

1. บทนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยซึ่งนำเข้ารายได้ให้กับประเทศ แต่ปัจจุบันผลผลิตของกุ้งกุลาดำมีจำนวนลดลง ปัญหาของโรคติดเชื้อที่เกิดในกุ้งนั้นส่วนใหญ่จะเกิดจากไวรัสและแบคทีเรีย ซึ่งโรคติดเชื้อจากไวรัสนั้นสามารถทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็วและอัตราการตายสูง (Bonami *et al.*, 2008) นอกเหนือไปจากการที่ทำให้เกิดการตายของกุ้งแล้ว ไวรัวยังก่อให้เกิดปัญหาทั้งแกระแกรน หรือมีลักษณะที่ผิดปกติ ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคอีกด้วย ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งนั้นมีหลายชนิด ได้แก่ white-spot syndrome virus (WSSV) yellow-head virus (YHV) hepatopancreatic parvovirus (HPV) monodon baculovirus (MBV) taura syndrome virus (TSV) infectious hypodermal and hematopoietic virus (IHHNV) Mourilyan virus (MOV) และ Laem Singh virus (LSNV) (Flegel, 2006) นอกจากผลกระทบต่อปริมาณของผลผลิตแล้ว ไวรัสบางชนิดยังส่งผลให้กุ้งมีการแกระแกรน ได้แก่ ไวรัส HPV IHHNV และ MBV (Chayaburakul *et al.*, 2004) ซึ่งไวรัสหลักที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของกุ้ง คือ WSSV YHV และ TSV (Liu *et al.*, 2009)

แม้ว่าไวรัสที่ก่อปัญหาร้ายแรงในกุ้งนั้นจะมีหลายชนิด เช่น WSSV YHV TSV แต่การศึกษาส่วนใหญ่ไม่ได้มุ่งไปทางการติดเชื้อ WSSV ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดความสูญเสียของผลผลิตเป็นจำนวนมากทั้งในกุ้งและสัตว์ตระกูล crustaceans อื่นๆ (Flegel, 1997; Lo *et al.*, 1996) ความพยายามที่จะยับยั้งและควบคุมการติดเชื้อของไวรัส WSSV นั้น มีทั้งการใช้วัคซีนจาก viral envelope protein การใช้ RNA interference ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการใช้โปรตีนต้านไวรัส เป็นต้น (Liu *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2003; Robalino *et al.*, 2007; Roch *et al.*, 2008; Wittevelde *et al.*, 2004a; Wittevelde *et al.*, 2004b; Zhang *et al.*, 2004) นอกจากการศึกษาด้านไวรัส WSSV แล้วยังมีการศึกษาใน YHV และ TSV ได้แก่ การนำ anti glycoprotein (gp116) antiserum มาใช้ในการยับยั้งการติดเชื้อ YHV (Assavalapsakul *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีการกวดการแสดงออกโปรตีนของไวรัส YHV โดยใช้ dsRNA พบว่า การฉีด YHV-protease dsRNA นั้นสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส YHV ได้ทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* (Tirasophon *et al.*, 2005; Tirasophon *et al.*, 2007) สำหรับการศึกษาการต้านไวรัส TSV นั้นมีการผลิต transgenic shrimp ที่มี antisense TSV-coat protein gene ซึ่งทำให้อัตราการรอดเมื่อติดเชื้อ TSV นั้นสูงถึง 83% (Lu & Sun, 2005) และการศึกษาถึงการ binding ของโปรตีนจากกุ้งต่อ TSV capsid protein (Senapin & Phongdara, 2006)

โปรตีนต้านไวรัสก็เป็นหนทางหนึ่งในการที่จะยับยั้งและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในไวรัส WSSV เช่น โปรตีน PmAV ซึ่งเป็น C-type lectin ชนิดหนึ่งที่ได้จากกุ้งกุลาดำนั้น แสดงการยับยั้งการเกิด cytopathic effect ใน fish cell culture (Luo *et al.*, 2003) นอกจากนี้ C-type lectin จากกุ้งขาวก็แสดงสมบัติการต้านไวรัสด้วยเช่นกัน (Zhao *et al.*, 2009) โปรตีน hemocyanin จากกุ้งก็สามารถแสดงการต้านไวรัสจากปลา และ WSSV (Lei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2004) และเมื่อไม่นานมานี้ยังพบว่า anti-lipopolysaccharide factor-3 (ALFPm3) ซึ่งเป็นโปรตีนต้านจุลชีพในกุ้งกุลาดำที่มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงเราสามารถแสดงสมบัติการต้านไวรัส WSSV ทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* (Somboonwivat *et al.*, 2005; Tharntada *et al.*, 2009) นอกจากโปรตีนจากกุ้งแล้วยังพบว่าโปรตีนจาก *Mytilus galloprovincialis* ก็แสดงสมบัติการต้านไวรัส WSSV และลดอัตราการตายของกุ้งได้อีกด้วย (Dupuy *et al.*, 2004; Roch *et al.*, 2008)

โปรตีน ALFPm3 แสดงสมบัติในการต้านจุลชีพได้หลายชนิดทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ รา และไวรัส WSSV นอกจากนี้ยังพบว่า ALFPm3 สามารถต้านไวรัส Herpes simplex virus 1 ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในคน (Carriel-Gomes *et al.*, 2007) นอกจากนี้โปรตีน ALFPm3 ที่พบในกุ้งกุลาดำแล้ว ในฐานข้อมูลของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Expressed Sequence Tag database (<http://pmonodon.biotec.or.th>) (Tassanakajon *et al.*, 2006) ยังพบยีนของโปรตีนต้านจุลชีพชนิดอื่น ได้แก่ crustin lysozyme และ penaeidin (Amparyup *et al.*, 2008; Supungul *et al.*, 2004; Supungul *et al.*, 2008; Vatanavicharn *et al.*, 2009) ซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีนจากยีนเหล่านี้อาจจะมีฤทธิ์ในการต้านไวรัส การศึกษาสมบัติของโปรตีนเหล่านี้ในการต้านไวรัสจึงมีความสำคัญที่จะทำให้ค้นพบโปรตีนในกุ้งชนิดใหม่ซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อการป้องกันหรือรักษาโรคระบาดที่เกิดจากไวรัสได้

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสมบัติการต้านไวรัสของโปรตีนต้านจุลชีพจากกุ้งกุลาดำ ซึ่งจะเป็นแนวทางสำคัญในการควบคุมโรค โดยจะศึกษาการตอบสนองของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพเมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะที่ติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และศึกษาถึงบทบาทการต้านไวรัสของโปรตีนต้านจุลชีพ โดยผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของโปรตีนต้านจุลชีพและนำมาทดสอบสมบัติการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การจัดเรียงตัวของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ

ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากกุ้งกุลาดำโดยใช้วิธีสกัดแบบ phenol-chloroform extraction และ ออกแบบไพรเมอร์ที่จะใช้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA จากยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ ALFPm6 และ PmStylicin ลำดับของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ได้จะนำมาใช้ทำ PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ กุ้งกุลาดำเป็น template โดยในแต่ละ reaction ของ PCR ปริมาตร 50 µl นั้นจะประกอบไปด้วย เอนไซม์ RBC Taq DNA Polymerase (RBC Bioscience) 1 Unit, สารละลาย 1 × reaction buffer (10 mM KCl, 2 mM MgSO₄·7H₂O, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% Triton X-100, 10mM(NH₄)₂SO₄ and 0.1 mg/ml BSA), dNTP mixture ความเข้มข้น 200 mM, ไพรเมอร์ forward primer และ reverse primer อย่างละ 0.2 mM อุณหภูมิที่ใช้ทำ PCR คือ 94°C นาน 10 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที, 65°C เป็นเวลา 40 วินาที, 72°C เป็นเวลา 90 วินาที และ 1 รอบ ของ 72°C เป็นเวลา 10 นาที PCR product ที่ได้จะถูกนำมา โคลนเข้าสู่ TA cloning vector (RBC Bioscience) เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่นำมาใช้หาการจัดเรียงตัวของยีน

