การศึกษาคุณลักษณะโปรตีนต้านแบคทีเรียจากหอยตะโกรมกรามขาว *Crassostrea belcheri*

Characterization of Antibacterial Proteins from *Crassostrea belcheri*

คำนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอาชีพที่สร้างรายได้แก่เกษตรกรเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม ปัญหาหนึ่งที่เกษตรกรยังประสบอยู่คือ โรคสัตว์น้ำที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่อผลผลิต ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่แก้ปัญหาโดยใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในการรักษาโรคสัตว์น้ำ ผลเสียที่ตามมาคือ ทำให้เกิดสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ดื้อยาและสารตกค้างในสัตว์น้ำ ปัญหาสารตกค้างได้ถูกนำมาเป็นข้อกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศผู้นำเข้าและผู้ส่งออกสินค้าสัตว์น้ำ ทำให้ประเทศผู้ส่งออกสินค้าสัตว์น้ำอย่างประเทศไทยต้องสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมหาศาล

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำ เป็นแนวทางหนึ่งที่มีการศึกษาและวิจัยอย่างกว้างขวาง สารต้านจุลชีพจากทะเล เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นส่วนใหญ่ สารดังกล่าวเกิดจากกลไกการป้องกันตัวแบบที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่อยู่ในน้ำเลือดของสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลชีพ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพหลายกลุ่ม และไม่ทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์ของสารต้านจุลชีพจากทะเล ยังมีน้อยเนื่องจากขาดข้อมูลพื้นฐาน เช่น เทคนิคที่เหมาะสมและวิธีการในการแยกสกัดสาร คุณสมบัติทางเคมี กลไกและประสิทธิภาพในการทำงานของสารต้านจุลชีพ

ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาสารต้านจุลชีพในหอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) ซึ่งเป็นหอยนางรมที่มีการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวางในบริเวณชายฝั่งของประเทศไทย ผลการศึกษาพบโปรตีนในน้ำเลือดที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* หลายชนิด นอกจากนั้นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต้านแบคทีเรียที่ได้จากการทดลอง เป็นความรู้เบื้องต้นที่จะนำไปสู่การศึกษายีนที่ผลิตโปรตีนชนิดนี้ ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญต่อการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตสารต้านจุลชีพเชิงพาณิชย์เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะและสารเคมี

ซึ่งไม่ทำให้เกิดสารตกค้างและไม่ทำลายระบบนิเวศในแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยสรุปสารต้านจุลชีพจากทะเลมีศักยภาพต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศในอนาคตให้มีความยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. แยกโปรตีนจากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวด้วยวิธี Gel Filtration Chromatography

2. ศึกษาความสามารถของโปรตีนที่แยกได้จากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* spp. และสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3. หาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่แยกได้จากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp.

การตรวจเอกสาร

ชีวประวัติของหอยตะโกรมกรามขาว

หอยนางรมที่จัดว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมีอยู่ 2 กลุ่มคือ หอยนางรมพันธุ์เล็กและหอยนางรมพันธุ์ใหญ่ ในกลุ่มของหอยนางรมพันธุ์เล็ก ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Saccostrea* ได้แก่ *Saccostrea forskalii* มีชื่อสามัญภาษาไทยว่า หอยนางรมปากจีบ ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งคือ หอยนางรมพันธุ์ใหญ่อยู่ในสกุล *Crassostrea* มีชื่อสามัญภาษาไทยว่า หอยตะโกรม ซึ่งเป็นชนิดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มหอยนางรม ในประเทศไทยพบหอยนางรม 2 ชนิด คือ *Crassostrea iredalei* หรือหอยตะโกรมกรามดำและ *C. belcheri* หรือหอยตะโกรมกรามขาว (ธเนศ, 2540)

หอยตะโกรมกรามขาว นิยมเลี้ยงบริเวณปากแม่น้ำ พบมากในจังหวัดสุราษฎร์ธานีบริเวณปากแม่น้ำตาปี คลองท่าทอง อำเภอพุมเรียง เกาะปราบ อ่าวบ้านดอน อำเภอกาญจนดิษฐ์ นอกจากนี้ยังพบที่คลองนาทับ จังหวัดสงขลา ส่วนฝั่งทะเลอันดามัน พบได้ที่จังหวัดระนอง พังงา กระบี่ และจังหวัดตรัง นอกจากนั้นยังพบในแหล่งเลี้ยงบางแห่งในจังหวัดจันทบุรีด้วย

ระบบภูมิคุ้มกันในหอยสองฝา

หอยสองฝาและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง มีระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถจำแนกสิ่งแปลกปลอมและสิ่งที่เป็นของตัวเองได้ ซึ่งจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเฉพาะต่อสิ่งแปลกปลอมเท่านั้น แต่การตอบสนองจะไม่มีความจำหรือการเรียนรู้ ไม่มีการสร้าง antibody และไม่มีความเฉพาะเจาะจง (non-specificity) ภูมิคุ้มกันสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่เข้ามาในร่างกายหอยสองฝา อาจเกิดจากระบบเดียวหรือหลายระบบรวมกัน (Cooper, 1976; Roch, 1999) ระบบภูมิคุ้มกันในหอยสองฝา เป็นกลไกที่ไม่ซับซ้อนและมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับเซลล์ (cellular immune response) และภูมิคุ้มกันในเลือด (humoral immune response) การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับเซลล์ เกิดจากการกระทำของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต โดยขบวนการ phagocytosis ซึ่งกำจัดสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กออกจากตัวหอยโดยเซลล์เดี่ยวๆ หรือขบวนการ nodule formation เป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กแต่มีจำนวนมากโดยเซลล์หลายๆ เซลล์ ส่วน encapsulation เป็นขบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ ภูมิคุ้มกันในเลือดหอยสองฝาไม่มีการสร้างแอนติเจนต่อแอนติบอดีแต่มีปฏิกิริยาอื่นๆ ในการ

ตอบสนองซึ่งเกิด ขึ้นภายในเลือดของหอยสองฝาเมื่อพบสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเม็ดเลือดของหอยสองฝาสามารถแบ่งออกได้ 3 ชนิดคือ 1) hyaline hemocyte ซึ่งมี vacuole ขนาดใหญ่ 2) semi-granular hemocyte มี granule ขนาดเล็กอยู่มากมายกระจายภายในเซลล์ และ 3) granular hemocyte มีgranule ขนาดใหญ่ ใน semi-granular และ granular hemocyte พบว่ามีผลทำให้เกิดความเป็นพิษในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งสันนิษฐานว่ามาจาก granule ที่อยู่ภายในเซลล์ ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจะเกิดปฏิกิริยาต่อไปนี้คือ clotting reaction, pro-phenoloxidase activity, cytotoxicity, lysozyme activity, การสร้าง lectins และ antimicrobial substance หอยสองฝามีระบบเลือดแบบเปิด เมื่อเกิดบาดแผลหรือมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาจะกระตุ้นกลไกของระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบ มีการตอบสนองอย่างรวดเร็วและมีสัญญานส่งต่อกันไปเพื่อกระตุ้นการทำงานของปฏิกิริยาอื่นๆ (Cooper, 1976; Lackie, 1986; Sindermann, 1990; Roch, 1999)

ในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในตัวอ่อนหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) โดย Elston (1980a, 1980b) ได้แบ่งประเภทของเม็ดเลือด เป็น phagocytic และ non-phagocytic haemocytes Dyrynda *et al*. (1995) พบสารที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน เช่น phenoloxidase, arylsulphatase, reaction oxygen (RO) metabolites และขบวนการ phagocytosis ในตัวเต็มวัยและตัวอ่อนระยะ trochophore และ veliger ของหอยแมลงภู่ ส่วน Mitta *et al*. (2000a) พบโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ชื่อ mytilinsในตัวอ่อนระยะ metamorphosis และช่วงหลัง metamorphosisใน *M. galloprovincialis* ในหอย *Modiolus modiolus* พบว่า lectins ที่สกัดจากน้ำเลือด ทำหน้าที่ต่อต้านแบคทีเรียและนอกจากนี้ยังเพิ่มการทำงานของ phagocytic cells (Vasta, 1991; Olafsen, 1992; Olafsen *et al.*, 1995) และ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* spp. ได้เป็นอย่างดี (Tunkijjanukij and Olafsen, 1998)

<u>แบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ซึ่งทำความเสียหายแก่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ</u>

วิบริโอเป็นแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae และจัดเป็น facultative anaerobic (Buamann *et al*., 1984) มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้งงอ มีความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.5-0.8 ไมครอน ยาว 1.4-2.6 ไมครอน บางชนิดอาจมีแฟลกเจลลัมเป็นจำนวนมากที่บริเวณด้านข้างของเซลล์ เจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 28 -37 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดอาจเจริญได้ดีที่ 20 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบ oxidase test ให้ผลบวกและมี Selective media เป็น Thiosulfate Citrate Bile Salt-Sucrose (TCBS) หรือ Bromthymol Blue Salt Teepol (BTBST) เมื่อเจริญบนอาหารดังกล่าวจะให้โคโลนีสีเขียวและสีเหลือง ขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการ

ใช้งานน้ำตาลซูโครสของแต่ละสายพันธุ์ (Cowan, 1975) วิบริโอเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในบริเวณชายฝั่งทะเลและแหล่งน้ำจืด เจริญได้ในช่วงความเค็มค่อนข้างกว้าง หลายชนิดเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคในคน สัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล (Buchanan *et al.,* 1974) ลักษณะการก่อให้เกิดโรคเป็นแบบ secondary infection คือเมื่อร่างกายของสัตว์น้ำเกิดอาการเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ เชื้อวิบริโอจึงสามารถเข้าทำลายได้ จึงเรียกเชื้อชนิดนี้ว่าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคแบบฉวยโอกาส (Prosser *et al.,* 1997)

Chen *et al.* (1992) รายงานว่า *V. harveyi*, *V. damsela*, *V. neseis*, *V. tubiashii*, *V. anguillarum* และ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุที่ทำให้กุ้งกุลาดำตายในประเทศไต้หวันในระหว่างปี 1998 ถึง1999 ในประเทศไทย *V. harveyi* เป็นสาเหตุการตายของลูกกุ้งแชบ๊วยในบ่อเลี้ยง 70-100% (ดารุณี และคณะ, 2530) และ *V. harveyi* เป็นสาเหตุที่ทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามระยะก่อนคว่ำตายด้วยอาการเรืองแสง ตัวขาวขุ่น ว่ายน้ำไม่สะดวกและตายในที่สุด ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้ลูกกุ้งแสดงอาการและทำให้เกิดโรคคือ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ดรุณี และคณะ, 2530) จากรายงานของชลอ (2531) พบว่า *V. vulnificus* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเสี้ยนดำในกุ้ง (black splint หรือโรค melanosis) ขนาดใหญ่ก่อนจับขาย ถึงจะไม่ทำให้เกิดการตายอย่างรุนแรง แต่ทำให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจพอสมควร

<u>การตรวจสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ</u>

การตรวจสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพใช้วิธีการเดียวกับการตรวจสอบฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ ตามรายงานของ Kilara (1980) 2 วิธี คือ 1) วิธีทางจุลชีววิทยา อาศัยหลักการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือเชื้อตรวจสอบ ซึ่งเกี่ยวข้องกับหลักการแพร่กระจายของยา ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อตรวจสอบเจริญอยู่ ทำให้เกิดบริเวณใสที่เชื้อไม่เจริญ (clear zone) และเกี่ยวข้องกับความขุ่นจากการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการวัดความขุ่นใสของอาหารเหลว ถ้าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อตรวจสอบได้ อาหารเหลวจะใส ถ้ายับยั้งไม่ได้อาหารเหลวจะขุ่น วิธีการทางจุลชีววิทยานี้มีความไวในการตรวจสอบสารปฏิชีวนะสูง แต่ไม่สามารถแยกชนิดของสารได้ และ 2) วิธีการทางเคมี ได้แก่ electrophoresis และ chromatography สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้แต่ต้องมีความบริสุทธิ์ จากนั้นนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบชนิดแล้วได้ ทำให้สามารถแยกชนิดของสารได้จึงเป็นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ

โปรตีนต้านแบคทีเรีย (Antibacterial proteins)

โปรตีนต้านแบคทีเรีย พบทั่วไปในธรรมชาติและเป็นส่วนหนึ่งในกลไกการป้องกันตัวของสิ่งมีชีวิต (Lehrer and Ganz, 1999) โปรตีนกลุ่มนี้พบครั้งแรกในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เมื่อเกิดการติดเชื้อสิ่งมีชีวิตจะผลิตโปรตีนนี้ขึ้นมาเป็นจำนวนมากเพื่อต้านเชื้อจุลชีพ จากรายงานของ Handcock and Scott (2000) พบว่าโปรตีนต้านแบคทีเรียมีประจุรวมสุทธิเป็นบวก (cationic antibacterial protein) จึงสามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นประจุลบได้เป็นอย่างดีและยังพบว่าโปรตีนไม่ได้ทำลายเซลล์ของแบคทีเรียโดยตรง แต่มีกลไกการทำงานซึ่งเป็นผลจากระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate response) และกลไกการเกิดการอักเสบ (inflammation) ลักษณะการทำงานของโปรตีนจึงเป็นกลไกแบบไม่เฉพาะเจาะจง ทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาได้ยาก สามารถแบ่งโปรตีนต้านแบคทีเรียเป็นกลุ่มตามโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และลำดับกรดอะมิโนภายในโปรตีนออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1. โปรตีนมีโครงสร้างเป็นสายเกลียว (α-helix structure) เป็นโครงสร้างที่มีการศึกษาและพบมากที่สุดโปรตีนในกลุ่มนี้จะเสียสภาพเมื่ออยู่ในของเหลวแต่จะฟอร์มโครงสร้างเป็นสายเกลียวเมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่เป็น hydrophobic หรือเข้าจับกับพื้นผิวที่เป็นลิปิด (Zhao *et al*., 2002) โปรตีนที่พบในกลุ่มนี้ เช่น magainin 2 พบใน *Xenopus laevis* และ cepropin A พบใน *Hyalophora cecropia* (Boman, 1995; Mangoni *et al*., 2000)

กลุ่มที่ 2.โปรตีนมีโครงสร้างเป็นแผ่น (β-sheet structure) ที่มีพันธะไดซัลไฟด์หลายพันธะซึ่งเกิดจากการสายโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน cysteins จำนวนมาก ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้ง่าย โครงสร้างเกิดขึ้นจึงได้โครงสร้างเป็นแผ่นและในสายโปรตีนอาจมีสายโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวสายสั้นๆประกอบอยู่ด้วยโปรตีนที่พบในกลุ่มนี้ เช่น tachyplesin 1 พบใน *Tachypleus gigas* (Matsuzaki, 1999) และ polyphemusin 1 พบใน *Limulus polyphemus*

กลุ่มที่ 3.โปรตีนมีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (linear structure) ไม่เกิดพันธะไดซัลไฟด์ภายในสายโปรตีน แต่โครงสร้างเกิดจากการที่มีกรดอะมิโนชนิดเดียวกันอยู่ในตำแหน่งติดกัน เช่นสารชื่อ indolicidin (Selsted *et al*., 1992) และสารชื่อ histatin (Helmerhorst *et al.,* 1999)

กลุ่มที่ 4 โปรตีนมีโครงสร้างเป็นรูปบ่วง (loop structure) ภายในสายโปรตีนประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนที่มี proline และ arginineเป็นจำนวนมาก ไม่สามารถฟอร์ม

โครงสร้างเป็น amphipathic ได้ แต่จะฟอร์มเป็นสาย polyproline helical (Boman *et al*., 1993; Cabiaux *et al*., 1994) เช่น สารชื่อ Lantibiotics ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงแหวนซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ thioether มีรายงานว่านำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Breukink and de Krujiff, 1999)

<u>กลไกการทำงานของโปรตีนต้านแบคทีเรีย (Mode of action)</u>

โปรตีนต้านแบคทีเรียโดยส่วนมากจะมีคุณสมบัติเป็น amphiphilic ที่มีทั้งประจุรวมเป็นบวกและพื้นผิวที่เป็นพวกไม่ชอบน้ำ (hydrophobic surface) ทำให้ง่ายต่อการแทรกสู่ผนังเซลล์ มีผลทำให้ผนังเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมเสียสภาพ นอกจากนั้นยังมีผลต่อการเกิดอาการอักเสบและการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Hancock and Lehrer, 1998; Hancock and Rozek, 2002; Douglas *et al*., 2003) จากคุณสมบัติที่มีประจุรวมสุทธิเป็นบวก จึงอาจเรียกสารต้านจุลชีพนี้ว่า cationic antibacterial protein

Hancock (2001) อธิบายกลไกการทำงานของ โปรตีนต้านแบคทีเรียดังนี้ เนื่องจากผนังเซลล์ภายนอกของแบคทีเรียมี glycolipid และ lipopolysaccharide ซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนที่เรียกว่า protein receptor ของโปรตีนต้านจุลชีพ ทำให้สายโปรตีนเข้าไปเกาะและแทรกเข้าสู่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ เมื่อแทรกเข้าสู่ผนังเซลล์ในปริมาณมากขึ้นทำให้เกิดเสียสภาพการทำงาน จนทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายในที่สุด หากสายโปรตีนเกาะกับผิวของผนังเซลล์ในแนวขนานจะทำให้เกิดช่อง (channel) ขึ้นโดยมีโปรตีนต้านแบคทีเรียเป็นตัวควบคุมหรืออาจเกาะบนผิวผนังเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งลักษณะแทรกของโปรตีนต้านแบคทีเรียมี 2 รูปแบบคือ “Barrel-Stave” และ “Carpet model” ทำให้เกิดการฟอร์มเป็นช่องในผนังเซลล์ ผนังเซลล์จึงเสียสภาพการทำงาน โปรตีนต้านแบคทีเรียที่มีจำนวน cysteins ประกอบอยู่ในสายโปรตีนเป็นจำนวนมาก เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม defensins พบใน fat body ของแมลงและในน้ำเลือดหอยและในกุ้ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Krause *et al.*, 2000) นอกจากนั้น Mitta *et al.* (2000b) ได้แบ่งกลุ่มของ cationic antibacterial protein ในหอยแมลงภู่ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) และการจัดเรียงตัวของ cysteins ภายในสายโปรตีนได้ดังนี้

