

การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีการเกาะกลุ่มกับเลคตินขนุน

Identification of Microbes by Jackfruit Lectin Agglutination Assay

นวลฉวี เวชประสิทธิ์^{1*}, ฐากรณ์ สอนวัฒนา²

Nuanchawee Wetprasit^{1*}, Thakorn Sornwatana²

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University

²ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

* E-mail: nuanwee@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้นำสารเลคตินขนุนที่ทำให้บริสุทธิ์จากเมล็ดขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) มาทดสอบการจับจำเพาะกับเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 31 สายพันธุ์ โดยวิธีการเกาะกลุ่มพบว่า เลคตินขนุนสามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus saprophyticus* DMST 8034 และ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 การเกาะกลุ่มมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ ที่เวลา 2-24 ชั่วโมง นอกจากนี้ได้นำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อกับเลคตินขนุนด้วยกาแลคโตสและอนุพันธ์ ผลการทดลองพบว่า 2-deoxy-D-galactose ที่ความเข้มข้น 0.002 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการเกาะกลุ่ม *E. faecalis* ได้ดีที่สุด ส่วน D-galactosamine ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการเกาะกลุ่ม *S. saprophyticus* และ *S. cerevisiae* ได้ดีที่สุด การเกาะกลุ่ม *S. cerevisiae* ยังถูกยับยั้งได้ดีด้วย raffinose ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลเฉพาะสำหรับเลคตินขนุนที่จับกับกาแลคโตส ดังนั้นเลคตินขนุนสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: เลคตินขนุน การเกาะกลุ่ม เชื้อจุลินทรีย์

Abstract

In this study, the purified jackfruit lectin from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds was examined for the interaction with thirty one strains of microbes by agglutination assay. It was found that jackfruit lectin induced the agglutination of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus saprophyticus* DMST 8034 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601. The

agglutination was highly increased according to the growth rate at 2-24 h. In addition, these three strains were determined the inhibition of jackfruit lectin-induced cell agglutination by galactose and its derivatives. The results showed that 2-deoxy-D-galactose at a concentration of 0.002 mM was the most potent inhibition of *E. faecalis* whereas D-galactosamine at a concentration of 0.01 mM was a strong inhibition of *S. saprophyticus* and *S. cerevisiae*. Moreover, the agglutination of *S. cerevisiae* was effectively inhibited by raffinose at a concentration of 0.01 mM. These results suggest that microbial cell walls are composed of specific sugar molecules for galactose-binding jackfruit lectin. Therefore jackfruit lectin can be applied to the preliminary identification of microbes in laboratory.

Keywords: Jackfruit lectin, Agglutination, Microbes

บทนำ

เลคตินเป็นสารโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต โดยมีบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างน้อย 2 บริเวณขึ้นไป และไม่ได้สร้างจากระบบภูมิคุ้มกัน สามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือตกตะกอนโมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบได้ และการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยเลคตินนั้น สามารถยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลโมเลกุลเล็กที่มีความจำเพาะต่อเลคตินแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน (Goldstein et al., 1980) เลคตินพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทุกประเภท ส่วนใหญ่พบในพืช โดยเฉพาะในเมล็ด เลคตินมีคุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ ทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม เช่น เม็ดเลือดแดง อสุจิ เชื้อแบคทีเรีย (Cole et al., 1984; Davidson, Keller & Doyle, 1982) กระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Leiner, Sharon & Goldstein, 1986) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น abrin (เลคตินจากเมล็ดมะกล่ำตาหนู) ricin (เลคตินจากเมล็ดกะหล่ำ) และมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (Weiler et al., 1990; Swanson et al., 2010) เป็นต้น เนื่องจากเลคตินจับจำเพาะกับน้ำตาล ทำให้มีการแบ่งเลคตินตามความจำเพาะต่อน้ำตาล คือ เลคตินจับจำเพาะกับน้ำตาล mannose/glucose เลคตินจับจำเพาะกับน้ำตาล N-acetylglucosamine เลคตินจับจำเพาะกับน้ำตาล N-acetylgalactosamine/galactose เลคตินจับจำเพาะกับน้ำตาล fucose และเลคตินจับจำเพาะกับ sialic acid ในการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินนั้น เกิดจากความจำเพาะในการจับกับโมเลกุลน้ำตาลที่อยู่บนผนังเซลล์ ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ที่โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) บนผิวแคปซูล บริเวณที่จับโมเลกุลเลคตินบนผนังเซลล์พบว่า ประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp. มีสารที่ผิวเซลล์เป็นเดกซ์แทรน (dextran) สามารถจับยึดกับ *Canavalia ensiformis* (Con A; เลคตินจากถั่วพราง) ได้ (Goldstein, Poretz & Yang, 1986) จากคุณสมบัติต่าง ๆ จึงนำเลคตินมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม การแยกชนิดของเชื้อราและโปรโตซัว การแยกชนิดของเซลล์ตามความแตกต่างของน้ำตาลบนผิวเซลล์ที่

