้างอีกครั้งที่ 13,000 rpm 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้แห้งในอุณหภูมิห้องจนตัวอย่างแห้งสนิท หลังจากนั้นเติม 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) เก็บไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำไปใช้

3.4 การกระตุ้นการสร้าง AMP ในดั่งมูลสัตว์และการสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี RT-PCR

ตัวอย่างอ่อนของดั่งมูลสัตว์ จะนำมากระตุ้นให้เกิดการสร้าง AMP โดยการฉีดด้วย LPS ที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* (strain JM109) โดยทำให้ตัวอย่างอ่อนสลบด้วยการแช่ในน้ำแข็ง ใช้เข็มเบอร์ 26 ฉีด LPS ประมาณ 50 µl หลังจากนั้นนำตัวอย่างอ่อนเก็บในรังก้อนมูลเดิมนำไปเก็บไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงนำมาสกัด RNA การสร้าง cDNA library และตรวจคัดกรองเพื่อหาชิ้นที่ควบคุมการสร้าง AMP ในตัวอย่างดั่งมูลสัตว์จะทำโดยเทคนิค rapid amplification of cDNA ends (RACE) (รูปที่ 4) โดยการสกัด total RNA ภายหลังจากที่มีการฉีดเชื้อ *E. coli* ไปแล้วประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเนื้อเยื่อรอบ ๆ บริเวณที่มีการฉีดเชื้อ *E. coli* เพื่อนำไปสกัด total RNA และ RNA ที่สกัดได้จะนำมาสร้างเป็น cDNA ด้วย First Stand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific: USA) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ ใช้ตัวอย่าง total RNA ที่สกัดได้ประมาณ 5 µl (1 ng- 5 µg)

ใส่ลงใน PCR tube ขนาด 200 μ l เติม Oligo (dT)₁₈ primer linker (5'-GACCACGCGTATCG ATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV-3) 1 μ l และเติม nuclease free water ให้ครบ 12 μ l โดยปฏิกิริยาสำหรับการทำ RT-PCR เพื่อสร้าง first stand cDNA ประกอบด้วย reaction buffer ปริมาณ 4 μ l, ribolock RNase inhibitor (20 u/ μ l) ปริมาณ 1 μ l, 10 mM dNTPs mixed ปริมาณ 1 μ l, และ RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ μ l) 1 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ pipette และนำไป incubate ที่ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากทำลายเอนไซม์ reverse transcriptase โดยเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 °C นาน 5 นาที สาย first stand cDNA ที่ได้จะเก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาศึกษาเพื่อสร้างสาย second strand ต่อไป



รูปที่ 4 หลักการของเทคนิค rapid amplification of cDNA ends (RACE)

3.5 การทำ PCR สร้างสาย Second strand

cDNA ที่ได้จากขั้นตอนการทำ RT-PCR จะนำมาเพิ่มจำนวนสาย complementary strand โดยใช้ primers ที่ออกแบบจำเพาะสำหรับยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP (ตารางที่ 2) โดยการออกแบบ primers อาศัยข้อมูลจากการสร้างสาย consensus ของกรดอะมิโนของ AMP ที่พบได้ในแมลงกลุ่มใกล้เคียง นำมาแปลงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปเป็นต้นแบบสำหรับการออกแบบ primers การสร้างสาย complementary strand มีขั้นตอนและองค์ประกอบของปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR แสดงในตารางที่ 3

3.6 การโคลนยีน

PCR product ที่ได้จะนำมาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis และนำ PCR product ไปทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด PCR purification kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up; Macherey Nagel: Germany) ตัวอย่าง DNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะนำมาเชื่อมต่อใน plasmid pTZ57R/T (Isn TAclone Kit; Thermo Scientific: USA) TA และ transform เข้าสู่เชื้อ *E.coli* (DH5- α) โดยมีรายละเอียดดังตารางที่

ตารางที่ 2 primers ที่ออกแบบและเป้าหมายของยีนที่ใช้ในการศึกษา

Name	Sequence (5'-3')
AMP-1	AACAAGTTGCAGAGTATACGAG
AMP-2	GATACAAGATGTCGAAATCCTTCC
AMP-3	TTGTACTTTCTACTGCTTACGTGG
AMP-4	TCTTAACCAGTTCATACCCAGC

ตารางที่ 3 องค์ประกอบและสภาวะในการทำ PCR

Reaction (50 μ l)	Condition
1X buffer	Start 95 °C 10 min 1 cycle
1.5 mM MgCl ₂	Denaturation 95 °C 1 min
200 μ M dNTPs	Annealing 55 °C 40 sec
0.5 pmol each primers	Extension 72 °C 1 min
0.04 unit/ μ l of Taq	} 35 cycles
2 μ l of DNA template	Final Extension 72 °C 5 min

ตารางที่ 4 องค์ประกอบและสภาวะในการโคลนยีน

Reaction (30 μ l)	Volume
plasmid pTZ57R/T (0.17 pmol ends)	3 μ l
5X Ligation Buffer	6 μ l
PCR product	3 μ l
Water, nuclease free	to 29 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l