1) defensins สกัดได้จากน้ำเลือดของ *Mytilus edulis* และ *M. galloprovincialis* ประกอบด้วย consensus cysteins 6 ตัว 2) mytilins สกัดได้จากน้ำเลือดของ *M. edulis* และ *M. galloprovincialis* ประกอบด้วย consensus cysteins 8 ตัว 3) mytilins สกัดได้จากน้ำเลือดของ *M. galloprovincialis*

ประกอบด้วย consensus cysteins 8 ตัว เช่นกันแต่มีตำแหน่งที่แตกต่างจาก mytilins และ 4) mytimycin สกัดได้จากน้ำเลือดของ *M. edulis* ประกอบ ด้วย cysteins 12 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 6.5 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

Oliver *et al*. (1999) พบว่าโปรตีนที่แยกได้จากหอยนางรม *C. virginica* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 35 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อโปรโตซัว *Perkinsus marinus* ได้ แต่โปรตีนที่แยกได้จากน้ำเลือดหอยนางรม *C. gigas* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันแต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อโปรโตซัว *P. marinus*

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย

- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave); Sanyo รุ่น MLS3780
- เครื่องเขย่า (shaker); Rocker II รุ่น 260350
- ตู้เขี่ยเชื้อ (laminarflow)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator); Memmert
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง; Satorius รุ่น BP221S
- pH meter; Consort รุ่น C831
- Vortex mixer; Vortex genie 2
- Syringe filter, 0.2 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร; Acrodisc
- Stirer; GEM รุ่น HS-101

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS); MERCK
- Tryptic Soy Agar (TSA); MERCK
- Tryptic Soy Broth (TSB); MERCK

3. อุปกรณ์เตรียมน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว

- Syringe ขนาด 10 มิลลิลิตรและ needle
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge); Hettich รุ่น Universal 32R
- Spectrophotometer; Amersham Bioscience รุ่น GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator
- Freeze dryer; Telstar รุ่น Lyoalfa-6

4. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับ Gel Filtration Chromatography

- Sephacryl S-200; Amersham Bioscience
- คอลัมน์ขนาด 1.6x70 เซนติเมตร; Amersham Bioscience
- Gel Filtration LMW Calibration kits; Amersham Bioscience
- Sodiumhydroxide (NaOH); MERCK
- Hydrochloric acid (HCl); MERCK
- Tris-hydrochloric (Tris-HCl); MERCK
- Calcium Chloride ($CaCl_2$); MERCK
- Magnesium Chloride ($MgCl_2$); MERCK
- Manganese Chloride ($MnCl_2$); MERCK

5. สารเคมีที่จำเป็นในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford (1976)

- Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad
- Bovine serum albumin (BSA); Sigma

6. สารเคมีสำหรับ Electrophoresis

- Hoefer miniVE, 8 x 9 cm gels; Amersham Bioscience
- Power Supply EPS 301; Amersham Bioscience
- Acrylamide; BDH
- N'-N'bis methylene-acrylamide; BDH
- Sodium dodecyl sulfate; BDH
- NNN'N'-Tetrametyletylenediamine (TEMED); BDH
- Ammonium persulfate; BDH
- Coomassie brilliant blue R-250; BDH
- Glycerol; Amersham Bioscience
- β-mercaptoethanol; BDH
- Acetic acid; BDH
- Glycine; Promega

7. ชุดสารเคมีและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำ Two-dimensional gel electrophoresis

- Ettan IPGphor; Amersham Bioscience
- Ettan IPGphor strip Holder, 7 cm; Amersham Bioscience
- Hoefer miniVE, 8 x 9 cm gels; Amersham Bioscience
- ImageScanner; Amersham Bioscience
- ImageMaster 2D Platinum version 5.00; Amersham Bioscience
- Immobiline Drystrip pH 3-10, 7 cm; Amersham Bioscience
- IPG-Buffer, pH 3-10; Amersham Bioscience
- Drystrip cover fluid; Amersham Bioscience
- 2D Clean-up kit; Amersham Bioscience
- 2D-Quant kit; Amersham Bioscience
- Dialysis tubing cellulose membrane, 3500 MWCO; Sigma
- Urea; Amersham Bioscience
- CHAPS; Amersham Bioscience
- Dithiothreitol; Amersham Bioscience
- Iodoacetamide; Amersham Bioscience
- Bromophenol blue; BDH
- Agarose; SeaKem

8. หอยตะโกรมกรามขาว *C. belcheri*

9. แบคทีเรียใช้ในการทดสอบ

- *V. alginolyticus*
- *V. harveyi*
- *V. vulificus*
- *V. cholerae*
- *V. parahaemolyticus*

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างและการเตรียมน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว

เก็บตัวอย่างเลือดหอยตะโกรมกรามขาว ตัวเต็มวัยขนาด 9-13 เซนติเมตร ซึ่งรวบรวมจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดเลือดบริเวณกล้ามเนื้อยึดเปลือก นำเลือดปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แบ่งส่วนใสน้ำเลือดเก็บไว้ที่ –80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติและเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดโดยใช้วิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร นำผลที่ได้เทียบผลกับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ก)

2. ทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของน้ำเลือดจากหอยตะโกรมกรามขาว

ทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว โดยใช้แบคทีเรียสกุล *Vibrio* 5 ชนิด ซึ่งเป็นเชื้อ *Vibrio* ที่ได้ผ่านการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณลักษณะทั่วไปตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Buchanan *et al*., 1974)

2.1 เตรียมเชื้อ *Vibrio sp.*

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียวิบริโอในอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ที่ผสม 1.5% NaCl เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเลือกเขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่ได้ ลงบนอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ที่ผสม 1.5% NaCl และนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อแบคทีเรียประมาณ $1x10^6$ CFU/ml นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียด้วยวิธี Total plate count บนอาหาร Thiosulfate Citrate Bile Salt-Sucrose Agar (TCBS) เพื่อยืนยันระดับปริมาณของเชื้อแบคทีเรียและนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 ทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดจากหอยตะโกรมกรามขาว โดยประยุกต์จากวิธีของ Tunkijjanukij และ Olafsen (1998)

กลุ่มควบคุม นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 2.1 ที่มีปริมาณเชื้อ $1x10^6$ CFU/ ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Sterile normal saline ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากครบ 1 ชั่วโมงใส่ Sterile normal saline ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จะได้ dilution 10^{-1} หลังจากนั้นทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า ด้วย Sterile normal saline จนได้ dilution 10^{-6} ดูดสารที่ dilution 10^{-4}, 10^{-5}และ 10^{-6} ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำมา Spread บนอาหาร TSA ที่มี 1.5% NaCl นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและบันทึกผลการทดลอง

กลุ่มทดลอง นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 2.1 ที่มีปริมาณเชื้อ $1x10^6$ CFU/ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำเลือดจากข้อ 1 ที่กรองด้วย Sterile syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากครบ 1 ชั่วโมงใส่ Sterile normal saline ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จะได้ dilution 10^{-1} หลังจากนั้นทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า ด้วย Sterile normal saline จนได้ dilution 10^{-6} ดูดสารที่ dilution 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำมา spread บนอาหาร TSA ที่มี 1.5% NaCl นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและบันทึกผลการทดลอง

เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยนับจำนวนโคโลนีและคำนวนหาค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว โดยใช้สูตร

$$A = \frac{[NC - NT] \times 100}{NC}$$

เมื่อ A = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

NC = จำนวนโคโลนีในกลุ่มควบคุม

NT = จำนวนโคโลนีในกลุ่มทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนส์ และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD (Least Significant Different) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

3. <u>แยกโปรตีนในน้ำเลือดตามน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ เทคนิค Gel Filtration Chromatography</u>

3.1 การเตรียมคอลัมน์และแยกกลุ่มโปรตีน

บรรจุ Sephacryl S-200 (Amersham Bioscience) ในคอลัมน์ขนาด 1.6 x 70 เซนติเมตร แล้วชะล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.15 โมลาร์ NaCl ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.1 โดยใช้อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นาน 12 ชั่วโมงแยกโปรตีนมาตรฐาน LMW-marker (Amersham Bioscience) ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และเก็บโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์เฟลคชั่น ละ 3 มิลลิลิตร เพื่อทำกราฟมาตรฐาน นำตัวอย่างน้ำเลือด 3 มิลลิลิตร ใส่ในคอลัมน์และชะล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.15โมลาร์ NaCl ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.1 ใช้อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บโปรตีนในน้ำเลือดที่ผ่านคอลัมน์เฟลคชั่นละ 3 มิลลิลิตร วัดปริมาณโปรตีนในแต่ละ เฟลคชั่นที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ทำกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ปริมาตรต่างๆ

3.2 คำนวนน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐาน

คำนวนน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานและหาความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละเฟลคชั่นเก็บโปรตีนส่วนที่อยู่ในพีคเดียวกันรวมกันเพื่อทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ทั้ง 5 ชนิดต่อไป

4. <u>ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนที่แยกได้</u>

4.1 เตรียมตัวอย่างโปรตีนที่แยกได้

ใส่โปรตีนในแต่ละพีคที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) ลงในถุงไดอะไลซ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือกที่ 3,500 ดาลตัน แช่ใน 0.15 โมลาร์ NaCl ใน Tris-HCl มิลลิโมลาร์, pH 7.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และเจือจางโปรตีนทุกพีค ให้มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองตัวอย่างโปรตีนด้วย Sterile syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน นำไปทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลายโปรตีน

4.2 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio sp.*

ใส่ตัวอย่างโปรตีนทุกพีคที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ชุดสำหรับเชื้อวิบริโอทั้ง 5 ชนิดที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.1 โดยเติมเชื้อ *Vibrio* ในตัวอย่างชนิดละชุด หลอดละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มเชื้อกับตัวอย่างที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เจือจางเชื้อในชุดทดลองด้วย Sterile normal saline จนได้ dilution 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} นำ dilution ดังกล่าวปริมาตร 100 ไมโครลิตร Spread บนอาหารแข็ง TSA ที่เติม 1.5% NaCl แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-20 ชั่วโมง ตรวจผลเพื่อคัดเลือกโปรตีนใน พีคที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยเทียบจำนวนโคโลนีกับกลุ่มควบคุมที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.2 และผสมเชื้อ 20 ไมโครลิตร กับ 0.15 โมลาร์ NaCl ใน Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, pH 7.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แทน Sterile normal saline

เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยนับจำนวนโคโลนีและคำนวนหาค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรตามข้อ 2.2.2 ค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนส์และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD (Least Significant Different) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แยกโปรตีนและเก็บเฉพาะพีคที่มีคุณสมบัติดีที่สุดเพื่อทำแห้งแบบเยือกแข็งต่อไป

5. <u>การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio* spp.ได้ดีที่สุด</u>

5.1 การศึกษาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการยับยั้งแบคทีเรียของโปรตีนที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ใส่โปรตีนในพีคที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ทุกชนิดได้ดีที่สุด ในถุงไดอะไลซ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือกที่ 3,500 ดาลตัน แช่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ใส่ในหลอด ไมโครทิวบ์หลอดละ 200 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อเอาตะกอนออก แล้วจึงกรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามวิธีในข้อ 2.2 โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 10

ชุดเพื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส โดยกลุ่มควบคุมผสมเชื้อกับสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แทน Sterile normal saline

เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยนับจำนวนโคโลนีและคำนวนหาค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรตามข้อ 2.2 เปรียบเทียบกันระหว่างชุดการทดลองที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการยับยั้ง

5.2 การศึกษาช่วง pH ต่อความคงตัวของโปรตีนที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ละลายโปรตีน ในพีคที่สามารถยับยั้ง*เชื้อ Vibrio* ทุกชนิดได้ดีที่สุด ที่ทำแห้งด้วยความเย็นละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่สารละลายโปรตีนในถุงไดอะไลซ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือกที่ 3,500 ดาลตัน แต่ละถุงแช่ในสารละลาย 0.01 ไมโครลิตร Sodium acetate ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl ที่ pH 3, 4 และ 5 ตามลำดับ และแช่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl ที่ pH 6, 7, 8, 9 และ 10 ตามลำดับ ปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วกรองด้วย Sterile syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามวิธีในข้อ 2.2 โดยกลุ่มควบคุมผสมเชื้อกับสารละลายที่แช่ถุงไดอะไลซ์ แต่ละ pH ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แทน Sterile normal saline

เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยนับจำนวนโคโลนีและคำนวนหาค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรตามข้อ 2.2 เปรียบเทียบกันระหว่างชุดการทดลองที่ค่า pH ต่างๆ เพื่อหาช่วงค่า pH ที่เหมาะสมให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อสูงสุด

5.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของโปรตีนที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย

ละลายโปรตีนในพีคที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ทุกชนิดได้ดีที่สุด ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งไว้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่สารละลายโปรตีนในถุงไดอะไลซ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือกที่ 3,500 ดาลตัน แช่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ หลอดละ

200 ไมโครลิตร นำแต่ละหลอดบ่มที่อุณหภูมิ 4, 20, 30, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อเอาตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามวิธีในข้อ 2.2 โดยกลุ่มควบคุมผสมเชื้อกับสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แทน Sterile normal saline

เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยนับจำนวนโคโลนีและคำนวนหาค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรตามข้อ 2.2 เปรียบเทียบกันระหว่างชุดการทดลองที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อหาอุณหภูมิที่โปรตีนสามารถคงสภาพและทำงานได้

5.4 การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นโปรตีนที่ระดับต่างๆ กับความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย V. *parahaemolyticus*

ใส่โปรตีนพีคที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ทุกชนิดได้ดีที่สุด ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งในถุงไดอะไลซ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือกที่ 3,500 แล้วแช่ในสารละลาย 0.15 โมลาร์ NaCl ใน Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, pH 7.1 และเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 320, 160, 80, 40 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเจือจางด้วยสารละลาย 0.15 โมลาร์ NaCl ใน Tris–HCl 0.05 โมลาร์, pH 7.1 หลังจากนำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 80 ไมโครลิตร ครบทุกลำดับความเข้มข้น ชุดควบคุมใส่ 0.15 โมลาร์ NaCl ใน Tris–HCl 0.05 โมลาร์, pH 7.1 ปริมาณ 80 ไมโครลิตร แทนสารละลายโปรตีน จากนั้นนำสารละลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* มาใส่ลงในสารละลายโปรตีนแต่ละความเข้มข้น ๆ ละ 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละหลอดจะเท่ากับ 320, 160, 80, 40 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เจือจางสารละลายในแต่ละหลอดครั้งละ 10 เท่าด้วย Sterile normal saline จนถึง dilution 10^{-6} นำเชื้อที่เจือจางใน dilution ที่ 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาณ 100 ไมโครลิตร Spread เชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่เติม 1.5 % NaCl บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง แล้วตรวจผลการทดลอง

นับจำนวนโคโลนีของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นโปรตีน เทียบกับชุดควบคุมแล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งตามสูตรในข้อ 2.2 เพื่อหาความสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นของโปรตีนกับเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง

5.5 การทดสอบความต้องการโลหะไอออนของโปรตีน กลุ่มที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ได้ดีที่สุดกับเชื้อ *V.parahaemolyticus*

นำโปรตีนในพีคที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ทุกชนิดได้ดีที่สุด ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่สารละลายโปรตีนในถุงไดอะไลซ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือกที่ 3,500 ดาลตัน 5 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 แช่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 2 ลิตร นาน 24 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 2 ถึงการทดลองที่ 5 แช่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ Disodium-EDTA ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 2 ลิตร นาน12 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำสารละลายแต่ละชุดการทดลองแยกไปแช่ในสารละลายดังนี้

ชุดการทดลองที่ 2 แช่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 2 ลิตร นาน 12 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 3 แช่ในสารละลาย $CaCl_2$ 0.01โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 2 ลิตร นาน 12 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 4 แช่ในสารละลาย $MgCl_2$ 0.01โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 2 ลิตร นาน 12 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 5 แช่ในสารละลาย $MnCl_2$ 0.01โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 2 ลิตร นาน 12 ชั่วโมง

เมื่อแช่ครบตามเวลานำสารละลายทั้ง 5 ชุดปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้กรองด้วย Sterile syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน ไปทดสอบความต้องการของโลหะไอออนของโปรตีน โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามวิธีในข้อ 2.2 โดยกลุ่มควบคุมผสมเชื้อกับสารละลาย 0.01 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.15 โมลาร์ NaCl, pH 7.1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แทน Sterile normal saline

เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยนับจำนวนโคโลนีและคำนวนหาค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สูตรตามข้อ 2.2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ยับยั้งระหว่างชุดการทดลอง

6. ศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่แยกได้จาก Gel Filtration Chromatography ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

6.1 แยกโปรตีนในพีคที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ได้ดีที่สุดและหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยใช้เทคนิค Native-PAGE (Laemmli, 1970)

นำโปรตีนพีคที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดและโปรตีนพีคอื่นๆ ผสมกับ 2x Sample buffer ที่ไม่มี β-mercaptoethanol โดยใช้อัตราส่วน 2x Sample buffer: fraction เท่ากับ 1:1 โดยปริมาตร เตรียม Separating gel (12% acrylamide) และ Stacking gel (4% acrylamide) หยอดตัวอย่างโปรตีนลงในหลุมของเจลปริมาตร 10 ไมโครลิตรและหยอดโปรตีนมาตรฐาน LMW marker ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์ต่อเจลและความต่างศักย์ 120 โวลต์ เมื่อแถบสีเคลื่อนลงมาจนเหลือระยะห่างจากขอบด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงหยุดกระแสไฟฟ้า นำเจลออกจากกระจกตัดส่วน Stacking gel ออก ย้อมด้วยเทคนิค Silver staining จนกระทั่งเจลใสและเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นและตรวจสอบแถบโปรตีน

6.2 ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลขององค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

