

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2554

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง
การโคลนยีนกำหนดการสร้างเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์จากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก
การใช้ประโยชน์
ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
Molecular Cloning of Antimicrobial Peptide Genes from Amphibians and
Applications

คณะผู้ดำเนินงาน
อ.ดร.ภัทรดร ภิญโญพิชญ์
ผศ.ดร.วิเชษฐ คุ้มเชื้อ
รศ.ผุสดี ปริยานนท์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ หรือ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา สวนสัตว์เปิดเขาเขียว หรือ องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน่วยวิจัยสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะในเชื้อแบคทีเรีย ทำให้มีความพยายามในการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะได้ หนึ่งในสารที่มีการวิจัยกันอย่างกว้างขวาง คือ เปปไทด์ต้านจุลชีพ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด เปปไทด์ต้านจุลชีพพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่มีรายงานพบมากในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก โดยเฉพาะในกลุ่มกบ งานวิจัยนี้มุ่งค้นหายีนที่กำหนดการสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพ จากกบหลังไพล (*Rana lateralis*) เพื่อจะสามารถทำนายลำดับของเปปไทด์ที่ได้ และประเมินความเป็นไปได้ในการใช้เปปไทด์ที่ค้นพบในการบำบัดรักษาโรคติดเชื้อ ผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ RQ1 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโน ILPLLAGLVHGLSSIFGK ประจุสุทธิ +2 ความยาว 18 กรดอะมิโน ซึ่งอาจจัดไว้ในกลุ่ม Temporins มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ (MIC สำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* มีค่าเท่ากับ 25 μ M และ 50 μ M ตามลำดับ) แต่ยังมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงสูง ($HC_{50} = 60 \mu$ M) ดังนั้น การนำมาพัฒนาต่อเป็นยา อาจจำเป็นต้องมีดัดแปลงลำดับของกรดอะมิโนก่อนนำไปใช้

คำสำคัญ เปปไทด์ต้านจุลชีพ แบคทีเรีย กบหลังไพล

Abstract

Antibiotic resistance, especially in bacteria has motivated scientists to find novel bioactive compounds which may be used as antibiotic alternative. One of the most promising agents is antimicrobial peptide (AMP) which is a part of innate immune response. AMPs can be found virtually in all organisms but there are abundant in amphibians especially in frogs. This work focused on cloning AMP genes from *Rana lateralis* in order to get the sequence of putative peptides which were used for peptide synthesis. To assess therapeutic potential, each synthetic peptide was then used for antimicrobial peptide assay and hemolytic assay. The result indicated that 18-residue peptide RQ1 (ILPLLAGLVHGLSSIFGK) which has +2 net charge may be classified into Temporin family. This peptide can inhibit gram positive bacteria better than gram negative bacteria (MIC for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were 25 μ M and 50 μ M respectively). However, toxicity toward red blood cell was relatively high (HC50 = 60 μ M). Thus, change of some amino acid sequence through peptide engineering is needed.

Keyword: Antimicrobial Peptides, Bacteria, *Rana lateralis*

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญเรื่อง.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
วิธีดำเนินการศึกษา.....	4
ผลการศึกษา.....	9
สรุปและวิจารณ์ผล.....	14
เอกสารอ้างอิง.....	18
ภาคผนวก.....	20
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	22

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงลำดับกรดอะมิโน ประจุสุทธิ ความยาวเป็นจำนวนกรดอะมิโนที่ทำนายได้จากลำดับเบสของ cDNA และผลการสืบค้นจาก Antimicrobial Peptide Database รวมถึงโครงสร้างทุติยภูมิจาก HNN secondary structure prediction ของกบหลังไพลตัวที่ 1 (ตัวอักษร hh แทนโครงสร้าง alpha-helix, cc แทน random coil และ ee แทน extended-strand ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนั้น).....	11
ตารางที่ 2 แสดงลำดับกรดอะมิโน ประจุสุทธิ ความยาวเป็นจำนวนกรดอะมิโนที่ทำนายได้จากลำดับเบสของ cDNA และผลการสืบค้นจาก Antimicrobial Peptide Database รวมถึงโครงสร้างทุติยภูมิจาก HNN secondary structure prediction ของกบหลังไพลตัวที่ 1 (ตัวอักษร hh แทนโครงสร้าง alpha-helix, cc แทน random coil และ ee แทน extended-strand ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนั้น).....	12
ตารางที่ 3 แสดงค่า MIC (μ M) ของเปปไทด์ RQ1 ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (<i>E.coli</i> และ <i>S.tym</i>) แบคทีเรียแกรมบวก (<i>S.aureus</i> และ <i>B.cereus</i>) และค่า HC50 ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู.....	13
ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm จากการการทำ hemolysis assay.....	21

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ผลการแยกขนาด cDNA ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis.....	10
ภาพที่ 2 ตัวอย่างการแปลงลำดับเบสโดยโปรแกรม Vector NTI Advance 11 เป็นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ต้านจุลชีพจากโคลน RQ45 ลำดับเบสในแถบที่บคือ ลำดับที่จะถูกแปรรหัสเป็น peptide precursor และลำดับที่อยู่ในกรอบ เป็นลำดับกรดอะมิโนของส่วน mature peptide.....	10
ภาพที่ 3 แสดงการทำ sequence alignment ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ที่คล้ายคลึงกับเปปไทด์ที่สนใจ (RQ1) จากสิ่งมีชีวิตจำพวกกบ.....	15
ภาพที่ 4 ภาพผลการจัดกลุ่ม แสดงถึงความสัมพันธ์เปปไทด์ ILPLLAGLVHGLSSIFGK (RQ1) กับเปปไทด์ต้านจุลชีพอื่นๆที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน.....	16
ภาพที่ 5 แสดง plot ระหว่าง % hemolysis และ ความเข้มข้นของเปปไทด์ เพื่อใช้ในการหาค่า HC50.....	20

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AMP	antimicrobial peptide
MIC	minimal inhibitory concentration
HC ₅₀	50% hemolytic concentration
μM	micromolar

**การโคลนยีนกำหนดการสร้างเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์
จากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและการใช้ประโยชน์**
**Molecular Cloning of Antimicrobial Peptide Genes from Amphibians and
Applications**

ภัทรธร ภิญโญพิชญ์, วิเชษฐ์ คนชื้อ และ พุสดี ปริยานนท์
Pataradawn Pinyopich, Wichase Khonsue and Putsatee Pariyanon

*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai road, Pathumwan, Bangkok, 10330*

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยีนที่กำหนดการสร้าง Antimicrobial peptides (AMPs) พบได้เป็นจำนวนมากในธรรมชาติ โดยสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ทั้งในอาณาจักรพืชและสัตว์ สามารถสังเคราะห์ AMPs ได้ โดย AMPs เป็นกลไกส่วนหนึ่งของภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) และเป็นด่านแรกของการป้องกันตัวของสิ่งมีชีวิตจากการรุกรานของเชื้อโรคต่างๆ

AMPs ทำงานต่อต้านจุลินทรีย์โดยการเข้ารบกวนเสถียรภาพเยื่อหุ้มของจุลินทรีย์ และทำให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโตหรือตาย กลไกการทำงานเช่นนี้เป็นกลไกที่ไม่จำเพาะ (low specificity) ดังนั้น AMP ชนิดหนึ่ง ๆ จึงมีผลต่อจุลินทรีย์หลายชนิด (broad spectrum effect) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้แก้ไขปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะได้

ในช่วง 3 ทศวรรษที่ผ่านมา มีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวาง ประกอบกับการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้อง ทำให้ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยา มีเชื้อโรคหลายชนิดได้กลายพันธุ์และดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance) ดังนั้น สิ่งสำคัญอันดับต้นๆ ในขณะนี้ คือ การพัฒนายาแนวใหม่ หรือ การดัดแปลงโมเลกุลจากธรรมชาติมาใช้ ซึ่งจะช่วยในการควบคุมการระบาดของเชื้อโรค ทั้งในคน สัตว์เลี้ยงและพืช โดยโมเลกุลที่จะนำมาใช้ ควรมีลักษณะ ดังนี้ คือ (1) มีความเป็นธรรมชาติมากที่สุด (2) มีผลต่อต้านเชื้อโรคหลายชนิด (3) ผลิตง่าย (4) และไม่ก่อให้เกิดการดื้อยาได้ง่าย เห็นได้ว่า Antimicrobial Peptides (AMPs) มีลักษณะครบทั้ง 4 ประการ ดังที่กล่าวข้างต้น

นอกจากประโยชน์ในเชิงการนำไปใช้แล้ว การศึกษา AMPs ยังมีประโยชน์ในวิจัยเพื่ออนุรักษ์และจัดการ ปัญหาการลดลงของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ซึ่งได้เกิดมากขึ้นในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาและได้แพร่กระจายออกไปในพื้นที่ส่วนต่างๆ ของโลก มีการตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจากปัจจัยทางกายภาพ ทำให้

ระบบภูมิคุ้มกันของกบอ่อนแอ ทำให้เกิดโรคอุบัติใหม่ที่ไม่เคยมีมาก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อราพวก chytrid