เปลี่ยนแปลงไปในกระบวนการต่าง ๆ เช่น การพัฒนาการเจริญเติบโต หรือการเปลี่ยนรูปแบบของเซลล์ (Oda et al., 1999; Ofek, Mirelman & Sharon, 1977) การนำเลคตินไปใช้ในการแยกหมู่เลือดในธนาคารเลือด (Sharon & Lis, 1995) การใช้เลคตินตรวจสอบเซลล์มะเร็ง การใช้เลคตินเป็นตัวนำยาหรือสารเคมี ซึ่งเลคตินบางชนิดมีความสามารถในการเข้าจับกับเซลล์ที่เจริญผิดปกติได้ จึงใช้เลคตินเป็นตัวนำยา หรือสารเคมีเข้าทำลายเซลล์ที่ผิดปกติ เช่น การใช้ Con A ซึ่งเป็นเลคตินยึดติดกับยาต่อต้านเซลล์เนื้องอก พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ในหลอดทดลองได้ดีกว่าการใช้ยาอย่างเดียวโดยไม่มีเลคตินเป็นตัวนำยา (Kitao & Hattori, 1977) หรือการใช้ ricin และ abrin เชื่อมกับโมเลกุลของโมโนโคลนัลแอนติบอดี เป็น immunotoxin ในการทำลายเซลล์มะเร็งเพื่อการรักษาโรคมะเร็ง (Lis & Sharon, 1986) การนำเลคตินมาเป็น ligand หรือเชื่อมติดกับโมเลกุลอื่น ๆ เช่น โมเลกุลน้ำตาล เพื่อประโยชน์ในการนำไปแยกโมเลกุลหรือสารไกลโคโปรตีนที่จับกับน้ำตาลนั้น ๆ ได้ เป็นต้น

เลคตินขนุน (jackfruit lectin) ได้จากเมล็ดขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) ซึ่งเป็นพืชเขตร้อน อยู่ในวงศ์ MORACEAE พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ Jacalin (*Artocarpus integrifolia*) มีความจำเพาะจับกับน้ำตาล N-acetylgalactosamine (Namjuntra, Muanwongyathi & Chulavatnatol, 1985) เลคตินขนุนสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคน หนู แพะ และแกะ เกิดการเกาะกลุ่มได้เช่นเดียวกับเซลล์อสุจิของคน และหนู (Namjuntra, Muanwongyathi & Chulavatnatol, 1985; Prapunpoj & Chulavatnatol, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่า เลคตินขนุนสามารถกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด NK lymphocyte (CD+/CD56+) ให้มีการแบ่งตัว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสเริม ชนิด 2 (Herpes Simplex Virus type 2; HSV 2) และ Cytomegarovirus (Wetprasit et al., 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ตรวจหาคุณสมบัติทางชีวภาพของเลคตินขนุนในการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน และทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เพื่อนำเลคตินขนุนไปประยุกต์ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการทางคลินิก โดยนำวิธีการเกาะกลุ่มของเชื้อกับเลคตินขนุน ไปพัฒนาใช้ร่วมกับขั้นตอนการวิเคราะห์เบื้องต้น เช่น การย้อมสีแกรม (Gram staining) การดูลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) เป็นต้น เพื่อให้การวิเคราะห์มีความจำเพาะ สะดวก และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเลคตินขนุนในการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคน และการจับจำเพาะกับน้ำตาลโดยวิธีการเกาะกลุ่ม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จำนวน 31 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter baumannii* ATCC 19066, *Acinetobacter lwoffii* ATCC 15309, *Aeromonas hydrophila* DMST 2798, *Bacillus cereus* ATCC

11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Citrobacter freundii* DMST 1959, *Enterobacter cloacae* DMST 3557, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* DMST 4743, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Klebsiella oxytoca* DMST 16071, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 17368, *Salmonella paratyphi* A DMST 8486, *Salmonella typhi* DMST 5784, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Shigella boydii* DMST 7776, *Shigella dysenteriae* DMST 15111, *Shigella flexneri* DMST 4423, *Shigella sonnei* DMST 2982, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus saprophyticus* DMST 8034, *Streptococcus bovis* DMST 8379, *Streptococcus pyogenes* DMST 17020, *Vibrio cholerae* non O1, non O139 DMST 2873, *Vibrio vulnificus* DMST 5852 และ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 ที่ เป็นสายพันธุ์มาตรฐานจาก American Type Culture Collection (ATCC) จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และศูนย์รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences Culture Collection; DMST) กระทรง สารรณสุช นำมาเพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ตูดอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนบนทั้ง ล้างเซลล์ซ้ำนี้อีก 2-3 ครั้ง ด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) ทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยและเจือจาง ปรับความขุ่นด้วย PBS ให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น (suspension turbidity detector; Biosan Ltd., Latvia)