นำพีคโปรตีนที่มียับยั้งเชื้อดีที่สุด ผสม Sample buffer ในอัตราส่วน Sample buffer: fraction เท่ากับ 1:1 โดยปริมาตรและเติม 5% β-mercaptoethanol ของปริมาตรทั้งหมดและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อสลายพันธะของโปรตีน เตรียม Separating gel (4% acrylamide) หยอดตัวอย่างลงในหลุมเจล 10 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 120 โวลต์ใน Stacking gel และใช้กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ และความต่างศักย์ 120 โวลต์ ใน Separating gel เมื่อแถบสีเคลื่อนลงมาจนหลือระยะห่างจากขอบด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงหยุด กระแสไฟฟ้า ตัดส่วน Stacking gel ออก ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลา 10 นาที บนเครื่องเขย่า หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย Destaining จนกระทั่งเจลใสและเห็นแถบโปรตีนชัดเจนล้างเจลด้วยน้ำกลั่นและตรวจสอบแถบโปรตีน

6.3 ศึกษาค่า Isoelectric point ขององค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้เทคนิค Two Dimensional Gel Electrophoresis

เตรียมโปรตีนพืดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดีที่สุดด้วย 2D Clean-up kit และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) เพื่อปรับให้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10-62 ไมโครกรัม เพื่อใช้แยกตามค่า pI (isoelectric point) บน Immobiline drystrip ที่ช่วง pH 3-10 ใน Rehydration bufer ช่วง pH 3-10 โดยตั้งค่าเครื่อง Ettan IPGPhor ให้ rehydration นาน 12 ชั่วโมง ที่ 20 องศาเซลเซียส ขั้นที่ 1 ความต่างศักย์ 250 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 30 นาที ขั้นที่ 2 ความต่างศักย์ 500 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 30 นาทีและ ขั้นที่ 3 ความต่างศักย์ 7,500 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบขั้นตอน แช่ Immobiline drystrip ใน Equilibration buffer ที่มี Dithiothreitol นาน 10 นาที และเปลี่ยนมาแช่ใน equilibration buffer ที่มีIodoacetamide นาน 10 นาที นำ Immobiline drystrip ไปแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลบน SDS-PAGE (Stacking gel 12% acrylamide) ใช้ LMW marker เป็นโปรตีนมาตรฐาน ใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 300 โวลต์ นาน 15 นาทีและเปลี่ยนเป็นกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 300 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 นาน 12 ชั่วโมง แล้วล้างเจลจนเห็นจุดโปรตีนชัดเจน

7. วิเคราะห์หา Mass spectrum และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเทคนิค MALDI-TOF

นำจุดโปรตีนที่ถูกคัดเลือกวิเคราะห์ ด้วย MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, USA) ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

8. วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค LC-MS/MS และเปรียบเทียบชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีน

นำแถบโปรตีนจาก Two dimensional gel electrophoresis และ SDS-PAGE วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS (Thermo Electron Corporation) ที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Units) ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี ข้อมูล Mass spectrometry spectrum ของโปรตีนที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFasta ใน NCBI โดยใช้โปรแกรม Biowork

ผลการทดลอง

1. น้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว

ตัวอย่างหอยตะโกรมกรามขาวที่รวบรวมจากแหล่งเพาะเลี้ยงในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ในช่วงเดือนตุลาคม 2547 ถึง เดือนสิงหาคม 2548 มีความกว้างประมาณ 8.98±0.75 เซนติเมตร ความยาว 11.56±1.06 เซนติเมตร และน้ำหนักตัวเฉลี่ย 33.50±4.83 กรัมได้น้ำเลือดที่บริเวณมัดกล้ามเนื้อเปิดปิดฝา เฉลี่ยตัวละ 3.90±1.86 มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนประมาณ 6.363±0.923 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

2. คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดจากหอยตะโกรมกรามขาว

ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* 5 ชนิด พบว่าน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ได้ 3 ชนิด คือ *V. cholerae* , *V. harveyi* และ *V. vulnificus* มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 33.38±1.67, 29.51±1.66 และ22.31±1.68 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และเมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งต่อแบคทีเรียแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) แต่พบว่าน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โดยผลที่ได้เหมือนกันทั้ง 3 ชุดการทดลอง เมื่อควบคุมให้มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 6.700 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชุดการทดลองที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *V. cholerae*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* เท่ากับ 33.33, 30.03 และ 21.58 ตามลำดับในชุดการทดลองที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *V. cholerae*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* เท่ากับ 33.00, 27.65 และ 21.11 ตามลำดับ และในชุดการทดลองที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *V. cholerae*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* เท่ากับ 33.33, 30.85 และ 24.24 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* 5 ชนิด ของน้ำเลือดจากหอยตะโกรมกรามขาว ที่มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 6.700 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

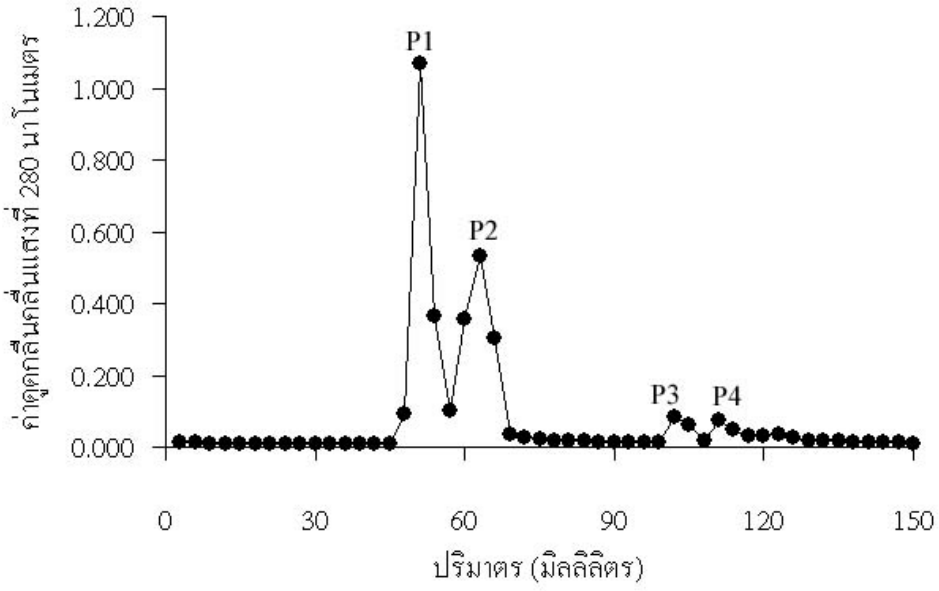
ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	เฉลี่ย
V. cholerae	33.33	33.00	33.83	33.38±0.42[a]
V. harveyi	30.03	27.65	30.85	29.51±1.66[b]
V. vulnificus	21.58	21.11	24.24	22.31±1.68[c]
V. alginolyticus	N	N	N	N
V. parahaemolyticus	N	N	N	N

หมายเหตุ N: ไม่มีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว
ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

3. แยกโปรตีนในน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวตามน้ำหนักโมเลกุล

3.1 แยกโปรตีนด้วยเทคนิค Gel Filtration Chromatography

สามารถแยกโปรตีนได้ 4 กลุ่มด้วยกันคือ P1, P2, P3 และ P4 ปริมาตรที่พบกลุ่มโปรตีนคือช่วงมิลลิลิตรที่ 45-51, 54-63, 102 และ 108-111 ตามลำดับ รูปแบบของโครมาโตแกรมที่ได้มีความคล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 1) น้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวที่ทำให้แห้งโดยใช้ความเย็น มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 6.700 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 1 กลุ่มโปรตีนที่คัดแยกโดยวิธี Gel Filtration Chromatography จากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) โดยทำการวัดปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร กลุ่มโปรตีนได้ 4 กลุ่ม (P1-P4)

3.2 น้ำหนักโมเลกุลเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐาน

ในการหาปริมาณโปรตีนและมวลโมเลกุลของกลุ่มโปรตีนในชุดการทดลอง 3 ชุด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 2,000 ถึง 13.7 กิโลดาลตัน (ภาคผนวก ข) พบว่า กลุ่มโปรตีน P1 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 75.4±5.8 กิโลดาลตัน มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 4.724±0.079 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มโปรตีน P2 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 58.4±6.8 กิโลดาลตัน มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 0.648±0.021มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มโปรตีน P3 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 18.7±0.0 กิโลดาลตัน มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 0.079±0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและกลุ่มโปรตีน P4 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 15.2±0.7 กิโลดาลตัน มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 0.064±0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 1 ในน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวที่มีปริมาณโปรตีน 6.714 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีน้ำหนักโมเลกุลของกลุ่มโปรตีน P1, P2, P3 และ P4 เท่ากับ 81.3, 64.5, 18.7 และ 16.0 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 2 ในน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวที่มีปริมาณโปรตีน 5.316 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีน้ำหนักโมเลกุลของกลุ่มโปรตีนP1, P2, P3 และ P4 เท่ากับ 75.3, 59.7, 18.7 และ 14.8 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 3 ในน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวที่มีปริมาณโปรตีน 7.060 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีน้ำหนักโมเลกุลของกลุ่มโปรตีนP1, P2, P3 และ P4 เท่ากับ 69.6, 51.1, 18.7 และ 14.8 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของกลุ่มโปรตีนที่แยกได้ด้วยวิธี Gel Filtration Chromatography และความเข้มข้นของโปรตีนที่คัดแยกได้จากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว

กลุ่มโปรตีน	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
P1	4.813	4.664	4.694	4.724±0.079	81.30	75.3	69.6	75.4±5.8
P2	0.658	0.624	0.663	0.648±0.021	64.5	59.7	51.1	58.4±6.8
P3	0.071	0.090	0.077	0.079±0.009	18.7	18.7	18.7	18.7±0.0
P4	0.061	0.080	0.051	0.064±0.015	16.0	14.8	14.8	15.2±0.7

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4. <u>คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนที่แยกได้จากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว</u>

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* 5 ชนิดกับกลุ่มโปรตีนที่แยกได้ทั้ง 4 กลุ่ม ใน 3 ชุดการทดลอง ได้ผลการทดลองดังนี้

กลุ่มโปรตีน P1 มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 4.724±0.079 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนที่ใช้ทดสอบการยับยั้ง 64 ไมโครกรัม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* และ *V. harveyi* เท่ากับ 95.54±0.95, 66.28±2.04, 60.19±1.05 และ 40.86±3.16 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. cholerae*

กลุ่มโปรตีน P2 มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.648±0.021 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนที่ใช้ทดสอบการยับยั้ง 64 ไมโครกรัม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* และ *V. cholerae* เท่ากับ 93.26±1.18, 71.93±2.24, 55.37±4.25, 39.30±1.05 และ 16.90±0.94 ตามลำดับ

กลุ่มโปรตีน P3 มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.079±0.010 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนที่ใช้ทดสอบการยับยั้ง 64 ไมโครกรัม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* และ *V. cholerae* เท่ากับ 95.03±0.47, 91.13±0.85, 86.06±1.13, 62.31±0.46 และ 8.77±3.82 ตามลำดับ

กลุ่มโปรตีน P4 มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.064±0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนที่ใช้ทดสอบการยับยั้ง 64 ไมโครกรัม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* เท่ากับ 80.05±1.16 และ 25.26±1.25 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V.vulnificus, V. cholerae* และ *V. alginolyticus* ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. cholerae* ของน้ำเลือดและกลุ่มโปรตีนที่แยกได้จากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวทั้ง 4 กลุ่ม เมื่อมีปริมาณโปรตีน 64 ไมโครกรัม

ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย				
	VP*	VH*	VA*	VV*	VC*
Crude	N	27.59 ±2.59[c]	N	18.98 ±6.94[d]	33.39 ±0.42[b]
P1	94.54 ±0.95[ab]	40.86 ±3.16[b]	60.19 ±1.05[b]	66.28 ±2.04[b]	N
P2	93.26 ±1.18[b]	39.30 ±1.05[b]	71.93 ±2.24[c]	55.37 ±4.25[c]	16.90 ±0.94[c]
P3	95.03 ±0.47[a]	62.31 ±0.46[a]	86.06 ±1.13[a]	8.77 ±3.82[a]	91.13 ±0.85[a]
P4	80.05 ±1.16[c]	25.26±1.25[c]	N	N	N

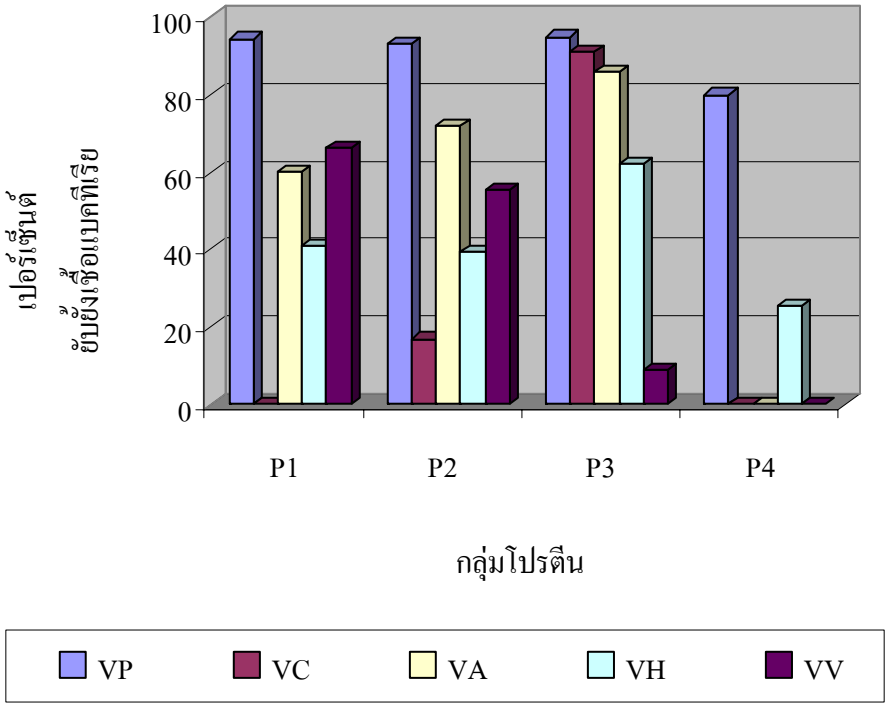
หมายเหตุ N : ไม่มีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

* VP: *V. Parahaemolyticus*, VH: *V. harveyi*, VA: *V. alginolyticus*, VV: *V. vulnificus*, VC: *V. cholerae*

เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อในโปรตีนทั้ง 4 กลุ่มพบว่าโปรตีนกลุ่ม P3 สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ได้สูงสุดทุกชนิด (ภาพที่ 2) จึงแยกโปรตีนกลุ่ม P3 และทำให้แห้งโดยใช้ความเย็นเพื่อทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนจากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว โดยเลือกใช้เชื้อ *V. parahemolyticus* เป็นเชื้อตัวแทนในการทดสอบ เนื่องจากโปรตีนที่แยกได้ทุกกลุ่มสามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahemolyticus* ได้

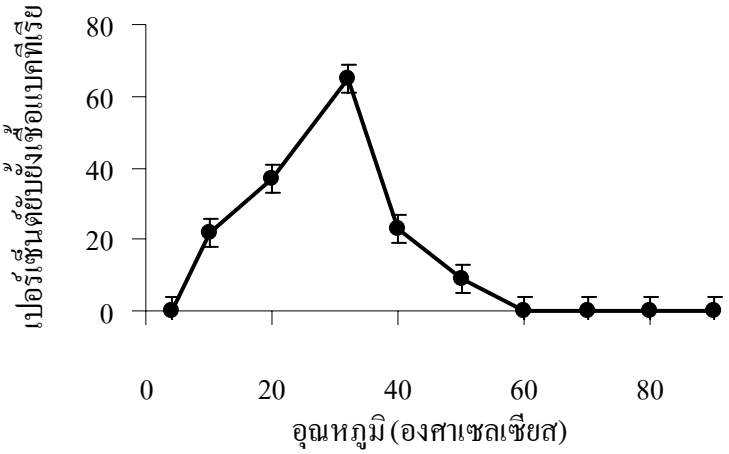


ภาพที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ VP: *V. Parahaemolyticus*, VH: *V. harveyi*, VA: *V. alginolyticus* , VV: *V. vulnificus* , VC: *V. cholerae* ของกลุ่มโปรตีนที่แยกได้จากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวทั้ง 4 กลุ่ม

5. <u>การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนจากน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาวที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด</u>

5.1 การศึกษาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของโปรตีนกลุ่ม P3 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย

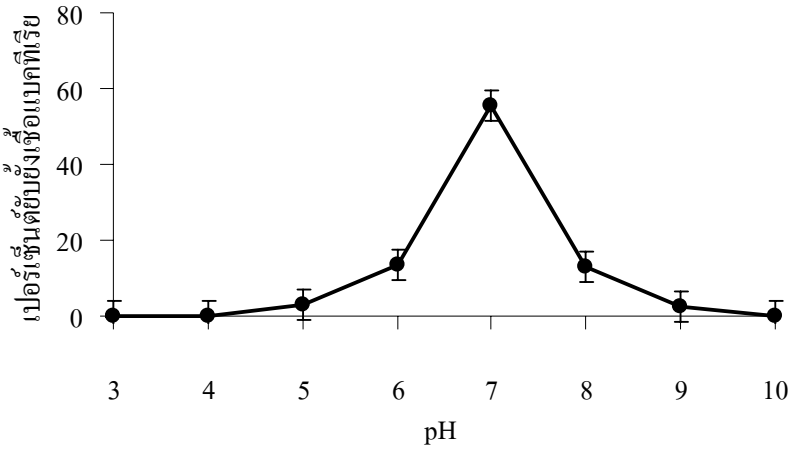
ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของโปรตีนกลุ่ม P3 คือ 10 ถึง 50 องศาเซลเซียส เมื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ายังคงเหลือเปอร์เซ็นต์ยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่มื่อบ่มที่อุณหภูมิ 10, 20, 40 และ 50 องศาเซลเซียสเปอร์เซ็นต์ยับยั้งไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)



<u>ภาพที่ 3</u> ผลของอุณหภูมิต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อ *V.parahaemolyticus* ของโปรตีนกลุ่ม P3

5.2 การศึกษาช่วง pH ต่อความคงตัวของโปรตีนกลุ่ม P3 ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