นำ reaction ทั้งหมด incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป transform เข้าสู่เชื้อ competent cell *E. coli* (DH5- α) ที่ได้เตรียมไว้แล้วโดยชุดเตรียม competent cell สำเร็จรูป (Z competentTM; Zymo Research) ขั้นตอนการ transform ดำเนินการดังนี้คือ ใช้ plasmid ที่ได้ตัดต่อยีนไว้แล้วปริมาณ 5 μ l ใส่ลงใน competent cell *E. coli* (DH5- α) ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ pipette โดยกระบวนการทั้งหมดทำในภาชนะที่ใส่น้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นในน้ำแข็งประมาณ 1 นาที หลังจากนั้นเจือจาง competent cell ที่ transformed แล้วด้วย Lauryl Tryptose Broth 500 μ l แล้วใช้เชื้อปริมาณ 100 μ l นำไป spread ลงบน Tryptic Soy Agar (TSA) ที่มียา ampicillin (100 μ g/ml) ผสมอยู่ โดย spread plate อย่างน้อย 3 plate นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่สามารถ

เจริญในอาหารที่ผสมยา ampicillin ได้ นำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อทดสอบว่าได้รับ plasmid ที่มียีนที่ต้องการแทรกอยู่หรือไม่

3.7 การคัดเลือกโคลนที่มียีนควบคุมการสร้าง AMP จาก bacterial clone

การตรวจสอบโคลนที่ได้ทำโดยใช้เทคนิคการทำ direct PCR จากโคลนของแบคทีเรีย โดยการคัดเลือกโคลนที่สามารถเจริญบนอาหาร TSA ที่ผสมยา ampicillin โดยใช้ปลายของ เข็มเขี่ยเชื้อเลือกเชื้อแต่ละโคลน โดยคัดเลือกมาแบบสุ่มประมาณ 50 โคลน แล้วนำมา streak ลงบน TSA ที่ผสมยา ampicillin ใหม่อีกครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทดสอบแต่ละโคลนโดยใช้ปลายไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วป้ายเชื้อแต่ละโคลนมาเล็กน้อยนำไปทำ PCR ด้วย primers AMP-4 ร่วมกับ primer ต่อบริเวณ linker ที่เชื่อมต่อกับสาย oligo (dT)

3.8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดทำ phylogenetic tree

โคลนที่ให้ผลบวกจากผลการตรวจสอบด้วย PCR จะสกัดเอา plasmid โดยชุดสกัด plasmid (NucleoSpin Plasmid Miniprep kit; Macherey-Nagel: Germany) จากโคลนนั้นเพื่อไปทำการศึกษาค้นหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ โดยส่งไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยังต่างประเทศ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำมา blast เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP ใน GenBank ต่อไป

3.9 การสังเคราะห์เปปไทด์

การสังเคราะห์เปปไทด์ ทำโดยการวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ตรวจพบ โดยใช้โปรแกรมจากฐานข้อมูล the antimicrobial peptides database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเปปไทด์เป็นช่วง ๆ เพื่อตรวจสอบว่าบริเวณใดของลำดับกรดอะมิโนนั้นมีคุณสมบัติที่จะเป็น AMP ได้ โดยการเน้นไปที่ความสามารถในการจับกับโครงสร้าง α -helix ได้ และมีโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จากนั้นจึงนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ส่งไปสังเคราะห์ยังต่างประเทศ

3.11 การทดสอบประสิทธิภาพต่อเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์ในการฆ่าแบคทีเรีย จะทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (minimal inhibitory concentration: MIC) ด้วยเทคนิค micro broth dilution test ใน 96 well plate โดยมีรายละเอียดดังนี้ เตรียมแบคทีเรียที่ใช้สำหรับการทดสอบ ได้แก่ *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 700603), และ *S. Typhimurium* (isolated strain) โดยใช้แบคทีเรียที่มีอายุประมาณ 18-20 ชั่วโมง นำมาปรับความเข้มข้นด้วยเครื่อง densitometer ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีแบคทีเรียอยู่ประมาณ $1-2 \times 10^8$ CFU/ml หลังจากนั้นเจือจางแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ 0.85 % ในอัตราส่วน 1: 100 จะทำให้ได้แบคทีเรียประมาณ $1-2 \times 10^6$ CFU/ml ปริมาตรของแบคทีเรียที่ใช้คือ 50 μ l เมื่อรวมกับปริมาตรของอาหารและเปปไทด์ แล้วจะมีปริมาตรรวมเท่ากับ 200 μ l /well ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ทดสอบอยู่ที่ประมาณ 5×10^4 CFU/well หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง จึงนำมาอ่านผล

บทที่ 4

ผลการทดลอง

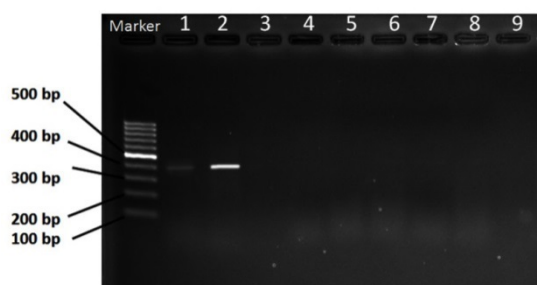
4.1 การสร้าง cDNA และการโคลน

การค้นหาลำดับเบสที่เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP ในตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ โดยเก็บตัวอย่างตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์จากกองมูลโคจากภายในฟาร์มของมหาวิทยาลัยทักษิณ (รูปที่ 5) หลังจากฉีดตัวอ่อนด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำมาสกัด RNA สร้างสาย first strand cDNA ด้วย Oligo (dT)₁₈ primer linker และใช้เทคนิค RACE โดย primers ที่ออกแบบสำหรับยีนในกลุ่ม AMP ที่เคยมีรายงานในด้วงมูลสัตว์ สำหรับสร้างสาย second strand DNA

