

การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Complementary DNA ที่ควบคุมการ
สร้าง Antimicrobial Peptide จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์
Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of Complementary DNA
Encoding Antimicrobial Peptide from Dung Beetle Larva

มณฑล เลิศวรปรีชา^{1*}
Monthon Lertworapreecha^{1*}

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสร้างแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ (antimicrobial peptide; AMP) จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ พบว่ายีนที่โคลนได้มีขนาดยาว 382 คู่เบส ประกอบด้วย 1 open reading frame (ORF) ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 80 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8.55 kDa การเปรียบเทียบ nucleotide identities ของ cDNA ที่ได้จาก AMP ที่พบในแมลงกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน มีค่าอยู่ระหว่าง 15 ถึง 96% โดยมีความคล้ายกับ coprisin ซึ่งเป็น AMP ที่พบใน *Copris tripartitus* มากที่สุด (96%) นอกจากนี้ยังคล้ายกับ AMP ที่พบในด้วงชนิดอื่น ๆ ได้แก่ defensin A ที่พบใน *Anomala cuprea* (36%), defensin B ที่พบใน *Anomala cuprea* (30%), rhinoceros defensin ที่พบใน *Oryctes rhinoceros* (20%), และ defensin-2 ใน *Pediculus humanus corporis* (15%) การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของเปปไทด์สังเคราะห์ของกรดอะมิโนที่แปลงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อแบคทีเรียพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 7.8, 15.6 และ 31.25 µg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* มีค่ามากกว่า 500 µg/ml

คำสำคัญ : การโคลนยีน แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ ด้วงมูลสัตว์

¹ อ.ดร., หน่วยวิจัยการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

* Corresponding author: e-mail: worapreecha@gmail.com Tel. 0865004120

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

Abstract

The gene encoding antimicrobial peptide (AMP) was cloned from dung beetle larva. The DNA sequence analysis of the gene revealed that the cloned cDNA had 328 bp in length, and comprised of one open reading frame (ORF) encode for 80 amino acid residues, which had a predicted molecular weight of 8.55 kDa. The nucleotide identity analysis to a related AMP gene demonstrated that the identity values ranging between 15 to 96%. The most identity was the coprisin from *Copris tripartitus* (96%) follow by defensin A from *Anomala cuprea* (36%), defensin B from *Anomala cuprea* (30%), rhinoceros defensin from *Oryctes rhinoceros* (20%), and defensin-2 from *Pediculus humanus corporis* (15%). Antimicrobial activity testing of synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence indicated that it able to inhibit *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella Typhimurium* at the MIC of 7.8, 15.6 and 31.25 µg/ml respectively, whereas the MIC for *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* were more than 500 µg/ml

Keywords : Gene Cloning, Antimicrobial Peptide, Dung Beetle

บทนำ

แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ (antimicrobial peptide; AMP) เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และบางชนิดมีรายงานว่าฆ่าเซลล์มะเร็งได้ [1] ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาพบ AMP ในแมลงหลายชนิด เช่น cecropin เป็น AMP ที่มีคุณสมบัติ เป็น amphipathic peptide ขนาดประมาณ 3-4 kDa แยกได้ครั้งแรกจาก hemolymph ของหนอนไหม (giant silk moth; *Hyalophora cecropia*) [2] การศึกษาในปัจจุบันพบ AMP มากกว่า 800 ชนิด ในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายเช่น พืช แมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์มีกระดูกสันหลัง รวมทั้งในมนุษย์ด้วย [3- 4] ในจำนวนนี้ AMP ที่แยกได้จากแมลงพบได้มากที่สุดประมาณ 200 ชนิด [5] ตัวมูลสัตว์ (แมลงกุดจี่) จัดเป็นแมลงปีกแข็งจำพวกด้วงแรด (scarab) พบแพร่กระจายได้ทั่วโลกมีประมาณกว่า 7,000 ชนิด ตัวมูลสัตว์เป็นแมลงที่มีวงจรชีวิตน่าสนใจ เนื่องจากวงจรชีวิตของตัวด้วงจะสัมพันธ์กับแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และโพรโทซัว เป็นจำนวนมากในตลอดช่วงอายุ โดยที่ไม่เกิดอันตรายจากเชื้อโรคจำนวนมากที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาวะแวดล้อมนั้น ซึ่งสันนิษฐานว่าตัวมูลสัตว์อาจจะสร้าง AMP ออกมาป้องกันตัวเองจากการติดเชื้อโรคต่าง ๆ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์สำคัญเพื่อค้นหาและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้าง AMP ที่สร้างโดยแมลงในกลุ่มของตัวมูลสัตว์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP ในตัวมูลสัตว์กับฐานข้อมูลยีนจาก GenBank เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การศึกษาในเชิงลึก เช่น การศึกษาการแสดงออก (expression) ของโปรตีน การศึกษาถึงประสิทธิภาพของ AMP ต่อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ต่อไป