การสอบสวนเอกสาร

เปปไทด์ต้านจุลชีพถือเป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด เพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อจุลชีพที่เข้ามาภายในร่างกาย ในช่วง 20 กว่าปีที่ผ่านมาได้มีการค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลัง รวมถึงพืช ราและแบคทีเรีย (Reddy, et al. 2004) เปปไทด์ต้านจุลชีพนี้มีคุณสมบัติบางอย่างร่วมกัน คือ มีขนาดเล็ก (<10 kDa) มีประจุสุทธิเป็นบวก มีสมบัติเป็น amphipathic และมีความยาวรวมทั้งโครงสร้างทุติยภูมิที่หลากหลาย สามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้รวดเร็วโดยปราศจากความเป็นพิษต่อ host cell ด้วยการยึดเกาะและแทรกตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นลบของจุลชีพเข้าไป ทำให้เกิดรูรั่ว จุลชีพจึงสูญเสียความสมดุลในการผ่านเข้าออกของสารภายในและภายนอกเซลล์ทำให้เซลล์แตกในที่สุด

เนื่องจากกลไกการทำงานไม่มีความจำเพาะต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพตามแบบฉบับของยาปฏิชีวนะทั่วไปจึงไม่ทำให้จุลชีพเกิดการต้านทานได้โดยง่าย (Zaslloff, M 2002) อีกทั้งยังออกฤทธิ์กว้างไม่เพียงแต่ในเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น เช่น มีการวิจัยผลของเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อเชื้อไวรัส HIV (VanCompernelle, et al. 2005) ปัจจุบันเปปไทด์ต้านจุลชีพนั้นถูกนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นแผลพุพอง แผลที่เท้าของผู้ป่วยโรคเบาหวานและการติดเชื้อ *Helicobacter* ในกระเพาะอาหาร (Reddy, et al. 2004) เปปไทด์ต้านจุลชีพจึงนับเป็นทางเลือกที่ดีในการใช้กำจัดเชื้อจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรค

จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า กบเป็นแหล่งที่มีเปปไทด์ต้านจุลชีพอยู่มาก โดยจะสร้างและหลั่งออกมาจากต่อมใต้ผิวหนังชนิด granular gland เพื่อช่วยป้องกันอันตรายจากเชื้อจุลชีพต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มันอาศัยอยู่ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิต AMPs ได้หลายชนิดและมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างยาวนานตามภูมิปัญญาชาวบ้าน ทั่วโลกจะมีการศึกษา AMPs กันมากในกบแฟมิลี Hylidae และ Ranidae โดยมีรายงานการศึกษาในเกือบทุกทวีป ได้แก่ อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป เอเชีย และออสเตรเลีย (Conlon, et al. 2004)

เมื่อพิจารณาในระดับยีนจะพบว่า AMPs มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนเหล่านี้มีความแตกต่างกัน และกำหนดการสร้างโปรตีนหลากหลายชนิด Vanhoye (Vanhoye, et al. 2003) ได้ประมาณการจำนวนชนิดของ AMPs ในกบ โดยใช้ข้อมูลจาก AMPs ที่ค้นพบบ้างแล้ว โดยคาดคะเนว่า AMPs จะมีความหลากหลายสูงมาก โดยหากกบแต่ละชนิดสามารถผลิต AMP ได้ 10-20 ชนิด ดังนั้น กบทั่วโลกประมาณ 5,000 ชนิดสามารถผลิต AMP ชนิดต่างๆ ได้รวมกันประมาณ 100,000 ชนิด สำหรับในประเทศไทยมีสัตว์จำพวกกบอยู่ประมาณ 80 ชนิด ดังนั้น สามารถประมาณการได้ว่าน่าจะมี AMPs จำนวนประมาณ 800-1600 ชนิด และเป็นทรัพยากรที่ยังไม่ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษา AMPs ในกบชนิดที่พบในไทยแต่ยังไม่ได้ได้รับการศึกษามาก่อน เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ต่อไป โดยอาจใช้เป็นทางเลือกแทนยาปฏิชีวนะ (Jagusztyn-Krynicka, et al. 2001) ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษา จึงเป็นที่น่าสนใจในการทำการศึกษเปปไทด์ต้านจุลชีพจากกบหลังโพ (Rana lateralis) ที่

พบในประเทศไทย กบชนิดนี้อยู่ในแฟมิลี Ranidea ซึ่งหาได้ง่าย มีอยู่ทั่วไป และยังไม่ได้รับการศึกษามาก่อน

วัตถุประสงค์ของโครงการ

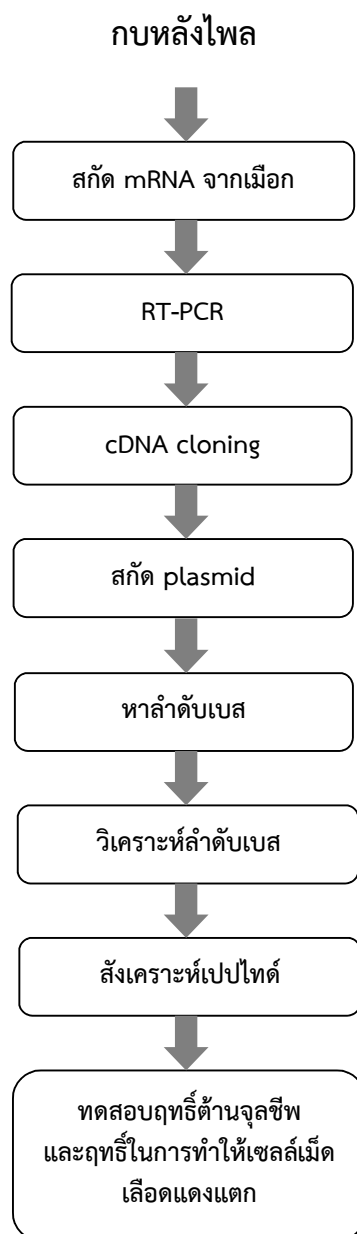
1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่กำหนดการสร้าง antimicrobial peptides (AMPs) จากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินชนิดที่พบในประเทศไทยและยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเปปไทด์ที่ค้นพบ เพื่อใช้แทนยาปฏิชีวนะ โดยดูจากความสามารถในการฆ่าเชื้อ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

วิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า	ชุดสกัด mRNA dynal bead	น้ำกลั่น
หลอดทดลองขนาด 1.5 ml	Micropipette ขนาด 2, 20, 200, 1000 ul	หลอด PCR ผนังบางขนาด 0.2 ml
Thermo cycler	One-Step RT-PCR kit	Agarose
ชุด Gel Electrophoresis	สีย้อม DNA SyBR	แหล่งกำเนิดแสงสีน้ำเงิน
PCR TOPO cloning kit	Plasmid purification kit	High speed centrifuge
UV spectrophotometer	Incubator shaker	Biosafety cabinet
Computer	ขวดรูปชมพู่	Kanamycin
เลือดหนู rat	เชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 1729) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) และ <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311)	96-well plate
Microplate reader	LB broth	MHB broth
MHB agar	Vortex	Primers
Phosphate buffer saline	Culture dish	Loop
Filtered pipette tips		

แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง



การเก็บเมือกจากผิวหนังของกบ

นำกบหลังโพลจำนวน 2 ตัวซึ่งเก็บมาจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรีมากระตุ้นที่ผิวหนังด้านหลัง ด้วยไฟฟ้าความต่างศักย์ 6 โวลต์ (เครื่องกระตุ้นกล้ามเนื้อขาของกบ) เพื่อให้สัตว์หลังเมือกออกมา จากนั้นดูดเมือกมาผสมใน Cell lysis/mRNA stabilization Solution ได้เป็นสารละลายเมือกที่พร้อมทำการสกัดในขั้นตอนต่อไป

การสกัด mRNA

ทำการแยกเอาเฉพาะ mRNA จากสารละลายเมือกด้วย Dynabeads® mRNA DIRECT™ KIT ซึ่งอาศัยเม็ด Magnetic beads ที่เชื่อมต่อกับสาย oligo dT เป็นตัวเลือกจับกับ mRNA ที่อยู่ในเมือก โดยนำสารละลายเมือกในขั้นตอนที่แล้ว เติมลงในหลอดที่มี Magnetic beads จากนั้นวางหลอดในแท่นแม่เหล็ก ดูดสารละลายทิ้งไป สะ Magnetic beads ด้วย buffer แล้วดูดเอาส่วนของเหลวทิ้งไปจนหมด จากนั้นเติม elution buffer แล้วใช้ความร้อน 70°C ในการแยก mRNA ออกจาก Magnetic beads เก็บ mRNA ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะทำการทดลองขั้นถัดไป

การโคลนยีน

อาศัยกระบวนการ Reverse-Transcription PCR (RT-PCR) ในการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA ที่ได้จากการสกัดในขั้นตอนที่แล้ว โดยใช้สารเคมีและเอนไซม์ดังนี้

2X reaction mix	10 µl
mRNA	2.5 µl
primer RANASS (10uM)	0.5 µl
oligo dT (5uM)	0.5 µl
Reverse-transcriptase	1.0 µl
Distilled water	5.5 µl

ภายใต้สภาวะ

Reverse transcription	55°C	30 นาที
Denaturation	94°C	2 นาที

จากนั้นเข้าสู่ PCR cycle 35 รอบ

Denaturation	94°C	15 วินาที
Annealing	62°C	30 วินาที
Extension	68°C	45 วินาที

แล้วเข้าสู่

Final extension	68°C	10 นาที
-----------------	------	---------

ตรวจสอบผลของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ โดยดูที่ขนาดของ cDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 300-400 คู่เบส ด้วยวิธี Gel Electrophoresis ใน 0.8% Agarose gel

