ฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของครัสทินชนิดที่ 2 ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Antimicrobial activities of a novel type-II crustin from whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

อรวรรณ เปียพรัด* และ สุเชาวน์ ดอนพุดซา

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110

Orawan Piaprad* and Suchao Donpudsa

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110

บทคัดย่อ

ครัสทิน (crustin) เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยมีหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อจากจุลชีพต่าง ๆ ซึ่งงานวิจัยนี้สนใจศึกษาครัสทินชนิดที่ 2 (*Lv*crustinA) ซึ่งพบในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยยีน *Lv*crustinA ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 519 คู่เบส ที่สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 172 โมเลกุล ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาการแสดงของยีน *Lv*crustinA พบว่าเมื่อกุ้งขาวได้รับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค ยีน *Lv*crustinA จะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น จึงเป็นไปได้ว่า *Lv*crustinA น่าจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งชนิดนี้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการผลิตโปรตีนลูกผสม *Lv*crustinA (r*Lv*crustinA) ในระบบของ *Escherichia coli* แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่า r*Lv*crustinA สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ดังนั้นยีน *Lv*crustinA น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

คำสำคัญ: ครัสทินชนิดที่ 2 เพปไทด์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์การต้านจุลชีพ *Litopenaeus vannamei*

Abstract

Crustin is an antimicrobial peptide that is found in shrimp immune system. This peptide (crustin) is involved in the shrimp defensive system against the bacterial infection. In this work, the type-II crustin (*Lv*crustinA) from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was studied. The *Lv*crustinA gene contained an open reading frames of 519 bp encoding 172 amino acid residues. The previous work, it was shown that the *Lv*crustinA expression was up-regulated after injecting the pathogenic microorganisms into the shrimp. The *Lv*crustinA was probably involved in the shrimp immune system. In this research, this

Corresponding author: orawan.piaphad@g.swu.ac.th

recombinant protein (r*Lv*crustinA) was produced in *Escherichia coli* expression system for testing the antimicrobial activities. From the result, it presented the antimicrobial activities against two gram-positive bacteria; *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Lv*crustinA was probably involved the shrimp immune system.

Keywords: Type-II crustin, Antimicrobial peptide, Antimicrobial activities, *Litopenaeus vannamei*

บทนำ

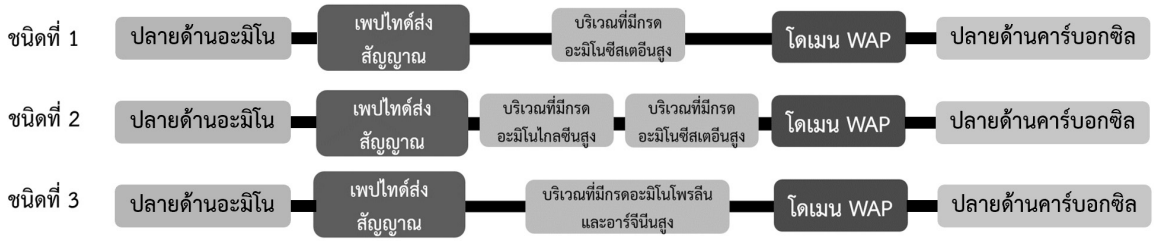
กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย โดยมีมูลค่าการส่งออกที่สูง แต่ในปัจจุบันมูลค่าการส่งออกกลับลดลงอย่างรวดเร็ว [1] เนื่องจากมีโรคระบาดแพร่เข้ามาภายในประเทศ จึงส่งผลให้กุ้งตายอย่างรวดเร็ว ไม่ว่าจะเป็นโรคที่เกิดจากไวรัส เช่น ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) หรือไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus) หรือโรคที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ทำให้เกษตรกรได้รับความเสียหายเป็นอย่างมาก [2] เกษตรกรจึงได้หันมาใช้ยาปฏิชีวนะในการแก้ปัญหาเหล่านี้ ซึ่งการใช้ยาอย่างผิดวิธีอาจส่งผลให้จุลชีพดื้อยา และเกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาแนวทางต่าง ๆ ในการป้องกันและควบคุมโรคในกุ้งขาว เช่น การใช้สารสกัดในการเลี้ยงกุ้งขาว การพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจโรค [3, 4] และอีกแนวทางหนึ่งคือ การศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เพื่อช่วยพัฒนาความสามารถในการต้านไวรัสและป้องกันโรคต่าง ๆ ที่เกิดในกุ้งขาว