วิธีการวิจัย

การกระตุ้นการสร้าง AMP ในตัวมูลสัตว์และการสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี RT-PCR

เก็บตัวอย่างตัวมูลสัตว์โดยเลือกเก็บตัวอ่อนของตัวมูลสัตว์ในเขตบริเวณฟาร์มเลี้ยงโค มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง นำตัวอ่อนของตัวมูลสัตว์มากระตุ้นให้สร้าง AMP โดยการฉีดด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* (strain JM109) การสกัด LPS ดำเนินตามขั้นตอนของชุดสกัด (LPS extraction kit; Intron Biotechnology; Korea) ก่อนการฉีด LPS จะทำให้ตัวอ่อนสลบด้วยการแช่ในน้ำแข็ง และใช้เข็มเบอร์ 26 ฉีด LPS ประมาณ 50 µl

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

จากนั้นนำตัวอ่อนเก็บในรังก่อนมูลเดิม ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำตัวอ่อนมาสกัด RNA การสกัด RNA ดำเนินตามขั้นตอนของชุดสกัด (E.Z.N.A Tissue RNA Kit; OMEGA: USA) การสร้าง cDNA library และตรวจคัดกรองเพื่อหาชิ้นที่ควบคุมการสร้าง AMP ในตัวอ่อนตัวงมูลสัตว์ ทำโดยเทคนิค rapid amplification of cDNA ends (RACE) โดยภายหลังจากที่ฉีด LPS เข้าไปแล้วประมาณ 24 ชั่วโมง จะเก็บเนื้อเยื่อรอบ ๆ บริเวณที่ฉีดนำไปสกัด total RNA และ RNA ที่สกัดได้จะนำมาสร้างเป็น cDNA ด้วย first stand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific: USA) โดยการสร้าง cDNA ดำเนินตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป

การสร้างสาย Second strand

cDNA ที่ได้จากขั้นตอนการทำ RT-PCR จะนำมาเพิ่มจำนวนสาย complementary strand โดยใช้ primers ที่ออกแบบจำเพาะสำหรับยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP (ตารางที่ 1) โดยการออกแบบ primers อาศัยข้อมูลจากการสร้างสาย consensus ของกรดอะมิโนของ AMP ที่พบได้ในแมลงกลุ่มใกล้เคียง นำมาแปลงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปเป็นต้นแบบสำหรับการออกแบบ primers การสร้างสาย complementary strand มีขั้นตอนและองค์ประกอบของปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR แสดงในตารางที่ 2

การโคลนยีน

PCR product ที่ได้จะนำมาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis และนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purification kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up; Macherey Nagel: Germany) ตัวอย่าง DNA ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วจะนำมาเชื่อมต่อไปใน plasmid pTZ57R/T (Isn TAclone Kit; Thermo Scientific: USA) และ transform เข้าสู่เชื้อ *E. coli* (DH5- α) รายละเอียดดังตารางที่ 3