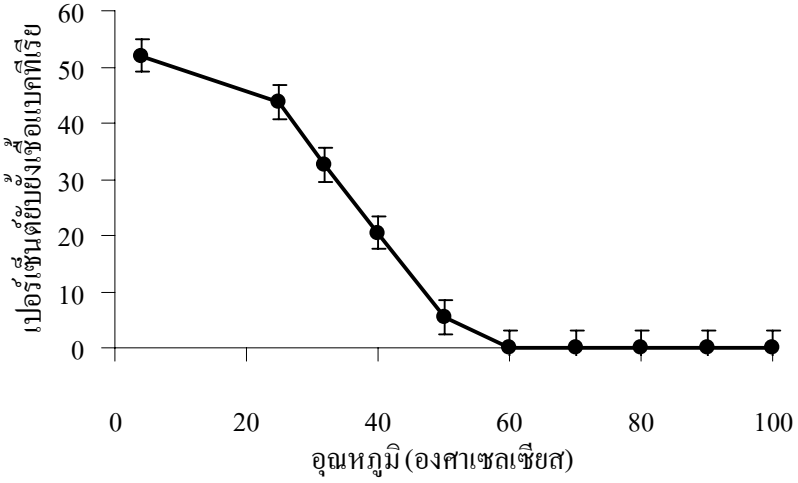
โปรตีนกลุ่ม P3 มีความคงตัวที่ช่วง pH 6 ถึง 8 แต่จะคงตัวได้ดีที่สุดที่ 7.1โดยใช้ค่าการยับยั้งเชื้อในการเปรียบเทียบ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ผลของ pH ต่อความคงตัวของโปรตีนกลุ่ม P3 เมื่อไดอะไลซ์ที่ pH ต่างๆ ก่อนนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*

5.3 การศึกษาอุณหภูมิต่อความคงตัวของโปรตีนกลุ่ม P3 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

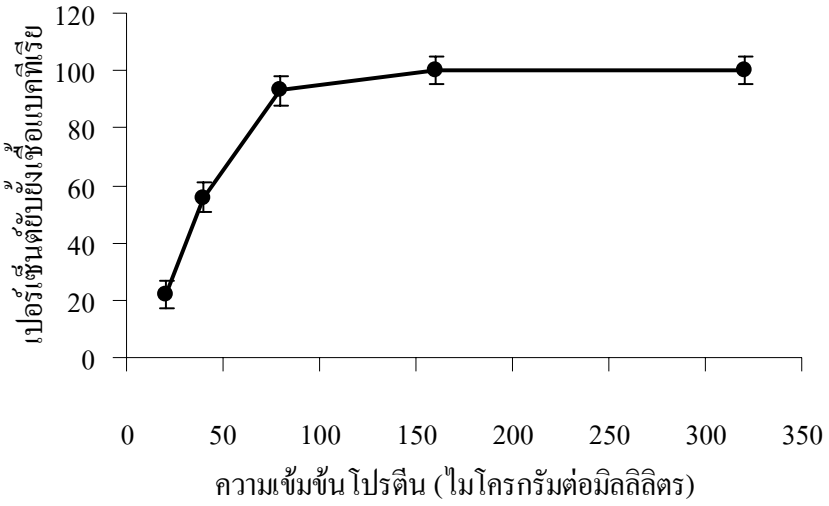
โปรตีนกลุ่ม P3 มีความคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 4-50 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ายังคงเหลือเปอร์เซ็นต์ยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเริ่มลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้นและเสียสภาพสมบูรณ์ที่ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของโปรตีนกลุ่ม P3 หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *V .parahaemolyticus*

5.4 การทดสอบหาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นโปรตีนกับความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

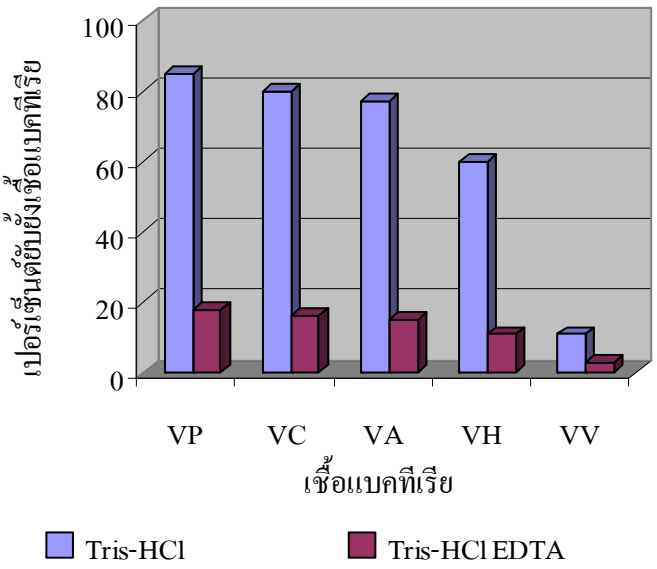
พบว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนโดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นโปรตีนสูงกว่า 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป และลดลงเหลือ 92.93, 55.74 และ 22.07 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 80, 40 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลของความเข้มข้นโปรตีนกลุ่ม P3 ที่ระดับต่างๆ กับความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

5.5 การศึกษาความต้องการไอออนของโลหะของโปรตีนกลุ่ม P3 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*

พบว่าโปรตีน P3 ชุดการทดลองที่ไม่ดึงโลหะไอออนออก สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus, V.cholerae, V. alginolyticus, V. harveyi* และ *V. vulnificus* ได้ดีตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 85.30, 80.85, 76.61, 60.13 และ 10.28 ตามลำดับ และโปรตีน P3 ชุดการทดลองที่ดึงโลหะไอออนสามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus, V.cholerae, V. alginolyticus* และ *V. harveyi* ได้ดีตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อเท่ากับ 17.82, 16.67, 15.32 และ 12.56 ตามลำดับ แต่ไม่ยับยั้งเชื้อ *V. vulnificus* (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ผลของไอออนของโลหะต่อโปรตีนกลุ่ม P3 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio spp.*5 ชนิด

ดึงโลหะไอออนออกจากโปรตีน P3 และเติมกลับด้วยโลหะไอออนชนิดต่างๆ พบว่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งไดอะไลซ์กับสารละลาย $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ เท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์ และในชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 17.82, 17.26 และ 19.38 แสดงในตารางที่ 4

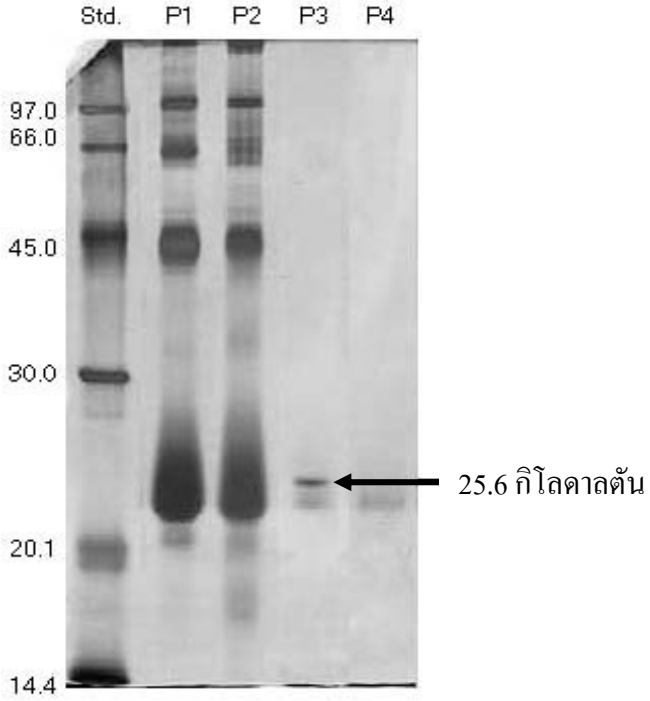
ตารางที่ 4 ผลของโลหะไอออนต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ชนิดสารละลายที่ไดอะไลซ์ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อ
0.01 โมลาร์ Tris-HCl ใน 0.15 โมลาร์ NaCl pH 7.1	85.30
0.01 โมลาร์ disodium-EDTA	17.82
0.01 โมลาร์ $CaCl_2$	73.00
0.01 โมลาร์ $MgCl_2$	17.26
0.01 โมลาร์ $MnCl_2$	19.38

6. <u>ศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่แยกได้จาก Gel Filtration Chromatography ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย</u>

6.1 แยกโปรตีนในพีคที่ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดและหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแบบไม่เสียสภาพโดยใช้เทคนิค Native-PAGE (Laemmli, 1970)

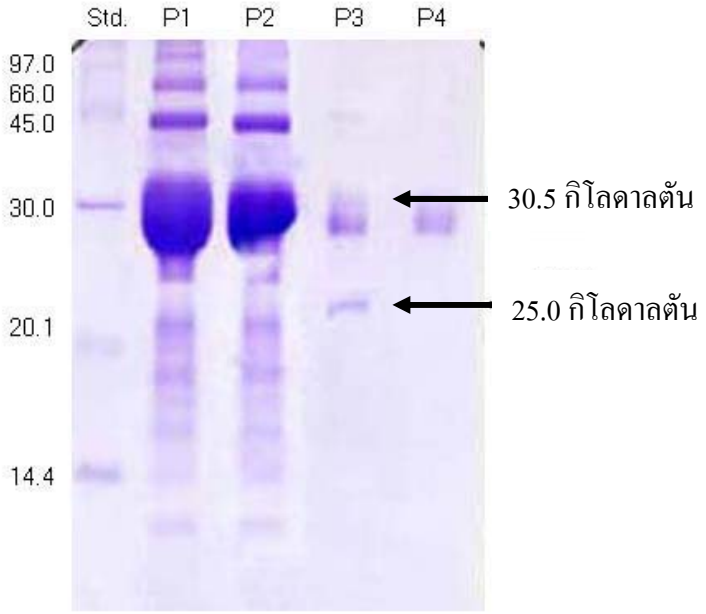
เมื่อแยกโปรตีนกลุ่ม P3 ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ได้ดีที่สุดและโปรตีนกลุ่ม P1, P2 และ P4 ด้วยเทคนิค Native-PAGE พบว่าโปรตีนกลุ่ม P3 ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 25.6 กิโลดาลตัน (ภาคผนวก ค.) กลุ่มโปรตีน P1 ปรากฏแถบโปรตีน 4 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 78.3, 67.2, 57.0 และ 25.3 กิโลดาลตัน ตามลำดับ กลุ่มโปรตีน P2 ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 78.3, 57.0 และ 25.3 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และกลุ่มโปรตัน P4 พบแถบโปรตีน 1 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 23.6 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังภาพที่ 8



<u>ภาพที่ 8</u> แถบโปรตีน P1, P2, P3 และ P4 ในการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค Native- PAGE และโปรตีนมาตรฐานคือ Phosphorylase B (97.0 กิโลดาลตัน), albumin (66.0 กิโลดาลตัน), Ovalbumin (45.0 กิโลดาลตัน), Carbonic (30.0 กิโลดาลตัน), Trypsin inhibitor (20.1 กิโลดาลตัน) และ Lactabumin (14.4 กิโลดาลตัน).

6.2 ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลขององค์ประกอบของโปรตีนที่แยกได้โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

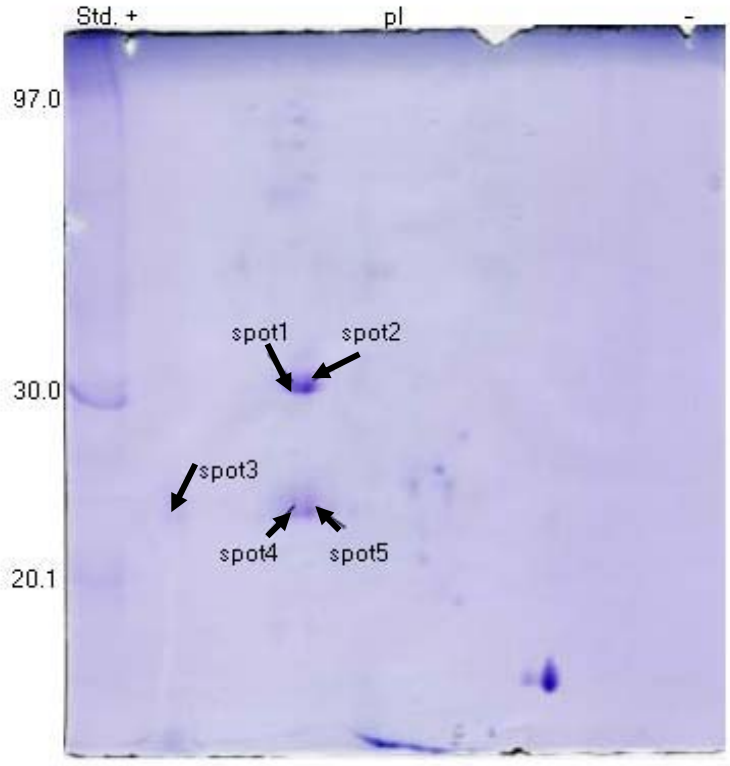
เมื่อแยกโปรตีนกลุ่ม P3และโปรตีนกลุ่ม P1, P2 และ P4 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนกลุ่ม P3 ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน LMW-marker พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30.5 และ 25.0 กิโลดาลตัน (ภาคผนวก ค.) กลุ่มโปรตีน P1 ปรากฏแถบโปรตีน 9 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 67.0, 61.2, 52.8, 34.7, 23.2, 18.7, 15.0, 13.0 และ 10.0 กิโลดาลตัน ตามลำดับ กลุ่มโปรตีน P2 ปรากฏแถบโปรตีน 8 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 67.0, 52.8, 34.7, 23.2, 18.7, 15.0, 13.0 และ 10.0 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และกลุ่มโปรตัน P4 พบแถบโปรตีน 1 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 9 น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน P1, P2, P3 และ P4 โดยเทคนิค SDS-PAGE และโปรตีนมาตรฐานคือ Phosphorylase B (97.0 กิโลดาลตัน), albumin (66.0 กิโลดาลตัน), Ovalbumin (45.0 กิโลดาลตัน), Carbonic (30.0 กิโลดาลตัน), Trypsin inhibitor (20.1 กิโลดาลตัน) และ Lactabumin (14.4 กิโลดาลตัน).

6.3 ศึกษาค่า Isoelectric point ขององค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้เทคนิค Two Dimensional Gel Electrophoresis (2D-PAGE)

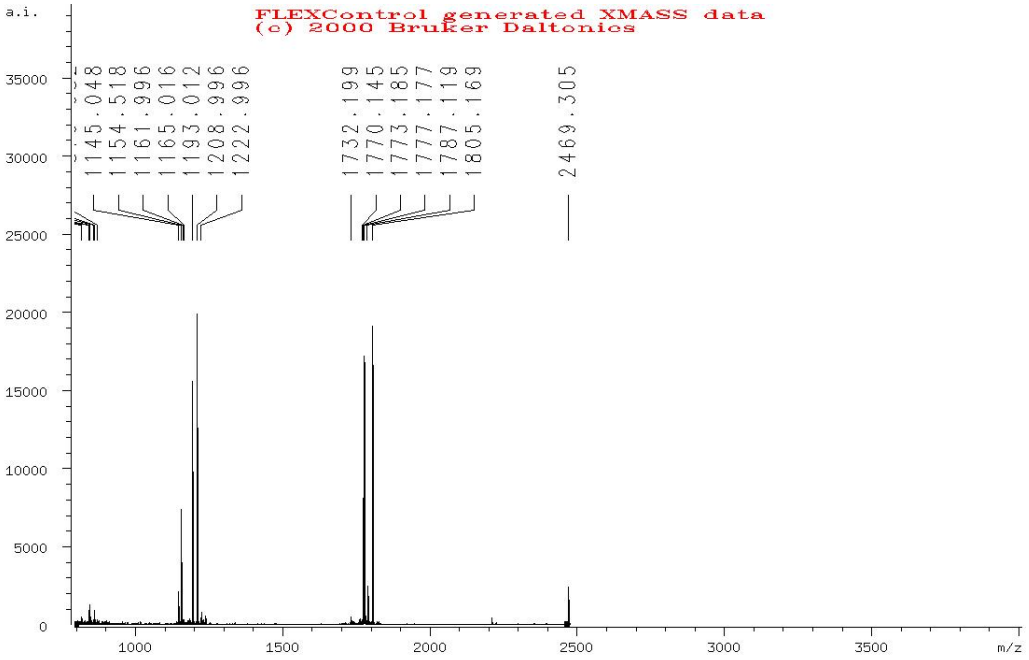
เมื่อแยกโปรตีนกลุ่ม P3 ด้วยเทคนิค 2D-PAGE พบจุดโปรตีนที่แยกได้ทั้งหมด 5 จุด ด้วยกัน (ภาพที่ 11) ได้แก่ spot 1 spot 2 spot3 spot 4 และ spot 5 ซึ่งมีค่า p*I* เท่ากับ 5.1, 5.3, 3.0, 3.6 และ 5.2 ตามลำดับ แล้วพบว่า spot 1 และ spot 2 ปรากฏในตำแหน่งใกล้เคียงกันที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30.7 กิโลดาลตัน ในส่วนของ spot 3, spot 4 และ spot 5 ปรากฏในตำแหน่งที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 25.8 กิโลดาลตัน ทั้ง 3 จุด (ภาคผนวก ค)