ผลการทดสอบของผู้วิจัยพบว่า primers จำนวน 1 เส้น คือ AMP-4 (ตารางที่ 2) สามารถเพิ่มจำนวนยีนในตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ที่ผู้วิจัยได้ immunized ด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ของแบคทีเรีย โดยพบระดับการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นในตัวอย่างที่ได้รับการ immunized ด้วย LPS ในขณะที่ตัวอย่าง control พบการแสดงออกเพียงเล็กน้อย โดยตัวอย่างของ DNA ที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาดประมาณ 400 bp (รูปที่ 6)



รูปที่ 5 ตัวอย่างตัวอ่อนของด้วงมูลสัตว์ที่เก็บจากมูลโค ลักษณะก่อนมูลที่มีตัวอ่อนอยู่ภายใน และแสดงลักษณะของตัวอ่อนที่เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

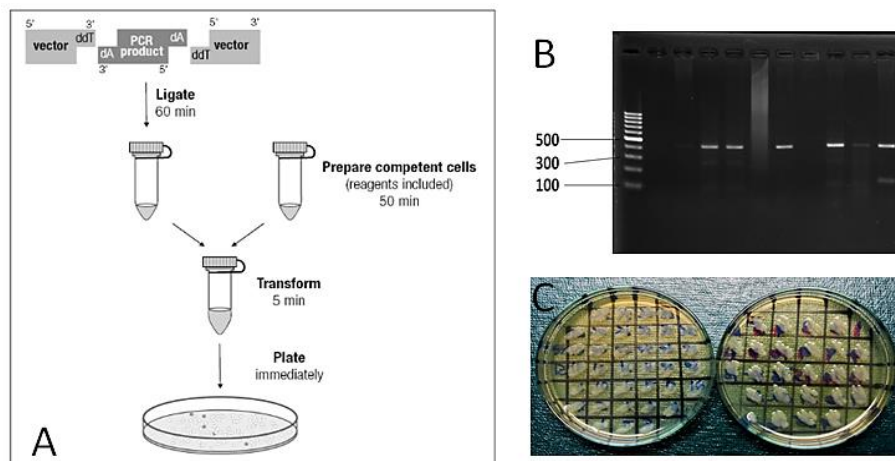


รูปที่ 6 ผลการทำ RT-PCR จาก RNA ที่สกัดจากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ที่ฉีดด้วย LPS และไม่ได้ฉีดด้วย LPS นำมาเพิ่มจำนวนสาย first strand cDNA ด้วย primers จำนวน 4 เส้น

แถวที่ 1 primer AMP-4: LPS -
แถวที่ 3 primer AMP-3: LPS -
แถวที่ 5 primer AMP-2: LPS -
แถวที่ 7 primer AMP-1: LPS -
แถวที่ 9 Negative control

แถวที่ 2 primer AMP-4: LPS +
แถวที่ 4 primer AMP-3: LPS +
แถวที่ 6 primer AMP-2: LPS +
แถวที่ 8 primer AMP-1: LPS +

ตัวอย่าง DNA ที่เพิ่มจำนวนได้จะนำไปโคลนเข้าสู่ plasmid และ transform เข้าสู่เชื้อ *E. coli* หลังจากนั้นตรวจสอบโคลนที่มี insert ยีนที่ต้องการโดยเทคนิค PCR ด้วย primer AMP-4 และ primer ที่จำเพาะกับ linker ผลการศึกษาพบว่าจากการสุ่มทดสอบจากจำนวนโคลนทั้งหมด 30 โคลน พบว่ามีทั้งหมด 6 โคลนที่ให้ผลบวกโดยให้แถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 400 bp (รูปที่ 7)

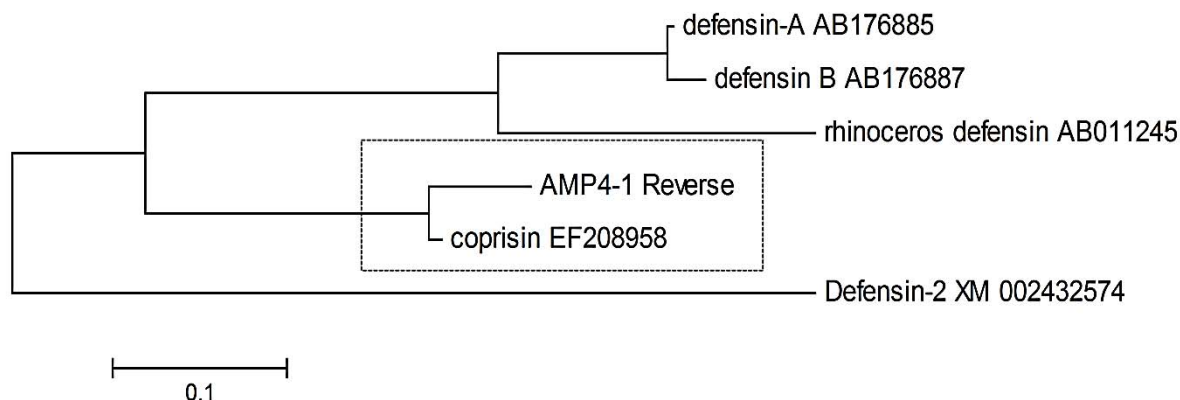


รูปที่ 7 ผลการโคลนยีนและทดสอบโคลนที่มี insert gene; A. ขั้นตอนการโคลนยีน; B. ผลการสุ่มตรวจสอบโคลนที่มี insert gene; C. โคโลนีของ *E. coli* ที่เจริญใน ampicillin

4.2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความคล้าย (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับ AMP ที่พบในด้วงชนิดอื่น