ตารางที่ 1 primers ที่ออกแบบและเป้าหมายของยีนที่ใช้ในการศึกษา

Name	Sequence (5'-3')
AMP-1	AACAAGTTGCAGAGTATACGAG
AMP-2	GATACAAGATGTCGAAATCCTTCC
AMP-3	TTGTACTTCTACTGCTTACGTGG
AMP-4	TCTTAACCAGTTCATACCCAGC

การคัดเลือกโคลนที่มียีนควบคุมการสร้าง AMP

การตรวจสอบโคลนที่ได้ ทำโดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนโดยตรงจากโคลนของแบคทีเรีย โดยคัดเลือกโคลนที่เจริญบนอาหาร TSA ซึ่งผสมยา ampicillin ทำการทดสอบแต่ละโคลน โดยใช้ปลายไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วป้ายเชื้อแต่ละโคลนมาเล็กน้อยนำไปทำ PCR ด้วย primers AMP-4 ร่วมกับ primer ต่อบริเวณ linker ที่เชื่อมต่อกับสาย olig (dT)

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

ตารางที่ 2 องค์ประกอบและสภาวะการทำ PCR

Reaction (50 µl)	Condition
1X buffer	Start 95 °C 10 min 1 cycle
1.5 mM MgCl ₂	Denaturation 95 °C 1 min
200 µM dNTPs	Annealing 55 °C 40 sec
0.5 pmol each primers	Extension 72 °C 1 min
0.04 unit/µl of Taq	} 35 cycles
2 µl of DNA template	
	Final extension 72 °C 5 min

ตารางที่ 3 องค์ประกอบและสภาวะสำหรับ โคลนยีน

Reaction (30 µl)	Volume
plasmid pTZ57R/T (0.17 pmol ends)	3 µl
5X Ligation Buffer	6 µl
PCR product	3 µl
Water, nuclease free	to 29 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

การทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ต่อแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์สังเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโน ที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อการฆ่าแบคทีเรีย ทำการทดสอบโดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (MIC) ตามมาตรฐานของ CLSI [6] โดยเจือจางเปปไทด์สำหรับทดสอบแบบ 2 fold dilution ตั้งแต่ความเข้มข้น 500-0.24 µg/ml ทำการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 700603) และ *S. Typhimurium* (isolated strain) โดยใช้แบคทีเรียอายุประมาณ 18-20 ชั่วโมง เจือจางแบคทีเรียในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) (Himedia: India) ให้ได้ปริมาณเชื้อสุดท้ายที่ทำการทดสอบกับเปปไทด์คือ 5×10^4 CFU/well

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การสร้าง cDNA และการโคลน

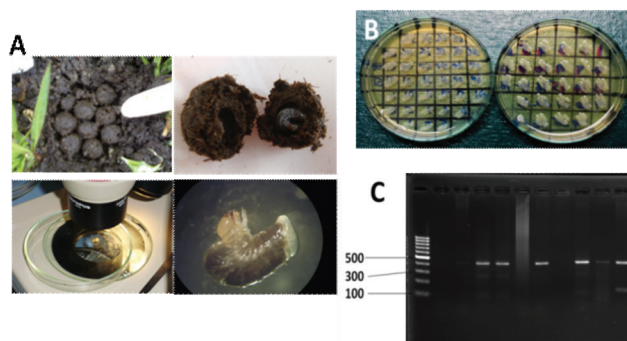
การค้นหาเป้าหมายที่เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP ในตัวอ่อนตัวงูมูสสัตว์ (ภาพที่ 1 A) หลังจากฉีดตัวอ่อนด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำมาสกัด RNA สร้างสาย first strand cDNA ด้วย Oligo (dT)¹⁸ primer linker และใช้เทคนิค RACE โดย primers ที่ออกแบบสำหรับยีนในกลุ่ม AMP ที่เคยมีรายงานในตัวงูมูสสัตว์ สำหรับสร้างสาย second strand DNA ผลการทดสอบพบว่า มี primers จำนวน 1 เส้น คือ AMP-4 สามารถเพิ่มจำนวนยีนในตัวอ่อนตัวงูมูสสัตว์ที่ได้ immunized ด้วย LPS ของแบคทีเรีย โดยพบระดับการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นในตัวอย่างที่ได้รับการ