กุ้งขาวเป็นสัตว์ที่มีเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่ไม่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาภายในตัวกุ้งขาวจะมีกลไกการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม 2 รูปแบบ คือ การตอบสนองโดยการใช้เซลล์ (cellular immune response) โดยสามารถแบ่งได้เป็นกระบวนการกินเซลล์แบบฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และการตอบสนองอีกรูปแบบหนึ่งคือ การตอบสนองด้วยสารน้ำ (humoral immune response) โดยกุ้งขาวจะผลิตและปล่อยสารต่าง ๆ เช่น เพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides, AMPs), ตัวยับยั้งโปรทีเนส (proteinase inhibitor) และไซโทคีนไลท์แฟกเตอร์ (cytokine-like factors) เป็นต้น ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม [5]

AMP เป็นเพปไทด์กลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ โดยเป็นเพปไทด์ที่มีประจุบวก และประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 50-100 โมเลกุล [6] สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป จึงมีความสำคัญมากโดยเฉพาะกับสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อโรคต่าง ๆ เพปไทด์ต้านจุลชีพเป็นเพปไทด์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ซึ่งได้มีรายงานการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับ AMP หลากหลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยพบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพแต่ละชนิดมีอยู่หลายไอโซฟอร์ม (isoform) โดยแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อจุลชีพได้แตกต่างกันไป [7] ซึ่งในกุ้งขาวได้มีการค้นพบและรายงานเกี่ยวกับ AMP มากมายที่มีความสำคัญในกุ้งขาว เช่น ดีเฟนซิน (definsins) และครัสทิน (crustins) เป็นต้น [6]

ครัสทินเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สามารถพบได้ในกุ้งขาว เนื่องจากครัสทินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้หลายชนิด จึงเป็น AMP กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยครัสทินจะประกอบไปด้วยโดเมนที่เรียกว่า โดเมน whey acidic protein (WAP) โดยจะอยู่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิล (C-terminal) ของสายเพปไทด์ ซึ่งมีรูปแบบของโครงสร้างดังนี้ C-(X_n)-C-(X_n)-C-(X_5)-C-(X_5)-CC-(X_3,X_5)-C ประกอบด้วยกรดอะมิโน 50–60 โมเลกุล ซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็นซิสเตอีน (Cystein, Cys) 8

โมเลกุล ที่สามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้ 4 พันธะ (four-disulfide core, 4DC) และบริเวณปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) จะมีเพปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ซึ่งทำหน้าที่ส่งครัสทินออกไปนอกเซลล์ เพื่อไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพต่าง ๆ โดยครัสทินแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด โดยแต่ละชนิดจะมีบริเวณของโดเมน WAP และเพปไทด์ส่งสัญญาณเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างที่กรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างเพปไทด์ส่งสัญญาณและโดเมน WAP โดยครัสทินชนิดที่ 1 จะมีบริเวณที่มีกรดอะมิโนที่เป็นซิสเตอีนสูง (Cys-rich) ในครัสทินชนิดที่ 2 จะมีบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนและซิสเตอีนสูง [(Gly-rich) และ (Cys-rich)] และครัสทินชนิดที่ 3 จะมีบริเวณที่มีกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จีนีนสูง [(Pro-rich) และ (Arg-rich)] [8] ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะของครัสทินชนิดที่ 1-3 (ดัดแปลงจาก [5])

