บทที่ 6

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาโปรตีนที่จับจำเพาะกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* 2297 ซึ่งโปรตีนสารพิษ Mtx2 ที่ถูกผลิตโดยสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของแบคทีเรีย *B. sphaericus* จะมีประสิทธิภาพในการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงรำคาญได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลาย อย่างไรก็ตามในบางสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดนี้ เช่น *B. sphaericus* สายพันธุ์ 2297 กลับมีความสามารถในการผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2 ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงรำคาญ

กลไกในการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียโดยทั่วไป กลไกหนึ่งซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโปรตีนสารพิษกับโมเลกุลของโปรตีนตัวรับที่จำเพาะต่อโปรตีนสารพิษชนิดนั้นๆ ที่มีอยู่บนเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุงซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมาย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้นำเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาโปรตีนคือ การแยกและวิเคราะห์โปรตีนด้วย Sodium Dodecyl Sufate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE) การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและการติดตามโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Western blot และการวิเคราะห์โปรตีนเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF) มาประยุกต์ใช้สำหรับการศึกษาหาโปรตีนที่จับจำเพาะกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus*

ในเบื้องต้นของการศึกษา ผู้ศึกษาได้ทำการตรวจหาโปรตีนที่น่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 โดยทำการตรวจหาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก Brush border membrane fraction (BBMF) จากลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ได้อย่างจำเพาะ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot ผลจากการศึกษาเบื้องต้นไม่สามารถตรวจพบโปรตีนจาก BBMF ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ได้อย่างแท้จริง ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF อาจถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการเตรียม ถึงแม้ว่าในขั้นตอนการเตรียมนั้นจะมีการใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease inhibitor) แล้วก็ตาม แต่ตัวยับยั้งดังกล่าวอาจไม่สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ทุกชนิด และอาจมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนบางชนิด

สามารถทำงานได้ ทำให้โปรตีนดังกล่าวอาจถูกย่อยและสูญเสียสภาพธรรมชาติ ส่งผลทำให้ไม่สามารถจับกับโปรตีน tMtx2 ได้ นอกจากนี้มีความเป็นไปได้อย่างสูงในการสูญเสียโปรตีนบางส่วนในระหว่างขั้นตอนการเตรียม BBMF เนื่องจากขั้นตอนดังกล่าวเป็นขั้นตอนที่มีการปั่นเหวี่ยงและตกตะกอนด้วย $MgCl_2$ ในหลายขั้นตอน ซึ่งจะต้องมีส่วนทิ้งและส่วนเก็บในแต่ละขั้นตอน ดังนั้นโปรตีนดังกล่าวอาจปะปนไปกับส่วนที่ทิ้งไป ทำให้ไม่สามารถตรวจพบแถบโปรตีนที่สามารถจับได้กับโปรตีน tMtx2 ได้อย่างแท้จริง

อย่างไรก็ตามแถบโปรตีนขนาดประมาณ 100 140 และ 200 kDa ที่มีลักษณะจางเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นหลังของแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ถูกตรวจพบจากการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot ซึ่งสามารถตรวจพบแถบโปรตีนในลักษณะเดียวกันจากการทำ Western blot โดยไม่มีการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยโปรตีน tMtx2 นอกจากนี้ผลจากการวิเคราะห์โปรตีนจาก BBMF ด้วยเทคนิค Dot blot ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างโปรตีน และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะไม่ถูกบ่มด้วยโปรตีน tMtx2 หรือแม้แต่แอนติบอดีใดๆ แต่จะถูกบ่มด้วยสารผสมระหว่าง BCIP/NBT ในสารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอเนต ซึ่งเป็นสับสเตรตสำหรับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ผลจากการวิเคราะห์พบสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสกับสับสเตรตที่จำเพาะ โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นมีความแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนจาก BBMF ที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอย่างชัดเจนว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลจากที่มีการศึกษาพบว่า เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ BBMF ของลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ในธรรมชาติ (Popova-Butler and Dean, 2009) ดังนั้นอาจมีความเป็นไปได้ว่าแถบโปรตีนดังกล่าวอาจเป็นแถบโปรตีนที่เกิดจากการกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติ (renature) ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ในระหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง BBMF สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot

จากผลการศึกษาเบื้องต้นจึงทำให้ผู้ศึกษาเล็งเห็นปัญหาหลายประการในการศึกษาหาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ที่มีความสามารถในการจับได้กับโปรตีน tMtx2 เช่น ปัญหาการถูกย่อยของโปรตีนจาก BBMF อย่างรวดเร็ว รวมทั้งปัญหาการควบคุมคุณภาพของ BBMF ในการเตรียมสำหรับการทดลองแต่ละครั้ง ซึ่งเป็นสิ่งที่กระทำได้ยาก ดังนั้นเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย *Aedes albopictus* C6/36 ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงจากลูกน้ำยุงต่างสปีชีส์ (species)

กับยุงลาย *Aedes aegypti* แต่ยุงทั้งสองชนิดก็มีจีนัส (genus) ที่มีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นกลุ่มของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจึงไม่น่าจะมีความแตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาความสามารถในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงดังกล่าว โดยพบว่าโปรตีนสารพิษดังกล่าวมีความสามารถในการแสดงความพิษโดยมีผลทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวมีการตายได้ในปริมาณหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่มีการขยายขนาดของแวคิวโอล (vacuole) ซึ่งเป็นแหล่งสะสมสารพิษภายในเซลล์ (ทรัพย์อนันต์, Senior Project พ.ศ.2550) จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย *Aedes albopictus* C6/36 ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนของลูกน้ำยุงลายที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป

ข้อมูลจากการศึกษาโปรตีน Parasporin-2 จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน (identity) กับโปรตีน Cry15Aa1 ซึ่งเป็นโปรตีน Cry ที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กับโปรตีน Mtx2 และ Mtx3 จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* (Akiba et al., 2009) และยังมีโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนสารพิษ Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และโปรตีนสารพิษ ε-toxin จากแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* ซึ่งมีกลไกการแสดงความเป็นพิษที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดรูรั่วที่มีลักษณะเป็น β-barrel pore บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ดังนั้นจากหลักฐานของผลที่เกิดจากการแสดงความเป็นพิษและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Parasporin-2 ที่มีความคล้ายกับโปรตีนสารพิษทั้งสองชนิด จึงถูกคาดหวังว่ากลไกการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน Parasporin-2 น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดรูรั่วบนเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายด้วยเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน Parasporin-2 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงหลากหลายชนิด ภายหลังจากการปล่อยให้โปรตีน Parasporin-2 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 พบว่าโปรตีน Parasporin-2 มีผลทำให้เกิดโครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายบอลลูน (balloon-like shape) ตรงตำแหน่งบริเวณโดยรอบเซลล์และยังมีการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของรูปร่างดังกล่าวจากเซลล์หนึ่งไปยังบริเวณใกล้เคียงกับอีกเซลล์หนึ่ง โครงสร้างดังกล่าวมีลักษณะคล้ายฟองอากาศ พบกระจายอยู่โดยรอบ และมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (Kitada et al., 2006) นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน Parasporrin-2 ที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยง NIH-3T3 ก็ให้ผลการเปลี่ยนแปลงต่อเซลล์ที่เป็นไปในลักษณะเดียวกับผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 (Kitada et al., 2006) อย่างไรก็ตามผลของการแสดงความเป็นพิษของ

โปรตีน Parasporin-2 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MOLT-4 ให้ผลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphology) ที่มีลักษณะแตกต่างออกไป โดยภายหลังจากการปล่อยให้โปรตีน Parasporin-2 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MOLT-4 พบว่าโปรตีน Parasporin-2 มีผลทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวมีการบวมของเซลล์โดยภายในเซลล์จะพบแวคูโอล (vacuole) ขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งผลจากภาพบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง MOLT-4 ภายหลังได้รับโปรตีน Parasporin-2 พบว่าการเปลี่ยนแปลงต่างๆประกอบด้วยการเกิดแวคูโอลภายในเซลล์ (vacuolation) การบวมของเซลล์ (cell swelling) และทำให้เซลล์แตก (Kitada et al., 2006) อย่างไรก็ตามโปรตีน Parasporin-2 ไม่มีผลทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง HeLa เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แต่อย่างใด

จากผลการศึกษาความสามารถในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน Parasporin-2 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดพบว่า ผลการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน Parasporin-2 ต่อเซลล์ MOLT-4 เป็นผลที่เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับผลจากการทดสอบความสามารถในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Mtx2 ที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่ากลไกในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเหล่านี้น่าจะมีความคล้ายคลึงกัน

สำหรับการศึกษานี้ ผลจากการตรวจหาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย *Aedes albopictus* C6/36 ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ได้อย่างจำเพาะ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot พบโปรตีนขนาดประมาณ 72 และ 75 kDa ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 อย่างไรก็ตามจากภาพที่ 19 (ข) จะพบว่าแถบโปรตีนที่มีความเข้ม (intensity) สูง ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa ที่สามารถจับได้กับโปรตีน tMtx2 เช่นกัน แถบโปรตีนขนาด 35 kDa ดังกล่าวอาจเป็นผลที่เกิดจากการที่โมเลกุลของโปรตีนขนาด 75 kDa มีการแยกออกจากกันครึ่งหนึ่ง ซึ่งข้อสันนิฐานนี้มีความเป็นไปได้อย่างสูงโดยสังเกตได้จากผลในการทดลองเดียวกันนั้นจะพบว่าแถบโปรตีนขนาด 75 kDa ที่ตรวจพบจากการทำ Western blot นั้นเป็นเพียงแถบโปรตีนที่มีลักษณะจางเท่านั้น นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิค 2-DE และตามด้วยการติดตามโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot ก็ให้ผลที่มีความสอดคล้องกัน โดยพบโปรตีนขนาดประมาณ 72 และ 75 kDa ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวถึงแม้จะเป็นผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 2D-E และ Western blot ซึ่งโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่นำมาวิเคราะห์จะอยู่ในโครงสร้างที่

มีการเสียสภาพ (denatured) อย่างไรก็ตามมีการคาดหมายว่าบริเวณจดจำของโปรตีนสารพิษ Mtx2 ในการเข้าจับกับโปรตีนตัวรับที่จำเพาะน่าจะเป็นหมู่คาร์โบไฮเดรต (glycan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างที่เป็น GPI-anchored ภายในโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนตัวรับ ซึ่งน่าจะเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับกลไกการเข้าจับกับโปรตีนตัวรับของโปรตีนสารพิษ Aerolysin ซึ่งเป็นโปรตีนสารพิษที่มีลักษณะคล้ายกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 (Abrami et al, 2000)

ภายหลังจากการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 2D-E และ Western blot ซึ่งพบโปรตีนขนาด 72 และ 75 kDa ที่สามารถจับกับโปรตีน tMtx2 ได้อย่างจำเพาะ ผู้ศึกษาจึงได้นำโปรตีน 72 และ 75 kDa ดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF) และทำการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS และเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์กับข้อมูลภายในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าโปรตีนขนาด 72 และ 75 kDa ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ดังกล่าว น่าจะเป็นโปรตีนชนิดใด (ตารางที่ 2 และตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การเลือกใช้ชนิดของแมทริกซ์ที่มีความเหมาะสมกับชนิดหรือประเภทของโปรตีน ที่จะช่วยให้เปปไทด์ซึ่งเป็นโปรตีนสายสั้นๆซึ่งได้จากการย่อยโมเลกุลโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน สามารถเกิดปฏิกิริยาการเป็นไอออน (Ionization) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ ข้อจำกัดของการยิงแสงเลเซอร์ซึ่งจะต้องเป็นไปอย่างสุ่ม โดยผู้ศึกษาจะต้องทำการเลือกชุดข้อมูลของน้ำหนักโมเลกุล (mass) ของไอออนที่ดีที่สุดที่จะนำไปทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนเพื่อให้ได้ผลที่ดีและมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ที่โปรตีนที่แตกต่างกันสองชนิดจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและให้ผลของน้ำหนักของไอออนที่มีค่าเท่ากัน (Bayyareddy et al., 2009) เป็นต้น