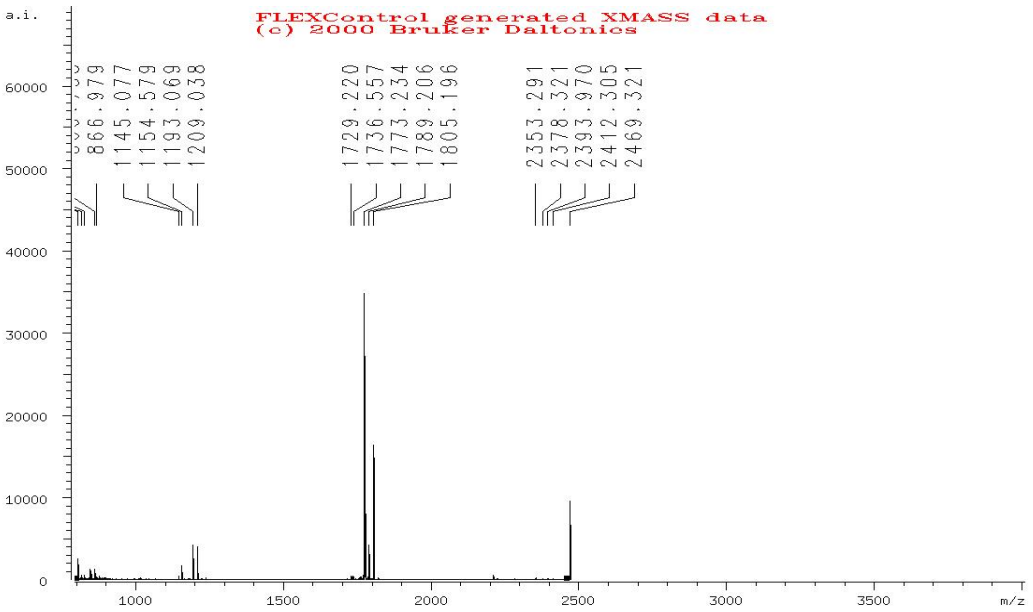
<u>ภาพที่ 10</u> จุดโปรตีน spot 1, spot 2, spot 3, spot 4 และ spot 5 ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 5.1, 5.3, 3.0, 3.6 และ 5.2 ตามลำดับ ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค 2D-PAGE ในช่วง pI 3 ถึง 10 และตามน้ำหนักโมเลกุล

7. <u>วิเคราะห์หา mass spectrum และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน P3 โดยเทคนิค MALDI-TOF</u>

ผลการวิเคราะห์พบว่าจุดโปรตีน spot 1 spot 2 spot 3 spot 4 และ spot 5 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 27,258 29,715 25,625 25,451 และ 22,698 ดาลตัน ตามลำดับ สามารถแบ่งโปรตีนทั้ง 5 จุด ตามลักษณะของ mass spectrum ที่ปรากฏเป็น 2 ชุดได้แก่ ชุดที่ 1 spot 1 และ spot 2 ปรากฏ mass spectrum ที่ตำแหน่งเดียวกันในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 1,200 1,800 และ 2,500 ดาลตัน ตามลำดับ ดังภาพที่ 11 และ12 โดยที่จุดโปรตีน spot 2 มี mass spectrum ที่ชัดเจนและมีค่า a.i. (Atomics Intensity) ที่สูงกว่า spot 1

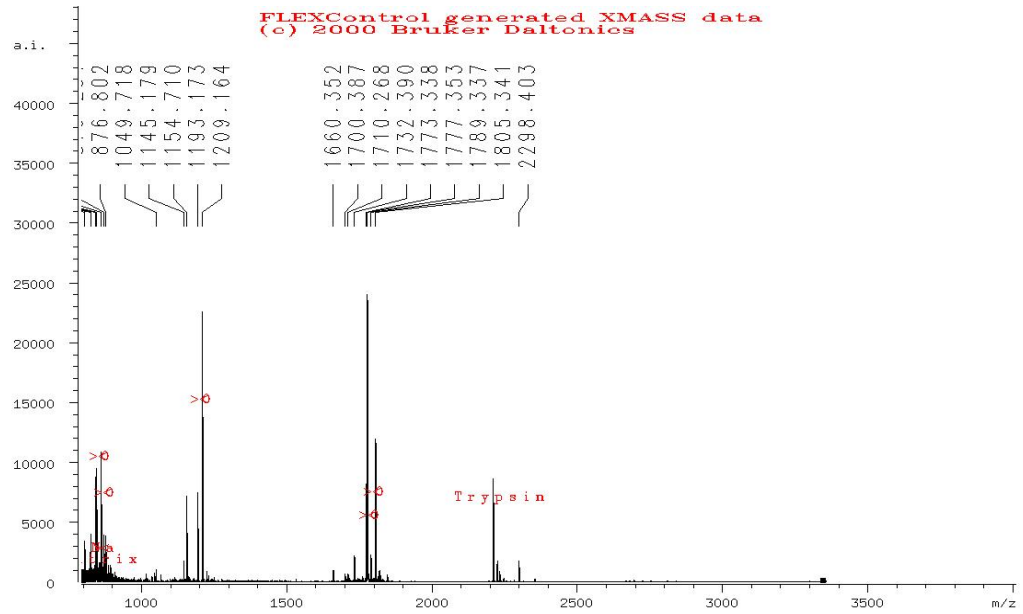


<u>ภาพที่ 11</u> mass spectrum ของจุดโปรตีน spot 1 ที่ปรากฏบน Two dimensional electrophoresis gel

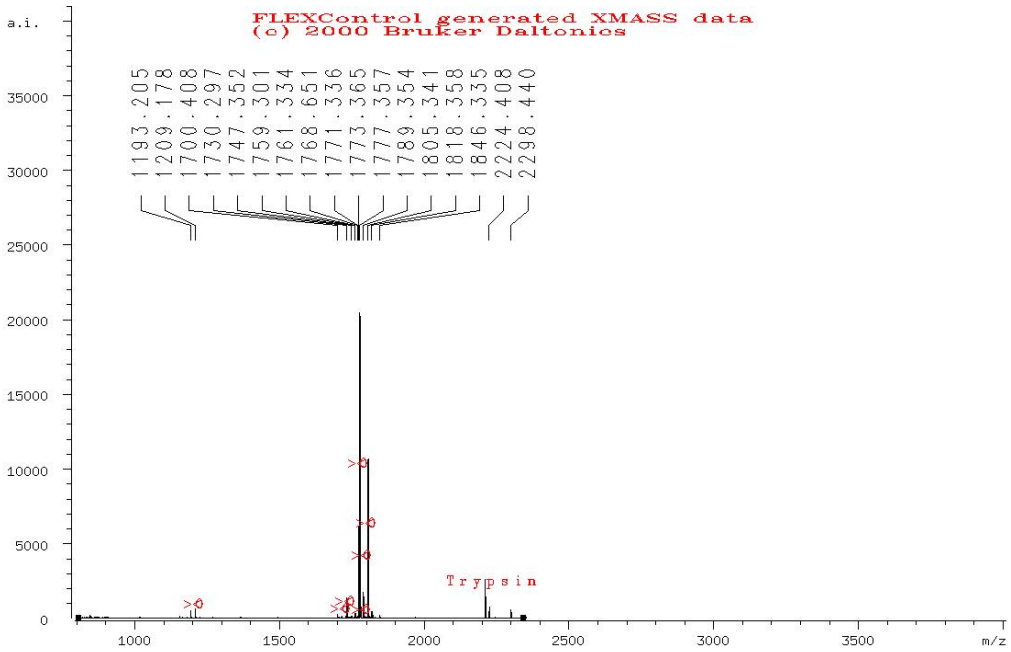


ภาพที่ 12 mass spectrum ของจุดโปรตีน spot 2 ที่ปรากฏบน Two dimensional electrophoresis gel

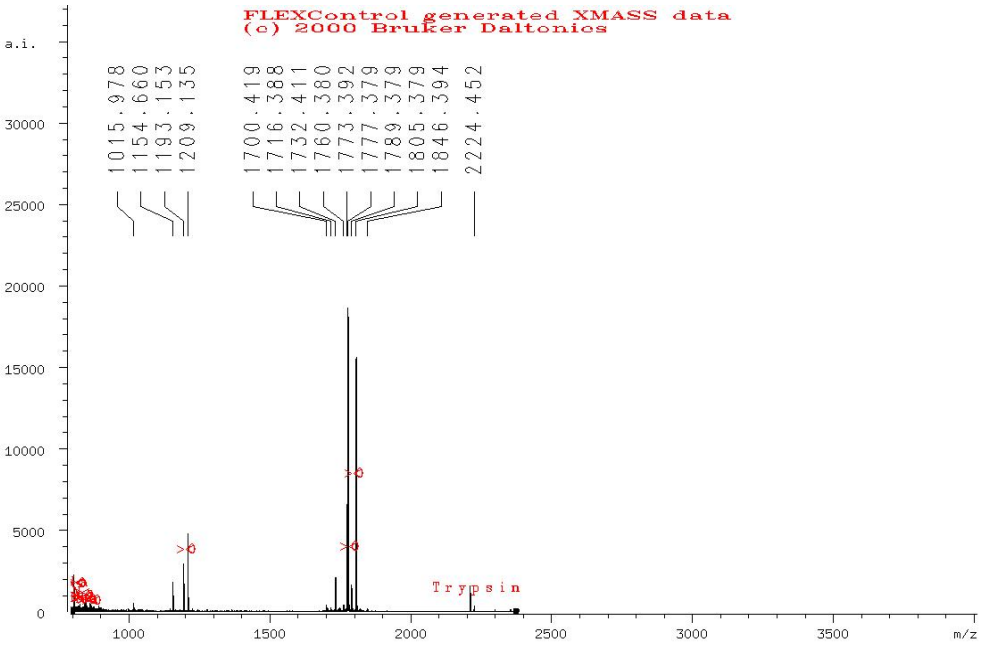
ชุดที่ 2 spot 3 spot 4 และ spot 5 ปรากฏ mass spectrum ที่ตำแหน่งเดียวกันในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 1,200 และ 1,800 ดาลตัน ดังภาพที่ 13 -15 โดยที่จุดโปรตีน spot 3 มี mass spectrum ที่ชัดเจนและมีค่า a.i. ที่สูงกว่า spot 4 และ spot 5 จึงนำ spot 2 และ spot 3 ซึ่งเป็นตัวแทนของโปรตีนชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ต่อไป



ภาพที่ 13 mass spectrum ของจุดโปรตีน spot 3 ที่ปรากฏบน Two dimensional electrophoresis gel



ภาพที่ 14 mass spectrum ของจุดโปรตีน spot 4 ที่ปรากฏบน Two dimensional electrophoresis gel

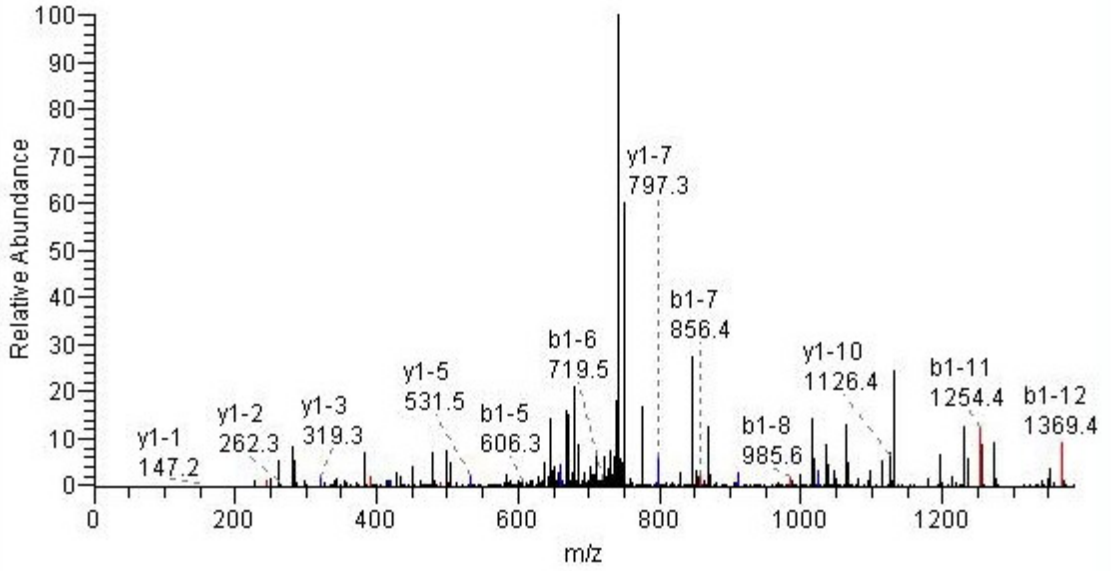


ภาพที่ 15 mass spectrum ของจุดโปรตีน spot 5 ที่ปรากฏบน Two dimensional electrophoresis gel

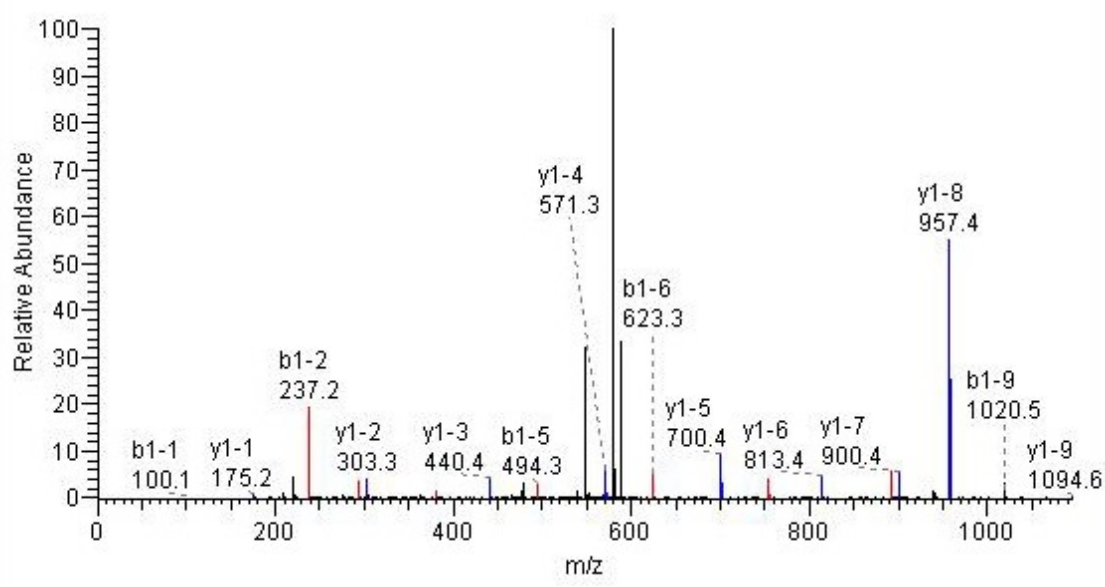
8. <u>วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค LC-MS/MS</u>

8.1 วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนจาก SDS-PAGE และ 2D-PAGE โดยเทคนิค LC-MS/MS

เมื่อส่งตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ในแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30.5 กิโลดาลตัน และ 25.0 กิโลดาลตัน เพื่อวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้ mass spectrum ของโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30.5 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 16 ซึ่งได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ VHGSIEMHQR และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 25.0 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 17 เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ NKFTDLHKLVGDK



<u>ภาพที่ 16</u> mass spectrum ของแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน จาก SDS-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS



ภาพที่ 17 mass spectrum ของแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 25.0 กิโลดาลตัน จาก SDS-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

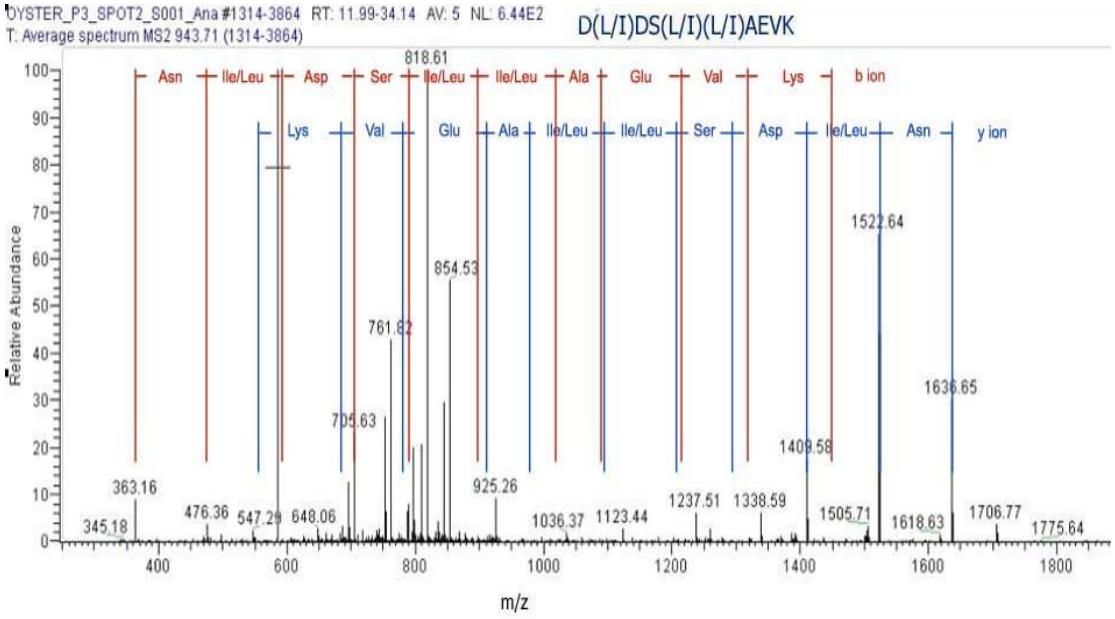
ส่งตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการทำ 2D-PAGE ในจุดโปรตีน spot 2 เพื่อวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้ mass spectrum ดังภาพที่ 18-33 สามารถคำนวนลำดับกรดอะมิโนได้ 5 ส่วน ในจุดโปรตีน spot 3 คำนวนลำดับกรดอะมิโนได้ 11 ส่วน ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีน spot 2 และ spot 3 ใน 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