2. การเตรียมสารบริสุทธิ์เลคตินขนุน

นำเมล็ดขนุนมาสกัดสารเลคตินและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีที่ได้ศึกษาริ้วยไว้แล้ว (Namjuntra Muanwongyathi & Chulavatnatol, 1985; Prapunpoj & Chulavatnatol, 1996) โดยเอาเปลือกหุ้มเมล็ด ออก หั่นเป็นชิ้นเล็กและบดให้ละเอียดใน PBS นำไปปั่น 3,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำส่วนใสมาเติมด้วย 60% saturated ammonium sulfate ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอน ที่ 27,000 x g เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้ละลายด้วย PBS และไป dialysis ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 18-24 ชั่วโมง นำส่วนใสไปผ่าน N-acetylgalactosamine-agarose affinity column (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) ขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง x ยาว) 1.8 x 6.5 เซนติเมตร ทำการ ล้างโปรตีนที่ไม่จับคอลัมน์ (unbound protein) ด้วย PBS และทำการชะโปรตีนเลคตินขนุนที่จับคอลัมน์ ด้วย 0.03 โมลาร์ ของน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) ใน PBS นำตัวอย่างเลคตินขนุนมาวัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Lowry's Method (Lowry et al., 1951) และเก็บเลคตินขนุนที่ทำบริสุทธิ์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3. การทดสอบการเกาะกลุ่มของเซลล์

นำสารละลายเลคตินขนุนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจือจางปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาส่งดูการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 และ 40 เท่า รายงานการเกาะกลุ่มผลลบ (ไม่เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อ) และผลบวก (เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อจากน้อยที่สุด คือ ระดับ 1+ ถึงมากที่สุด คือ ระดับ 4+)

4. การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในการเกาะกลุ่มกับเลคตินขนุน

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารแข็ง LB มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (10% inoculum) เก็บเซลล์ทันทีที่ทำกรถ่ายเชื้อเสร็จให้นับเป็นชั่วโมงเริ่มต้น ($t=0$) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บเซลล์เพื่อวัดการเจริญเติบโตที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยเก็บเชื้อครั้งละ 5 มิลลิลิตร จนครบ 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอย โดยเจือจางปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ทำการทดสอบความสามารถในการเกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อกับเลคตินขนุน

5. การทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด

นำสารละลายเลคตินขนุนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจาง 2 เท่า ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำเลคตินขนุนที่เจือจางแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาใส่ในไมโครไตเตอร์เพลตชนิด 96 หลุม (V-bottom) เติม 2% สารละลายของเม็ดเลือดแดงแกะ ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงไปทุกหลุม เขย่าเบา ๆ และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อ่านผลการทดลองเป็นค่าไตเตอร์ ซึ่งเป็นค่าเจือจางมากที่สุดของเลคตินขนุนที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ โดยวัดเป็นหน่วย haemagglutination unit (HA) (Wetprasit & Chulavatnatol, 1997)

6. การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินขนุนด้วยน้ำตาล

นำสารละลายน้ำตาล (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) ในตารางที่ 1 ความเข้มข้น 180 มิลลิโมลาร์ มาเจือจาง 2 เท่า ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำแต่ละความเข้มข้นที่เจือจาง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลตชนิด 96 หลุม (U-bottom) เติมสารละลายเลคตินขนุนลงไปทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ค่าไตเตอร์ของเลคตินขนุนที่มีค่าเจือจางน้อยกว่าไตเตอร์ของเลคตินขนุนที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่ม ประมาณ 2 dilution (2 units of HA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

หลังจากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจือจางปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ใส่ลงทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตการเกิดการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกลับ กำลังขยาย 10 เท่า โดยการทดสอบใส่สารละลายผสมระหว่าง PBS กับเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นตัวควบคุม อ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารละลายน้ำตาลที่ใช้ทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินขนุน

โมโนแซคคาไรด์ (Monosaccharide)	ไดแซคคาไรด์ (Disaccharide)	ไตรแซคคาไรด์ (Trisaccharide)
- 2-deoxy-D-galactose	- 4-O- α -D-	- Raffinose
- 6-O-methyl-D-galactose	galactopyranosyl-D-	
- Galactose	galactopyranose	
- D-galactosamine		
- Methyl- α -D-galactopyranoside		
- Methyl- β -D-galactopyranoside		
- N-acetyl-D-galactosamine		
- p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside		