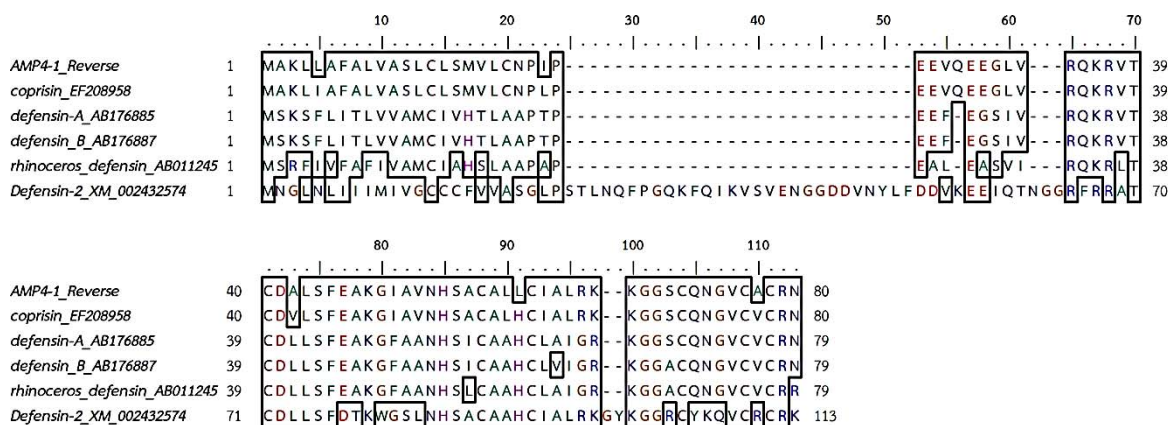
ตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 6 โคลนจะนำมาสกัด plasmid และนำส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดทำ alignment โดยโปรแกรม Bioedit และ และจัดทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 5 ตามวิธี Neighbor-joining method (1,000 bootstrap)

ผลการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide identities) ของ DNA ที่ได้จากทั้ง 6 โคลน เปรียบเทียบกับ AMP ที่พบในแมลงกลุ่มด้วงที่ใกล้เคียงกันมีค่าอยู่ระหว่าง 15 ถึง 96% โดยมีความคล้ายกับ coprisin ประมาณ 96% ซึ่ง coprisin เป็น AMP ที่มีรายงานพบใน *Copris tripartitus* (EF208958) นอกจากนี้ยังพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับ AMP ที่พบในด้วงชนิดอื่น ๆ ได้แก่ defensin A (36%) ที่พบใน *Anomala cuprea* (AB176885), defensin B (30%) ที่พบใน *Anomala cuprea* (AB176887), rhinoceros defensin (20%) ที่พบใน *Oryctes rhinoceros* (AB011245), และ defensin-2 (15%) ใน *Pediculus humanus corporis* (XM_002432574) (รูป 8)



รูปที่ 8 Phylogenetic tree ของ DNA ที่โคลนได้จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ (AMP4-clone 1) แสดงให้เห็นถึงความคล้ายกับยีนควบคุมการสร้าง AMP จากด้วงชนิดต่าง ๆ (Neighbor-joining 1,000 bootstrap)