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR จึงทำการโคลนยีนโดยอาศัย TOPO TA Cloning® Kits ซึ่งจะนำ cDNA ที่ได้มาแทรกเข้าไปใน plasmid vector ชนิด pCR2.1-TOPO จากนั้นทำการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของ TOP10 *E. coli* โดยละลาย competent cell ในน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำ cloning reaction 2.5 µl ผสมให้เข้ากัน แช่หลอดในน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้น Heat shock ให้ความร้อนที่ 42°C นาน 30 วินาที แล้วนำหลอดกลับสู่ น้ำแข็ง 10 วินาที จึงนำ transformants ที่ได้เลี้ยงใน S.O.C. medium 250 µl เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน agar plate ที่มี Kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml สุดท้าย incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โคลนีที่เกิดขึ้นจะถูกสุ่มเลือกเพื่อทำการเพิ่มจำนวน ใช้ปลายทูปจิ้มโคลนีที่แยกตัวเดี่ยว ๆ ออกมาใส่หลอดขนาด 1.5 ml ที่มี LB medium และ Kanamycin (50 µg/ml) ทำซ้ำเช่นนี้จนได้จำนวนโคลนีตามต้องการ จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และเก็บรักษาเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20° จนกว่าจะทำการทดลองขั้นถัดไป

การสกัด plasmid

นำแต่ละโคลนีที่คัดเลือกไว้ไปแยกเลี้ยงเพิ่มจำนวนใน LB medium ที่มี kanamycin (50 µg/ml) โดย incubate ที่อุณหภูมิ 32°C เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลานานข้ามคืนจึงทำการสกัด plasmid ด้วย GeneJET™ Plasmid Miniprep KIT (Fermentas) แล้วส่งไปที่ Marcogen Inc. เพื่อนำไปหาลำดับเบสต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับเบส

ทำการ Translation เพื่อแปลลำดับเบสเป็นลำดับกรดอะมิโน และ Alignment โดยโปรแกรม Vector NTI Advance 11 และใช้เครื่องมือ Blast ในการหาความใกล้เคียงกันของลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูลออนไลน์ของ NCBI และ APD: the Antimicrobial Peptide Database จากนั้นวิเคราะห์หาโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์จากเว็บไซต์ NPS@: HNN secondary structure prediction (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html) เพื่อรวบรวมข้อมูลความเป็นไปได้ที่เปปไทด์จะมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ

อาศัยวิธี micro-dilution broth method เพื่อหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) (Wiegand et al., 2008) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค 4 ชนิด คือ *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Bacillus cereus* (ATCC 1729) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) และ *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) เริ่มจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดใน 5 ml MHB broth ที่ 37 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อแบคทีเรียที่ได้มีค่า OD₆₀₀ อยู่ในช่วง 0.1-0.3 โดยวัดจาก Spectrophotometer จากนั้นนำไปเจือจางต่อใน MHB broth ให้มีค่า OD₆₀₀ เป็น 0.02 สำหรับเก็บไว้เป็น stock แล้วนำไปทดสอบโดยเจือจางต่อให้มีค่า OD₆₀₀ เป็น 0.002

ขั้นต่อไป จะใช้ 96-well plate ทำการเตรียมเปปไทด์ให้มีความเข้มข้น 8000 μM จากนั้นใส่ MHB broth ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 90 μL ในหลุมที่ 1 และปริมาตร 50 μL ในหลุมที่ 2-10 นำเปปไทด์ ปริมาตร 10 μL จากที่เตรียมไว้ออกมาเจือจางด้วยวิธี 2-fold serial dilution ใส่ลงในหลุมที่ 1 แล้วจึงเริ่มเจือจางเปปไทด์ในหลุมที่ 1 โดยปิเปตต์สารละลาย 50 μL จากหลุมที่ 1 ใส่ลงในหลุมที่ 2 แล้วปิเปตต์สารละลายในหลุมที่ 2 มา 50 μL ใส่ลงไปในหลุมที่ 3 ทำเช่นนี้ในหลุมถัดไปจนถึงหลุมที่ 10 แล้วปิเปตต์สารละลายจากหลอดสุดท้ายปริมาตร 50 μL ทั้ง จะได้ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่อยู่ในช่วง 0.78 - 400 μM หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้างต้นปริมาตร 50 μL ใส่ลงในแต่ละหลุม และทำ growth control และ sterility control โดยจะใส่ MHB broth ที่ปราศจากเชื้อ 50 μL ผสมกับเชื้อแบคทีเรีย 50 μL และ MHB broth ที่ปราศจากเชื้อ 100 μL ตามลำดับ นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นวัดผลด้วยสายตาโดยเปรียบเทียบระดับความขุ่นในแต่ละหลุมกับ sterility control ซึ่งเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้หลุมนั้นจะต้องไม่มีความขุ่น โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นของเปปไทด์ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้

การทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

ในการศึกษาจะใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู โดยนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย Hemocytometer วิธีนับแสดงในภาคผนวก จากนั้นทำการเจือจางด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ให้มีจำนวนเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 4×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายเปปไทด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี 2-fold serial dilution ดังเช่นในการทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ข้างต้น แต่ทำในหลอดขนาด 1.5 ml และใช้สารละลาย PBS ในการเจือจาง จากนั้นเติมสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง 50 μL ในแต่ละหลอด โดย Negative control และ Positive control ประกอบด้วยสารละลาย PBS 50 μL กับสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง 50 μL และสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง 50 μL กับ 10% TritonX 50 μL ตามลำดับ จากนั้น incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปั่นตกด้วยความเร็ว 3000 g เป็นเวลา 30 วินาที แยกเฉพาะส่วนใสมาใส่ใน 96-well plate เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และคำนวณ %Hemolysis ด้วยสูตรดังนี้

$$\% \text{ Hemolysis} = 100 \times (\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} / \text{ค่าดูดกลืนแสงของ Positive control})$$

นำค่า % Hemolysis และค่าความเข้มข้นของเปปไทด์ มาแสดงผลในรูปกราฟ semi-log เพื่อหาค่า HC_{50} ซึ่งก็คือ ค่าความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก 50%

สถานที่ทำการศึกษาและเก็บข้อมูล

จากการสำรวจภาคสนาม สามารถจับกบหลังโพ (Rana lateralis) โดยเก็บจากสองพื้นที่ คือ เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี พื้นที่ละ 1 ตัว

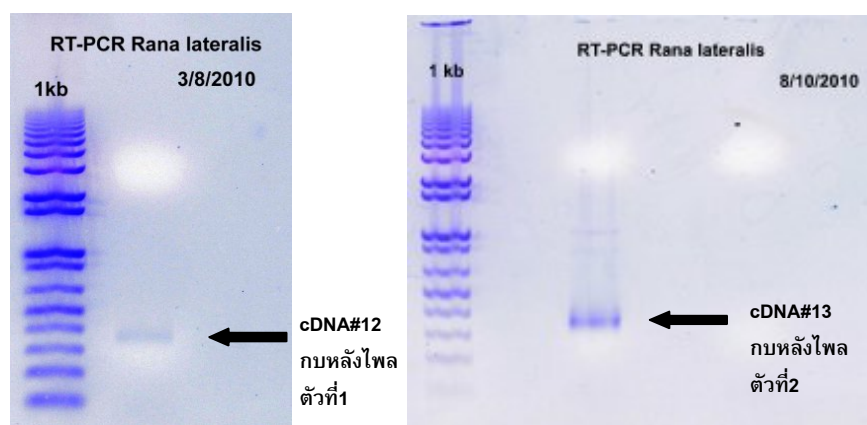
ผลการศึกษา

ผลการโคลนยีน

จากการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA ที่ได้จากเมือกของกบหลังไหลจำนวน 2 ตัว โดยอาศัยกระบวนการ RT-PCR เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 300 - 400 คู่เบส (ภาพที่ 1) ทำการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ RT-PCR เข้ากับเวกเตอร์ pCR2.1-TOPO และถ่ายยีนเข้าสู่ TOP10 *E. coli* เมื่อนำไปเลี้ยงใน agar plate ที่มี Kanamycin จะได้เป็นโคโลนีเดียวเกิดขึ้น