ผลการวิจัย

การทดสอบการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินขนุน

ในการทดสอบการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์พบว่า เลคตินขนุนสามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์ได้แตกต่างกัน ซึ่ง *E. faecalis*, *S. saprophyticus* และ *S. cerevisiae* เกิดการเกาะกลุ่มให้ผลบวกสูงสุด 3+ โดยที่เชื้อชนิดอื่น ๆ ไม่พบการเกาะกลุ่ม (ตารางที่ 2) หลังจากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มาศึกษาวัฏจักรเจริญเติบโตและการเกาะกลุ่มต่อไป

การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการเกาะกลุ่มกับเลคตินขนุน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดการเกาะกลุ่มกับเลคตินขนุน จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *E. faecalis*, *S. saprophyticus* และ *S. cerevisiae* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB และทำการวัดการเจริญเติบโตและการเกาะกลุ่มของเชื้อที่เวลาต่าง ๆ พบว่า ระยะพักตัว (lag phase) ของการเจริญเติบโตที่ 0-1 ชั่วโมง มีการเกาะกลุ่มของเชื้อให้ผลลบ แต่ในระยะเพิ่มจำนวน (exponential phase) ที่ 2-4 ชั่วโมง และระยะคงที่ (stationary phase) ที่ 5-12 ชั่วโมงพบว่า เกิดการเกาะกลุ่มในระดับ 3+ ของ *E. faecalis* ATCC 29212, *S. saprophyticus* DMST 8034 และ *S. cerevisiae* ATCC 2601 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5, 9 และ 10 ตามลำดับ (ภาพที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 2 การเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินขนุน

เชื้อจุลินทรีย์	ผลการเกาะกลุ่ม
1. <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19066	-
2. <i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 15309	-
3. <i>Aeromonas hydrophila</i> DMST 2798	-
4. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	-
5. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-
6. <i>Citrobacter freundii</i> DMST 1959	-
7. <i>Enterobacter cloacae</i> DMST 3557	-
8. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+++
9. <i>Enterococcus faecium</i> DMST 4743	-
10. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
11. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	-
12. <i>Klebsiella oxytoca</i> DMST 16071	-
13. <i>Micococcus luteus</i> ATCC 10240	-
14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-
15. <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 17368	-
16. <i>Salmonella paratyphi</i> A DMST 8486	-
17. <i>Salmonella typhi</i> DMST 5784	-
18. <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	-
19. <i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	-
20. <i>Shigella boydii</i> DMST 7776	-
21. <i>Shigella dysenteriae</i> DMST 15111	-
22. <i>Shigella flexneri</i> DMST 4423	-
23. <i>Shigella sonnei</i> DMST 2982	-
24. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-
25. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-
26. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> DMST 8034	+++
27. <i>Streptococcus bovis</i> DMST 8379	-
28. <i>Streptococcus pyogenes</i> DMST 17020	-
29. <i>Vibrio cholerae</i> non O1, non O139 DMST 2873	-
30. <i>Vibrio vulnificus</i> DMST 5852	-
31. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	+++