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

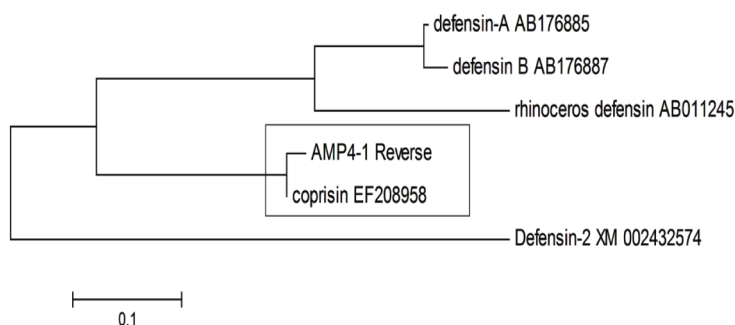
immunized ด้วย LPS ในขณะที่ตัวอย่าง control พบการแสดงออกเพียงเล็กน้อย โดยตัวอย่างของ DNA ที่เพิ่มจำนวน ได้มีขนาดประมาณ 400 bp จากนั้นนำตัวอย่าง DNA ที่เพิ่มจำนวนได้ไปโคลนเข้าสู่ plasmid และ transform เข้าสู่ เชื้อ *E. coli* หลังจากนั้นตรวจสอบโคลนที่มี insert ยีนที่ต้องการโดยเทคนิค PCR ด้วย primer AMP-4 และ primer ที่ จำเพาะกับ linker ผลการศึกษาพบว่าจากการสุ่มทดสอบจากจำนวนโคลนทั้งหมด 30 โคลน พบว่ามีทั้งหมด 6 โคลนที่ ให้ผลบวก (ภาพที่ 1 B) โดยให้แถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 400 bp (ภาพที่ 1 C)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เปรียบเทียบความคล้าย (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับ AMP ที่พบในด้วงชนิดอื่น

ผลการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide identities) ของ DNA ที่ได้จากทั้ง 6 โคลน เปรียบเทียบกับ AMP ที่พบในแมลงกลุ่มด้วงที่ใกล้เคียงกันมีค่าอยู่ระหว่าง 15 ถึง 96% โดยมีความคล้ายกับ coprisin ประมาณ 96% ซึ่ง coprisin เป็น AMP ที่มีรายงานพบใน *Copris tripartitus* (EF208958) นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีลำดับนิว คลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับ AMP ที่พบในด้วงชนิดอื่น ๆ ได้แก่ defensin A (36%) ที่พบใน *Anomala cuprea* (AB176885), defensin B (30%) ที่พบใน *Anomala cuprea* (AB176887), rhinoceros defensin (20%) ที่พบใน *Oryctes rhinoceros* (AB011245), และ defensin-2 (15%) ใน *Pediculus humanus corporis* (XM_002432574) (ภาพที่ 2)



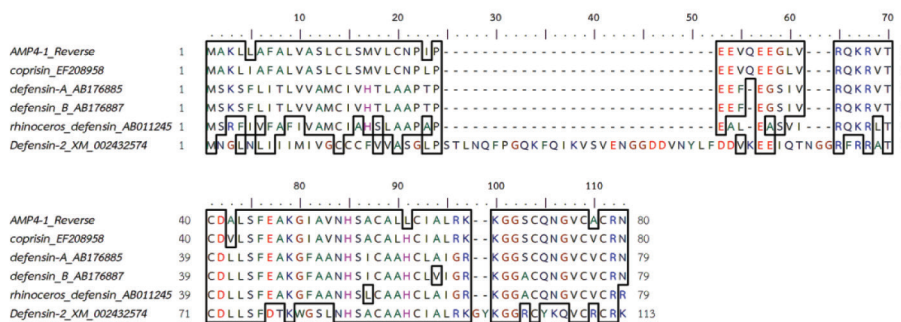
ภาพที่ 1 A. ลักษณะของตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์จากก้อนมูลโค, B. โคโลนีของ *E. coli* ที่ได้รับ plasmid ที่เจริญในอาหาร ผสมยา ampicillin, C. ผลการสุ่มตรวจสอบโคลนที่มี insert gene จากการสุ่มจำนวน 30 โคลน พบ โคลน ที่ให้ผลบวกด้วย PCR จำนวน 6 โคลน ที่ให้ PCR product ขนาดประมาณ 400 bp.