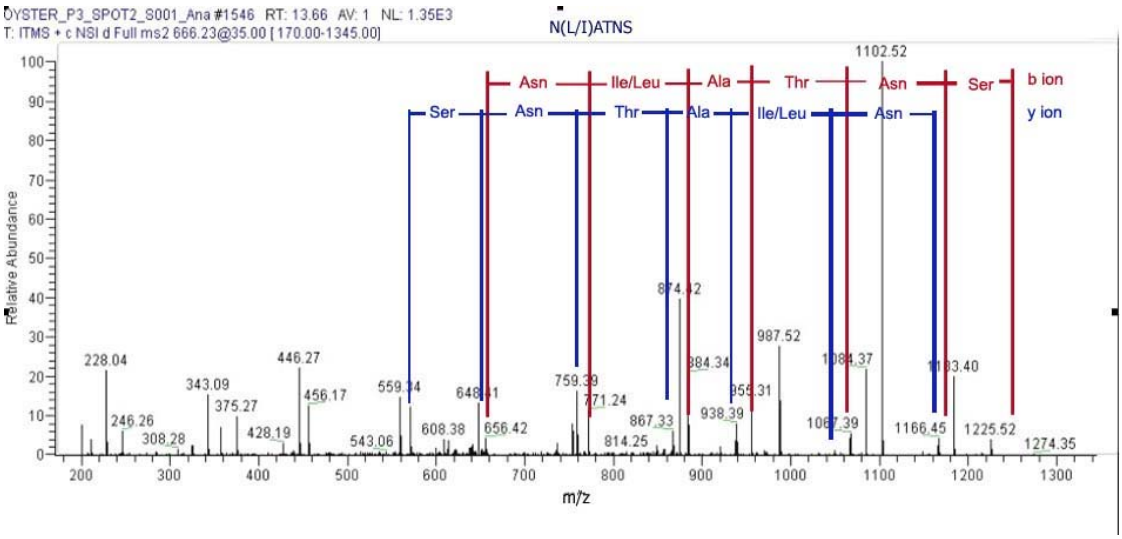
จุดโปรตีน	ส่วนที่	ลำดับกรดอะมิโน	Mass spectrum ในภาพที่
spot 2	1	D(L/I)DS(L/I)(L/I)AEVK	18
	2	N(L/I)ATNS	19
	3	VEA(L/I)PCD(L/I)D	20
	4	G(L/I)RDS	21
	5	VHG(L/I)EM_oHQR (M_o= Methionine oxidation)	22

ตารางที่ 5 (ต่อ)

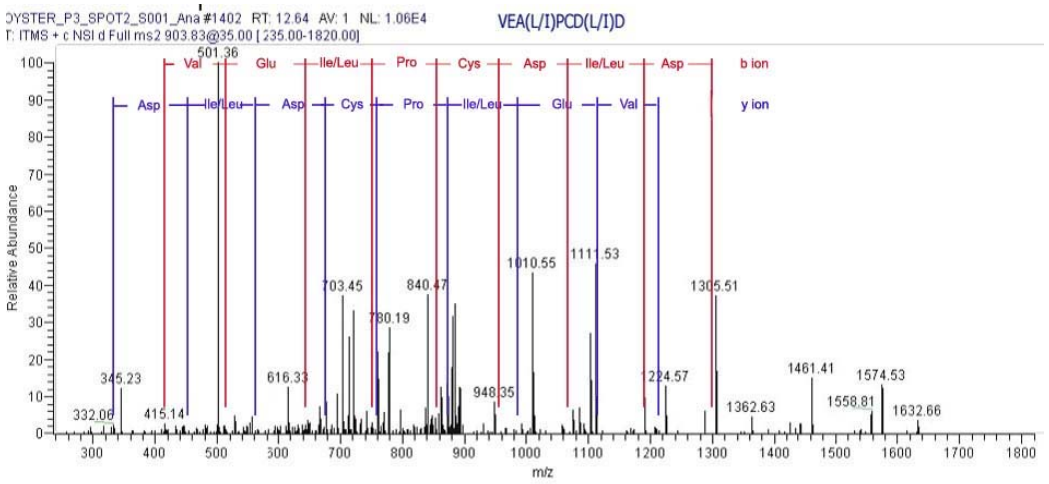
จุดโปรตีน	ส่วนที่1	ลำดับกรดอะมิโน	Mass spectrum ในภาพที่
spot 3	1	D(Q/K)E(L/VKE(L/I)SE(L/I)NR	23
	2	E(L/I)SE(L/I)NRVEA(L/I)NSD(L/I)-R	24
	3	VEA(L/I)NSD(L/I)-R(L/I)DP(L/I)ESTYR	25
	4	(L/I)DP(L/I)ESTYRSS(L/I)(Q/K)E(L/I)NND(L/I)ET-K	26
	5	SS(L/I)(Q/K)E(L/I)NND(L/I)ET-KDT(L/I)YTYYDPR	27
	6	DT(L/I)YTYYDPRD(Q/K)E(L/I)FNVK	28
	7	D(Q/K)E(L/I)FNVK(L/I)DVE(L/I)ATYR	29
	8	(L/I)DVE(L/I)ATYRAN(L/I)(F/M_o)(Q/K)ENGE(L/I)V-K (M_o= Methionine oxidation)	30
	9	AN(L/I)(F/M_o)(Q/K)ENGE(L/I)V-K (M_o= Methionine oxidation)	31
	10	AES(L/I)Y(Q/K)SK(L/I)EWESR	32
	11	(L/I)EWESR	33



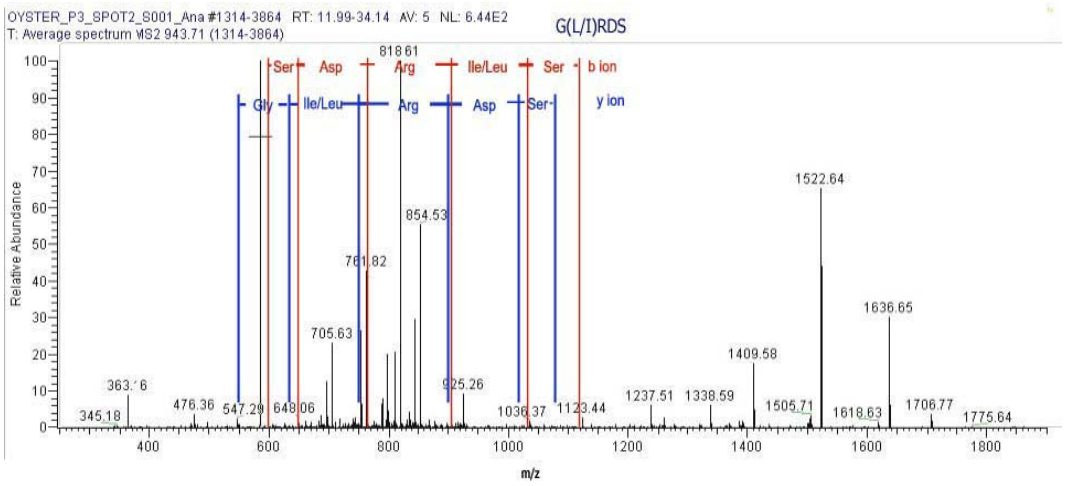
ภาพที่ 18 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 1 จุดโปรตีน spot 2 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 5)



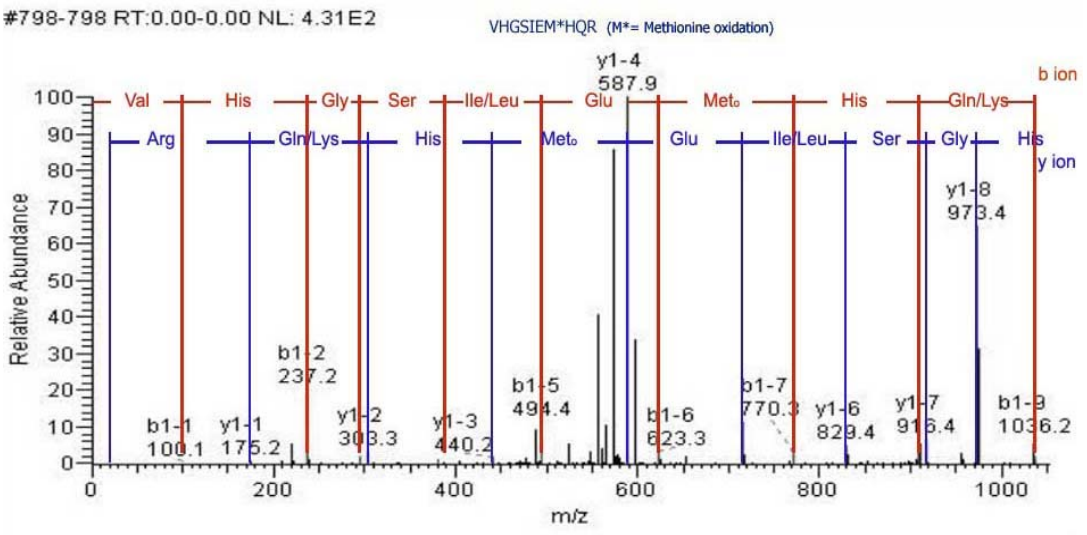
ภาพที่ 19 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 2 จุดโปรตีน spot 2 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 6)



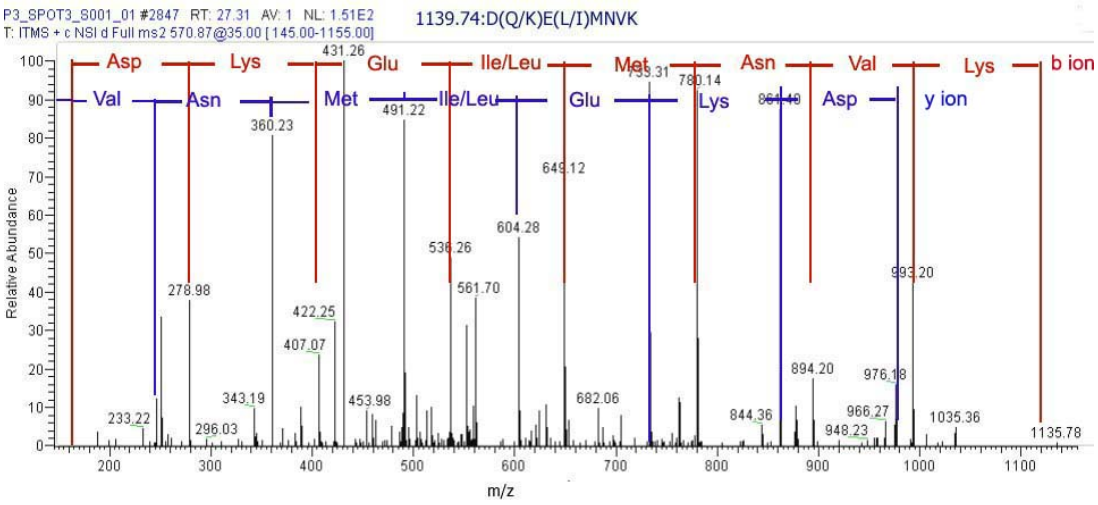
ภาพที่ 20 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 3 จุดโปรตีน spot 2 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 7)



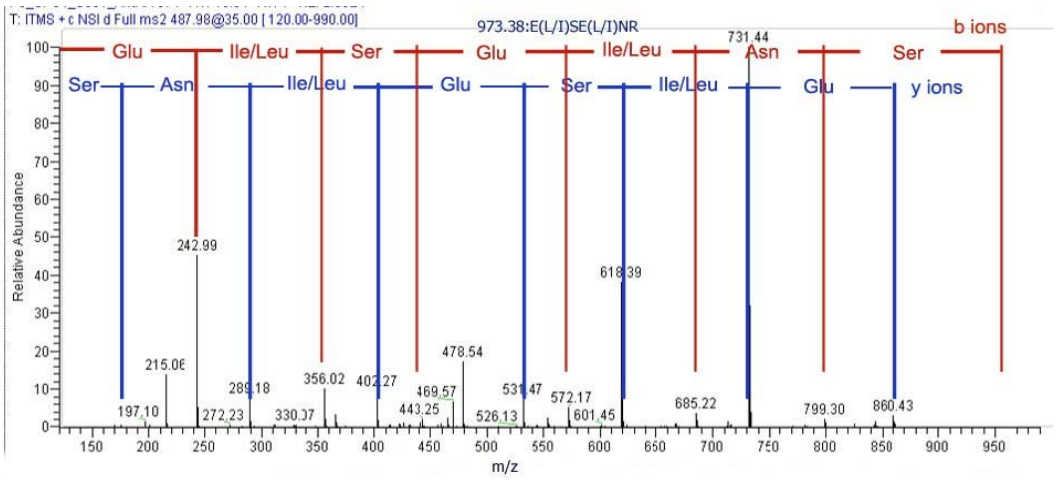
ภาพที่ 21 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 4 จุดโปรตีน spot 2 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 8)



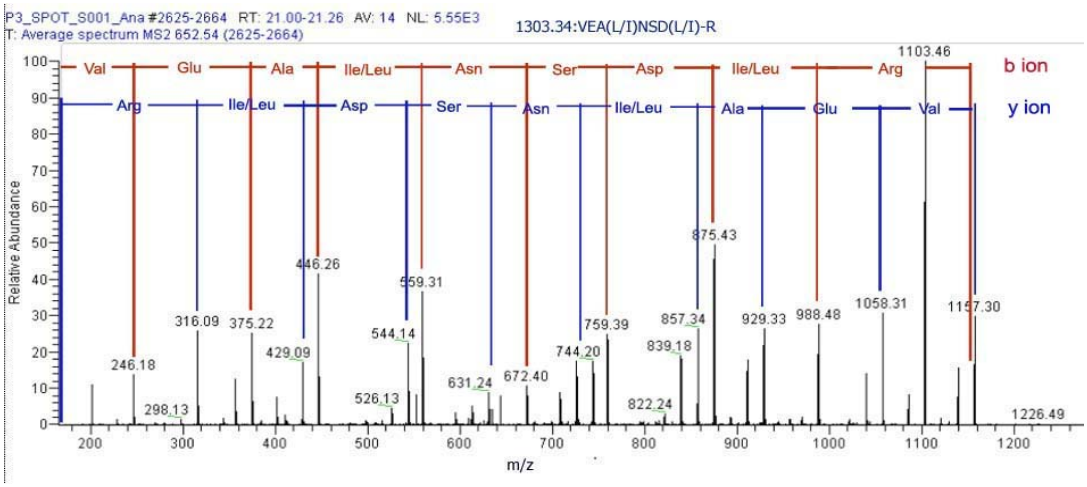
ภาพที่ 22 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 5 จุดโปรตีน spot 2 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 9)



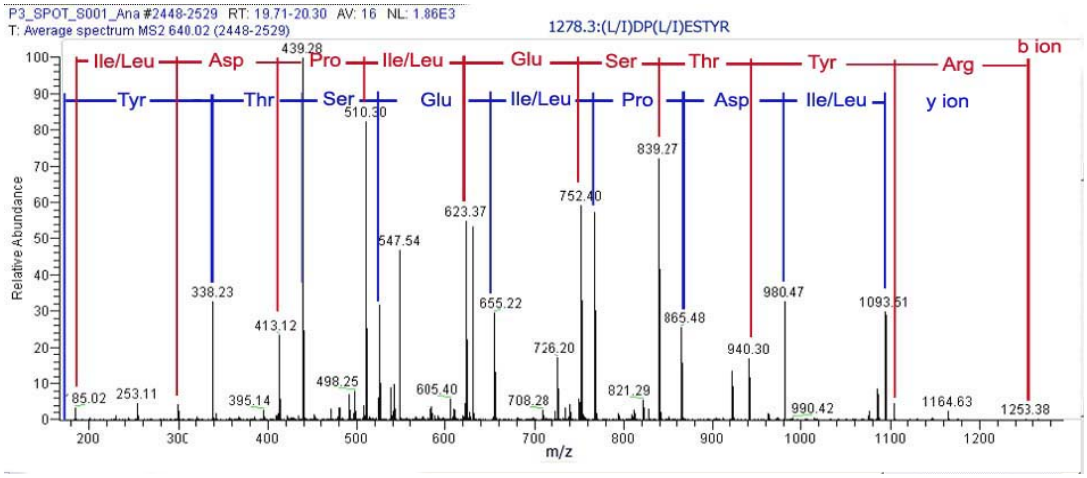
ภาพที่ 23 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 1 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 10)



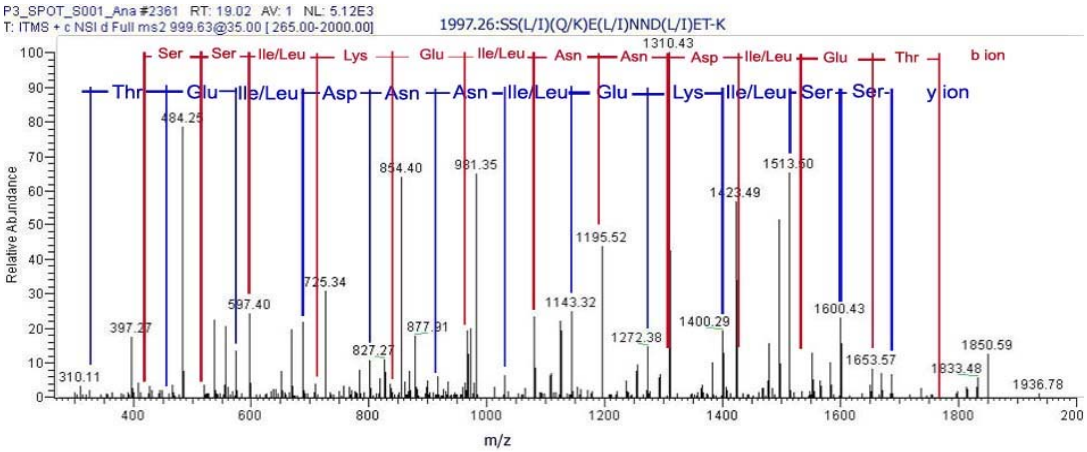
ภาพที่ 24 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 2 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 11)



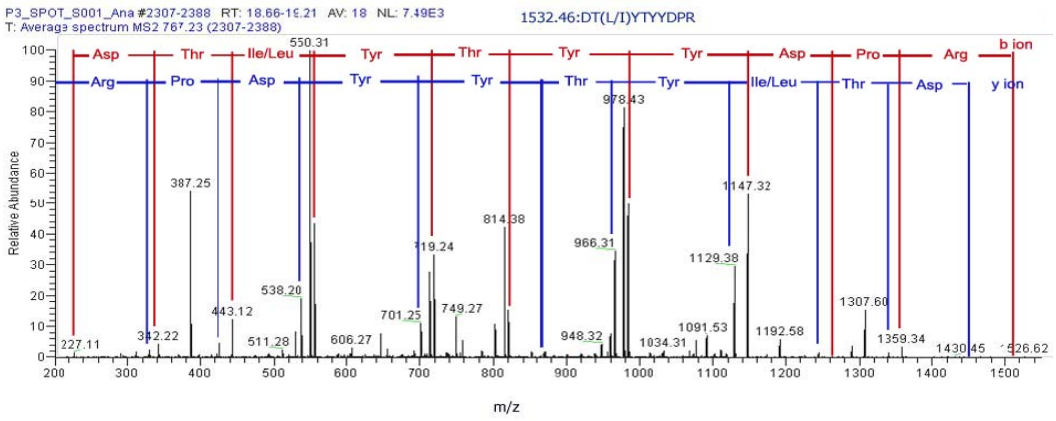
ภาพที่ 25 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 3 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 12)