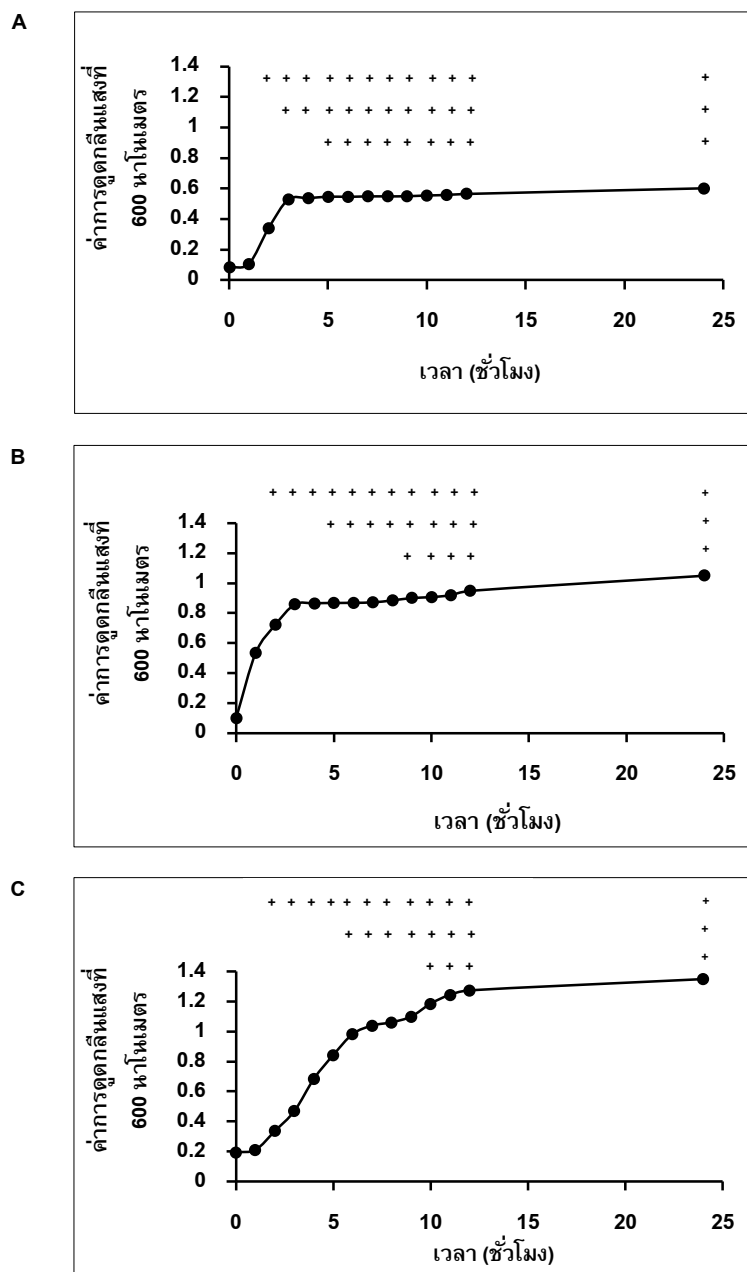
การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินบนพื้นด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อกับเลคตินด้วยน้ำตาลกาแลคโตสและอนุพันธ์พบว่าเกิดการจับจำเพาะกับน้ำตาลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่า 2-deoxy-D-galactose ยับยั้งการเกาะกลุ่ม *E. faecalis* ที่ความเข้มข้น 0.002 มิลลิโมลาร์ และ D-galactosamine ยับยั้งการเกาะกลุ่ม *S. saprophyticus* ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ ได้ดีที่สุด ส่วนการเกาะกลุ่ม *S. cerevisiae* ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดด้วย D-galactosamine และ raffinose ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 3)

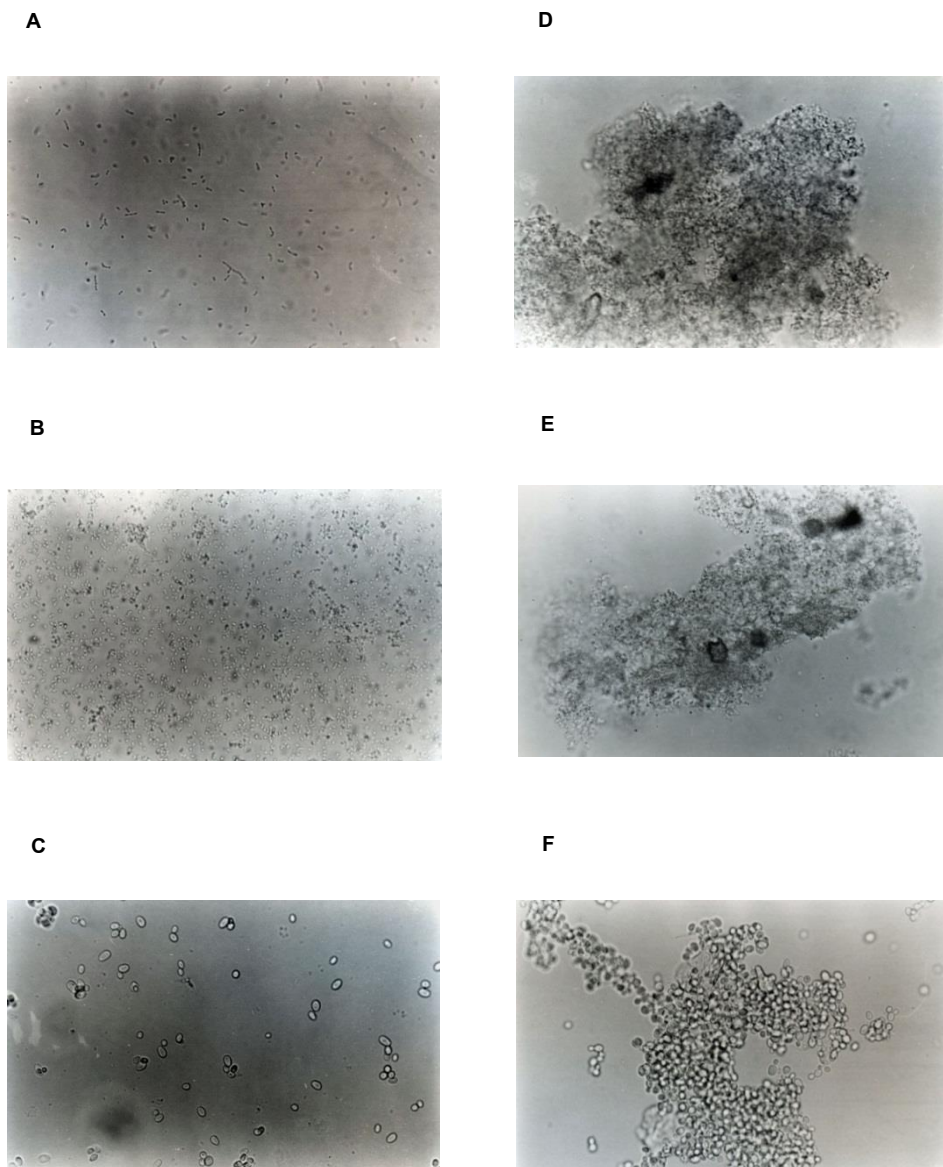
ตารางที่ 3 การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินบนพื้นด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