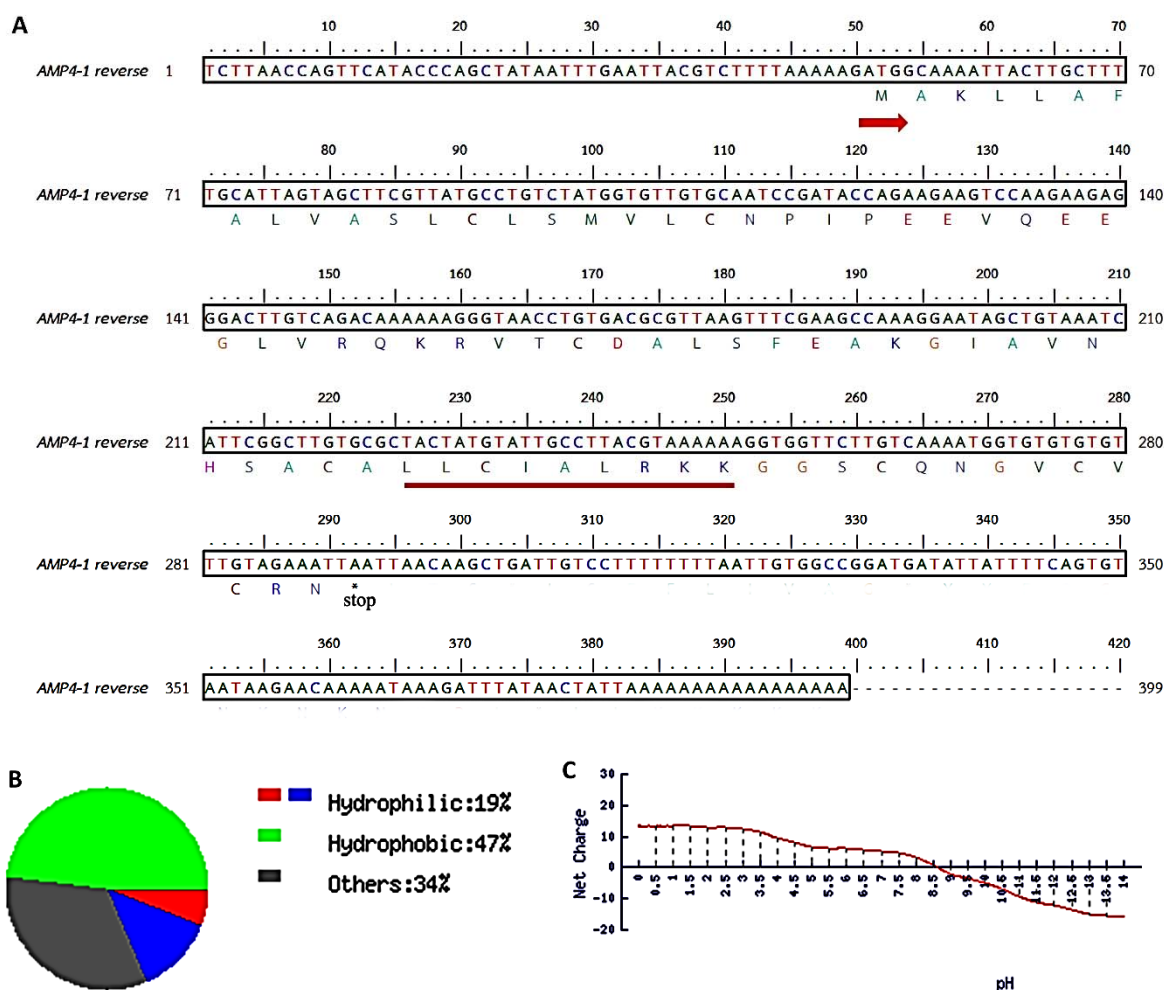
ผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน ซึ่งได้จากการแปลรหัสจาก DNA ที่โคลนได้จากตัวอย่างตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์กับ AMP ที่สืบค้นจากฐานข้อมูล พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่พบมีความเหมือนกับ coprisin มากที่สุด (98%) และมีความเหมือนกับ defensin A (54%) ที่พบใน *Anomala cuprea* (AB176885), defensin B (50%) ที่พบใน *Anomala cuprea* (AB176887), rhinoceros defensin (44%) ที่พบใน *Oryctes rhinoceros* (AB011245), และมีความคล้ายคลึงกับ defensin-2 ใน *Pediculus humanus corporis* (XM_002432574) 29% นอกจากนี้พบว่า AMP ทั้งหมดที่นำมาเปรียบเทียบมีบริเวณอนุรักษ์ (conserve) ร่วมกันที่ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 65-110 ซึ่งคาดว่าจะเป็นที่ตำแหน่งของการออกฤทธิ์ของ AMP (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ DNA ที่โคลนได้จากตัวอย่างตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนที่ได้จาก AMP ชนิดอื่น ๆ (กรดอะมิโนในกรอบแสดงถึงบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน)

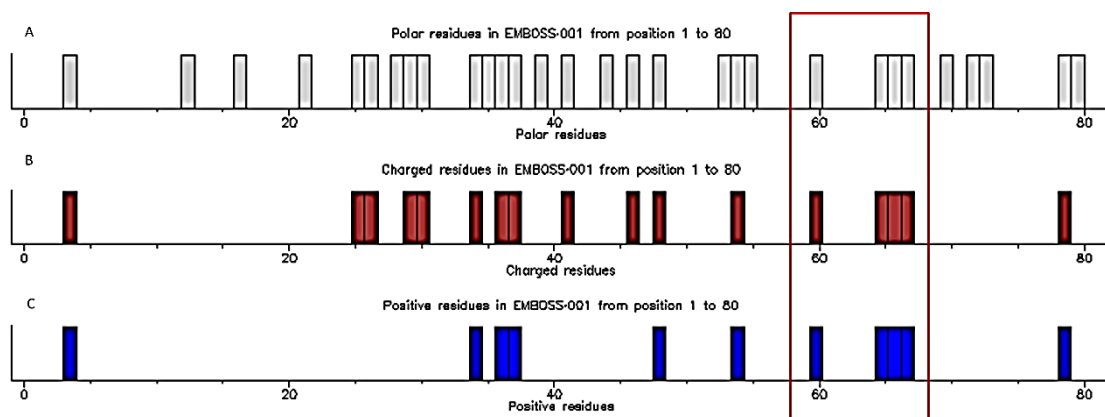
4.3 การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่มีแนวโน้มเป็น AMP

จากลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลน นำมาแปลเป็นกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม MEGA 5 พบว่า DNA ขนาด 382 bp (ตัดบริเวณของ plamid ออกไป) ที่ได้นั้นประกอบด้วย 1 Open Reading Frame (ORF) โดย start condon อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 51 โดยที่บริเวณปลาย 5' จะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการสร้างเปปไทด์ (untranslated region) ประมาณ 50 นิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 80 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 10.18 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic 19%, hydrophobic 47% มีค่า Isoelectric Point เท่ากับ 8.6 มีค่าประจุรวมเท่ากับ +5.5 (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 A. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของ DNA ที่ clone ได้จากตัวอ่อนตัวงูมูลสัตว์ (กรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้เป็นลำดับที่นำไปสังเคราะห์เพื่อทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, B. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติ hydrophobicity ของกรดอะมิโนทั้งหมด, C. ผลการวิเคราะห์ค่า isoelectric point ของสายเปปไทด์

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทั้งสายเพื่อพิจารณาหาบริเวณของสายเปปไทด์ที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติของ AMP โดยอาศัยคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เป็นกลุ่ม hydrophobic และเป็น positive charge ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ EMBOSS Pepinfo (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepinfo/) พบว่ากรดอะมิโนที่อยู่ในลำดับที่ 59-67 มีคุณสมบัติดังกล่าว (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนลำดับที่ 59-67, A. ลำดับของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น polar residues, B. ลำดับของกรดอะมิโนที่ขั้ว (charged residues), C. ลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นประจุบวก (positive residues), กรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติร่วมกันของ hydrophobicity และเป็น positive charge (กรอบสี่เหลี่ยม)