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับครัสทินชนิดต่าง ๆ ในกุ้งขาว โดยในปี ค.ศ. 2009 Shockey และคณะ [9] ได้ศึกษาการแสดงออกของ *Lv*ABP1 ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสให้ครัสทินชนิดที่ 2 พบว่าเมื่อฉีด double-stranded RNA (dsRNA) ของยีนนี้เข้าไปในกุ้งขาวพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับ dsRNA และ *V. penaeicida* มีอัตราการตายที่สูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การศึกษาของ Visetnan และคณะ [10] พบว่า *Lv*SWD ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสให้ครัสทินชนิดที่ 3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จนกระทั่งปี ค.ศ. 2018 มีการรายงานของ Li และคณะ [11] ได้ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของ *Lv*crustinA ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสให้ครัสทินชนิดที่ 2 พบว่าเมื่อกระตุ้นกุ้งขาวโดยการฉีด *V. parahaemolyticus* และไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าไปภายในตัวกุ้ง ยีน *Lv*crustinA มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นยีนนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งโดยงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าครัสทินชนิดที่ 2 ในกุ้งชนิดต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพหลายชนิด [5-8] อย่างไรก็ตามครัสทินชนิดที่ 2 ดังกล่าวประกอบด้วยบริเวณ Gly-rich บริเวณ Cys-rich และโดเมน WAP ที่สมบูรณ์ แต่ตรงกันข้ามกับ *Lv*crustinA ซึ่งเป็นครัสทินชนิดที่ 2 ที่ไม่มีบริเวณ Cys-rich จึงพบเฉพาะบริเวณของ Gly-rich และโดเมน WAP เท่านั้น ดังนั้นผลกระทบของการขาดบริเวณ Cys-rich ของครัสทินชนิดนี้ต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษา เริ่มจากการนำยีน *Lv*crustinA จากกุ้งขาวโคลนใส่เข้าไปในแบคทีเรียเพื่อผลิตเป็นโปรตีนลูกผสม (r*Lv*crustinA) และนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในลำดับต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การโคลนยีน *Lv*crustinA ของกุ้งขาวและการสร้างพลาสมิดลูกผสม

ในงานวิจัยนี้จะทำการโคลนยีน *Lv*CrustinA (GenBank accession No.KY351820) จาก cDNA ของกุ้งขาวที่สังเคราะห์โดย Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, USA) จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนยีนด้วย

กระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งไพร์เมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะกับยีน *Lv*CrustinA โดย forward primer (LvCrustinAF: 5′ AATTGATATCCAT CATCATCATCATCATCAGAACACCAACAGCACC 3′) จะมีบริเวณตัดจำเพาะของ *Eco*RV และลำดับเบสที่สามารถแปลรหัสได้ histidine 6 ตัว (6×His-tag) และ reverse primer (LvCrustinAR: 5′ TATACTCGAGTCACTTCCC AAAATTGGAG 3′) จะมีบริเวณตัดจำเพาะของ *Xho*I และรหัสหยุดเพิ่มเข้ามา โดยปริมาตรรวมในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารผสมดังนี้ 1xBuffer, 0.1 mM dNTP, forward และ reverse primer อย่างละ 0.2 µM, 1.25 units ของ RBC Tag DNA polymerase (RBCBioscience, Taiwan) cDNA ของกุ้งขาว และน้ำปราศจากไอออน (Deionized water หรือ DI water) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ บ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะที่กำหนดอีก 30 รอบ ซึ่งในแต่ละ 1 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ บ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และบ่มที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ตามลำดับ สุดท้ายบ่มที่ 72 องศาเซลเซียส ต่ออีก 10 นาที โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟไรซิส (agarose gel electrophoresis) จากนั้นตัดชิ้นส่วนของเจลบริเวณที่มียีนที่สนใจ และทำการสกัดผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเจลด้วย FavorPrepTM GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen, Korea) นำชิ้นส่วนยีนที่สกัดได้ไปบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RV และ *Xho*I เพื่อโคลนเข้าไปใน pVR500 vector ด้วย T4 DNA ligase (BioLabs, USA) ซึ่ง pVR500 vector เป็นพลาสมิดที่ดัดแปลงมาจากเวคเตอร์ pET32a โดยได้อธิบายไว้ในงานวิจัยของ Donpudsa และคณะ [12] จากนั้นจึงนำส่งพลาสมิดลูกผสมนี้ (recombinant plasmid) เข้าไปใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ทำการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและตรวจสอบความถูกต้องของยีน *Lv*CrustinA โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *Lv*CrustinA ของสิ่งมีชีวิตอื่น โดยใช้โปรแกรม BLAST (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