น้ำตาล	ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำตาล ที่ใช้ในการยับยั้ง (มิลลิโมลาร์)		
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
โมโนแซคคาไรด์			
- 2-deoxy-D-galactose	0.002	0.70	0.02
- 6-O-methyl-D-galactose	NI	NI	NI
- Galactose	2.81	45	0.02
- D-galactosamine	1.41	0.01	0.01
- Methyl- α -D-galactopyranoside	5.63	2.81	0.18
- Methyl- β -D-galactopyranoside	0.18	5.63	0.35
- N-acetyl-D-galactosamine	0.02	2.81	0.35
- p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	0.02	0.02	NI
ไดแซคคาไรด์			
- 4-O- α -D-galactopyranosyl-D-galactopyranose	2.81	5.63	22.5
ไตรแซคคาไรด์			
- Raffinose	0.35	0.18	0.01

หมายเหตุ: NI หมายถึง No Inhibition (ไม่มีการยับยั้ง)



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เวลาต่างๆ และการเกาะกลุ่มของเชื้อกับเลคตินขนุน โดยวัดการเกาะกลุ่มของเชื้อจากระดับ 1+ ถึง 4+
(A) : *E. faecalis*, (B) : *S. saprophyticus*, (C) : *S. cerevisiae*



ภาพที่ 2 แสดงการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินขนุนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ที่เวลา 10 ชั่วโมง และเกิดการเกาะกลุ่มระดับ 3+ โดยการทดสอบกับเชื้อ คือ

1. ไม่มีเลคตินขนุน ; (A) : *E. faecalis*, (B) : *S. saprophyticus*, (C) : *S. cerevisiae*
2. มีเลคตินขนุน ; (D) : *E. faecalis*, (E) : *S. saprophyticus*, (F) : *S. cerevisiae*