จากข้อจำกัดของการใช้ MALDI-TOF MS ในการวิเคราะห์ดังที่ได้กล่าวข้างต้น ผู้ศึกษาจึงได้เลือกใช้เทคนิค LC/MS-MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและให้ผลที่มีความแม่นยำมากขึ้น โดยนอกจากจะประกอบด้วย Electrospray ionization (ESI) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน ยังมีอุปกรณ์ Ion trap ซึ่งเป็นตัวตรวจวัดที่มีประสิทธิภาพชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพการทำงานของเครื่องในการวิเคราะห์มวลหรือน้ำหนัก (mass) การศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเกิด Post-translational modification ของโมเลกุลโปรตีน และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการเหนี่ยวนำทางเคมีของโปรตีน ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ผลจากการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 72 และ 75 kDa ด้วยเทคนิค LC/MS-MS และเปรียบเทียบผลที่ได้กับฐานข้อมูลพบว่าโปรตีนขนาด 72 kDa มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน lamin (gi 108881054) จากลูกน้ำยุง *Aedes aegypti* อย่างมีนัยสำคัญด้วยคะแนนสูงสุด โดยที่ไม่พบโปรตีนชนิดอื่นที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน 72 kDa อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4) ในขณะที่ผลจากการวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนขนาด 75 kDa พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนหลายชนิดออย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5 ตารางที่ 6 และ ตารางที่ 7) โดยมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน Conserve hypothetical protein (gi 167879012) จากลูกน้ำยุง *Culex quinquefasciatus* ด้วยคะแนนสูงสุด อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ของโปรตีนที่มีความใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ของโปรตีน 75 kDa ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-E ซึ่งมีค่า pI ประมาณ 5.9 พบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล ค่า pI ที่มีความใกล้เคียง และมีความเป็นไปได้ที่จะบ่งชี้ชนิดของโปรตีนขนาด 75 kDa ดังกล่าว คือ โปรตีน Conserved hypothetical protein (gi 167879012) จาก *Culex quinquefasciatus* และโปรตีน V-Atpase subunit A (gi 61971317) จาก *Aedes albopictus*

อย่างไรก็ตาม Conserved hypothetical protein (gi 167879012) ถึงแม้จะเป็นโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน 75 kDa อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยคะแนนสูงสุด แต่จากข้อมูลของโปรตีนชนิดนี้ไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนในกลุ่มใด ในขณะที่โปรตีน V-Atpase subunit A (gi 61971317) เป็นโปรตีนจากลูกน้ำยุงลาย *Aedes albopictus* ซึ่งอยู่ในจีนัสและสปีชีส์เดียวกับเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงที่นำมาใช้ในการศึกษา นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่ให้ผลจากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับโปรตีน V-ATPase subunit A (gi 61971317) ซึ่งคือ โปรตีน ATP Synthase alpha subunit vacuolar (gi 108875173) ซึ่งเป็นโปรตีนจากลูกน้ำยุง *Aedes aegypti* ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้อย่างสูงว่าโปรตีนขนาด 75 kDa ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 น่าจะเป็นโปรตีนในกลุ่มเดียวกันกับโปรตีนดังกล่าว

จากการศึกษาก่อนหน้ามีการรายงานว่าโปรตีนสารพิษ Cry1Ac จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สามารถจับได้กับโปรตีน V-ATPase subunit A ที่เป็นองค์ประกอบจากตัวอ่อนของ *H. virescens* (Krishna-moorthy et al., 2007) นอกจากนี้จากการศึกษาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนสารพิษ Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* พบว่าโปรตีน V-ATPase subunit B และ V-ATPase subunit E เป็นโปรตีนในกลุ่ม V-ATPases ในบรรดาโปรตีนหลากหลายชนิดที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน Cry4Ba ด้วยเช่นกัน (Bayyareddy et al., 2009)