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส

เมื่อทำการหาลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสจากกบหลังไหลจำนวน 2 ตัว พบว่าเปปไทด์ที่ได้มีโครงสร้าง 3 ส่วนคล้ายกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ ประกอบด้วยส่วน signal region เริ่มต้นด้วยกรดอะมิโนชนิด methionine ตามด้วยส่วน acidic propiece ที่จบลงด้วยลำดับกรดอะมิโน -Lys-Arg- ซึ่งเป็นส่วนที่จะถูก proteolytic enzyme ตัดและส่วนสุดท้ายของปลาย carboxyl คือ mature peptide (ภาพที่ 2) ซึ่งในกบหลังไหลตัวที่ 1 นั้นได้ทำการศึกษาโดยวิธีเดิม ส่วนกบหลังไหลตัวที่ 2 ทำการศึกษาโดยวิธีใหม่ จากการสืบค้นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากกบหลังไหลทั้งสองตัวใน Antimicrobial Peptide Database และการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิจาก HNN secondary structure prediction ได้ผลดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 พบว่าเปปไทด์แต่ละสายมีความยาวแตกต่างกันในช่วง 18 - 49 กรดอะมิโน และส่วนใหญ่มีประจุสุทธิเป็นบวก ยกเว้นเปปไทด์ที่ได้จากโคลน RQ13 มีประจุสุทธิเป็น -2 นอกจากนั้นยังพบว่าเปปไทด์จากบางโคลนสามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบ alpha-helix ซึ่งเปปไทด์ใหม่เหล่านี้ส่วนใหญ่ก็คล้ายคลึงกับเปปไทด์ต้านจุลชีพอื่นๆ ที่ได้จาก Antimicrobial Peptide Database แต่มีเปปไทด์ ILPLLGLVHGLSSIFGK จากโคลน RQ1 ที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดใด เพราะมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง 50 % กับเปปไทด์ต้านจุลชีพ 5 ชนิด ได้แก่ Temporin-1Od, Brevinin-1DYc, Pelophylaxin-4, Hylin b1 และ Dybowskin-6



ภาพที่ 1 ผลการแยกขนาด cDNA ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

+1	Met	Phe	Thr	Leu	Lys	Lys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Gly	Ile	Ile-	
1	ATGTTTCACCT TGAAGAAATC CCTGTTACTC CTTTTCTTTC TTGGGATCAT																	
+1	Ile	Ser	Met	Ser	Leu	Cys	Glu	Gln	Glu	Arg	Asp	Ala	Asp	Glu	Glu	Asp	Gly	Gly-
51	CTCCATGTCT CTCTGTGAGC AAGAGAGAGA TGCTGATGAA GAAGATGGAG																	
+1	Gly	Glu	Val	Thr	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Gly	Cys	Trp	
101	GGGAAGTTAC AGAGGAAGAA GTAAAAAGAA GTGCACTCAA AGGGTGCTGG																	
+1	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Pro	Lys	Pro	Cys	Phe	Gly	***	Asn	***	Asn	Met	Ile-	
151	ACCAAGAGTA TTCCACCAAA GCCTTGTTTT GGA TAAAAATT AAAACATGAT																	
+1	Ile	Arg	Lys	Ser	Ser	Ala	Val	Glu	Tyr	His	Leu	Val	Lys	Cys	Leu	Ile	Lys	Gln-
201	TAGGAAGTCA TCTGCTGTGG AATATCATTT AGTTAAATGT CTGATAAAAC																	
+1	Gln	***	Lys	Tyr	Tyr	Thr	Gln	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys-
251	AATAAAAAATA TTACACACAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA																	

ภาพที่ 2 ตัวอย่างการแปลงลำดับเบสโดยโปรแกรม Vector NTI Advance 11 เป็นลำดับกรดอะมิโนของ เปปไทด์ต้นจุลชีพจากโคลน RQ45 ลำดับเบสในแถบที่บคือ ลำดับที่จะถูกแปรรหัสเป็น peptide precursor และลำดับที่อยู่ในกรอบ เป็นลำดับกรดอะมิโนของส่วน mature peptide

ตารางที่ 1 แสดงลำดับกรดอะมิโน ประจุสุทธิ ความยาวเป็นจำนวนกรดอะมิโนที่ทำนายได้จากลำดับเบสของ cDNA และผลการสืบค้นจาก Antimicrobial Peptide Database รวมถึงโครงสร้างทุติยภูมิจาก HNN secondary structure prediction ของกบหลังไหลตัวที่ 1 (ตัวอักษร hh แทนโครงสร้าง alpha-helix, cc แทน random coil และ ee แทน extended-strand ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนั้น)

	Clone	Amino acid sequence & secondary structure	Charge	Length	Blast-AMP database
กบ หลัง ไหล ตัวที่ 1	RQ1	ILPLLAGLVHGLSSIFGK	+ 2	18	Temporin-1Od (50%)
	RQ2	chhhhhhhhhhhhhccc			
	RQ4				
	RQ6				
	RQ8				
	RQ9				
	RQ10				
	RQ15				
	RQ17				
	RQ18				
	RQ20				
	RQ24				
	RQ25				
	RQ13	FPDLSEDTIASLLGK	-2	15	No similarity
	RQ16	ccchchhhhhhhcc			
	RQ22				
	RQ23				
	RQ27				
	RQ14	CVAAIIPPYRIRCKFLGQC	+3	19	BTD-4 (Baboon theta-defensin-4, XXC; baboon, animals; BBMM) (38.09%)
		Cccccccccceeehcccc			
	RQ26	GLFSKKGKGGKSWIKGIFNGIKGISKDVG ADVIRTGIEIAACKIKGEC Cccccccccceeehhccchhhchccc hhhhhhhhhhhhhhhhccc	+6	49	Esculentin-1GRa (66 %)

ตารางที่ 2 แสดงลำดับกรดอะมิโน ประจุสุทธิ ความยาวเป็นจำนวนกรดอะมิโนที่ทำนายได้จากลำดับเบสของ cDNA และผลการสืบค้นจาก Antimicrobial Peptide Database รวมถึงโครงสร้างทุติยภูมิจาก HNN secondary structure prediction ของกบหลังไพลตัวที่ 2 (ตัวอักษร hh แทนโครงสร้าง alpha-helix, cc แทน Random coil และ ee แทน extended-strand ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนั้น

	Clone	Amino acid sequence & secondary structure	Charge	Length	Blast-AMP database
กบ หลัง ไพล ตัวที่ 2	RQ28 RQ30 RQ34 RQ40	FFGGVMKLAALKVLPSTFCSVTHKC cchhhhhhhhhccceeeecccc	+4	24	Brevinin-1SY (66.66 %)
	RQ38	ILPLLGLVHGLSSIFGK chhhhhhhhhhhccc	+2	18	Temporin-10d (50%) Brevinin-1Dyc (50%) Pelophylaxin-4 (50%) hylin b1 (50%) Dybowski-6 (50%)
	RQ29 RQ37 RQ41 RQ42 RQ48 RQ49	GGIKGFMVRVASQYNKCKDTNFQAPNCKVFCKM ccccceeeecccccccccccccchhhccc	+6	32	D51 (synthetic; grammar-based design) (37.5 %)
	RQ32	FLGHVLGALGNILPKIFGK cchhhhhhhchhhheccc	+3	19	Temporin-LTa (68.42%)
	RQ33	APFVNIWPMYEEIRKQYIEDAKKNG cccccccchhhhhhhhhhhhhccc	+1	26	Latarcin 6c (33.3%)
	RQ39	CVAAIIPPYRIRCKFLGQC ccccccccceeeehcccc	+3	19	BTD-4 (Baboon theta-defensin-4, XXC; baboon, animals; BBMM) (38.09%)
	RQ43	GALKGLTRIANQYKCKDTNFQAPNCNVFNKM cchhhhhhhhhhhhhccccccccchhccc	+5	32	Cupiennin 1a (38.09 %)
	RQ45	SALKGCWTKSIPPKPCFG ccccccccccccccccccc	+3	18	Odorranain-B1 (85%)
	RQ47	GLFSKKGKGGKSWIKGIFNGIKGISKDVGADVIRTGIEI AACKIKGEC ccccccccccccceeehhcccchhhchcccchhhhhhhhh hhhhcccc	+ 6	49	Esculentin-1GRa (66%)

ผลการสังเคราะห์เปปไทด์

เลือกโคลน RQ1 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโน ILPLLAGLVHGLSSIFGK ประจุสุทธิ +2 ความยาว 18 กรดอะมิโน เพื่อนำมาสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวิธีทางเคมี เนื่องจากเปปไทด์ RQ1 อาจจะสามารถจำแนกเป็น เปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มใหม่ได้ เพราะมีความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ที่ถูกค้นพบแล้วค่อนข้างต่ำ จึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของ RQ1 ต่อไป จากการสังเคราะห์ได้เปปไทด์มาจำนวน 9 mg

ผลการทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ และฤทธิ์ในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

ค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ของเปปไทด์ RQ1 ต่อแบคทีเรียแกรมลบสอง ชนิด มีค่า 200 μM ใน *Escherichia coli* และ 400 μM ใน *Salmonella typhimurium* ส่วนแบคทีเรีย แกรมบวกสองชนิดมีค่า MIC 25 μM ใน *Staphylococcus aureus* และ 50 μM ใน *Bacillus cereus* (ตารางที่ 3)

ในการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm แล้วนำมาคำนวณเป็นค่า % hemolysis แล้วนำค่าที่ได้ไปวาดกราฟระหว่าง % hemolysis กับค่าความเข้มข้นของเปปไทด์ เพื่อระบุหาค่า HC_{50} แสดงในภาคผนวกภาพที่ 6 ผลที่ได้พบว่าเปปไทด์ RQ1 มีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก 50% ที่ความเข้มข้น 60 μM และทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก 100% ที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 μM ขึ้นไป

ตารางที่ 3 แสดงค่า MIC (μM) ของเปปไทด์ RQ1 ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*E.coli* และ *S.tym*) แบคทีเรียแกรมบวก (*S.aureus* และ *B.cereus*) และค่า HC_{50} ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู

Peptide	MIC (μM)				HC ₅₀
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
RQ1	200	400	25	50	60

สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาโดยวิธีโคลนนิ่งจาก mRNA ทำให้สามารถทำนายโครงสร้าง peptide precursor ของเปปไทด์ด้านจุลชีพได้ พบว่าเปปไทด์ด้านจุลชีพแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างภายในสายเปปไทด์ที่เหมือนกัน คือ ส่วน signal peptide ที่ปลาย N-terminal ตามด้วย acidic spacer และ mature peptide ที่ปลาย C-terminal ซึ่งลำดับกรดอะมิโนสองตัวสุดท้ายของส่วน acidic spacer คือ -Lys-Arg- เป็น enzymatic processing site จะถูกตัดโดย endoproteolytic enzyme ที่จำเพาะ mature peptide จึงถูกปล่อยและส่งออกไปเก็บสะสมที่ serous cell ในต่อมไคตัวหนังบริเวณสันหลังก่อนที่จะปล่อยออกสู่ภายนอกไปทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะต่อไป เพื่อป้องกันอันตรายจากเชื้อจุลชีพที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของส่วน signal peptide และ acidic spacer ได้ถูกอนุรักษ์ไว้อย่างสูง แต่ในส่วนของ mature peptide กลับมีความหลากหลายอย่างมาก จากการศึกษาพบเปปไทด์ด้านจุลชีพในกบหลังโพทที่หลากหลายมากกว่า 1 ชนิด โดยสอดคล้องกับการศึกษาใน *Odorrana grahami* ซึ่งพบเปปไทด์ด้านจุลชีพถึง 107 ชนิด (Li, et al. 2007) จึงมีความเป็นไปได้ว่า ความหลากหลายในระดับโมเลกุลของเปปไทด์ด้านจุลชีพในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นเป็นผลมาจากการเกิด multiple duplication ของยีนต้นกำเนิดหลายครั้ง ระหว่างการเกิดวิวัฒนาการแบบแผ่ขยายทั้งภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน โดยมี selective pressure เป็นตัวคัดเลือกให้บริเวณ N-terminal ของ peptide precursor ถูกอนุรักษ์ไว้ ขณะที่บริเวณ C-terminal มีบทบาทในการตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพที่หลากหลายแตกต่างกันไปแล้วแต่ถิ่นที่อยู่ของสัตว์ (Duda, et al. 2002)

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสและสืบค้นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ใน Antimicrobial Peptide Database พบว่าเปปไทด์ RQ1 ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น ILPLLAGLVHGLSSIFGK มีความยาว 18 กรดอะมิโน และประจุสุทธิ +2 ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพชนิดใด เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง 50 % กับ Temporin-1Od, Brevinin-1DYc, Pelophylaxin-4, Hylin b1 และ Dybowskin-6 เมื่อทำการ Alignment โดยโปรแกรม Vector NTI Advance 11 เทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ด้านจุลชีพชนิดอื่นๆที่มีความใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4) พบว่าเปปไทด์นี้มีความคล้ายคลึงกับ Hylin b1 มากที่สุด รองลงมาใกล้เคียงกับ Temporin-1Od (ภาพที่ 5) แต่จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า เปปไทด์ในกลุ่มของ Temporins มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความหลากหลายสูง โดยส่วนมากประกอบด้วยกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่ง (Lys หรือ Arg) ซึ่งพบ Lys ในเปปไทด์ที่สนใจ และเปปไทด์กลุ่มนี้มีความยาวอยู่ประมาณ 10-14 กรดอะมิโน (Conlon, et al. 2004a) หรือมากกว่านั้นใน *Hylarana latouchii* ซึ่งมีความยาว 17 กรดอะมิโน (Wang, et al. 2009) ซึ่งพบยาวมากที่สุด 19 กรดอะมิโนใน *Rana sakuraii* อีกทั้งยังพบในกบที่มีการกระจายอยู่ในทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปยุโรป และเอเชียอีกด้วย ดังนั้นเปปไทด์ RQ1 ที่สนใจน่าจะมี ความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ในกลุ่มของ Temporins โดยมีความใกล้เคียงกับ Temporin-1Od มากที่สุด

ส่วนเปปไทด์ด้านจุลชีพในกลุ่ม Brevinin-1 มี cyclic domain ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Ala⁹, Cys¹⁸, Lys²³ และ Cys²⁴ ซึ่งเป็นส่วนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในกลุ่มนี้ไม่เปลี่ยนแปลง (Conlon, et al. 2004b) จะพบว่าเปปไทด์ RQ1 ไม่มีลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวจึงไม่น่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม Brevinin-1 และ Dybowskin-6

แต่ก็พบว่ามีส่วนที่คล้ายกับเปปไทด์ที่อยู่ในกลุ่ม atypical Brevinin-1 ด้วยเช่นกัน (Koyama and Iwamuro, 2008) เนื่องจากเปปไทด์กลุ่มนี้มีความแตกต่างออกไปจาก Brevinin-1 ยกตัวอย่างเช่น Brevinin-1Ja ขาดส่วนที่เป็น cyclic domain ที่ปลาย C-terminal แต่กลับพบ $\Rightarrow$ -amidated residue ที่ปลาย C-terminal แทน ส่วนใน Brevinin-1Da มีจำนวนกรดอะมิโน 17 ตัวซึ่งใกล้เคียงกับเปปไทด์ที่สนใจ และมีลำดับกรดอะมิโน 4 ตัวแรก คือ ILPLL เหมือนกัน อีกทั้งยังไม่พบ Pro ซึ่งปรากฏอยู่ในเปปไทด์ด้านจุลชีพส่วนมากในกลุ่มของ Brevinin-1 อีกด้วย นอกจากนี้เปปไทด์ด้านจุลชีพในกลุ่ม Hylin b1 และ Pelophylaxin-4 มีความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ที่สนใจก็จริง แต่เนื่องจากว่า Hylin b1 นั้นพบใน *Hyla biobeba* ที่ประเทศบราซิล ถิ่นที่อยู่นั้นห่างไกลกับ *Rana lateralis* อีกทั้ง *Hyla biobeba* ยังจัดอยู่ใน family Hyllidae ซึ่งอยู่คนละ family กันกับ *Rana lateralis* ที่อยู่ใน family Ranidae ด้วย (Castro, et al. 2005) ส่วน Pelophylaxin-4 พบใน *Pelophylax plancyi fukienensis* (Zhou, et al. 2002) ซึ่งอยู่คนละ genus กับ *Rana lateralis* จึงเป็นไปได้ว่าเปปไทด์ RQ1 ไม่น่าจะอยู่ในสองกลุ่มนี้

Brevinin-1	FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKKC
Brevinin-1DYc	FLPLLLAGLPKLLCLFFKKC
Dybowski-6	FLPLLLAGLPKLLCLFFKKC
Brevinin-1Da	ILPLLLGKVVCAITKKC
Brevinin-1Ja	FLGSLIGAAIPAQKQLLGLKK
Temporin-10d	FLPLLASLFSGLF
Pelophylaxin-4	ILPFLAGLFSKIL
Hylin b1	FIGAILPAIAGLVHGLINR
RQ1	ILPLLAGLVHGLSSIFGK

ภาพที่ 3 แสดงการทำ sequence alignment ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ด้านจุลชีพชนิดต่างๆ ที่คล้ายคลึงกับเปปไทด์ที่สนใจ (RQ1) จากสิ่งมีชีวิตจำพวกกบ



ภาพที่ 4 ภาพผลการจัดกลุ่ม แสดงถึงความสัมพันธ์เปปไทด์ ILPLLAGLVHGLSSIFGK (RQ1) กับเปปไทด์ต้านจุลชีพอื่นๆที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน

นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ที่น่าสนใจจากกบหลังโพลในการนำมาพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป คือ RQ26 ซึ่งมีความยาว 49 กรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกับ Esculentin-1GRa ที่พบในกบแถบเอเชีย คือ *Rana grahami* จัดอยู่ในกลุ่มของ Esculentin-1 ซึ่งพบครั้งแรกใน *Rana esculenta* โดยมีความยาว 46 กรดอะมิโน เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* โดยมีค่า MIC ต่ำมาก ($\text{MIC} < 1 \mu\text{M}$) ถือว่ายับยั้งเชื้อจุลชีพได้ดีแม้ในความเข้มข้นน้อย จากการสังเคราะห์เปปไทด์ขึ้นมาใหม่ให้เป็นเปปไทด์สายตรง โดยประกอบด้วยการแทนที่บางลำดับกรดอะมิโน ได้แก่ Met²⁸ แทนที่ด้วย Leu Cys⁴⁰ แทนที่ด้วย Ser และ Cys⁴⁶ แทนที่ด้วย Ser ทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง จึงมีคุณสมบัติเหมาะแก่การนำมาพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะ ยิ่งไปกว่านั้น ยังมีรายงานการพบเปปไทด์ต้านจุลชีพในกลุ่ม Esculentin-1 อยู่บ่อยมาก เนื่องจากพบยาก