Gene	Primers	Sequence (5'-3')
ALFPm6	ALF6_GF	GTCCATCATGCGAGTGTCAGTCTTCAG
	ALF6_GR	TCGTCGCCTTAATTATTCAGCCAAG
PmStylicin	SLC_GF	CCACACATCTGCTGCCATCA
	SLC_GR	TCTTTATCCATTATAGCCTCCCT

2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ (ALFPm และ PmStylicin) ในขณะที่กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ ยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพในการเพิ่มจำนวนยีนนั้นๆ แล้วเปรียบเทียบปริมาณ PCR product ที่ได้ระหว่างกลุ่ม ของกุ้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ เพื่อให้ทราบถึงการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพในสภาวะที่กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

2.2.1 กลุ่มตัวอย่างของสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน PmStylicin และศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ALF (ALFPm3 และ 6) เมื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัส WSSV จึงได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างของกุ้งกุลาดำเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง โดยในกลุ่มทดลองนั้นจะทำการฉีดเชื้อไวรัสที่เจือจางแล้ว (dose ที่ทำให้กึ่งกลาดำตาย 100% ภายใน 5 วัน) ส่วนกลุ่มควบคุมจะถูกฉีดด้วยสารละลายที่ใช้ในการเจือจางเชื้อไวรัส จากนั้นจะทำการเก็บเลือดที่เวลาตั้งแต่ 0 ถึง 48 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัด RNA เพื่อนำไปสร้าง first-strand cDNA ต่อไป โดยในแต่ละช่วงเวลาที่จะเก็บเลือดนั้นจะใช้กึ่ง 3 ตัว

2.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

นำเลือดกึ่งที่เก็บได้มาสร้าง first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ และยีนกลุ่ม housekeeping gene จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis และวัดปริมาณ PCR product จากความเข้มของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) ค่าการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพจะเทียบเป็น relative expression กับยีน housekeeping gene เมื่อได้ผลของการแสดงออกโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ดังที่กล่าวไปแล้วจึงนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านจุลชีพ โดยมียีน housekeeping gene เป็นยีนควบคุม แต่ละการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และนำข้อมูลที่ได้หาค่า threshold cycle (C_T) ไปวิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Pfaffli แล้วจึงนำไปหาค่าทางสถิติเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของค่าการแสดงออกของยีนด้วย independent samples t-test

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

Gene	Primers	Sequence (5'-3')
ALFPm3	ALFPm3QF	CCCACAGTGCCAGGCTCAA
	ALFPm3QR	TGCTGGCTTCTCCTCTGATG
ALFPm6	ALFPm6F	AGTCAGCGTTTAGAGAGGTT
	ALFPm6R	GCTCGAACTCTCCACTCTC
PmStylicin	SLC_F	AGGACCTTCAGCCAGGTCTC
	SLC_R	CATACACGATGCCGACATTC
β-ACTIN	β-ACTINQRTF	GAACCTCTCGTTGCCGATGGTG
	β-ACTINQRTR	GAAGCTGTGCTACGTGGCTCTG
EF-1alpha	EF-1alphaF	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC
	EF-1alphaR	CGTTCGGTGATCATGTTCTTGATG

2.3 การศึกษาสมบัติของโปรตีนต้านจุลชีพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส

2.3.1 การผลิตโปรตีนต้านจุลชีพด้วยเทคนิครีคอมบิแนนท์

โปรตีนรีคอมบิแนนท์สไลซินจะผลิตโดยระบบ *E. coli* expression system โดยใช้เวกเตอร์ pVR500 ซึ่งโปรตีนที่ได้จะอยู่ในรูป fusion protein (rTrx-PmStylicin) ทางปลายของหมู่อะมิโนจะเชื่อมกับโปรตีน thioredoxin (trx) ส่วนทางปลายของหมู่คาร์บอกซิลจะเชื่อมกับ polyhistidine tag โปรเมอร์จะออกแบบจากลำดับ cDNA ของยีนสไลซินบริเวณที่กำหนดรหัสของ mature peptide (ตารางที่ 3) โปรเมอร์ที่ได้จะนำมาทำ PCR ซึ่งใน recation ปริมาตร 50 μ l นั้นจะประกอบไปด้วย เอนไซม์ Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) 1 Unit, สารละลาย 1 $\times$ Phusion HF buffer, dNTP mixture ความเข้มข้น 200 mM, โปรเมอร์ forward primer และ reverse primer อย่างละ 0.2 mM อุณหภูมิที่ใช้ทำ PCR คือ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วย 28 รอบ ของ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 55°C เป็นเวลา 30 วินาที, 72°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 1 รอบ ของ 72°C เป็นเวลา 5 นาที PCR product ที่ได้จะถูกนำมาโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pVR500 บริเวณตำแหน่ง *NcoI* และ *XhoI* จากนั้นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จะถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบการ in-frame ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และนำไปทรานส์ฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3)pLysS เลี้ยงในอาหารเชื้อ LB broth ที่มี ampicillin จนกระทั่งได้ OD₆₀₀ อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 และทำการเหนี่ยวนำด้วย isopropyl thiogalactose (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1 mM จากนั้นจะเก็บเซลล์ของแบคทีเรียที่เวลา 4 ชั่วโมงแล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator โดยตั้งค่าที่ pulse on 2 วินาที สลับกับ pulse off 2 วินาที 30% Amplitude 4.30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 30 นาที 4°C แยกส่วนของ soluble protein ออกมาเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรเมอร์ที่นำมาสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pVR500-PmStylicin

Primers	Sequence (5'-3')
SLC_NcoIF	TGACCATGGAT-TCTTCCTTCTATGCACCCAG
SLC_XhoIR	TGCTCTCGAG-TCCATTATAGCCTCCCTTTT

2.3.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี

โปรตีนที่ผลิตได้นั้นอยู่ในรูปของ fusion protein ที่มีการเชื่อมกับโปรตีน thioredoxin (Trx) ที่ปลายหมู่อะมิโน กับโปรตีนที่เราสนใจ (rTrx-PmStylicin) ซึ่งทางปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล นั้นจะมี polyhistidine tag (His-tag) อยู่ ดังนั้นจึงจะทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะด้วยนิกเกิล (nickel affinity chromatography) เริ่มต้นจากการ equilibrate Ni-column (Ni Sepharose™ 6 Fast Flow) ด้วยสารละลาย binding buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) จากนั้นบ่มโปรตีนใน Ni-column เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วจึงเก็บส่วนของ flow-through fraction และล้างโปรตีนอื่นที่ไม่

เกี่ยวข้องออกด้วย สารละลาย binding buffer จนกระทั่ง OD₂₈₀ เป็นศูนย์ เซโปรตีนที่เราสนใจออกด้วย สารละลาย elute buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0) แล้วเก็บ สารละลายที่ชะออกมา (elute fraction) หลอดละ 1.5 ml นำส่วนของ flowthrough fraction, wash fraction และ elution fraction มาวัดปริมาณโปรตีนที่ OD₂₈₀ และวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE

เนื่องจากโปรตีน rTrx-PmStylicin ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์นั้นละลายอยู่ในสารละลาย elute buffer จึงต้อง เปลี่ยนให้โปรตีนดังกล่าวไปละลายอยู่ในสารละลาย enterokinase buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0) ซึ่งเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ enterokinase เพื่อให้เอนไซม์นั้นสามารถตัดส่วนของ โปรตีน thioredoxin ออกจาก rPmStylicin โดยการเปลี่ยนสารละลายนั้นจะใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบ เจลฟิลเตรชันด้วย Sephadex™ G-25 (PD-10 Desalting Columns) คอลัมน์จะถูก equilibrate ด้วยสารละลาย enterokinase buffer ก่อนที่จะเติมโปรตีนลงไปคอลัมน์ จากนั้นเติมโปรตีนลงไป แล้วจึงทำการชะโปรตีนออก ด้วยสารละลาย enterokinase buffer นำโปรตีนที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ enterokinase ซึ่งมีความจำเพาะต่อ ลำดับของกรดอะมิโน Asp-Asp-Asp-Asp-Lys โดยจะใช้เอนไซม์ต่อโปรตีนในอัตราส่วน 0.0002% (w/w) แล้วบ่ม ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ว่าโปรตีนถูกตัดสมบูรณ์หรือไม่ด้วยวิธี SDS-PAGE หลังจากนั้นทำการแยกโปรตีน rPmStylicin ออกจาก thioredoxin โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจับ จำเพาะด้วยนิกเกิล ซึ่งนิกเกิลนั้นจะจับจำเพาะกับ polyhistidine tag (His-tag) ที่อยู่ทางปลายด้านหมู่คาร์บอกซิ ลของโปรตีน rPmStylicin เท่านั้น โดยมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับการทำโปรตีน rTrx-PmStylicin ให้ บริสุทธิ์ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น จากนั้นจะเปลี่ยนตัวทำละลายของโปรตีน rPmStylicin ด้วย Sephadex™ G-25 เพื่อให้โปรตีนละลายอยู่ใน 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE ยืนยันผลด้วย Western blot analysis ด้วย anti-His antibody (GE Healthcare) ก่อนที่จะไปทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพ

2.3.3 การทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่ม

โปรตีน rPmStylicin จะถูกนำมาทดสอบสมบัติการต้านแบคทีเรียเพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง การเจริญของของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี liquid growth inhibition assay กับแบคทีเรียดังต่อไปนี้ *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยเลี้ยงแบคทีเรียและเจือจางแบคทีเรียให้ได้ OD₆₀₀ = 0.001 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ Poor Broth nutrient medium (1% bactotryptone, 0.5% (w/v) NaCl, pH 7.5) และ สำหรับกลุ่มเชื้อ *Vibrio* จะเจือจางในอาหาร saline peptone water (1.5% peptone, 1.5% NaCl, pH 7.2) ปิเปตเชื้อที่เจือจางแล้ว 50 µl ลงในหลุมของ 96-well microtiter plates ที่มีโปรตีนที่ต้องการทดสอบ 50 µl โดยใช้ตัวทำละลายของโปรตีนเป็น negative control นำไปเขย่าที่ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ บันทึกผลการทดลอง และดูความสามารถของโปรตีนในการเหนี่ยวนำให้ แบคทีเรียเกาะกลุ่ม (bacterial agglutination) ผ่านกล้องจุลทรรศน์

2.3.4 การทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum*

นำโปรตีน rPmStylicin มาทดสอบสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* โดยเจือจางสปอร์ของราให้ได้ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/ml ด้วย ½ Sabouraud dextrose broth ที่มี 10 µg/ml tetracycline และ 0.1% tween80 ปิเปตสารละลายของรา 50 µl ลงในหลุมของ 96-well microtiter plates ที่มีโปรตีนที่ต้องการทดสอบ 50 µl โดยใช้ตัวทำลายของโปรตีนเป็น negative control นำไปบ่มที่ 30°C และทำการติดตามการเจริญของรากับกล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการทดลอง

2.3.5 การทดสอบสมบัติการยับยั้งไวรัส White spot syndrome virus (WSSV)

นำโปรตีน rPmStylicin มาทดสอบสมบัติการยับยั้งการ propagation ของไวรัส WSSV ในกุ้งกุลาดำ การทดลองแบ่งกุ้งกุลาดำเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มทดลองจะถูกฉีดด้วยเชื้อไวรัสที่เจือจางแล้ว (1/10 เท่า ของ dose ที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 100% ภายใน 5 วัน) โดยจะบ่มกับโปรตีน rPmStylicin ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะฉีด กลุ่มควบคุมจะถูกฉีดด้วยไวรัส WSSV ที่บ่มกับตัวทำลายของโปรตีน หลังจากนั้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเลือด แล้วนำมาสกัด RNA เพื่อนำไปสร้าง first-strand cDNA วิธีดังข้างต้น และนำ cDNA ที่ได้มา semi-quantitative RT-PCR เพื่อการ propagation ของไวรัส WSSV โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนของ VP28 ซึ่งเป็นยีนของไวรัส WSSV และยีน EF-1 alpha ซึ่งเป็น housekeeping gene (ตารางที่ 4) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis และวัดปริมาณ PCR product จากความเข้มของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) ค่าการแสดงออกของยีนของ VP28 จะเทียบเป็น relative expression กับยีน EF-1 alpha

ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการ propagation ไวรัส WSSV

Gene	Primers	Sequence (5'-3')
VP28	VP28RTF	TCACTCTTTCGGTCGTGTCG
	VP28RTR	CCACACACAAAGGTGCCAAC
EF-1alpha	EF-1alphaF	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC
	EF-1alphaR	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG

3. ผลงานวิจัย

3.1 การจัดเรียงตัวของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ

การจัดเรียงตัวของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพนั้นถูกศึกษาด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก cDNA ของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับของ

(a)

```

GTCCATCATGCGAGTGTCTCTTCACTCATGATCCTCGTGGTGGTGGTGGCTGCGTCTT 60
M R V S V F S H I L V V V V A A S F

CGCA CCGCA GTGCCAAGCGAGTGGCTGGAGGCATTGGTCCAGCATTGCCGAA CAAACT 120
A P Q C Q A S G W E A L V P A I A N K L

CACAAGgt aagtg aattat tttat tcttc aagtt ggtt cctgt ctat tagtgg attagtt 180
T S

tatat ctttaa aagat catct tggga acaat gtag attc ctctct gtc ttttc agCTTGTGGGA 240
L W E

GAGTGGAGAGTTCGAGCTGTTAGGACACTACTGCAGCTTCAA CGTGA CACCGAAATTCAA 300
S G E F E L L G H Y C S F N V T P K F K

GCGTTGGCAACTATACTTCAGGGGTCGCA TGTGGTGCCAGG GTGGA CAACCAT CAGAGG 360
R W Q L Y F R G R H W C P G W T T I R G

CCAA Ggtac gccgaaattctga agtgt tatactgt ttagc cctata tatat acaaat gaatg 420
Q A

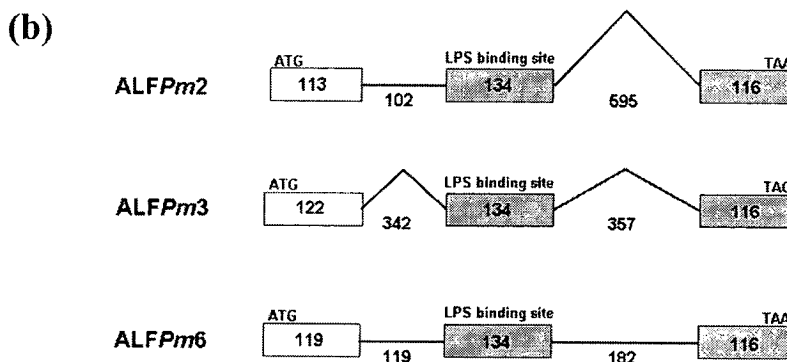
tgtaac agt aatct tctctac acaaga aattt cattat gactat cggact ggcggt cactg 480

cagttt ctctct agcatt acgtc aatct tttg cttac accatg ctaat ct ttcg ctctgtat 540

cccacagCTGAGACCCGTAGCAGATCGGGTGTGGTAGGTAGAACTACGCAGGACTTCGTC 600
E T R S R S G V V G R T T Q D F V

AGGAAA GCTTT CAGGGCGGGTATCATCACGAATCAGAGGCTCAA CTTGGCTGAATAAT 660
R K A F R A G I I T E S E A Q T W L N N

TAAAGCGACGA
  