อภิปรายผลการวิจัยและข้อแนะนำ

เลคตินมีคุณสมบัติในการจับจำเพาะกับน้ำตาล ทำให้เลคตินสามารถเชื่อมเซลล์กับเซลล์ไว้ด้วยกันโดยการจับกับน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบบนผนังเซลล์ ความสามารถในการทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือตกตะกอนสารโมเลกุลใหญ่ของเลคตินนี้จะเหมือนกับแอนติบอดี ซึ่งความสามารถนี้ถูกยับยั้งได้โดยการใช้น้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตที่จับจำเพาะกับเลคตินชนิดนั้น ๆ จากการศึกษาวิจัยเลคตินที่ได้จากพืชหลายชนิดพบว่า สามารถมีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรียได้หลากหลาย (Rudiger, 1998) จึงนำเลคตินมาทดสอบการเกิดเกาะกลุ่มกับเชื้อจุลินทรีย์ (Cole et al., 1984; Slifkin & Cumbie, 1987) ในการทดลองครั้งนี้พบว่า เลคตินขนุนสามารถชักนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ จำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *E. faecalis*, *S. saprophyticus* และยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ ที่ผนังเซลล์มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นหมู่น้ำตาลกาแลคโตสและอนุพันธ์ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อราในแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันของหมู่คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้เลคตินสามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลที่ผนังเซลล์ของเชื้อได้แตกต่างกัน จึงมีการใช้เลคตินมาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย เช่น การทดสอบแยกเชื้อ coagulase-negative staphylococci และ *S. aureus* โดยใช้เลคตินจาก *Mangifera indica* (Davidson, Keller & Doyle, 1982) การแยกเชื้อ *E. coli* K12, *E. faecalis*, *Streptococcus mutans* และ *S. typhi* โดยใช้เลคติน Con A (Saucedo et al., 2018) การแยกสปีชีส์ของเชื้อ *Lactobacilli* spp. โดยการใช้เลคตินจาก *C. ensiformis*, *Bandeiraea simplicifolia* I, *B. simplicifolia* II, *Arachis hypogaea*, *Vicia sativa* และ *Triticum vulgare* (Annuk et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีการใช้เลคตินมาตรวจหาหมู่เลือด (Sharon & Lis, 1972) เช่น เลคตินจาก *Dolichos biflorus* (จับจำเพาะกับน้ำตาล N-acetylgalactosamine) มีคุณสมบัติเหมือน anti-A1 ทำให้สามารถนำมาใช้ในการแก้ปัญหา ABO discrepancy ในคนหมู่เลือดกรุป A2 ที่มี anti-A1 ในซีรัม และเลคตินจาก *Ulex europaeus* (จับจำเพาะกับน้ำตาล fucose) มีคุณสมบัติเหมือน anti-H ที่นำมาใช้ตรวจในรายเลือดกรุป O Bombay phenotype เป็นต้น (Nance, 1986) ในการจับจำเพาะกับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ นั้นพบว่า เลคตินขนุนมีความสามารถในการจับจำเพาะกับน้ำตาล เช่น 2-deoxy-D-galactose, galactose, methyl- α -D-galactopyranoside, methyl- β -D-galactopyranoside, N-acetyl-D-galactosamine เป็นต้น (Namjuntra, Muanwongyathi & Chulavatnatol, 1985) ดังนั้นเลคตินขนุนจึงอยู่ในกลุ่มเลคตินจับจำเพาะกับน้ำตาล N-acetylgalactosamine/galactose จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเลคตินขนุนสามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสและอนุพันธ์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบบนผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบการจับจำเพาะของเชื้อจุลินทรีย์กับเลคตินขนุนในการวัดการเจริญเติบโต และการเกาะกลุ่มพบว่า ในระยะเพิ่มจำนวน ที่เวลา 2-4 ชั่วโมง และระยะคงที่ ที่เวลา 5-12 ชั่วโมง ของอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ เกิดการเกาะกลุ่มได้มากที่สุด เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่บริเวณจับกับเลคตินขนุนในระยะเพิ่มจำนวนมีการพัฒนาได้แล้ว แต่อาจยังไม่สมบูรณ์ และสมบูรณ์เต็มที่ในระยะคงที่ของการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงต้องใช้เวลาในการพัฒนาองค์ประกอบ และโครงสร้างของผนังเซลล์ เพื่อให้มีความเหมาะสมในการจับจำเพาะกับเลคติน ซึ่งโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตเป็นบริเวณที่ใช้จับกับเลคตินในแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า โมเลกุลที่สามารถจับกับเลคติน คือ โมเลกุลคาร์โบไฮเดรต เปปติโดไกลแคน

กรดไลโปทีโคอิก (lipoteichoic acid) กรดทีโคอิก (teichoic acid) กรดทีคูโรนิก (teichuronic acid) และ แคลปซูล ส่วนแบคทีเรียแกรมลบพบว่า เลคตินจับกับโมเลกุลไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ตรงบริเวณ outer membrane และในเชื้อราพบว่า เลคตินจับกับน้ำตาลที่ผนังเซลล์ เช่น ไคติน (chitin) จากการใช้เลคติน Con A ติดฉลากกับสปีฟลูออเรสซิน สามารถจับกับผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Candida mycoderma*, *Candida rugosa* และ *Sporobolomyces roseus* (Barkai-Golan & Sharon, 1978) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เลคตินขนุนสามารถเกิดการเกาะกลุ่มของ แบคทีเรีย เฉพาะกับเชื้อ *E. faecalis* และ *S. saprophyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคในคนที่ ระบบทางเดินปัสสาวะ *E. faecalis* เป็นเชื้อที่พบบ่อยของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและชุมชน ทำให้เกิด โรคในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส ผลการศึกษานี้สามารถนำมาใช้เป็น ข้อมูลพื้นฐาน สามารถที่จะนำเลคตินขนุนมาประยุกต์ใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรียก่อโรคในคน เพื่อ ประโยชน์ในการวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการทางคลินิก โดยนำมาใช้ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้สามารถนำข้อมูลมาใช้ศึกษาคุณสมบัติของเลคตินขนุน เช่น การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การแยกชนิดของเซลล์ การใช้เป็น probe หรือ ligand เชื่อมต่อกับโมเลกุลหรือสารต่าง ๆ เพื่อใช้ศึกษาการแยกชนิด และโครงสร้างองค์ประกอบของเซลล์ หรือการทำลายเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายเฉลิมชัย อยู่สมบูรณ์ และนางสาวกนกวรรณ แดงสวัสดิ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Annuk, H., Hynes, S.O., Hirno, S., Mikelsaar, M. & Wadstrom, T. (2001). Characterization and differentiation of lactobacilli by lectin typing. *Journal of Medical Microbiology*, 50(12), 1069-1074.
- Barkai-Golan, R. & Sharon, N. (1978). Lectins as a tool for the study of yeast cell walls. *Experimental Mycology*, 2, 110-113.
- Cole, H.B., Ezzell, J.W., Keller, K.F. & Doyle, R.J. (1984). Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectins. *Journal of Clinical Microbiology*, 19(1), 48-53.
- Davidson, S.K., Keller, K.F & Doyle, R.J. (1982). Differentiation of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci by lectins and plant agglutinins. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(4), 547-553.
- Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. (1980). What should be called a lectin?. *Nature*, 285(5760), 66.