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพนั้น จะมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว (hydrophobicity) มีประจุบวก (cationicity) ที่พอเหมาะ และสามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบ alpha-helix ซึ่งมีสมบัติเป็น amphipathic ได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเปปไทด์ที่ได้จากกบหลังโพลส่วนใหญ่มีประจุสุทธิเป็นบวก และมีเปปไทด์จากบางโคลนสามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบ alpha-helix ได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพจริง ส่วนเปปไทด์จากโคลน RQ13 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น FPDLS EDTIASLLGK มีประจุสุทธิ -2 จึงสันนิษฐานว่าเปปไทด์นี้ไม่มีคุณสมบัติในการเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ และเปปไทด์ RQ29 ซึ่งมีความคล้ายคลึง 37.5 % กับ D51(synthetic; grammar-based design), RQ33 มีความคล้ายคลึง 33.3% กับ Latacin 6c, RQ43 มีความคล้ายคลึง 38.09 % กับ Cupiennin 1a และ RQ14 มีความคล้ายคลึง

38.09% กับ BTD-4(Baboon theta-defensin-4, XXC; baboon, animals; BBMM) เปปไทด์เหล่านี้ไม่น่าจะเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพจริง เนื่องจากมีความคล้ายคลึงน้อยมากกับเปปไทด์ต้านจุลชีพและการมีลำดับกรดอะมิโนที่สั้น เมื่อทำการ Alignment จากฐานข้อมูล APD จึงมีโอกาสเหมือนกันกับเปปไทด์ตัวอื่นที่ไม่ใช่จากสัตว์จำพวกบกได้ง่าย

ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่ากบหลังไหลมีการแสดงออกของยีนกำหนดการสร้างเปปไทด์ที่มีแนวโน้มเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ 5 ชนิด ได้แก่ RQ1 มีความคล้ายคลึงกับ Temporin-1Od 50%, RQ26 คล้ายกับ Esculentin-1GRa 66%, RQ28 คล้ายกับ Brevinin-1SY 66.66%, RQ32 คล้ายกับ Temporin-LTa 68.42% และ RQ45 คล้ายกับ Odorrnanin-B1 85%

จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพของเปปไทด์ RQ1 พบว่ามีค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสองชนิดน้อยกว่า 50 μ M แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบทั้งสองชนิดซึ่งมีค่า MIC มากกว่า 200 μ M นอกจากนี้ฤทธิ์ของเปปไทด์ในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ซึ่งแสดงด้วยค่า HC_{50} มีค่าเท่ากับ 60 μ M ถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงพอสมควร จึงคาดว่าเปปไทด์นี้น่าจะสามารถเป็นแบบอย่างในการนำไปพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไปในอนาคตได้ โดยเหมาะสำหรับใช้ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่เหมาะสำหรับแบคทีเรียแกรมลบ เพราะต้องใช้ในความเข้มข้นสูงๆ ซึ่งทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเปปไทด์ตัวที่คล้ายคลึงกัน คือ Temporin-1Od พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกันกับเปปไทด์ RQ1 แต่มีค่า MIC ที่ต่ำกว่า คือ 13 μ g/ml แต่ตรวจไม่พบฤทธิ์ใน *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนเชื้อก่อโรคอื่นๆ รวมถึงค่า HC_{50} นั้นไม่มีรายงานการทดสอบ จะเห็นได้ว่าเปปไทด์ RQ1 และ Temporin-1Od มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ใกล้เคียงกัน

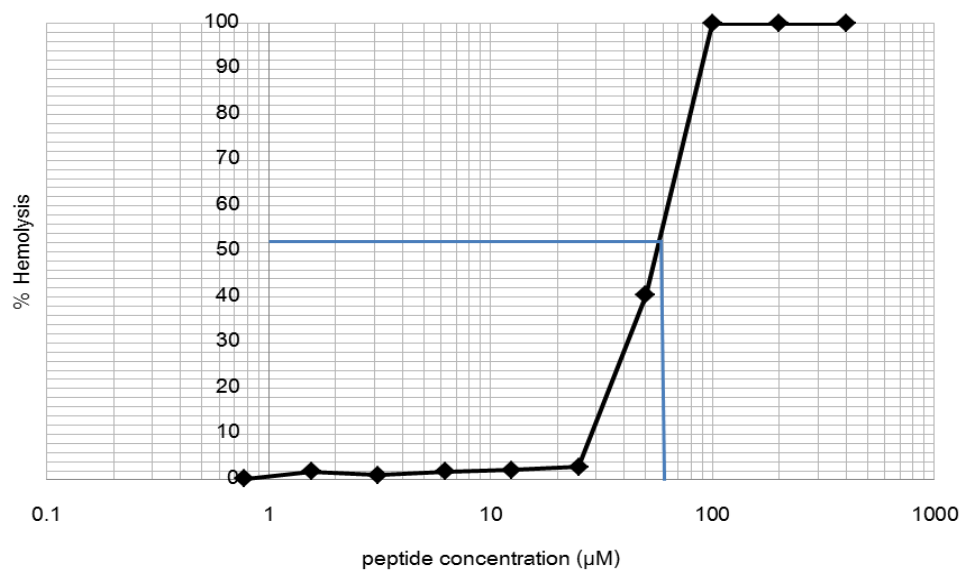
สรุปว่า เปปไทด์ RQ1 อาจยังไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะโดยตรง เนื่องจากมีค่า HC_{50} ที่สูงและต้องใช้ในความเข้มข้นสูงๆจึงจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ จึงอาจจะต้องมีการดัดแปลงลำดับของเปปไทด์เพื่อลดความเป็นพิษลง

เอกสารอ้างอิง

- Castro, M.S., Matsushita, R.H., Sebben, A., Sousa, M.V. & Fontes, W., Hyalins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. *Protein Pept Lett* 12: 89-93 (2005).
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J. & Nowotny, N., Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim Biophys Acta* 1696: 1-14 (2004a).
- Conlon, J.M., Seidel, B. & Nielsen, P.F., An atypical member of the brevinin-1 family of antimicrobial peptides isolated from the skin of the European frog *Rana dalmatina*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 137: 191-6 (2004b).
- Duda, T.F., Jr., Vanhoye, D. & Nicolas, P., Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. *Mol Biol Evol* 19: 858-64 (2002).
- Jagusztyń-Krynica, E.K. & Wyszynska, A., The decline of antibiotic era--new approaches for antibacterial drug discovery. *Pol J Microbiol* 57: 91-8 (2008).
- Koyama, T. & Iwamuro, S., Molecular cloning of a cDNA encoding atypical antimicrobial and cytotoxic Brevinin-1Ja from the skin of the Japanese brown frog, *Rana japonica*. *Zoolog Sci* 25: 487-91 (2008).
- Li, J. et al. Anti-infection peptidomics of amphibian skin. *Mol Cell Proteomics* 6: 882-94 (2007).
- Reddy, K.V., Yedery, R.D. & Aranha, C., Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents* 24: 536-47 (2004).
- VanCompernelle, S.E. et al. Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. *J Virol* 79: 11598-606 (2005).
- Vanhoye, D., Bruston, F., Nicolas, P. and Amiche, M. (2003), Antimicrobial peptides from hyalid and ranid frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European Journal of Biochemistry*, 270: 2068–2081.
- Vicente, M. et al., The fallacies of hope: will we discover new antibiotics to combat pathogenic bacteria in time? *FEMS Microbiol Rev* 30: 841-52 (2006).
- Wang, H. et al., The novel antimicrobial peptides from skin of Chinese broad-folded frog, *Hylarana latouchii* (Anura:Ranidae). *Peptides* 30: 273-82 (2009).

- Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R.E., Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3: 163-75 (2008).
- Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-95 (2002).
- Zhou, M., Chen, T., Walker, B. & Shaw, C., Pelophylaxins: novel antimicrobial peptide homologs from the skin secretion of the Fukien gold-striped pond frog, *Pelophylax plancyi fukienensis*: identification by "shotgun" cDNA cloning and sequence analysis. *Peptides* 27: 36-41 (2006).

ภาคผนวก



ภาพที่ 5 แสดง plot ระหว่าง % hemolysis และ ความเข้มข้นของเปปไทด์ เพื่อใช้ในการหาค่า HC_{50}

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm จากการการทำ hemolysis assay

ความเข้มข้น ของเปปไทด์RQ1 (μ M)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	%hemolysis
400	2.687	2.766	2.927	2.808	100%
200	2.687	2.845	2.880	2.804	100%
100	2.687	2.796	2.901	2.794	100%
50	1.238	1.895	0.252	1.128	40.5%
25	0.106	0.075	0.054	0.078	2.87%
12.5	0.044	0.081	0.046	0.057	2.15%
6.25	0.051	0.086	0.004	0.047	1.79%
3.12	0.009	0.072	0.001	0.027	1.08%
1.56	0.063	0.054	0.029	0.049	1.79%
0.78	0.015	0.015	-0.028	0.0006	0.22%
Negative control	0	0	0	0	0%
Positive control 10%TritonX	2.687	2.796	2.880	2.790	100%

ประวัติคณะวิจัย

ชื่อ-นามสกุล (ไทย) ดร.ภัทรธร ภิญโญพิชญ์
(อังกฤษ) Pataradawn Pinyopich, Ph.D.
ตำแหน่งวิชาการ อาจารย์

ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 218-7533

ที่อยู่ปัจจุบัน 1/32 หมู่ 10 ลาดพร้าว 41 กรุงเทพฯ 10230 โทรศัพท์ 02-539-1128

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปี พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ. เกียรตินิยมอันดับ 1	ชีววิทยา	2538
University of California , San Diego, USA	Ph.D.	Biology	2546