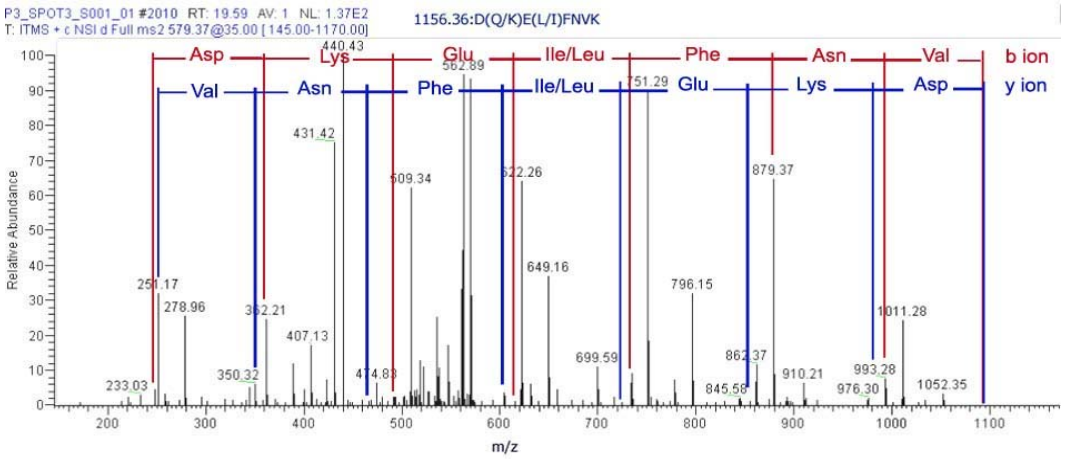
ภาพที่ 26 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 4 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 13)



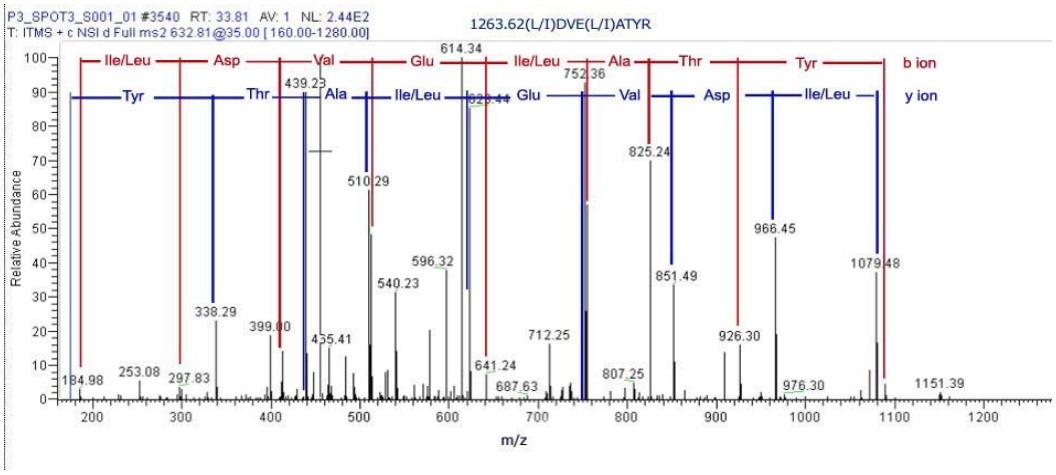
ภาพที่ 27 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 5 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 14)



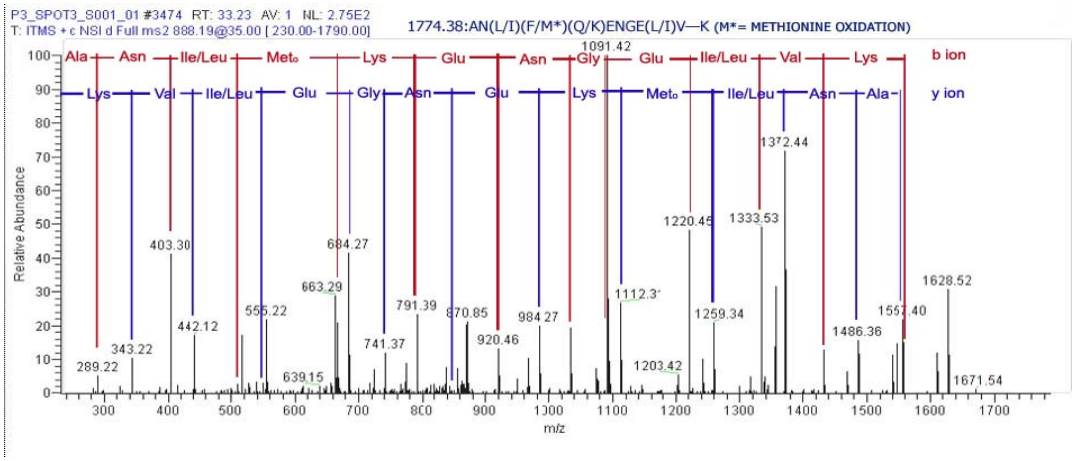
ภาพที่ 28 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 6 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 15)



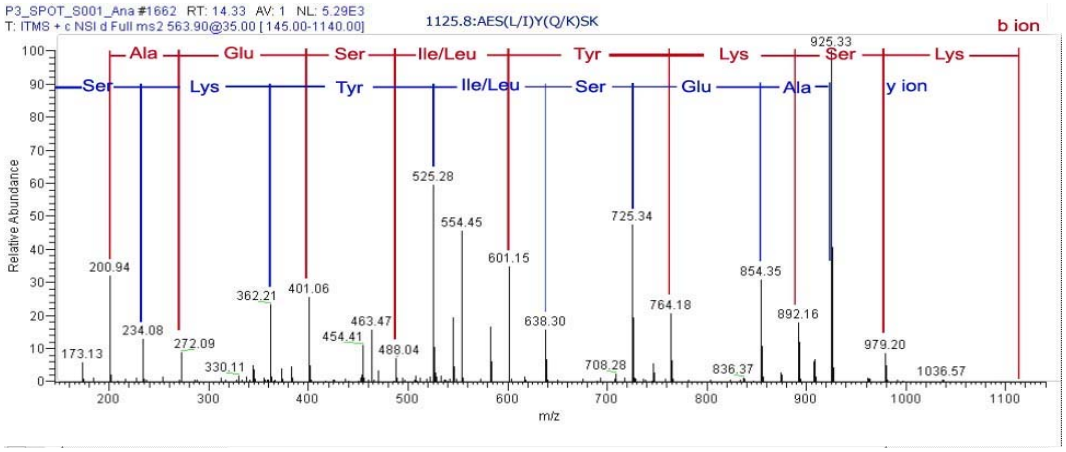
ภาพที่ 29 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 7 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 16)



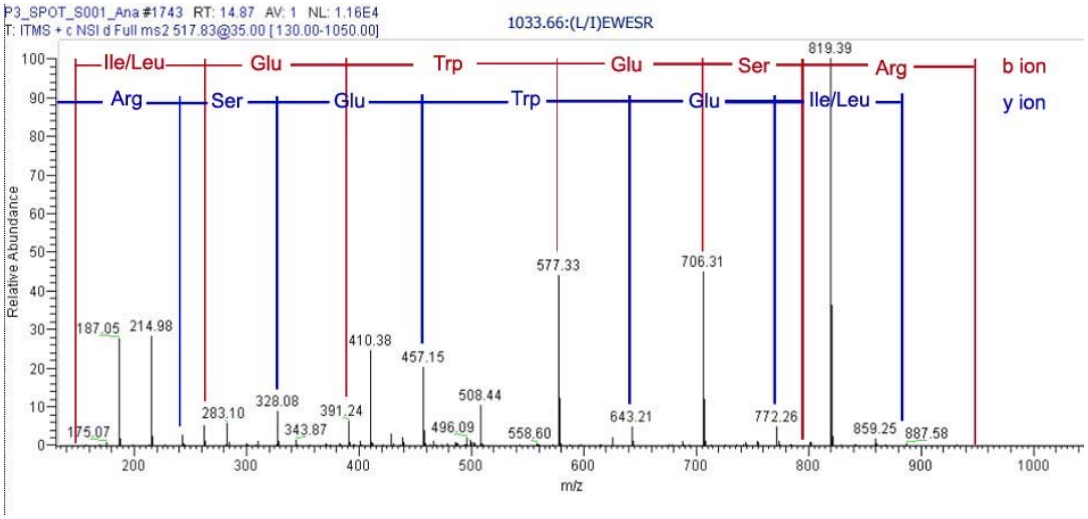
ภาพที่ 30 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 8 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 17)



ภาพที่ 31 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 9 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 18)



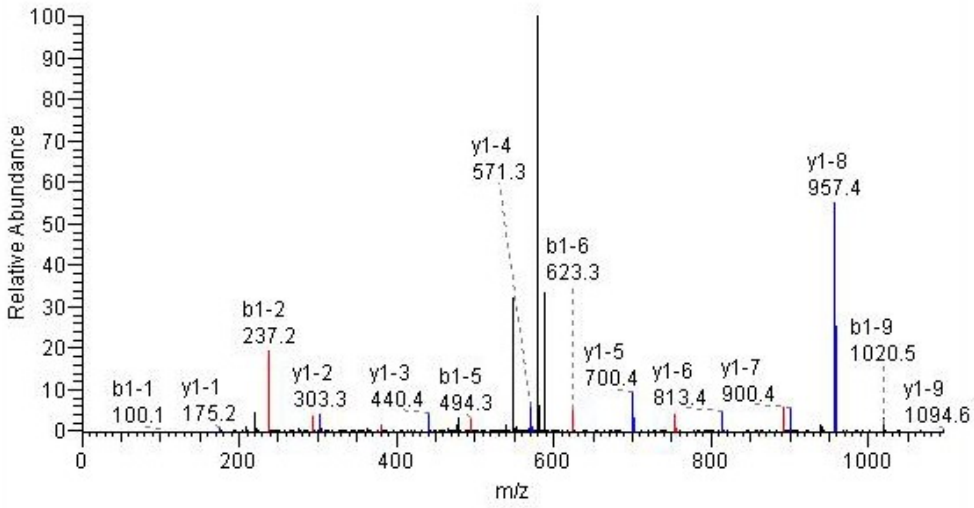
ภาพที่ 32 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 10 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 19)



ภาพที่ 33 mass spectrum ของโปรตีนส่วนที่ 11 จุดโปรตีน spot 3 ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS และระบุพีคที่เป็น b ไอออน y ไอออนและน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของโปรตีน (ตารางผนวกที่ 20)

8.2 วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีน

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่คำนวนได้จาก mass spectrometry spectrum ของ LC-MS/MS ในส่วนแถบโปรตีนจาก SDS-PAGE ใช้โปรแกรม Biowork เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFasta พบว่าแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตันมีความคล้ายกับโปรตีน Hemocyte extracellular superoxide dismutase ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนดังภาพที่ 34 มีค่า E-value เท่ากับ 1.9 และแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 25.0 กิโลดาลตันมีความคล้ายกับโปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนดังภาพที่ 35 มีค่า E-value เท่ากับ 0.007 และในส่วนของโปรตีนจาก 2D-PAGE ผลจากการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม Biowork จึงนำลำดับกรดอะมิโนที่คำนวนได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFasta โดยใช้โปรแกรม Search for short, nearly exact matches ทางอินเตอร์เน็ตในเว็ปไซท์ www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/newblast.html ทั้งโปรตีน spot 2 และ spot 3 ได้ผลดังแสดงในภาคผนวก จ พบว่าที่จุดโปรตีน spot 2 ขนาด 30.7 กิโลดาลตัน ส่วนที่ 5 มีความคล้ายกับ โปรตีน cavortin มีค่า E-value เท่ากับ 2.7 ซึ่งเป็นส่วนที่มีค่า E-value ต่ำที่สุด



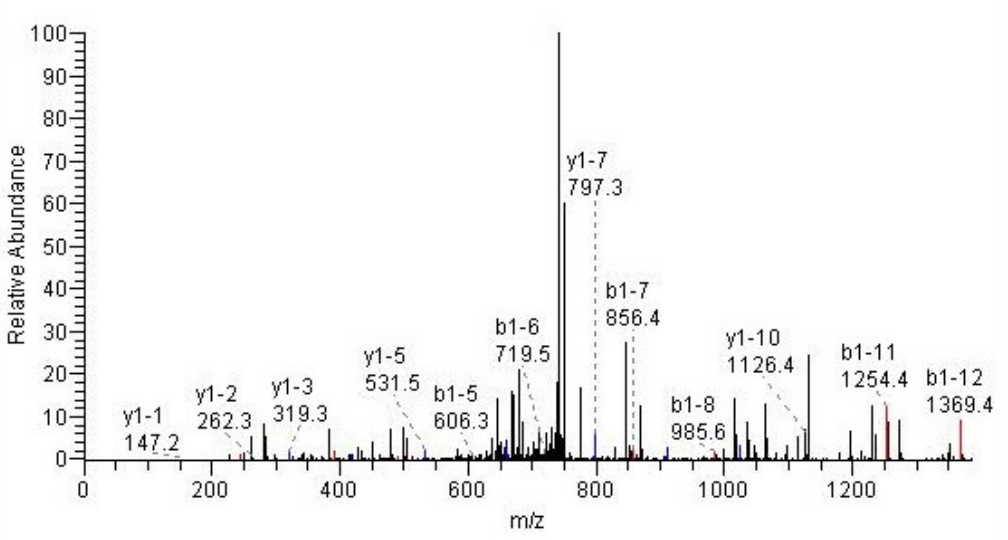
1 MNALIVLSLA ALAGFVSATAR NEANVNIYL HLSDDEDSNY ENSMHYAQCE MEPNHFMPGN

61 LHHR**VHGSIE** **MHQR**GDGPLE MEFHLTGFNV SEDFADHNYG LQIHEYGDLE HGCDTIGELY

121 HNEHAPNHDN PGDLGDLHDD DHGEVNATRT FDWLTIGHTD GILGLSSAIL QGDHTSHTAV

181 IACCVIGRSH AH

ภาพที่ 34 mass spectrum ของแถบโปรตีนจาก SDS-PAGE ของโปรตีนขนาด 30.5 กิโลดาลตัน และลำดับกรดอะมิโน (ตัวหนา)



1	TDYLVSKWKI	WYKSLDVNHD	GIISIENVEE	SR**NKFTDLHK**	**LVGDK**STGVK	VDMQKWWDTY
61	IFLTPGAEIS	ETQFVENLGN	SFKKDKAFLA	TMTACFNMIF	DVIDTDKDRS	IDLNEFIYAF
121	AAFGHENESV	VRTAFALLKP	DDDNTVPLRT	VVDAWISFVT	CEDASKTDV	IKSAFES

ภาพที่ 35 mass spectrum ของแถบโปรตีนจาก SDS-PAGE ของโปรตีนขนาด 25.0 กิโลดาลตัน และลำดับกรดอะมิโน (ตัวหนา)

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. <u>การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว และการแยกโปรตีนในน้ำเลือด</u>

จากการทดลองพบว่าน้ำเลือดหอยตะโกรมกรามขาว สามารถยับยั้งเชื้อ *V. cholerae, V. harveyi* และ *V. vulnificus* ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Tunkijjanukij and Olafsen (1998) ที่พบว่าน้ำเลือดของหอยกะพง *Modiolus modiolus* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* spp.แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของน้ำเลือดหอยกะพงมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิด เช่น สามารถยับยั้งเชื้อ *V. salmonicida*, *V. vicosus* และ *V. wodanis* ได้สูง ยับยั้งเชื้อ *V. anguillarum* และ *V. ordalii* ได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Alteromonas sp*., *Shewanella putrefaciens* และ *V. anguillarum* Tamplin and Fisher (1989) พบว่า น้ำเลือดหอยนางรม *C. virginica* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibro* spp. ได้เช่นกัน และ Charlet *et al*. (1996) รายงานว่าหอยแมลงภู่ *M. edulis* สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Micrococcus luteus* และเชื้อรา *Neurospora crassa* ได้

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของน้ำเลือดและกลุ่มโปรตีนที่แยกจากน้ำเลือด พบว่ากลุ่มโปรตีนที่แยกจากน้ำเลือดมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสูงกว่าในน้ำเลือดที่ไม่มีการแยกโปรตีนทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างดั้งเดิม ลักษณะการเกิดการม้วนพับของโปรตีนและโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อยนั้นมีผลต่อการทำงานของโปรตีน เมื่อปัจจัยข้างต้นมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานของโปรตีนก็แตกต่างออกไป Garrett and Grisham (2002) อธิบายว่าในร่างกายของสิ่งมีชีวิตมีระบบควบคุมการทำงานของสารต่างๆ ในขณะทำงานร่วมกันอาจมีหน้าที่ยับยั้งและส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน น้ำเลือดหอยตะโกรมซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหลายกลุ่มโปรตีนกลุ่มหนึ่งอาจมีผลไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนอีกกลุ่มทำให้ยับยั้งเชื้อได้เพียง 3 ชนิด แต่เมื่อแยกโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นสูงขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงตามไปด้วย จากรายงานของ Lucas-Elio *et al.* (2005) พบว่าการแยกโปรตีนยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย marinocine ที่สกัดได้จากเชื้อ *Marinomonas mediterranea* ทำให้ค่า specific activity ของโปรตีนต่อการจับกับยูแคริโอตเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้น Xue *et al*. (2004) พบว่า โปรตีนไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยนางรม *C. virginica* ที่แยกให้บริสุทธิ์มีค่า specific activity ต่อเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* เพิ่มขึ้น

2. <u>องค์ประกอบ (subunit) และน้ำหนักโมเลกุลของกลุ่มโปรตีน P3 ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย</u>