ภาพที่ 2 Phylogenetic tree ของ DNA ที่โคลนได้จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ (AMP4-clone 1) แสดงให้เห็นถึง ความคล้ายกับยีนควบคุมการสร้าง AMP จากด้วงชนิดต่าง ๆ (Neighbor-joining 1,000 bootstrap)

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

ผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน ซึ่งได้จากการแปลรหัสจาก DNA ที่โคลนได้จากตัวอ่อนตัวมูลสัตว์กับ AMP ที่สืบค้นจากฐานข้อมูล พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่พบมีความคล้ายกับ coprisin มากที่สุด (98%) และมีความคล้ายกับ defensin A (54%) ที่พบใน *Anomala cuprea* (AB176885), defensin B (50%) ที่พบใน *Anomala cuprea* (AB176887), rhinoceros defensin (44%) ที่พบใน *Oryctes rhinoceros* (AB011245), และมีความคล้ายกับ defensin-2 (29%) ที่พบใน *Pediculus humanus corporis* (XM_002432574) นอกจากนี้พบว่า AMP ทั้งหมดที่นำมาเปรียบเทียบมีบริเวณอนุรักษ์ (conserve) ร่วมกันที่ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 65-110 ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นตำแหน่งของการออกฤทธิ์ของ AMP (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ DNA ที่โคลนได้จากตัวอย่างตัวอ่อนตัวมูลสัตว์เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนที่ได้จาก AMP ชนิดอื่น ๆ (กรดอะมิโนในกรอบแสดงถึงบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน)

การทดสอบประสิทธิภาพต่อเชื้อแบคทีเรีย

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทั้งสายเพื่อพิจารณาหาบริเวณของสายเปปไทด์ที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติของ AMP โดยอาศัยคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เป็นกลุ่ม hydrophobic และเป็น positive charge ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ EMBOSS Pepinfo (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepinfo/) ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 80 ตัว น้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 10.18 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic 19%, hydrophobic 47% มีค่า isoelectric point เท่ากับ 8.6 มีค่าประจุรวมเท่ากับ +5.5 และพบว่ากรดอะมิโนที่อยู่ในลำดับ 90-100 คือ NH₂-L-L-C-I-A-L-R-K-K-CooH (ภาพที่ 3) ให้ผลการวิเคราะห์ถึงความเป็นไปได้ที่จะมีคุณสมบัติของ AMP โดยมี molecular weight ประมาณ 1.8 kDa และมีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ทั้งหมด 66 % ซึ่งคาดว่าเปปไทด์นี้จะสามารถแทรกตัวเข้าสู่เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียได้ดี นอกจากนี้เปปไทด์เป็น cationic peptide มีประจุเป็นบวก (net charge +3) ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์อาจจะมีคุณสมบัติมาจับเมมเบรนของแบคทีเรียที่มีประจุเป็นลบได้ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกช่วงของกรดอะมิโนดังกล่าวไปสังเคราะห์เป็นสายเปปไทด์เพื่อนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย โดยศึกษาเปรียบเทียบกับ coprisin (NH₂-L-H-C-I-A-L-R-K-K-CooH) และ defensin (NH₂-A-L-Y-L-A-I-R-K-R-COOH) ซึ่งใช้เป็น control สำหรับการศึกษาครั้งนี้โดยเปปไทด์สังเคราะห์ทั้งหมด มีความบริสุทธิ์ที่ 95.5% การทดสอบประสิทธิภาพ ทำโดยวิธีการหาค่า MIC ซึ่งทดสอบกับแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 700603), และ *S. Typhimurium* (isolated strain)