ผลการศึกษาพบว่าลำดับของกรดอะมิโนคือ NH₂-L-L-C-I-A-L-R-K-K-COOH (รูปที่ 9) ให้ผลการวิเคราะห์ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะมีคุณสมบัติของกรดอะมิโน โดยมี molecular weight ประมาณ 1.8 kDa และมีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ทั้งหมด 66 % ซึ่งคาดว่าเปปไทด์นี้จะสามารถแทรกตัวเข้าสู่เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียได้ดี นอกจากนี้เปปไทด์เป็น cationic peptide มีประจุเป็นบวก (net charge +3) ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์อาจจะมีความสามารถมาจับเมมเบรนของแบคทีเรียที่มีประจุเป็นลบได้ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล AMP พบว่าเปปไทด์ที่คัดเลือกมามีความคล้ายกับ Japonicin-1Npb (FVLPLVMCKILRK) ประมาณ 46.66% โดย Japonicin-1Npb เป็น AMP ที่แยกได้จากบชนิดหนึ่ง (*Nanorana parkeri*) ในประเทศจีน นอกจากนี้ยังมีความคล้ายกับ Mastoparan (INLKAIAALAKKLL) ประมาณ 42.85% โดย Mastoparan เป็น AMP ที่แยกได้จากตัวต่อ (*Vespa mandarinia*) และมีความคล้ายกับ Hyposin-H2 (LRPAFIRPKGK) มีความคล้ายกันประมาณ 41.66% เป็น AMP ที่แยกได้จากฉีพวง (Phyllomedusa hypochondrialis) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้เลือกเอาช่วงกรดอะมิโนดังกล่าวเพื่อสังเคราะห์เป็นเปปไทด์สำหรับการทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อแบคทีเรียต่อไป

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพของ AMP ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ ได้แก่ AMP4-1 (NH₂-L-L-C-I-A-L-R-K-K-CooH) เปรียบเทียบกับ coprisin (NH₂-L-H-C-I-A-L-R-K-K-CooH) และ definesin (NH₂-A-L-Y-L-A-I-R-K-R-COOH) ซึ่งใช้เป็น control สำหรับการศึกษานี้ โดยเปปไทด์สังเคราะห์ทั้งหมดมีความบริสุทธิ์ที่ 95.5% การทดสอบประสิทธิภาพทำโดยวิธีการหาค่า (MIC โดยการเตรียมความเข้มข้นของ AMP และเจือจางแบบ 2 fold dilution ตั้งแต่ความเข้มข้น 500-0.24 µg/ml ทำการทดสอบกับแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 700603), และ *S. Typhimurium* (isolated strain) โดยเตรียมความทำการทดสอบที่ความเข้มข้นตั้งแต่

ผลการทดสอบพบว่าค่า MIC ของ AMP4-1 ต่อเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922), คือ 7.8 µg/ml, ค่า MIC ของ AMP4-1 ต่อเชื้อ *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853) คือ 15.6 µg/ml และค่า MIC ของ AMP4-1 ต่อเชื้อ *S. Typhimurium* คือ 31.25 µg/ml ในขณะที่ค่า MIC ของ AMP4-1 ต่อเชื้อ *K. pneumoniae*, *S. aureus* นั้นมีค่ามากกว่า 500 µg/ml (ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (µg/ml) ของเปปไทด์สังเคราะห์ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด

AMP	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>Ps. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>S. Typhimurium</i> (isolated strain)	<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
COP-1: LLCIALRKK	7.8	15.6	31.25	>500	>500
Coprisin: LHCIALRKK	>500	>500	250	>500	>500
Defensin: LYLAIRKR	31.25	>500	>500	125	125

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะของยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ในครั้งนี้พบยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้าง AMP หนึ่งยีนซึ่งเมื่อศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง AMP จากแมลงในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันพบว่า ยีนที่โคลนได้มีความคล้ายกับ coprisin ซึ่งเป็น AMP ที่พบในด้วงมูลสัตว์ (*Copris tripartitus*) (Lee, et al., 2013) ในการศึกษาครั้งนี้ข้อจำกัดบางประการคือการจำแนก species ของตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์นั้นกระทำได้อย่างจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ แต่จากการตรวจสอบลักษณะของตัวเต็มวัยจากการฟักจากก้อนมูลพบว่าด้วงมูลสัตว์ที่พบอาจจะเป็นด้วงในกลุ่ม *Copris* spp. ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับของยีน AMP ที่โคลนได้ที่มีความคล้ายคลึงกับ coprisin มากที่สุด