ผลงานที่พิมพ์เผยแพร่

1. Liljegren S.J., Gustafson-Brown C., **Pinyopich A.**, Ditta G.S. and Yanofsky M.F. (1999) Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. Plant Cell. 11:1007-18.
2. **Pinyopich A.**, Ditta G.S., Savidge B., Liljegren S.J., Baumann E., Wisman E. and Yanofsky M.F. (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. Nature. 424:85-8.
3. Favaro R., Pinyopich A., Battaglia R., Kooiker M., Borghi L., Ditta G and Yanofsky M.F., Kater M.M. and Colombo L. (2003) MADS-Box Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in Arabidopsis. Plant Cell. 15:2603-11.
4. Ditta G.S., **Pinyopich A.**, Robles P., Pelaz S., and Martin F. Yanofsky. (2004) The SEP4 Gene of ARABIDOPSIS THALIANA functions in floral organ and meristem identity. Current Biology. 14: 1935-40

ชื่อ-นามสกุล (ไทย) ดร.วิชชุ์ คนเชื้อ
(อังกฤษ) Wichase Khonsue, Ph.D.
หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 2602 00113 502
ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท ปทุมวัน กทม 10330
โทรศัพท์ 02-218-5258
โทรศัพท์มือถือ 081-456-4113
โทรสาร 02-218-5256
E-mail: Wichase.k@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

2533-2536 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2536-2539 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2541-2544 Human and Environmental Studies Kyoto University, Kyoto, Japan

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขานิเวศวิทยาและอนุกรมวิธานสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

2551-2553 ความหลากหลายของชนิดและการใช้พื้นที่ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณ
เทือกเขาหินปูน จังหวัดสระบุรีและลพบุรี เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย
2553-2554 โครงการวิจัยข้อมูลเบื้องต้นของสัตว์มีกระดูกสันหลัง บริเวณพื้นที่เกาะทะลุ เป็น
หัวหน้าโครงการวิจัย
2553-2554 โครงการวิจัยการสำรวจเบื้องต้น microhabitat ของค้างคาวคุณกิตติ

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Othman, MS, Khonsue, W, Kitana, J, Thirakhupt, K, Robson, MG and Kitana, N. 2011. Reproductive mode of *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae) caught from Mae Sot, Thailand based on its gonadosomatic indices. Asian Herpetological Research 2(1): 41-45. แหล่งทุน National Center of Excellence in Environmental and Hazardous Waste Management และ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. Danaisawat, P. A. Pradatsundarasan, and W. Khonsue. 2010. Morphological character of some tadpole from Khao Sip Ha Chan Proposed National Park, 18 Chantaburi Province. Journal of Wildlife in Thailand. 17: 64-103. in Thai แหล่งทุนโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

3. Khonsue, W., T. Chaiananporn, and P. Pomchot. 2010. Skeletochronological assessment of age in the Himalayan Crocodile newt, *Tylototriton verrucosus* (Anderson, 1871) from Thailand. *Tropical Natural History* 10 (2): 181-188. แหล่งทุนโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยและทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. Phochayavanich, R., Voris, H.K., Khonsue, W., Thunhikorn, S. and Thirakhupt, K. 2010. Comparison of stream frog assemblages at three elevations in an evergreen forest, North-Central Thailand. *Zoological Studies* 49(5): 632-639. ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. Suttinee, Lhaoteaw, Chatchawan Chaisuekul and Wichase Khonsue. 2010. Feeding ecology of Big-headed frog, *Limnonectes macrongathus* (Boulenger, 1917), in natural forest, Nan Province. 36th Congress on Science and Technology of Thailand 26-28 October, 2010 . Bangkok, Thailand. P. 1-6. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
6. Patchara Danaisawat, Art-ong Pradatsundarasan and Wichase Khonsue. 2009. Habitat selection and relationships between annual occurrence of amphibians and climatic factors at Khao Sip Ha Chan National Reserve Forest, Chantaburi province. Abstract 13th BRT Annual Conference, Chiang Mai. p. 142. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
7. Pataradawn Pinyopich, Worrapong Kit-anan, Sirirat Rengpipat and Wichase Khonsue. 2009. Molecular cloning of antimicrobial peptide genes from the tree frog, *Rhacophorus feae*. Abstract 13th BRT Annual Conference, Chiang Mai. p. 139. แหล่งทุนโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
8. Kan Nitiroj and Wichase Khonsue. 2009. Vertical distribution and diets of the Median-striped bullfrog, *Kaloula mediolineata* (Smith, 1917), in San Ngao district, Tak Province. Abstract 13th BRT Annual Conference, Chiang Mai. p. 136. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
9. Anusorn Pansook, Wichase Khonsue, Sanit Piyapattanakorn and Putsatee Pariyanonth. 2009. Genetic diversity of the rice field frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiengmann, 1853), in natural habitats in Thailand by mitochondrial DNA (16SrRNA and cytochrome-b sequences). Abstract 13th BRT Annual Conference, Chiang Mai. p. 135. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
10. Othman, MS, Khonsue, W, Kitana, J, Thirakhupt, K, Robson, MG and Kitana, N. 2009. Hepatic biomarker responses in the frog, *Fejervarya limnocharis*, naturally exposed

- to environmental stress from cadmium contamination. Abstract, 16th International Congress of Comparative Endocrinology, Hong Kong S.A.R., China (P69). 19 แหล่งทุน National Center of Excellence in Environmental and Hazardous Waste Management และ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11. วิเชษฐ์ คนชื่อ. 2008. 2008 ปีแห่งการอนุรักษ์กับ 2008 ปีแห่งการอนุรักษ์กับ: วิฤติการสูญพันธุ์ และ บัญชีแดง. การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 12. 10-13 ตุลาคม 2551 โรงแรมไดมอนด์พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

ชื่อ-นามสกุล (ไทย) ผุสดี ปริยานนท์
(อังกฤษ) Pusatee Pariyanonth
ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท
ปทุมวัน กทม 10330
โทรศัพท์ 02-218-5372
โทรสาร 02-218-5386
E-mail: Putsatee.p@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา:

ปริญญา	ปีจบ	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ประเทศ
B.Sc.	1976	Animal Science	Khon Kean University	Thailand
M.Sc.	1982	Biology	Creighton University	U.S.A.

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์เลื้อยคลาน, การเพาะเลี้ยงกบ

ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ

1. Pariyanonth, P., Israngura, K., Jayasavasti, S., Nootprapan, T and Pradatsundarasar, A. 1985. Non Complete Cycle of Frog-farming. *J. Sci. Res. Chula. Univ.* 1(1): 46-55.
2. Pariyanonth, P., Chanpong, N., Watanasermkit, K., Meakwichai, V. and Rasmitta, A. 1985. Complete Cycle of Frog-farming. *J. Sci. Res. Chula. Univ.* 10(1):56-77.
3. Israngura, K., Chanpong, N., Nootprapan, T. and Pariyanonth, P. 1989. General Morphology and Anatomy of Frog (*Rana tigerina*). *J. Sci. Res. Chula. Univ.* 14(2): 91-98.
4. Rasmittad, A., Watanasermkit, K and Pariyanonth, P. 1989. Comparative Study of Protozoan in Frogs (*Rana tigerina*) in Farms and Natural habitats. *J. Sci. Res.Chula. Univ.* 14(2): 99-104.
5. Nootprapan, T. and Pariyanonth, P. 1991. Induction of Ovulation and Spermiation in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) outside of the normal breeding season by GnRH analogue. *J. Sci. Res. Chula. Univ.* 16(2): 97-101.
6. Tangpraputgul, P., Pariyanonth, P. and Chaitiamwong, R. 1996. Seasonal Changes in Plasma Gonadal Steroids in *Rana tigerina rugulosa* and *Rana catesbeiana*. *Thai J.Physiol. Sci.* 9(1): 35-44.

7. Chulaluksananukul, W., Suwanakerd A. and Pariyanonth, P. 1998. Karyotypic Study of *Kaloula mediolineata* (Amphibia:Microhylidae). **J. Sci. Res. Chula.Unvi.**, 23(2): 129-134.
8. Tangpraputgul, P and Pariyanonth, P. 1999. The Influence of Transportation on Plasma Gonadal Steroid Concentration in Adult Frogs, *Rana tigerina rugulosa* and *Rana catesbeiana*. **Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology**. Pp477-481.
9. Puangwatana, V., Chulaluksananukul, W., Pariyanonth, P. and Suwattana, D. 2002. Karyological studied of the lizard *Leiolepis belliana belliana* at Samaesarn island and nearby islands in Chonburi Provinces. **J. Sci.Res.Chula. Unvi., (Section T)**. 1(1): 45-67.
10. Chockchaichomnankit, P., Chulaluksananukul, W. and Pariyanonth, P. 2002. Sex Chromosome Identification of the frog *Hoplobatrachus rugulosus* by chromosome Banding Technique. **J. Sci. Res.Chula. Unvi., (Section T)**. 1(1): 154-166.
11. Chairat, A., Tangpraputgul, P., Pariyanonth, P. and Watanasirmit, K. 2003. Effect of Methylparathion on the Repreductive System in Male Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus*. **J. Sci. Res.Chula. Unvi.** Special Issue (NRC EHWM): 29-38.
12. Aranyavalai, V., Thirakhupt, K., Pariyanonth, P. and Chulalaksananukul, W. 2004. Karyotype and Unisexuality of *Leiolepis boehmei* Darevsky and Kupriyanova, 1993 (Sauria: Agamidae) from southern Thailand. The Natural History Journal of Chulalongkorn University 4(1): pp15-

Proceeding

1. Pariyanonth, P. and Daorerk, V. 1994. Frog farming in Thailand. **The Proceedings of Infofish-Aquatech ' 94, International conference on Aquaculture**. 29-31 August 1994, Colombo, Srilanka
2. Pariyanonth, P., Nootprapan, T. and Chanpong, N. 1996. Stock Selection and Growth Rate of *Rana tigerina* and *Rana catesbeiana*. **Proc. of the 3rd Congress of the AOSCE**. 22-26 January 1996, Sydney, Australia.
3. Tangpraputgul, P., Chaitiamwong, R. and Pariyanonth, P. 1996. Annual Sex Steroid Profiles in Female *Rana tigerina* and *Rana catesbeiana*. **Proc. of the 3rd congress AOSCE**. 22-26 January 1996, Sydney, Australia.