เมื่อแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์ Gel Filtration Chromatography ได้โปรตีนกลุ่ม P3 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 18.7 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการแยกด้วย Native-PAGE ได้แถบโปรตีน 1 แถบ แสดงว่าโปรตีนกลุ่ม P3 ที่ผ่านการแยกด้วย Gel Filtration Chromatography มีความบริสุทธิ์ และเมื่อนำมาแยกด้วย SDS-PAGE ที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ได้แถบโปรตีน 2 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 30.5 และ 25.0 กิโลดาลตัน ซึ่งทั้งสองเป็น subunit ของโปรตีนกลุ่ม P3 ที่ถูกแยกออกเนื่องจาก Sodium dodecylsulfate (SDS) ซึ่งเป็น detergent ที่มีประจุเป็นลบจะไปเกาะกับโปรตีนแน่นมากทำให้โปรตีนทั้งหมดเป็นประจุลบ นอกจากนั้น Sodium dodecylsulfate ยังทำให้โปรตีนเสียสภาพ โปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วยเกาะกันอยู่ ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย (Westermeier and Naven, 2002) จากผลการทดลองน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ไม่สอดคล้องกันระหว่างการแยกโปรตีนแบบ Native-PAGE และ SDS-PAGE ซึ่งเมื่อรวมน้ำหนักโมเลกุลของทั้ง 2 subunits แล้ว ควรได้น้ำหนักเท่ากับโปรตีนที่ไม่เสียสภาพ เกิดจากการที่โปรตีนเสียสภาพด้วยความร้อนทำให้โครงสร้างเปลี่ยนสภาพจากรูปทรงกลม (Globular) ไปอยู่ในสภาพสายตรง (Linear) (Westermeier and Naven, 2002) โปรตีนทั้ง 2 subunit อาจมีโครงสร้างที่แตกต่างกันเมื่อเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของโครงร่างเจลอะคริลาไมด์จึงได้แถบโปรตีนที่ตำแหน่งแตกต่างกัน จากผลการศึกษาของ Lucas-Elio *et al.* (2005) ที่ศึกษาสาร marinocine ที่เป็นโปรตีนยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเมื่อแยกโปรตีนแบบไม่เสียสภาพได้แถบโปรตีน 1 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 170 กิโลดาลตัน แต่เมื่อแยกด้วย SDS-PAGE แยกโปรตีนได้ 2 แถบ ที่ 185 และ 97 กิโลดาลตัน สามารถอธิบายได้ว่าที่ 185 กิโลดาลตัน เป็นองค์ประกอบที่เป็น dimer ของ 97 กิโลดาลตัน

เมื่อแยกโปรตีนด้วย 2D-PAGE ได้จุดโปรตีน 5 จุด ที่น้ำหนักโมเลกุล 35.7 กิโลดาลตัน 2 จุด คือ spot 1 และ spot 2 ค่า pI (Isoelectric point) 5.1 และ 5.3 ที่น้ำหนักโมเลกุล 25.8 กิโลดาลตัน 3 จุด คือ spot 3 spot 4 และ spot5 ค่า pI 3.0 3.6 และ 5.2 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับ SDS-PAGE แม้ว่าแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน ใน SDS-PAGE และ 35.7 กิโลดาลตัน ใน 2D-PAGE ให้ผลที่คลาดเคลื่อนกัน แต่จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค MALDI-TOF พบว่าที่จุดโปรตีน spot 1และ spot 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 27.26 และ 29.25 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จาก SDS-PAGE สาเหตุที่ทำให้แถบโปรตีนใน 2D-PAGE มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าอาจเกิดจาก แถบโปรตีนมาตรฐานที่น้ำหนักโมเลกุล 30.0 กิโลดาลตัน ไม่

ชัดเจน ทำให้คำนวณน้ำหนักคลาดเคลื่อนได้ ในส่วนของจุดโปรตีน spot 3 spot 4 และ spot 5 น้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF ได้คือ 25,625 25,451 และ 22,693 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงน้ำหนักเลกุลใน SDS-PAGE 2D-PAGE และ MALDI-TOF รูปแบบ mass spectrum ที่ได้จาก MALDI-TOF มี 2 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 ของโปรตีน spot 1และ spot 2 แบบที่ 2 ของโปรตีน spot 3 spot 4 และ spot 5 จากรูปแบบของ mass spectrum ที่เหมือนกันทำให้ซึ่งอาจสรุปได้ว่าโปรตีน spot 1 และ spot 2 เป็นโปรตีนชนิดเดียวกันและจุดโปรตีน spot 3 spot 4 และ spot 5 เป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน เนื่องจาก mass spectrum แต่ละตำแหน่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งจะมีตำแหน่งตัดเฉพาะที่ปลาย C-terminal ที่เป็นกรดอะมิโน Lysine (K-X) และ arginine (R-X) ยกเว้นที่เกิดพันธะกับ proline (K-P หรือ R-P) เมื่อตัดแล้วเส้นโปรตีนที่ได้เรียกว่า tryptic peptide (Kinter and Sherman, 2000) เมื่อเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน มีตำแหน่งตัดตำแหน่งเดียวกัน เส้นโปรตีนที่ย่อยได้มีขนาดเท่ากัน จึงได้รูปแบบของ mass spectrum ที่เหมือนกัน แต่ค่า pI ที่แยกได้ต่างกัน อาจเกิดจาก Protein modification โปรตีนสามารถเกิดการดัดแปลงได้ทั้งระหว่างกระบวนการภายในเซลล์ (Cellular process) หรือการเตรียมตัวอย่าง และการเกิด Post-translational modification (Weastermeier and Naven, 2002) การดัดแปลงที่พบได้แก่ Methionine oxidation, Cystein alkylation และPhosphorelation (Kinter and Sherman, 2000) มีผลทำให้ประจุสุทธิของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง ค่า pI ที่ได้จึงมีความแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังมีผลทำให้มวลที่ได้จาก MALDI-TOF เกิดความคลาดเคลื่อนได้โดย Wetermeier and Naven (2002) อธิบายว่าอนุภาคของ iodoacetamide ทำให้เกิด cystein alkylation ทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ cystein เพิ่มขึ้นจาก 103 ดาลตันเป็น 160 ดาลตัน

ค่า pI ของโปรตีนที่ได้จาก 2D-PAGE มีความสอดคล้องกับการศึกษาโปรตีนเลคตินในน้ำเลือดหอยกะพงที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ Tunkijjanukij and Olafsen (1998) โดยทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE พบจุดโปรตีน 4 จุด ที่น้ำหนักโมเลกุล 14 กิโลดาลตัน ค่า pI 5.1 และ 5.5 ที่น้ำหนักโมเลกุล 17.5 กิโลดาลตัน ค่า pI 5.5 และที่น้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน ค่า pI 4.9 ซึ่งค่า pI ที่ได้มีความใกล้เคียงกับค่า pI ของโปรตีนน้ำเลือดหอยนางรมในการทดลองนี้

3. <u>การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนและการเทียบฐานข้อมูลโปรตีน</u>

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก 2D-PAGE เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFasta พบโปรตีนที่มีความคล้ายกัน แต่ E value มีค่าสูง ซึ่งทั้งนี้อาจเกิดจากลำดับกรดอะมิโนที่ได้สั้นและ

ฐานข้อมูลของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีน้อยเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามลำดับกรดอะมิโนส่วนที่ 5 จากจุดโปรตีน spot 2 ที่น้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน มีลำดับกรดอะมิโน VHGSIEM$_0$H QR มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ชื่อว่า cavortin เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล nrFasta ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในน้ำเลือดของหอยนางรม *C. gigas* (ภาคผนวก จ.) จากการศึกษาของ Scotti *et al.* (2001) พบว่า cavortin ในน้ำเลือดหอยนางรม มีลำดับกรดอะมิโนที่ N-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโน histidine ปริมาณ 13.7% และกรดอะมิโน aspartic ปริมาณ 12.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนโปรตีน SODs (Superoxide dismutase) ที่ทำหน้าที่จับโลหะเป็นโปรตีนที่ช่วยในการส่งถ่ายออกซิเจน (Oxygen transport protein) และมีส่วนของ histidine rich glycoprotein ที่ช่วยในการ aggregation ของเม็ดเลือดและแบคทีเรียโดยใช้พันธะโคเวเลนท์ ซึ่งให้ผลเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนจาก SDS-PAGE เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFasta พบว่าที่แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน มีความคล้ายกับโปรตีน Hemocyte extracellular superoxide dismutase ที่พบในหอยนางรม *C. gigas* เช่นกัน Michael (2006) ได้อธิบายว่า Hemocyte extracellular superoxide dismutase เป็นเอนไซม์ที่พบว่าในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ถูกผลิตขึ้นเมื่อสัตว์เหล่านั้น เกิดจากความเครียดและจะผลิตสารในกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) ซึ่ง superoxide dismutase เป็นสารที่จะยับยั้งการทำงานของ ROS ได้ ซึ่งผลิตขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อจากจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรค และจาก SDS-PAGE เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFasta พบว่าที่แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 25.0 กิโลดาลตัน มีความคล้ายกับโปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) จากรายงานของ Leonard *et al.* (1997) อธิบายว่า Sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) เป็นโปรตีนที่มีหมู่ R ของกรดอะมิโนเป็นกรด ซึ่งมีค่า pI ค่อนข้างต่ำ ละลายน้ำได้ พบในเส้นประสาทและกล้ามเนื้อของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง SCP ทำหน้าที่จับกับแคลเซี่ยมไอออน ซึ่งเป็นไอออนสำคัญที่ช่วยในการส่งสัญญาณของระบบประสาท

ลำดับกรดอะมิโนจาก 2D-PAGE จุดโปรตีน spot 2 ส่วนที่ 3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน cystein ซึ่งสามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกันและฟอร์มโครงสร้างเป็นรูปบ่วง โครงสร้างนี้ประกอบ ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 1 พันธะภายในโมเลกุล (Hancock, 2001) นอกจากนั้นลำดับกรดอะมิโนทุกส่วนที่ได้จากจุดโปรตีน spot 3 มีกรดอะมิโน arginine และ lysine อยู่ค่อนข้างสูง ซึ่งคล้ายคลึงกับโปรตีนชื่อว่า polyphemusin-1 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ซึ่งพบในแมงดาทะเล มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ RRWCFRVC$_2$VRGFC$_2$YRKCR-NH$_2$ ประกอบไปด้วย arginine หลายตัว และมีโครงสร้างเบต้าชีท สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Staphylococcus aureus* และเชื้อยีสต์ *Candida albican* ได้ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน arginine และ lysine หลายตัว นอกจากนั้นในหนอนไหม

พบโปรตีน cepropin B ที่มีลำดับกรดอะมิโน KWKVFKKIEMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAK AL -NH_2 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้และมีกรดอะมิโน lysine อยู่เป็นจำนวนมาก (Hancock, 2001) จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ (degenerate primer) และนำไปสู่การค้นหายีนที่สร้างโปรตีน จากการทดลองของ Tomana *et al.* (1999) ที่ศึกษาในปลาคาร์พ *Cyprinus carpio* โดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ในส่วนปลาย N-terminal ของ immuno-globulin light chain variable region (VL) และ constant region (CL) ซึ่งทั้ง 2 ส่วน ประกอบด้วยกรดอะมิโน cysteins เรียงต่อกันแบบอนุรักษ์ และการทดลองของ Luo *et al.* (2005) หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PmLec cDNA ของ *P. monodon* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนปลาย N-terminal ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PmLec

4. <u>การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย</u>

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Vibrio spp.* พบว่ากลุ่มโปรตีน P2 และ P3 เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio spp.* ได้ทุกตัวและเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อแต่ละตัวแล้วพบว่ากลุ่มโปรตีน P3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio spp.* ได้ดีที่สุด ซึ่งเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่กลุ่มโปรตีน P3 สามารถยับยั้งได้สูงสุด จึงเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อตัวแทนในการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของกลุ่มโปรตีน P3 เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิที่เจริญได้ดีอยู่ในช่วง 5-45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37.5 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 7.5-8.5 ความเข้มข้นของเกลือที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 0.5-10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากจะทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำแล้ว ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงและอาหารเป็นพิษในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เชื้อนี้ยังสามารถสร้าง emzyme hemolysin ทำให้เกิด hemolysis ในเม็ดเลือดแดงในคน (Miyamoto *et al*., 1969) จากการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของกลุ่มโปรตีน P3 พบว่ายับยั้งได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเริ่มลดลงที่ 40 องศาเซลเซียสและเสียสภาพที่ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากหอยตะโกรมที่เพาะเลี้ยงจะอยู่ในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส ที่ความลึก 0.5-1.5 เมตร (จินตนา และคณะ, 2530) ซึ่งเป็นอุณหภูมิปกติที่หอยตะโกรมดำรงชีวิตและที่ 30 องศาเซลเซียส ยังเป็นอุณหภูมิที่เชื้อ *Vibrio spp.* เจริญได้ดีที่สุด (Buchanan *et al*., 1974) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bulgakov *et al*. (2004) ศึกษาโปรตีนเลค-ตินในน้ำเลือดของ manila clam (*Ruditapes philippinarum*) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือที่ 10-20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิปกติของน้ำ

ทะเลที่หอยชนิดนี้อาศัยอยู่ การทำงานของโปรตีนจะเริ่มลดลงที่ 30 องศาเซลเซียสและเสียสภาพที่ 90 องศาเซลเซียส

เมื่อนำโปรตีน P3 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าโปรตีนมีความคงตัวที่ 4 ºC ในการศึกษาโปรตีนและเอนไซม์ทั่วไปการเก็บโปรตีนควรอยู่ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ในตู้เย็นหรือในน้ำแข็งและที่ 0 ถึง -20 องศาเซลเซียส จะช่วยคงสภาพโปรตีนได้ดีมาก หากต้องการเก็บรักษาเป็นเวลานานควรเก็บที่ -70 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า (Linn, 1990) จากการทดสอบช่วง pH ที่กลุ่มโปรตีน P3 มีความคงตัวและทำงานได้ดีคือ pH 6 ถึง 8 แต่ดีที่สุดที่ pH 7.1 เนื่องจาก pH 7.1 เป็นค่า pH ของน้ำเลือดหอยตะโกรมที่วัดได้ สอดคล้องกับการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของโปรตีนเลคตินกับการเกิด agglutination กับเม็ดเลือดกรุ๊ปโอพบว่า pH ที่เหมาะสมคือ 6 ถึง 9 (Bulgakov *et al*., 2004) และจากการทดสอบพบว่าความเข้มข้นโปรตีนมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้นโปรตีน 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์และยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ 160 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากการทดลองความต้องการโลหะไอออนในการทำงาน พบว่ากลุ่มโปรตีน P3 มีความต้องการแคลเซี่ยมไอออนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพิ่มขึ้นจาก 17.82 เปอร์เซ็นต์ เป็น 73.00 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นแคลเซี่ยมไอออน 10 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากในน้ำทะเลมีโลหะไอออนที่สำคัญได้แก่ โซเดียมไอออน, แคลเซี่ยมไอออน, แมกนีเซียมไอออน, แมงกานีสไอออน และอื่นๆ (Xiao *et al*., 2002) และมีรายงานว่าในน้ำเลือดของหอยนางรมมีโลหะไอออนที่สำคัญคือ โซเดียมไอออน, แคลเซี่ยมไอออน, แมกนีเซียมไอออนเป็นองค์ประกอบ จากผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาโปรตีนเลคตินใน manila clam ต้องการแคลเซียมไอออนในการทำงานและทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นแคลเซียมไอออน 20 มิลลิโมลาร์ (Bulgakov *et al*., 2004; Xue *et al.*, 2004)

สรุป

1. น้ำเลือดของหอยตะโกรมกรามขาว (*C. belcheri*) มีปริมาณโปรตีน 6.363±0.923 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *V. cholerae, V. harveyi* และ *V. vulnificus* ได้ เป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 33.38±1.67, 29.51±1.66 และ22.31±1.68 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

2. สามารถแยกโปรตีนจากน้ำเลือด *C. belcheri* โดยเทคนิค Gel Filtration Chromatography ด้วย Sephacryl S-200 ได้โปรตีน 4 ชนิด คือ P1, P2, P3 และ P4 มีน้ำหนักโมเลกุล 75.4, 58.4, 18.7 และ 15.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

3. เมื่อทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. พบว่าโปรตีน P3 สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ P1, P2 และ P4 โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 95.03±0.47, 91.13±0.85, 86.06±1.13, 62.31±0.46 และ 8.77±3.82 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4. เมื่อศึกษาคุณลักษณะของโปรตีน P3 พบว่าประกอบด้วย 2 subunits ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30.5 และ 25.0 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 5 และ 3 ตามลำดับ

5. การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน P3 พบว่า subunit ที่ 1 (30.5 กิโลดาลตัน) ได้ลำดับกรดอะมิโน NKFTDLHKLVGDK ซึ่งคล้ายกับโปรตีน Hemocyte extracellular superoxide dismutase และ subunit ที่ 2 (25.0 กิโลดาลตัน) ได้ลำดับกรดอะมิโน VHGSIEMHQR ซึ่งคล้ายกับโปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียของโปรตีน P3 ที่แยกได้จากน้ำเลือด *C. belcheri* พบว่าโปรตีน P3 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส และเสียสภาพที่ 60 องศาเซลเซียส ช่วง pH ที่โปรตีนมีความคงตัวและทำงานได้ดีคือช่วง pH 6 ถึง 8 และดีที่สุดที่ pH 7.1 นอกจากนั้นโปรตีน P3 มีความต้องการแคลเซี่ยมไอออนเพื่อช่วยในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีขึ้นที่ความเข้มข้นแคลเซี่ยมไอออน 0.01 โมลาร์ และความสามารถในการยับยั้งมีความสัมพันธ์กับความ

เข้มข้นของปริมาณโปรตีน โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการเพิ่มเทคนิคในขั้นตอนแยกโปรตีนจะทำให้โปรตีนที่แยกได้บริสุทธิ์และมีความเข้มข้นมากขึ้น นอกจากนั้นอาจพบกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้

2. หากต้องการทราบความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพในวงกว้าง (Broad spectrum microbial) ควรเพิ่มเชื้อที่ใช้ในการทดลองให้มีทั้งแกรมบวก แกรมลบ เชื้อรา ยีสต์และโปรโตซัว

3. ในอนาคตหากต้องการที่จะศึกษาถึงยีนที่ผลิตโปรตีนนี้เราสามารถสร้าง degenerate primer ขึ้นมา โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนจากผลการทดลองเป็นแม่แบบในการออกแบบ