การวิจัยนี้ไม่ได้เริ่มต้นจากการศึกษาโดยการสกัดสารออกฤทธิ์ที่เป็น AMP จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์โดยตรง ดังเช่นในการศึกษากลุ่มของสัตว์ชนิดอื่น ๆ (Cytrynska, et al., 2007; Hara, et al., 1995; Villa-Hernandez, et al., 2009) แต่ใช้แนวทาง genetic deduction โดยการแปลรหัสจาก DNA ที่โคลนได้ ซึ่งแนวทางนี้ทำได้ง่ายกว่า และในกรณีที่มีข้อจำกัดสำหรับการสกัดและการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ แต่ก็อาจจะมีข้อเสียเนื่องจากยีนที่โคลนได้อาจจะไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีนในขณะนั้น ดังนั้นวิธีการกระตุ้นตัวอย่างโดยแบคทีเรียหรือองค์ประกอบของแบคทีเรียจะเป็นวิธีการสำคัญที่จะช่วยลดโอกาสผิดพลาดดังกล่าวลงไปได้ ซึ่งการศึกษาในหลาย ๆ รายงานก็มีการใช้เชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ กระตุ้นให้ตัวอ่อนของด้วงหรือหนอนผีเสื้อสร้าง AMP ออกมา และเปรียบเทียบลักษณะการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร (Hara & Yamakawa, 1995; Ishibashi, et al., 1999) สำหรับการศึกษาเลือกใช้ LPS ที่สกัดจากแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นให้ตัวอ่อนสร้าง AMP ออกมาได้เช่นกัน ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า LPS สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวในแมลงหวี่ (*Drosophila*) สร้าง AMP ออกมาป้องกันตนเองได้ (Lemaitre, et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า LPS สามารถกระตุ้นการสร้าง AMP ใน human sebocyte ด้วย (Nagy, et al., 2006)

การศึกษาลำดับกรดอะมิโนเพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นเปปไทด์และนำไปทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย การเลือกบริเวณของเปปไทด์เพื่อนำไปสังเคราะห์นั้นจำเป็นต้องพิจารณาถึงขนาดของ AMP นั้นด้วย เนื่องจากเปปไทด์ที่มีขนาดยาวอาจจะเป็นแอนติเจนและกระตุ้นให้ร่างกายตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าเปปไทด์สายสั้น หรืออาจกระตุ้นให้เกิดภาวะของภูมิแพ้ได้ (Bradshaw, 2003; Fritz, et al., 2004; Steward, et al., 1991) ในการศึกษาครั้งนี้จึงวิเคราะห์เพื่อจะเลือกเอาช่วงของเปปไทด์ที่มีขนาดสั้นที่สุด ที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ ซึ่งพบว่าเปปไทด์ที่เลือกมาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้บางชนิด (ตารางที่ 4) จากการศึกษาเปปไทด์จากช่วงที่นำมาสังเคราะห์พบว่ามีความแตกต่างจาก coprisin เพียงลำดับของกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวในตำแหน่งที่ 2 จากปลาย NH₂ คือเปลี่ยนจาก Lysine เป็น Histidine จากผลการทดสอบพบว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่งก็ส่งผลถึงประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งคาดว่าจะเกิดจากการที่กรดอะมิโน Lysine นั้นมีส่วน side chain ที่มีความเป็น hydrophobic ที่มากกว่า อาจเป็นไปได้ที่ทำให้ส่วน hydrophobic side chain ของเปปไทด์ สามารถแทรกตัวเข้าไปใน hydrophobic core ของ outer membrane ของแบคทีเรียได้ดีกว่า coprisin ที่ประกอบด้วย Histidine ซึ่งเป็นไปตามการอธิบายกลไกการทำงานของเปปไทด์ในแบบ carpet model (Brogden, 2005)

แม้ว่าการศึกษานี้จะสามารถโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง AMP จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ได้และแม้จะพบว่ามีความแตกต่างกันกับ coprisin ที่เคยมีรายงานในก่อนหน้านี้ แต่ก็พบว่าเป็นความแตกต่างเพียงส่วนน้อยมาก และจะเห็นว่าในตำแหน่งที่คาดว่าจะเปปไทด์เป็นบริเวณ active site นั้นเป็นบริเวณอนุรักษ์ที่เหมือนกันใน

AMP ที่พบในแมลงกลุ่มด้วงปีกแข็งเป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 8) ดังนั้นการที่จะศึกษาเพื่อค้นพบ AMP ชนิดใหม่ อาจจะต้องอาศัยแนวทางอื่น ๆ เพิ่มเติมเช่นการศึกษาสารสกัดโดยตรง และวิเคราะห์ถึงลำดับกรดอะมิโน ร่วมกับการใช้แนวทางการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจำนวนมาก ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือและเงินทุนที่สูง

โดยสรุปผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง AMP ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่ายีนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ coprisin ที่พบในด้วง *Copris tripartitus* มากที่สุด การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี โดยพบว่าเปปไทด์ที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Ps. aeruginosa* และ *S. Typhimurium* ได้ การโคลนยีนเป็นข้อมูลในเบื้องต้นซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนา การศึกษาในระดับต่อไป เช่นการศึกษาการแสดงออก ซึ่งหากปฏิบัติได้จะเป็นการช่วยลดต้นทุนลงได้อย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสังเคราะห์สายเปปไทด์ซึ่งมีต้นทุนที่สูงมาก นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้เป็นแนวทางสำคัญ ที่จะปรับปรุงสายเปปไทด์ที่ได้โดยการดัดแปลงโมเลกุลบางส่วนเพื่อให้เปปไทด์นั้นมีประสิทธิภาพในการฆ่า แบคทีเรียได้ดี และกว้างขวางขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Akuffo, H., Hultmark, D., Engstom, A., Frohlich, D., & Kimbrell, D. (1998). Drosophila antibacterial protein, cecropin A, differentially affects non-bacterial organisms such as Leishmania in a manner different from other amphipathic peptides. *Int J Mol Med*, 1(1), 77-82.
- Andres, E., & Dimarcq, J. L. (2004). Cationic antimicrobial peptides: update of clinical development. *J Intern Med*, 255(4), 519-520.
- Boman, H. G., & Steiner, H. (1981). Humoral immunity in *Cecropia pupae*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 94-95, 75-91.
- Bradshaw, J. P. (2003). Cationic antimicrobial peptides - Issues for potential clinical use. *Biodrugs*, 17(4), 233-240.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat Rev Microbiol*, 3(3), 238-250.
- Bulet, P., & Stocklin, R. (2005). Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*, 12(1), 3-11.
- Choi, S. C., Ingale, S. L., Kim, J. S., Park, Y. K., Kwon, I. K., & Chae, B. J. (2013). Effects of dietary supplementation with an antimicrobial peptide-P5 on growth performance, nutrient retention, excreta and intestinal microflora and intestinal morphology of broilers. *Anim Feed Sci Tech*, 185(1-2), 78-84.
- Clarke, S., Carmen, J., & Werner, S. (2007). Dung beetle Friendliness. 2010, from <http://www.dungbeetlesforafrica.org/index.html>
- Cytrynska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., & Jakubowicz, T. (2007). Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, 28(3), 533-546.