- Goldstein, I.J., Poretz, R.D. & Yang, S.Y. (1986). Protein-carbohydrate interaction: XVI. The interaction of concanavalin A with dextrans from *L. mesenteroides* B-512-F, *L. mesenteroides* (Birmingham), *Streptococcus bovis*, and synthetic α -(1-6)-D-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 127(1), 787-794.
- Kitao, T. & Hattori, K. (1977). Concanavalin A as a carrier of daunomycin. *Nature*, 265(5589), 81-82.
- Leiner, I.E., Sharon, N. & Goldstein, I.E. (1986). *The lectins: properties, functions and application in biology and medicine*. Orlando, FL: Academic Press.
- Lis, H. & Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 35-67.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Namjuntra, P., Muanwongyathi, P. & Chulavatnatol, M. (1985). A sperm-agglutinating lectin from seeds of jack fruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 128(2), 833-839.
- Nance, S.T. (1986). *Serology of the ABH Lewis blood group systems*. In Wallace ME and Gibbs SL ed. Blood group systems: ABH and Lewis. Associated Blood Banks, Arlington, Va., 57-81.
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F.R., Crowburn, D. & Chait, B.T. (1999). Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 6591-6596.
- Ofek, I., Mirelman, D. & Sharon, H. (1977). Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*, 265(5595), 623-625.
- Prapunpoj, P. & Chulavatnatol, M. (1996). Interaction between jackfruit lectin and rat epididymal sperm. *Journal of The Science Society Thailand*, 22(1), 21-30.
- Rudiger, H. (1998). Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica (Basel)*, 161(1-4), 130-152.
- Saucedo, N.M., Gao, Y., Pham, T. & Mulchandani, A. (2018). Lectin-and saccharide-functionalized nano-chemiresistor arrays for detection and identification of pathogenic bacteria infection. *Biosensors*, 8(3), 63; doi:10.3390/bios8030063, 1-11.
- Sharon, N. & Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, 177 (4053), 949-959.
- Sharon, N. & Lis, H. (1995). Lectins-proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays in Biochemistry*, 30, 59-75.

- Slifkin, M. & Cumbie, R. (1987). Identification of group B streptococcal antigen with lectin-bound polystyrene particles. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(7), 1172-1175.
- Swanson, M.D, Winter, H.C., Goldstein, I.J. & Markovitz, D.M. (2010). A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 8646-8655.
- Weiler, B.E., Schroder, H.C., Stefanovich, V., Stewart, D., Forrest, J.M.S., Allen, L.B., Bowden, B.J., Kreuter, M.H., Voth, R. & Muller, W.E.G. (1990). Sulphoevernan, a polyanionic polysaccharide, and the narcissus lectin potently inhibit human immunodeficiency virus infection by binding to viral envelope protein. *Journal of General Virology*, 71(9), 1957-1963.
- Wetprasit, N. & Chulavatnatol, M. (1997). Determination of sugar specificity of jackfruit lectin by a simple sugar-lectin binding assay using microtiter plate. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 42(2), 399-408.
- Wetprasit, N., Threesangsri, W., Klamklai, N. & Chulavatnatol, M. (2000). Jackfruit lectin: Properties mitogenicity and the Inhibition of herpesvirus infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 53(4), 156-161.

วันที่รับบทความ 15 ม.ค. 63, วันที่แก้ไขบทความ 22 เม.ย. 63, วันที่ตอบรับบทความ 2 พ.ค. 63