```



รูปที่ 1 การจัดเรียงตัวของยีนบนจีโนม และลำดับกรดอะมิโนของ ALFPm6 (A) การเปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของ ALFPm6 กับโอโซฟอรึมอื่น (B) ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ตัวหนาแสดงบริเวณ coding sequence ตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงส่วนของ intron บริเวณ splice junction แสดงด้วยตัวอักษรพิมพ์เล็กตัวหนาและเอียง ลำดับของกรดอะมิโนแสดงด้วยตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ตัวหนาโดยขีดเส้นใต้ที่บริเวณ signal peptide ตัวอักษรในกรอบแสดงลำดับของไพรเมอร์

cDNA งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากำหนดลำดับของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพในกุ้งกุลาดำทั้งหมด 2 ยีน คือ ALFPm6 และ PmStylicin ผลการศึกษาพบว่าการจัดเรียงตัวของยีน ALFPm6 บนจีโนมนั้นจะประกอบไปด้วย 3 exon มีขนาดเท่ากับ 119, 134 และ 116 bp ซึ่ง exon ทั้งสามนี้จะถูกแทรกด้วย 2 intron ซึ่งมีขนาด 105 และ 182 bp บริเวณ splice junction ทั้งหมดนั้นจะมีลำดับเป็น GT/AG donor/acceptor splice site (รูปที่ 1A) โปรตีน ALFPm6 ส่วนของ signal peptide นั้นจะถูกกำหนดรหัสโดย exon ที่ 1 ในขณะที่ส่วนของ mature peptide นั้นจะถูกกำหนดรหัสโดย exon 1 ถึง 3 บริเวณ LPS binding site นั้นจะอยู่ที่ exon ที่ 2 เช่นเดียวกับ ไอโซพอร์มอื่นของ ALFPm (รูปที่ 1B) นอกจากนี้ยังได้ศึกษากำหนดลำดับของยีน PmStylicin บนจีโนม พบว่า การจัดเรียงตัวของยีนนั้นประกอบไปด้วย 2 exon มีขนาดเท่ากับ 76 และ 236 bp โดยมี intron ขนาด 234 bp แทรกอยู่ระหว่าง exon ทั้งสอง ซึ่งบริเวณ splice junction มีลำดับเป็น GT/AG donor/acceptor splice site บริเวณ signal peptide นั้นจะถูกกำหนดรหัสโดย exon ที่ 1 และบริเวณ mature peptide จะถูกกำหนดรหัส โดย exon ที่ 1 และ 2 (รูปที่ 2)

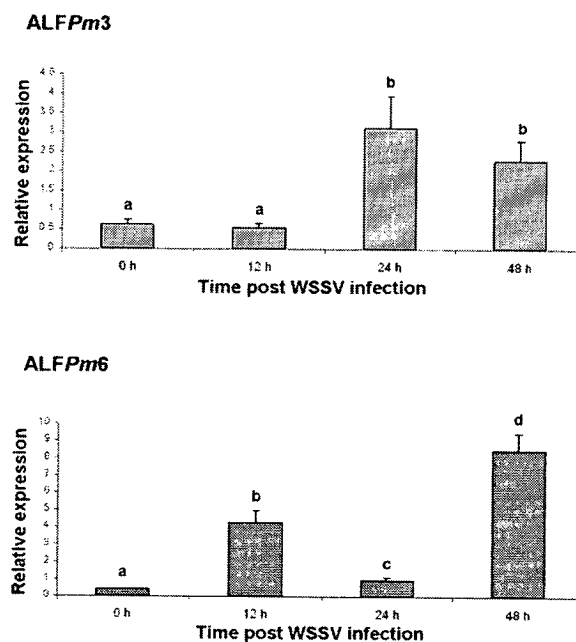
CCACACATCTGCTGCCATC ATGAGGACCTTCAGCCAGGTCTCTGGTTTGTCTTATTGGT	60
M R T F S Q V S G F V L L V	
TGCGATCGTGCGCATGTCAAGGCTCTTCCTTCT <i>gtaagttaaaaatacaacaagaacg</i>	120
A I V R M S Q G S S F Y	
ccctttattttatttgtgttattttgaactttaagtcgtaataaatcgatgctacccgtg	180
tgtgattatcattactggagaaaaatattgattatcgaaatgatgctctgttatgtaaca	240
aatggcaataatgatgttctaaatgtaatgacagcaatgttttttacttttttatttt	300
catttttttggttgcttgttattgttttac agATGCACCCAGTGGACCTCCGGGCGAGAGACA	360
A P S G P P G E R H	
TCCATGCCCACCGCAGTTGTGTCCAGTGTGCCAGGAGAGTGTCCGAAGTGCAGAGACTT	420
P C P P Q L C P V C P G E C P K C E S F	
CCCTGTGTGTACAGAGGTGTGTCCGATATTGCTATAGCATGTGACTGCCCTTCTACCA	480
P V C H E V C P D I A I A C D C P F Y H	
CAGCTGCGAATGTGGCATCGTGTATGTCCTCCCTGTGAAAATCCCATCGCTGAGCTGAT	540
S C E C R H R V C P P C E N P I A E L I	
TAAANAGGGAGGCTATAATGGATAAAGA	570
K K G G Y N G *	

รูปที่ 2 การจัดเรียงตัวของยีนบนจีโนม และลำดับกรดอะมิโนของ PmStylicin ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ตัวหนาแสดง บริเวณ coding sequenceตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงส่วนของ intron บริเวณ splice junction แสดงด้วย ตัวอักษรพิมพ์เล็กตัวหนาและเอียง ลำดับของกรดอะมิโนแสดงด้วยตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ตัวหนาโดยขีดเส้น ใต้ที่บริเวณ signal peptide ตัวอักษรในกรอบแสดงลำดับของไพรมอร์