4. Chulalaksananukul, W., Suwanakerd, W. and Pariyanonth, P. 1996. Karyotypic study of *Kaloula mediolineata*. **Proceeding of the Third Asia-Pacific Conferences on Agricultural Biotechnology**: 10-15 November, 1996, Prachuapkirikhan, Thailand.
5. Nootprapan, T., Pariyanonth, P., Werawatgoompa, S. and Krogstad, A. 1997. The effect of different GnRH analogues in inducing spawning in *Rana rugulosa*. **The proceeding of 13th International Congress of Comparative Endocrinology**, 17-21 November 1997, Yokohama, Japan.
6. Tangpraputgul, P., Chanchoa, C and Pariyanonth, P. 2004. Effect of Methylparathion on Liver Vitellogenin gene in female frogs, *Rana rugulosa* . **Fifth Congress of AOSCE for Comparative Endocrinology in Conjunction with the Annual Meeting of Japan Society for Comparative Endocrinology**. 26-30 March 2004, Nara, Japan
7. Chutmongkonkul, M., Khonsue, W. and Pariyanonth, P. 2006. Blood parasites of six species of wild amphibians from Khun Mae Kuang forest area, Thailand. **Proceeding of AZWAP 2006**. 26-29 October, 2006.
8. Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. Hematozoa of amphibians in Thailand. **Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians**. 14-18 April 2007, New Orleans, Louisiana.

Congress

1. พงนิญ์ เจริญพงษ์สกุล, มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ผุสดี ปริยานนท์. 2545. ผลของ Levamisole ต่อพยาธิตัวกลมในเต่าเหลือง *Indotestudo elongata* ณ สวนสัตว์ดุสิต **การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 10 (20-22 มีนาคม 2545) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**: หน้า 148.
2. วิถี เหมือนวอน, ลลิตา เรียบร้อยเจริญ, มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ผุสดี ปริยานนท์. 2546. หนอนพยาธิที่พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก อันดับแอนูรา ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี **การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**: หน้า 8.
3. มาลินี ฉัตรมงคลกุล, ผุสดี ปริยานนท์ และ สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา. 2548. ประสิทธิภาพของกิ้งก่าบิน (*Draco spp.*) พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. **การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. นครราชสีมา**: หน้า 124-125.
4. ประวีร์ พรหมโชติ, วิเชษฐ คนชื้อ, และผุสดี ปริยานนท์. 2549. วงศ์วานวิวัฒนาการของกะท่างน้ำใน ประเทศไทยโดยใช้ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ. **การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 10**: หน้า 88.

5. อนุสรณ์ ปานสุข ศานิต ปิยพัฒน์กร และ ผุสดี ปริยานนท์. 2550. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแอสกุล *Leiolepis* ที่พบในประเทศไทย จากลำดับเบสของยีน 12S rRNA ในไมโทคอนเดรีย . **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 15 “พันธุศาสตร์กับการพัฒนาประเทศตามแนวเศรษฐกิจพอเพียง”**: หน้า 213.
6. ศานิต ปิยพัฒน์กร อนุสรณ์ ปานสุข สุริยา แสงพงศ์ และ ผุสดี ปริยานนท์. 2550. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแอส *Leiolepis belliana belliana* บริเวณชายฝั่งตะวันออกและแอ่งในทะเลอ่าวไทย. **การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย: ประโยชน์แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 จ. ชลบุรี**: หน้า 38-42.
7. พัชร ดนัยสวัสดิ์ อนุสรณ์ ปานสุข วิเชษฐ์ คนชื้อ และ ผุสดี ปริยานนท์. 2550. ความหลากหลายของชนิดและสถานภาพด้านการอนุรักษ์สัตว์เลื้อยคลานของเกาะกูด. **การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย: ประโยชน์แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 จ. ชลบุรี**: หน้า 207-212.
8. วิเชษฐ์ คนชื้อ อนุสรณ์ ปานสุข พัชร ดนัยสวัสดิ์ และ ผุสดี ปริยานนท์. 2550. ความหลากหลายของชนิดและสถานภาพด้านการอนุรักษ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของเกาะกูด. **การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย: ประโยชน์แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 จ. ชลบุรี**: หน้า 213-217.
9. มาลีณี ฉัตรมงคลกุล วิเชษฐ์ คนชื้อ พงชัย หาญยุทธนากร และ ผุสดี ปริยานนท์. 2550. ปริมาณเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะกูด จังหวัดตราด. **การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย: ประโยชน์แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 จ. ชลบุรี**: หน้า 300-309.
10. Patinawin, S. and Pariyanonth, P. 1988. The karyotypic study of *Rana tigerina*. **14th Congress on Science and Technology of Thailand**. 19-21 October 1988.
11. Pariyanonth, P., Nootprapan, T. and Chanpong, N. 1990. Preliminary Study of the Hormones Induced Spawning in Tiger-frog (*Rana tigerina*) and Metamorphosis of the tadpoles. **28th Congress on Agricultural Science and Technology of Thailand**. 29-31 January 1990.
12. Pariyanonth, P., Nootprapan, T. and Chanpong, N. 1991. Use of GnRh analogue in induced Reproduction of Frog (*Rana tigerina*). **17th Congress on Science and Technology of Thailand**. 24-27 October 1991.
13. Nootprapan, T. Pariyanonth, P. and Chanpong, N. 1991. Induction of Ovulation and Spermiation in Common low land Frog (*Rana rugulosa*) by gonadotropin releasing hormone (GnRH analogue). **17th Congress on Science and Technology of Thailand**. 24-27 October 1991.

14. Chulalaksananukul, W., Pariyanonth, P. and Chockchaichomnankit, P. 1997. Sex chromosome study of *Rana catesbeiana*. **Chulalongkorn University 80th Anniversary Research Conference**. 15-17 October 1997, Bangkok, Thailand.
15. Chairat, A., Tangpraputgul, P., Pariyanonth, P. 2002. Effect of Methylparathion on Plasmatestosterone levels in Male Frogs, *Ranarugulosa*. **Fourth Intercongress Symposium of AOSCE**. Guanzhou, China.
16. Chutmongkonkul, M and Pariyanonth, P. 2005. Endoparasites of five species of anurans in Thailand. **5th World Congress of Herpetology**. 19-24 June 2005, Stellenbosch, South Africa: 125.
17. Chutmongkonkul, M., Pariyanonth, P., Tangtrongpiros, J. and Sailasuta, A. 2005. *Lankesterella* in *Hoplobatrachus rugulosus* in Thailand. **31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005**. Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
18. Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2005. Helminths and Blood Parasites of Butterfly Lizards, *Leiolepis* spp., in Thailand. **31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005**. Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
19. Pariyanonth, P., Singh-asa, P. and Pansook, A. 2005. Investigation for genetic markers in Rugose Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* by isozyme data. **31st Congress on science and technology of Thailand. 18-20 October 2005**. Technopolis, Suranaree University of technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
20. Pansook, A., Pariyanonth P. and Chulalanksananukul, W. 2005. Relationship between isozyme heterozygosity and morphological characters of white lined frog *Fejervarya limnocharis*. **14th Genetic Congress**. 11-13 March 2005, Bangkok, Thailand.
21. Pariyanonth, P., Chutmongkonkul M. and Pansook, A. 2005. The remonitoring amphibian species in Plant Genetics Conservation Project under the Royal Initiative of her Royal Highness Princess Mahachakri Sirindhon, Tablan National Park, Kornburi District, Nakhon Ratchasima Province. **The Royal Initiative of her Royal Highness Princess Mahachakri Sirindhon Congress, 17-22 October 2005.**, Nakhon Ratchasima, Thailand.
22. Sungsirin, N., Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2006. *Lankesterella* in Rice-field frog, *Hoprobatrachus rugulosus* and its infection in Glossiphoniid leech. **32nd**

- Congress on Science and Technology of Thailand (STT.32). 10-16 October 2006, Bangkok, Thailand.
23. Sungsirin, N., Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2006. Breeding of Glossiphonid Leech, *Placobdelloides siamensis* (oka, 1997) in Laboratory. **The 11th Biological Science Graduate Congress**. 15-17 December 2006, Bangkok, Thailand.