- Delves-Broughton, J. (2005). Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57(12), 525-527.
- Ekengren, S., & Hultmark, D. (1999). *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochem Mol Biol*, 29(11), 965-972.
- Espitia, P. J. P., Soares, N. D. F., Coimbra, J. S. D., de Andrade, N. J., Cruz, R. S., & Medeiros, E. A. A. (2012). Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 187-204.
- Fritz, J. H., Brunner, S., Birnstiel, M. L., Buschle, M., Gabain, A., Mattner, F., et al. (2004). The artificial antimicrobial peptide KLKLLLLLKLK induces predominantly a TH2-type immune response to co-injected antigens. *Vaccine*, 22(25-26), 3274-3284.
- Gallo, R. L., Murakami, M., Ohtake, T., & Zaiou, M. (2002). Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol*, 110(6), 823-831.
- Guani-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., & Teran, L. M. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*.
- Hara, S., & Yamakawa, M. (1995). A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem J*, 310 (Pt 2), 651-656.
- Hoback, W. W., Bishop, A. A., Kroemer, J., Scalzitti, J., & Shaffer, J. J. (2004). Differences among antimicrobial properties of carrion beetle secretions reflect phylogeny and ecology. *J Chem Ecol*, 30(4), 719-729.
- Hultmark, D. (1994). *Drosophila* as a model system for antibacterial peptides. *Ciba Found Symp*, 186, 107-119; discussion 120-102.
- Hultmark, D., Engstrom, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., & Boman, H. G. (1983). Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *Embo J*, 2(4), 571-576.
- Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Kapur, R., & Boman, H. G. (1982). Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*. *Eur J Biochem*, 127(1), 207-217.
- Ishibashi, J., Saido-Sakanaka, H., Yang, J., Sagisaka, A., & Yamakawa, M. (1999). Purification, cDNA cloning and modification of a defensin from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *Eur J Biochem*, 266(2), 616-623.
- Izadpanah, A., & Gallo, R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*, 52(3 Pt 1), 381-390; quiz 391-382.
- Jae-Sam Hwang, Juneyoung Lee, Yeon-Ju Kim, Hea-Son Bang, Eun-Young Yun, Seong-Ryul Kim, et al. (2009). Isolation and Characterization of a Defensin-Like Peptide (Coprinsin) from the Dung Beetle, *Copris tripartitus*. *Int J Peptides*, 2009, 1-5.

- Lee, E., Kima, J. K., Shin, S., Jeong, K. W., Shin, A., Lee, J., et al. (2013). Insight into the antimicrobial activities of coprisin isolated from the dung beetle, *Copris tripartitus*, revealed by structure-activity relationships. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1828(2), 271-283.
- Lehrer, R. I., & Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol*, 11(1), 23-27.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26), 14614-14619.
- Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L., & Huang, H. W. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35(43), 13723-13728.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., & Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 35(35), 11361-11368.
- Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A., et al. (2006). *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect*, 8(8), 2195-2205.
- Paquette, D. W., Simpson, D. M., Friden, P., Braman, V., & Williams, R. C. (2002). Safety and clinical effects of topical histatin gels in humans with experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*, 29(12), 1051-1058.
- Reddy, K. V., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 24(6), 536-547.
- Steward, M. W., Stanley, C. M., Dimarchi, R., Mulcahy, G., & Doel, T. R. (1991). High-affinity antibody induced by immunization with a synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease. *Immunology*, 72(1), 99-103.
- Villa-Hernandez, O., Hernandez-Orihuela, L., Rodriguez, M. D., Zamudio-Zuniga, F., Castro-Franco, R., Pando, V., et al. (2009). Novel Antimicrobial Peptides Isolated from Skin Secretions of the Mexican Frog *Hyla eximia*. *Protein and Peptide Lett*, 16(11), 1371-1378.
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D933-937.
- Wang, J. H., Wu, C. C., & Feng, J. (2011). Effect of dietary antibacterial peptide and zinc-methionine on performance and serum biochemical parameters in piglets. *Czech J Anim Scie*, 56(1), 30-36.
- Wang, Z., & Wang, G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res*, 32(Database issue), D590-592.

- Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., & Huang, H. W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J*, 81(3), 1475-1485.
- Yu, D., Sheng, Z., Xu, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., et al. (2006). A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides*, 27(1), 31-35.
- Yupa, H., & Mongkhon, P. (2006). The Diversity of Dung Beetles in Different Ecosystems in Sakaerat Biosphere, Nakhon Ratchasima. BRT Research Report 238-245.
- Zhou, M., Hu, Q., Li, Z., Li, D., Chen, C. F., & Luo, H. (2011). Expression of a novel antimicrobial peptide Penaeidin4-1 in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) enhances plant fungal disease resistance. *PLoS One*, 6(9), e24677.