3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพ

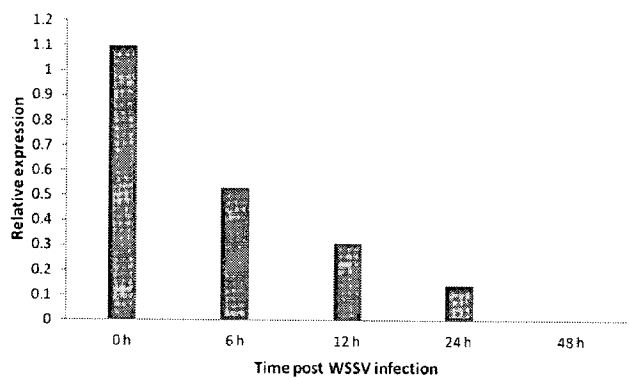
3.2.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ALFPm3 และ 6 ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน ALFPm3 และ 6 ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส WSSV ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR โดยมียีน β -actin ซึ่งเป็น housekeeping gene เป็นยีนควบคุม พบว่าการแสดงออกของยีน ALFPm3 จะเพิ่มขึ้น 5 เท่าเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV ไปแล้ว 24 ชั่วโมง และจะลดลงเหลือ 4 เท่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วน ALFPm6 นั้นจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 11 เท่า เมื่อติดเชื้อไวรัส WSSV ไปแล้ว 12 ชั่วโมง จากนั้นการแสดงออกจะลดลงเหลือ 3 เท่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นเป็น 22 เท่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การแสดงออกของยีน ALFPm3 และ 6 เมื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัส WSSV ที่เวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง การแสดงออกระดับ mRNA ของยีน ALFPm3 และ 6 ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR โดยเทียบเป็น relative expression กับยีน β -actin กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเป็นจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนเมื่อติดเชื้อไวรัส WSSV เทียบกับการแสดงออกของยีนที่กุ้งไม่ได้ติดเชื้อไวรัส WSSV และ $\pm$ S.D. จากการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง ความแตกต่างของการแสดงออกที่ $P < 0.05$ จะใช้ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a-d)

การแสดงออกของยีน *PmStylicin* ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส WSSV ด้วยถูกศึกษาเบื้องต้นด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยมียีน EF-1alpha ซึ่งเป็น housekeeping gene เป็นยีนควบคุม พบว่า การแสดงออกของยีน *PmStylicin* จะลดลงจนไม่มีการแสดงออกที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากติดเชื้อไวรัส WSSV โดยจะลดลง 0.5 เท่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง ลดลงอีกเป็น 0.3 เท่า ที่เวลา 12 ชั่วโมง และลดลง 0.1 เท่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง จนที่เวลา 48 ชั่วโมงจะไม่มีการแสดงออก (รูปที่ 1)



รูปที่ 4 การแสดงออกของยีน *PmStylicin* เมื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัส WSSV ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน *PmStylicin* ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยเทียบเป็น relative expression กับยีน EF-1alpha กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเป็นจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีนเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV เทียบกับการแสดงออกของยีนที่กุ้งไม่ได้ติดเชื้อไวรัส WSSV

3.3 การศึกษาสมบัติของโปรตีนด้านจุลชีพในการต้านยับยั้งแบคทีเรีย รา และไวรัส

3.3.1 การผลิตโปรตีนด้านจุลชีพด้วยเทคนิครีคอมบิแนนท์

โปรตีนรีคอมบิแนนท์สไลซินจะผลิตโดยระบบ *E. coli* expression system โดยใช้เวกเตอร์ pVR500 โปรตีนจะเชื่อมกับโปรตีน thioredoxin (trx) ทางปลายของหมู่อะมิโน ส่วนทางปลายของหมู่คาร์บอกซิลจะเชื่อมกับ polyhistidine tag ไพรเมอร์จะออกแบบจากลำดับ cDNA ของยีนสไลซินบริเวณที่กำหนดรหัสของ mature peptide เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนของสไลซิน คือ SLC_NcoIF และ SLC_XhoIR มาทำ PCR โดยใช้ cDNA จากกุ้งกุลาดำเป็น template ผลที่ได้คือ PCR product ของยีนสไลซินส่วนที่กำหนดรหัสของ mature peptide ซึ่งมีปลายด้าน 5' และ 3' จำเพาะต่อ restriction enzyme *NcoI* และ *XhoI* ตามลำดับ PCR product

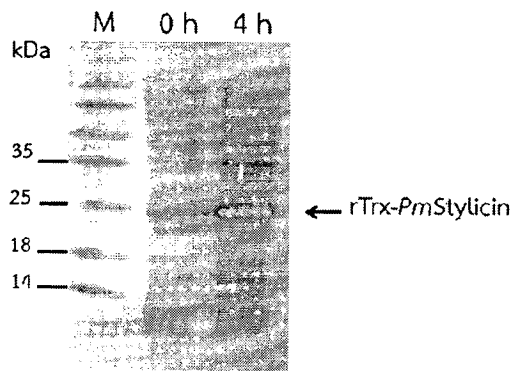
ที่ถูกตัดด้วย *NcoI* และ *XhoI* จะถูกเชื่อมกับพลาสมิด pVR500 เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ารีคอมบิ-
แนนท์พลาสมิด pVR500- *PmStylicin* ที่ได้นั้น in-frame (รูปที่ 5)

ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCG	60
M S D K I I H L T D D S F D T D V L K A	
GACGGGGCGATCCTCGTCGATTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCC	120
D G A I L V D F W A E W C G P C K M I A	
CCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACGACCGTTGCAAAACGTAAC	180
P I L D E I A D E Y Q G K L T V A K L N	
ATCGATCAAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTG	240
I D Q N P G T A P K Y G I R G I P T L L	
CTGTTCAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACGTCTAAAGGTCAGTTG	300
L F K N G E V A A T K V G A L S K G Q L	
AAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCGACGACGACACAAGGCC	360
K E F L D A N L A G S G S G D D D D K A	
enterokinase cleavage site	
ATGGATTCTTCCTTCTATGCACCCAGTGGACCTCCGGGCGAGAGACATCCATGCCACCG	420
M D S S F Y A P S G P P G E R H P C P P	
CAGTTGTGTCCAGTGTGCCAGGAGAGTGTCCGAAGTGCAGAGCTTCCCTGTGTGTACAC	480
Q L C P V C P G E C P K C E S F P V C H	
GAGGTGTGTCCCGATATTGCTATAGCATGTGACTGCCCTTCTACACAGCTGCGAATGT	540
E V C P D I A I A C D C P F Y H S C E C	
CGGCATCGTGTATGTCTCCCTGTGAAAATCCCATCGCTGAGCTGATTAAAAAGGGAGGC	600
R H R V C P P C E N P I A E L I K K G G	
<i>XhoI</i>	
TATAATGGACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGA	660
Y N G L E H H H H H H * D P A A N K A R	

รูปที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pVR500-*Pmstylicin* และลำดับกรดอะมิโนของ
โปรตีนรีคอมบิแนนท์ fusion protein โดยบริเวณ mature peptide ของสไทลิซิน
(ตัวอักษรตัวหนา) จะเชื่อมกับโปรตีน thioredoxin (ตัวอักษรขีดเส้นใต้) ซึ่งโปรตีน
thioredoxin นั้นจะถูกตัดออกโดยเอนไซม์ enterokinase

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pVR500-*PmStylicin* ที่ได้ถูกทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*
BL21(DE3)pLysS จากนั้นจะนำรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียมาผลิตโปรตีนโดยจะทำการเหนี่ยวนำด้วย isopropyl
thiogalactose (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1 mM เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่า
รีคอมบิแนนท์แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตโปรตีน rTrx-*Pmstylicin* ได้ (รูปที่ 6) และมีมวลโมเลกุลสอดคล้อง
กับการ predict จากลำดับของกรดอะมิโน คือ มีมวลโมเลกุลประมาณ 23 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ

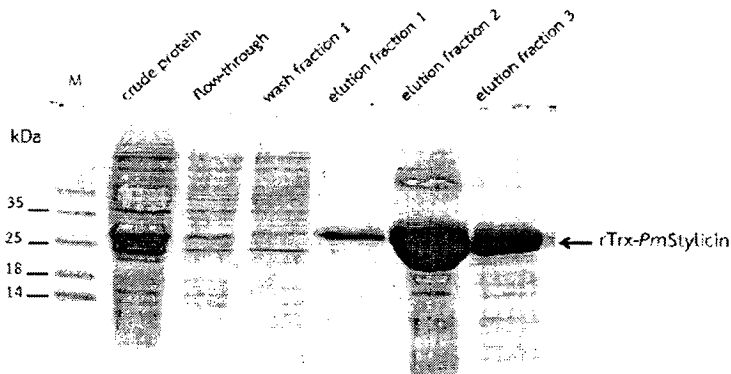
5.16 หลังจากทำให้เซลล์แตกโดยเครื่อง sonicator พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีอยู่ในส่วนของ soluble protein จึงได้นำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 6 แสดงผล SDS-PAGE ของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG พบว่าแบคทีเรียมีการผลิตโปรตีน rTrx-Pmstylicin

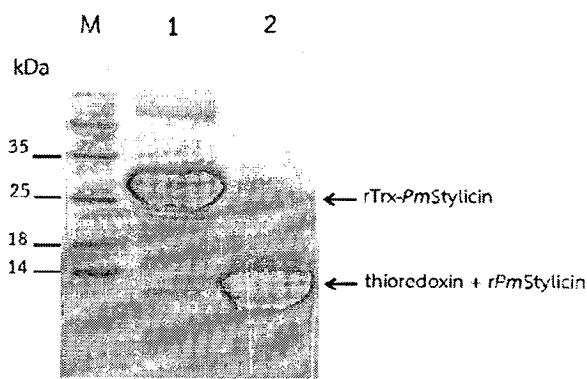
3.3.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี

นำโปรตีน rTrx-PmStylicin ซึ่งมีปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลติดอยู่กับ polyhistidine tag (His-tag) มาทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะด้วยนิกเกิล (nickel affinity chromatography) พบว่าโปรตีนที่เราสนใจสามารถถูกทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการชะโปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรียออกไปด้วยสารละลาย binding buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) จากนั้นโปรตีนที่เราสนใจจะถูกชะออกมาด้วยสารละลาย elute buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0) ในส่วนของ elution fraction (รูปที่ 7) โปรตีนจาก elution fraction จะถูกนำไปเปลี่ยนตัวทำละลายให้ละลายอยู่ใน สารละลาย enterokinase buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0) ซึ่งเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ enterokinase



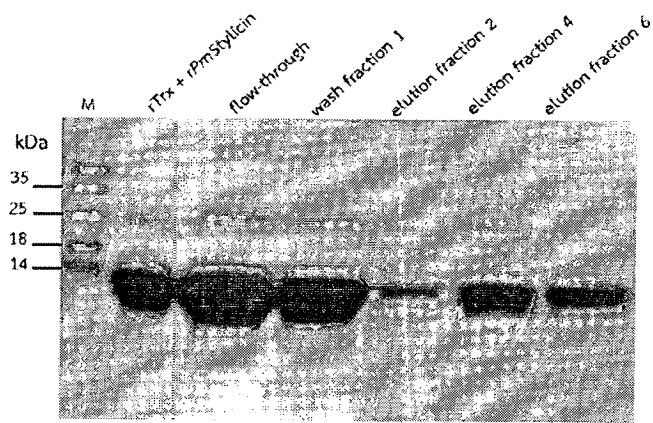
รูปที่ 7 แสดงผล SDS-PAGE ของการทำโปรตีน rTrx-PmStylicin ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะด้วยนิกเกิล

โปรตีนรีคอมบิแนนท์ rTrx-*PmStylicin* fusion ซึ่งมีโปรตีน thioredoxin (Trx) เชื่อมต่อกับโปรตีน *rPmStylicin* ที่บริเวณปลายหมู่อะมิโน จะถูกตัดส่วนของโปรตีน thioredoxin ออก ด้วยเอนไซม์ enterokinase ซึ่งมีความจำเพาะต่อลำดับของกรดอะมิโน Asp-Asp-Asp-Asp-Lys โปรตีนที่ตัดได้นั้นประกอบด้วยโปรตีน thioredoxin ขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตัน และ *rPmStylicin* ขนาดประมาณ 10 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูป 8



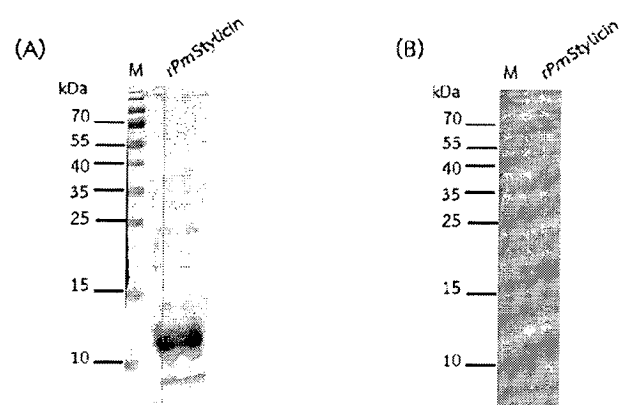
รูปที่ 8 แสดงผล SDS-PAGE ของโปรตีน rTrx-*PmStylicin* fusion (lane 1) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ enterokinase ได้โปรตีน thioredoxin และ *rPmStylicin* (lane 2)

โปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ enterokinase จะถูกนำมาทำโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะด้วยนิกเกิล เพื่อทำการแยกโปรตีน *rPmStylicin* ออกจาก thioredoxin ผลการทดลองพบว่าโปรตีน thioredoxin นั้นจะออกมาในส่วนของ flow-through และ wash fraction เมื่อใช้สารละลาย binding buffer ในการชะคอลัมน์ (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) มีเพียงโปรตีน *rPmStylicin* ซึ่งมีกับ polyhistidine tag (His-tag) ที่อยู่ทางปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลที่จะจับกับนิกเกิลในคอลัมน์ จากนั้นจะทำการชะด้วยสารละลาย elute buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0) เพื่อชะส่วนของโปรตีน *rPmStylicin* ออกมาจากคอลัมน์ใน elution fraction (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 แสดงผล SDS-PAGE ของการทำโปรตีน *rPmStylicin* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะด้วยนิกเกิล

ก่อนที่จะนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบสมบัติต่างๆ โปรตีนจะถูกเปลี่ยนตัวทำละลายให้ละลายใน 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 โดยใช้โครมาโทกราฟีเจลฟิลเตรชัน Sephadex™ G-25 โปรตีน rPmStylicin ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ได้นำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และยืนยันผลด้วย Western blot analysis ด้วย anti-His antibody พบว่าโปรตีนมีขนาดประมาณ 10 กิโลดาลตัน (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงผล SDS-PAGE (A) และผล Western blot analysis (B) ของโปรตีน rPmStylicin

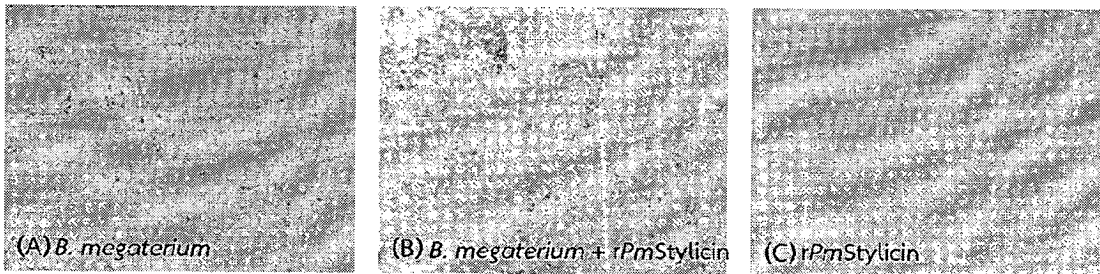
3.3.3 การทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่ม