โปรตีน V-ATPase เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของเซลล์อิพิธิเลียมที่เป็นองค์ประกอบเซลล์แมลง ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ด้านใน (cytoplasmic side) ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยโปรตีน V-ATPase จะทำหน้าที่ในการช่วยเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ ATP ด้วยโมเลกุลของน้ำ (hydrolysis) ซึ่งจะทำให้เกิด proton motive force หรือ proton pump ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ของโปรตอน ซึ่งก็คือโมเลกุลของไฮโดรเจน (H^+) ข้ามผ่านบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Wieczorek, 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีอยู่บริเวณ apical membrane ของกระเพาะอาหารส่วนกลางของลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* (Patrick et al, 2006; Popova-Butler and Dean, 2009) นอกจากนี้อันเนื่องมาจากการสร้างโมเดลโครงสร้างสมมติฐานของโปรตีนในกลุ่ม V-ATPases พบว่าโปรตีนในกลุ่มนี้มีตำแหน่งอยู่บริเวณด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic side) (Beyenbach and Wieczorek, 2006) อย่างไรก็ตามในธรรมชาติ หากโปรตีนสารพิษ Mtx2 มีการเข้าจับกับโปรตีน V-ATPase subunit A หรือ V-type proton ATPase catalytic subunit A อย่างจำเพาะ อาจมีผลทำให้ลูกน้ำยุงมีการสูญเสียสมดุลของ H^+ ในระบบการควบคุม pH ระหว่างสิ่งแวดล้อมภายในและภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งอาจส่งผลให้ลูกน้ำยุงตายในที่สุด

ในการศึกษาเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนหรือการตรวจหาหรือติดตามโปรตีนที่สนใจใดๆ ความไวของระบบการติดตาม (Sensitivity of detection) ถือเป็นหัวใจสำคัญในการที่จะทำให้การศึกษานั้นสำเร็จลุล่วงไปได้ สำหรับในการศึกษานี้ซึ่งเป็นการศึกษาหาโปรตีนที่จับจำเพาะกับโปรตีน Mtx2 จากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* โดยใช้เทคนิค Western blot ควบคู่กับระบบการตรวจหาโปรตีนดังกล่าวด้วยการตรวจสี เรียกว่าเทคนิค “Chromogenic detection” หรือ “Colorimetric detection” ซึ่งสามารถพบโปรตีนเพียงหนึ่งชนิดที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน Mtx2 อย่างไรก็ตามระบบตรวจวัดแบบ Chromogenic detection จัดว่าเป็นระบบการตรวจหาโปรตีนที่มีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับระบบการตรวจวัดอื่นๆเช่น ระบบการตรวจแบบ Chemiluminescent detection ซึ่งเป็นระบบการตรวจหาโปรตีนที่สนใจโดยใช้สารเรืองแสง และระบบ Radioactive detection ซึ่งเป็นการติดฉลากโปรตีนด้วยสารกัมมันตรังสี เป็นต้น โดยจะเห็นได้จากการศึกษาหาโปรตีนจับจำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆโดยทำการติดฉลากโปรตีนสารพิษด้วย I^{125} ซึ่งเป็นสารกัมมันตรังสีที่เป็นไอโซโทปของธาตุไอโอดีน จากนั้นจึงทำการศึกษาโดยปล่อยให้โปรตีนสารพิษซึ่งถูกติดฉลากมีการจับกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเซลล์เป้าหมายโดยตรง หลังจากนั้นจึงทำการตรวจผล ซึ่งการศึกษาด้วยวิธีดังกล่าวจะสามารถตรวจพบและให้ผลของโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนสารพิษเป็นจำนวนมาก อัน

เนื่องมาจากความไวในการตรวจวัดของระบบตรวจวัดที่ใช้นั่นเอง ดังนั้นในการศึกษาหาโปรตีนจับจำเพาะกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 ที่อาจจะมีการศึกษาต่อไปในอนาคต อาจมีความจำเป็นที่จะต้องปรับเปลี่ยนระบบการตรวจวัดเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาและข้อมูลทั้งหมดนี้ มีความเป็นไปได้อย่างสูงว่าโปรตีนที่จับจำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* น่าจะเป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีน V-ATPase subunit A ซึ่งจะต้องมีการศึกษายืนยันเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำหน้าที่ของโปรตีน ว่าโปรตีน V-ATPase subunit A ดังกล่าวนี้เป็นโปรตีนที่จะสามารถทำให้โปรตีนสารพิษ Mtx2 สามารถแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเป้าหมายได้อย่างสมบูรณ์