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

ผลการทดสอบพบว่าค่า MIC ของ AMP4-1 ต่อเชื้อ *E. coli*, คือ 7.8 µg/ml, ค่า MIC ของ AMP4-1 ต่อเชื้อ *Ps. aeruginosa* คือ 15.6 µg/ml และค่า MIC ของ AMP4-1 ต่อเชื้อ *S. Typhimurium* คือ 31.25 µg/ml ในขณะที่ค่า MIC ของ AMP4-1 ต่อเชื้อ *K. pneumonia* และ *S. aureus* นั้นมีค่ามากกว่า 500 µg/ml (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (µg/ml) ของเปปไทด์สังเคราะห์ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด

AMP	MIC (µg/ml)				
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>Ps.</i> <i>aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>S.</i> Typhimurium (isolated strain)	<i>K. pneumonia</i> (ATCC 700603)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
AMP4-1: LLCIALRKK	7.8	15.6	31.25	>500	>500
Coprisin: LHCIALRKK	>500	>500	250	>500	>500
Defensin: LYLAIRKR	31.25	>500	>500	125	125

การศึกษาลักษณะของยีนที่ควบคุมการสร้าง AMP จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์ในครั้งนี้นับว่ายีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้าง AMP หนึ่งยีน ซึ่งเมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง AMP จากแมลงในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันพบว่า ยีนที่โคลนได้มีความคล้ายกับ coprisin ซึ่งเป็น AMP ที่พบในด้วงมูลสัตว์ (*Copris tripartitus*) [7] ในการศึกษาครั้งนี้ข้อจำกัดบางประการคือการจำแนก species ของตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์นั้นกระทำได้ยากจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ แต่จากการตรวจดูจากลักษณะของตัวเต็มวัยจากการฟักออกจากก้อนมูลพบว่า ด้วงมูลสัตว์ที่พบอาจจะเป็นด้วงในกลุ่ม *Copris* spp. ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับของยีน AMP ที่โคลนได้ที่มีความคล้ายคลึงกับ coprisin มากที่สุด

การวิจัยนี้ไม่ได้เริ่มต้นจากการศึกษาโดยการสกัดสารออกฤทธิ์ที่เป็น AMP จากตัวอ่อนด้วงมูลสัตว์โดยตรง ดังเช่นในการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่น ๆ [8-10] แต่ใช้แนวทาง genetic deduction โดยการแปลรหัสจาก DNA ที่โคลนได้ ซึ่งแนวทางนี้ทำได้ง่ายในกรณีที่มีข้อจำกัดสำหรับการสกัดและแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ แต่ก็อาจจะมีข้อเสียเนื่องจากยีนที่โคลนได้อาจจะไม่ได้แสดงถึงความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน ดังนั้นการกระตุ้นตัวอย่างโดยแบคทีเรียหรือองค์ประกอบของแบคทีเรียจะเป็นวิธีการสำคัญที่จะช่วยลดโอกาสผิดพลาดดังกล่าวลงไปได้ ซึ่งการศึกษาในหลาย ๆ รายงานก็มีการใช้แบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ กระตุ้นให้ตัวอ่อนของด้วงหรือหนอนผีเสื้อสร้าง AMP ออกมา และเปรียบเทียบลักษณะการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร [1, 9] สำหรับการศึกษาที่เลือกใช้ LPS ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นให้ตัวอ่อนสร้าง AMP ออกมาได้เช่นกัน โดยมีรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า LPS สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวในแมลงหวี่ (*Drosophila*) สร้าง AMP ออกมาป้องกันตนเองได้ [11] การศึกษาลำดับกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เป็นเปปไทด์และนำไปทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จำเป็นต้องพิจารณาถึงขนาดของ AMP นั้นด้วย เนื่องจากเปปไทด์ที่มีขนาดยาวอาจจะเป็นแอนติเจนและกระตุ้นให้ร่างกายตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าเปปไทด์สายสั้น หรืออาจกระตุ้นให้เกิดภาวะของภูมิแพ้ได้ [12-14] ในการศึกษาครั้งนี้จึงวิเคราะห์เพื่อเลือกเอาช่วงของเปปไทด์ที่มีขนาดสั้นที่สุด ที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ ซึ่งพบว่าเปปไทด์ที่เลือกมามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้บางชนิด (ตารางที่ 4) จากการศึกษาเปปไทด์ที่ได้ มีความแตกต่าง