โปรตีน rPmStylicin ที่ได้นั้นถูกนำมาทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และสมบัติการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย (bacterial agglutination) พบว่าโปรตีนที่ความเข้มข้น 64 μ M ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* แต่สามารถแสดงยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus haemolyticus* ได้ประมาณ 40% สำหรับเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* นั้นไม่สามารถถูกยับยั้งโดยโปรตีนที่ความเข้มข้น 80 μ M (ตารางที่ 5) เมื่อนำโปรตีนมาทดสอบการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่ม พบว่าโปรตีนสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* เกาะกลุ่มได้ (รูปที่ 11) แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มในแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus haemolyticus*

ตารางที่ 5 สมบัติการยับยั้งและการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียโดยโปรตีน rPmStylicin

แบคทีเรีย	MIC ^a (μM)	MAC ^b (μM)
แบคทีเรียแกรมบวก		
<i>Bacillus megaterium</i>	>64	64
<i>Staphylococcus aureus</i>	>64	SA ^c
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SI ^d	>64
แบคทีเรียแกรมลบ		
<i>Escherichia coli</i>	>64	>64
<i>Vibrio harveyi</i>	>80	ND ^e
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	>80	ND

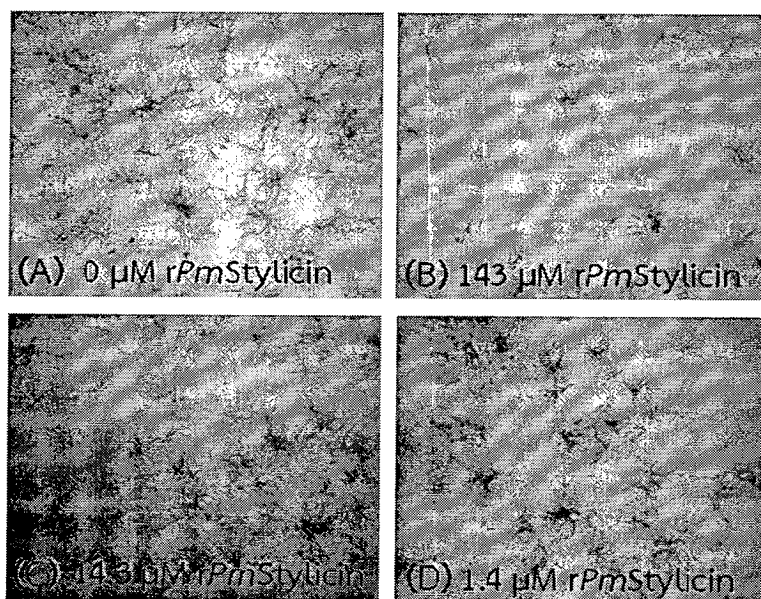
^aMIC, Minimal inhibitory concentration
^bMAC, Minimal agglutination concentration
^cSA, self-agglutinated
^dSI, Slight inhibition at 64 μM
^eND, not determined



รูปที่ 11 แสดงความสามารถของโปรตีน rPmStylicin เหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย *B. megaterium* รูป A คือ *B. megaterium* ใน 20 mM Tris pH8 รูป B คือ *B. megaterium* ในโปรตีน 64 μM และรูป C คือ โปรตีน 64 μM

3.3.4 การทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum*

โปรตีน rPmStylicin ที่ได้นั้นถูกนำมาทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* พบว่าเมื่อบ่มโปรตีนความเข้มข้น 143 μM กับเชื้อราเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่าการเจริญของเชื้อราในโปรตีนนั้นน้อยกว่าการเจริญของเชื้อราในสภาวะที่ไม่มีโปรตีน และเมื่อลดความเข้มข้นของโปรตีนลงเหลือ 14.3 และ 1.4 μM พบว่าโปรตีนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (รูปที่ 12) เมื่อครบ 48 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนทั้งสามความเข้มข้นนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

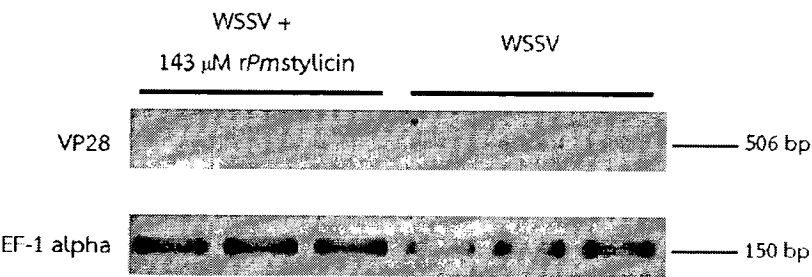


รูปที่ 12 แสดงสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่โปรตีน rPmStylicin ความเข้มข้น 143 (B), 14.3 (C) และ 1.4 μM (D) ตามลำดับ โดยมีเชื้อราใน 20 mM Tris pH 8 เป็นกลุ่มควบคุม (A)

3.3.5 การทดสอบสมบัติการยับยั้งไวรัส White spot syndrome virus (WSSV)

เพื่อทดสอบเบื้องต้นถึงสมบัติการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV propagation) การทดลองจึงนำโปรตีนบ่มกับไวรัส WSSV เวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนฉีดให้กุ้งกุลาดำ โดยมีกลุ่มควบคุม คือ กุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วยตัวทำลายของโปรตีนกับไวรัส WSSV หลังจากฉีดกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำการเก็บเลือดจากกุ้งทั้งสองกลุ่มเพื่อนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนของ VP28 ซึ่งเป็นยีนของไวรัส WSSV และยีน EF-1 alpha ที่เป็น housekeeping gene ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ความเข้มข้น 143 μM ทำให้การเพิ่มจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาวจะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่โปรตีน (รูปที่ 13) เมื่อวัดปริมาณ PCR product

และเทียบค่าการแสดงออกของยีนของ VP28 เป็น relative expression กับยีน EF-1 alpha พบว่าโปรตีน *rPmStylicin* สามารถยับยั้งการ propagation ไวรัส WSSV ได้ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 143 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 13 แสดงผลการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตัวดวงขาวโดยโปรตีน *rPmStylicin* ที่ความเข้มข้น 143 μM โดยใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจการแสดงออกของยีน VP28 และยีน EF-1alpha ซึ่งเป็น housekeeping gene

บทวิจารณ์

ALF พบครั้งแรกในเม็ดเลือดของ horseshoe crab, *Limulus polyphemus* และ *Tachypleus tridentatus* (Aketagawa *et al.*, 1986; Tanaka *et al.*, 1982) โดยโปรตีน ALF นี้มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ Gram-negative R-type bacteria หลังจากนั้นก็มีกรายงานว่าพบโปรตีนดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตพวกครัสเตเชียนรวมทั้งในกุ้งด้วย (Tassanakajon *et al.*, 2010) การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน ALF บนจีโนมของกุ้งกุลาดำนั้นพบว่าประกอบไปด้วย 3 exon และ 2 intron การจัดเรียงตัวของ ALF ในสิ่งมีชีวิตอื่น ได้แก่ *SpALF1* และ *SpALF2* จาก *Scylla paramamosain* (Imjongjirak *et al.*, 2011; Imjongjirak *et al.*, 2007) รวมไปถึง *EsALF1* จาก *Eriocheir sinensis* (Li *et al.*, 2008) ก็มีลักษณะการจัดเรียงตัวเช่นเดียวกับยีน *ALFPm* ในกุ้งกุลาดำ โดยการจัดเรียงตัวของยีน ALF ในสปีชีส์ที่กล่าวไปต่างก็มีบริเวณ LPS-binding domain อยู่ที่ exon ที่ 2 (Imjongjirak *et al.*, 2011; Imjongjirak *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Tharntada *et al.*, 2008) ในการศึกษา ALFPm6 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มใหม่ของ ALFPm ในกุ้งกุลาดำ มีลำดับ LPS binding site แตกต่างไปจาก ALFPm ที่เคยมีการรายงานได้ถูกนำมาศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน และพบว่าการจัดเรียงตัวของยีน รวมไปถึงตำแหน่งของบริเวณ LPS-binding domain นั้นเหมือนกับ ALF ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้

เนื่องจาก ALFPm6 มีความแตกต่างของลำดับ LPS-binding domain จึงเป็นไปได้ว่าความแตกต่างนี้อาจส่งผลถึงสมบัติการต้านจุลชีพที่แตกต่างไปจาก ALFPm อื่นที่เคยมีการรายงาน การศึกษานี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกระหว่าง ALFPm6 กับ ALFPm3 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส WSSV (Tharntada *et al.*, 2009) โดยทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของทั้งสองยีนในสภาวะที่กุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัส WSSV ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า ALFPm6 นั้นมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส WSSV เช่นเดียวกับการแสดงออกของ ALFPm3 โดยมีความแตกต่างของช่วงเวลาการแสดงออกเพิ่มขึ้น จึงเป็นไปได้ที่ ALFPm6 นั้นจะมีความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส WSSV โดยอาจจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส WSSV แตกต่างไปจาก ALFPm3 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ALFPm6 นั้นจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัส YHV (Prapavorarat *et al.*, 2010) จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ALFPm6 นี้มีแนวโน้มที่จะมีบทบาทในการต้านไวรัสในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งควรจะต้องศึกษาต่อไปในระดับของโปรตีน

Stylicin เป็นโปรตีนต้านจุลชีพพบครั้งแรกใน *Litopenaeus stylirostris* มีกรดอะมิโนของ mature peptide ของ Ls-Stylicin1 จำนวน 82 กรดอะมิโน และมีประจุสุทธิเป็นลบ โดยที่ปลายของหมู่อะมิโนจะมีส่วนที่เป็น proline rich และที่ปลายของหมู่คาร์บอกซิลประกอบด้วย 13 cysteine และมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* และแบคทีเรียในกลุ่มของ *Vibrio* (Rolland *et al.*, 2010) โดยในกุ้งกุลาดำนั้นก็พบยีนของโปรตีนสไทลิซิน (*PmStylicin*) เช่นกัน *PmStylicin* มีกรดอะมิโนของ mature peptide ทั้งหมด 81 ตัว และมีประจุสุทธิเป็นลบ ที่ปลายของหมู่อะมิโนจะมีส่วนที่เป็น proline rich และที่ปลายของหมู่คาร์บอกซิลจะประกอบด้วย 13 cysteine แม้ว่าลักษณะโดยทั่วไปจะเหมือนกับ Ls-Stylicin1 แต่ลำดับของกรดอะมิโนที่บริเวณ

mature peptide ของ Ls-Stylicin1 และ PmStylicin นั้นไม่ได้เหมือนกันทั้งหมด โดยมีความเหมือนประมาณ 60% (ไม่ได้แสดงข้อมูล) การจัดเรียงตัวของยีน PmStylicin นั้นจะคล้ายกับของ Ls-Stylicin1 คือประกอบด้วย 2 exon และ 1 intron แต่จะต่างกันที่ความยาวของ intron โดยโปรตีนทั้งสองต่างก็มีบริเวณ proline rich และ cysteine rich อยู่ที่ exon ที่ 2

การแสดงออกเมื่อถูกกลาดำติดเชื้อไวรัส WSSV นั้นพบว่ายีน PmStylicin จะมีการแสดงออกที่ลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่แสดงออกที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจาก LvStylicin ที่การแสดงออกลดลงที่ 24 ชั่วโมง และกลับมาเพิ่มขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมง (Goncalves *et al.*, 2014) ความแตกต่างของลักษณะการแสดงออกของยีน PmStylicin กับ LvStylicin ที่เกิดขึ้นอาจจะเกี่ยวข้องกับบทบาทของโปรตีนที่มีต่อถุงในสภาวะที่ติดเชื้อไวรัส WSSV ลักษณะการแสดงออกที่ลดลงเมื่อติดเชื้อไวรัส WSSV ของยีน PmStylicin นั้นแตกต่างจากลักษณะการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ALF ดังที่กล่าวไปข้างต้นที่จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส (Ponprateep *et al.*, 2012) อาจเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีน PmStylicin ที่ลดลงจะส่งผลให้โปรตีน PmStylicin ในตัวกุ้งไม่เพียงพอที่จะต่อต้านไวรัส WSSV และเป็นเหตุให้กุ้งตาย โปรตีนรีคอมบิแนนท์ของสไลซินในกุ้งกลาดำจึงถูกผลิตขึ้นในระบบของ *E. coli* expression system และนำมาทดสอบสมบัตการต้านไวรัส WSSV พบว่าโปรตีนมีสมบัตการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส WSSV นอกจากนี้โปรตีน rPmStylicin ยังได้ถูกทดสอบสมบัตการยับยั้งแบคทีเรียพบว่าโปรตีนดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* แต่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus haemolyticus* ได้ประมาณ 40% และลดการเจริญของรา *F. oxysporum* แต่ไม่สามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ สมบัตดังกล่าวนี้แตกต่างกับที่มีการรายงานของโปรตีน Ls-Stylicin1 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* และเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ (Rolland *et al.*, 2010) ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากลำดับของกรดอะมิโนที่ต่างกันระหว่างสองสปีชีส์ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน rPmStylicin มีสมบัตการเหนี่ยวนำให้เกิด bacterial agglutination ที่เกิดขึ้นเฉพาะกับ *Bacillus megaterium* แต่ไม่เกิดขึ้นกับ *Staphylococcus haemolyticus* ซึ่งแสดงผลการยับยั้งแบคทีเรีย จึงอาจเป็นไปได้ว่าสมบัตการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องกับการเกิด bacterial agglutination แต่อย่างไรก็ตามการที่โปรตีนสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียบางชนิดเกิดการเกาะกลุ่มได้นั้นจะช่วยสนับสนุนระบบ haemocyte-mediated bacterial clearance ของกุ้งได้ (Rolland *et al.*, 2010)

โปรตีนที่ต้านจุลชีพทั้งสองชนิด คือ ALFPm6 และ PmStylicin ได้ถูกศึกษาถึงบทบาทในการต้านไวรัส WSSV และพบว่าทั้ง ALFPm6 และ PmStylicin ต่างมีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส WSSV โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PmStylicin ที่ถูกผลิตในรูปของรีคอมบิแนนท์โปรตีน และได้แสดงให้เห็นสมบัตการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส WSSV นอกจากนี้โปรตีนดังกล่าวยังแสดงสมบัตการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา รวมไปถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย ทำให้เห็นได้ว่าโปรตีน PmStylicin นั้นมีบทบาทต่อระบบของภูมิคุ้มกันของกุ้งในการต้านจุลชีพ