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

จาก coprisin ในลำดับของกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวในตำแหน่งที่ 2 จากปลาย NH₂ คือ L-H จากผลการทดสอบพบว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่งก็ส่งผลถึงประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการ ที่กรดอะมิโน lysine นั้นมีส่วน side chain ที่มีความเป็น hydrophobic ที่มากกว่า อาจเป็นไปได้ที่ทำให้ ส่วน hydrophobic side chain ของเปปไทด์นั้นสามารถแทรกตัวเข้าไปใน hydrophobic core ของ outer membrane ของแบคทีเรียได้ดีกว่า coprisin ที่ประกอบด้วย histidine

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง AMP ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว พบว่า ยีนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ coprisin ที่พบในดักแด้ *Copris tripartitus* มากที่สุด การทดสอบประสิทธิภาพในการ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี โดยพบว่าเปปไทด์ที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Ps. aeruginosa* และ *S. Typhimurium* ได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 และขอขอบคุณ หน่วยวิจัยการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ และสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ซึ่ง ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Ishibashi, J., Saido-Sakanaka, H., Yang, J., Sagisaka, A., and Yamakawa, M. (1999). Purification, cDNA cloning and modification of a defensin from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. **European Journal of Biochemistry**. 266(2), 616-623.
- [2] Hultmark, D., Engstrom, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., and Boman, H.G. (1983). Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. **EMBO Journal**. 2(4), 571-576.
- [3] Izadpanah, A. and Gallo, R.L. (2005). Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 52(3 Pt 1), 381-390.
- [4] Reddy, K.V., Yedery, R.D., and Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 24(6), 536-547.
- [5] Bulet, P. and Stocklin, R. (2005). Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and Peptide Letters**, 16(11), 1371-1378.
- [6] CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests Approved Standard - Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute 2006a**.
- [7] Lee, E., Kima, J.K., Shin, S., Jeong, K.W., Shin, A., Lee, J., Lee, D.G., Hwang, J.S., and Kim, Y. (2013). Insight into the antimicrobial activities of coprisin isolated from the dung beetle, *Copris tripartitus*, revealed by structure-activity relationships. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**. 1828(2), 271-283.

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

- [8] Cytrynska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., and Jakubowicz, T. (2007). Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph **Peptides**. 28(3), 533-546.
- [9] Hara, S. and Yamakawa, M. (1995). A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. **Biochemical Journal**. 310 (Pt 2), 651-656.
- [10] Villa-Hernandez, O., Hernandez-Orihuela, L., Rodriguez, M.D., Zamudio-Zuniga, F., Castro-Franco, R., Pando, V., and Batista, C.V.F. (2009). Novel Antimicrobial Peptides Isolated from Skin Secretions of the Mexican Frog *Hyla eximia*. **Protein and Peptide Letters**. 16(11), 1371-1378.
- [11] Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94(26), 14614-14619.
- [12] Bradshaw, J.P. (2003). Cationic antimicrobial peptides - Issues for potential clinical use. **Biodrugs**. 17(4), 233-240.
- [13] Fritz, J.H., Brunner, S., Birnstiel, M.L., Buschle, M., Gabain, A., Mattner, F., and Zauner, W. (2004). The artificial antimicrobial peptide KLKLLLLLK induces predominantly a TH2-type immune response to co-injected antigens. **Vaccine**. 22(25-26), 3274-3284.
- [14] Steward, M.W., Stanley, C.M., Dimarchi, R., Mulcahy, G., and Doel, T.R. (1991). High-affinity antibody induced by immunization with a synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease. **Immunology**. 72(1), 99-103.