2. การผลิต r*Lv*crustinA และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ในการผลิตโปรตีน r*Lv*crustinA เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพนั้น ทำได้โดยส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ NiCo21(DE3) จากนั้นนำเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม (transformant) มาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 100 µg/µl ampicillin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งค่า optical density ที่ 600 nm (OD_{600}) มีค่าอยู่ในช่วง 0.6-0.8 จากนั้นเติม Isopropyl β-D-1 -thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน ทำการบ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที วิเคราะห์ผลผลิตโปรตีน r*Lv*CrustinA ที่เวลาต่าง ๆ ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่ความเข้มข้นเจล 15 เปอร์เซ็นต์

ทำการปั่นเก็บเซลล์ของแบคทีเรียที่ช่วงเวลาที่มีการผลิต r*Lv*crustinA สูงสุด ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4) และทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator จากนั้นทำการปั่นแยกตะกอนออกจากสารละลายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของสารละลายและตะกอนไปวิเคราะห์โปรตีน r*Lv*CrustinA ด้วยเทคนิค SDS–PAGE เพื่อตรวจสอบโปรตีนว่าอยู่ในส่วนของสารละลายหรือตะกอนเซลล์

ในการทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ ทำการละลายโปรตีนด้วย 0.1 M carbonate buffer pH 10 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นปั่นแยกเพื่อเก็บเฉพาะสารละลายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography) โดยอาศัย Ni-NTA column (GE Healthcare, Sweden) ทำให้สามารถดักจับ r*Lv*crustinA ซึ่งมีส่วนของ 6×His-tag อยู่ได้ จากนั้นจึงนำโปรตีนที่บริสุทธิ์ไปทำไดอะไลซิส (dialysis) ใน 0.1 M carbonate buffer pH 10 แล้วจึงนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford [13]

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion assay

ในการทดสอบฤทธิ์ของเพปไทด์ r*Lv*crustinA ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้ทำการทดสอบโดยวิธีซึ่งดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Donpudsa และคณะ [14] โดยทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ 5 สายพันธุ์ คือ *E. coli* 363, *V. harveyi* 639, *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus* (AHPND) และ *Klebsiella pneumoniae* โดยทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB (ยกเว้นแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth (TSB) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) แล้วจึงนำไปวัดค่า OD_{600} จากนั้นเจือจางเชื้อแต่ละสายพันธุ์ด้วย 1% (w/v) agarose gel ใน PBS โดยให้เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีค่า OD_{600} ประมาณ 0.1 จากนั้นรอจนกระทั่งเจลแข็งตัว จึงเจาะหลุมกว้างประมาณ 0.3 เซนติเมตร แล้วเติมโปรตีนความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลุมปริมาตรหลุมละ 120 ไมโครลิตร โดยใช้ 3 nmol ampicillin และ PBS เป็น positive control และ negative control บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition zone) บนจานเพาะเชื้อที่ทำการเติมเพปไทด์ r*Lv*crustinA เปรียบเทียบกับจานเพาะเชื้อที่ทำการเติม 3 nmol ampicillin เพื่อทดสอบฤทธิ์ของเพปไทด์ r*Lv*crustinA ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยรายงานผลในรูปแบบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของแบคทีเรียที่เกิดจากโปรตีนต่อโซนยับยั้งที่เกิดจากการเติม 3 nmol ampicillin ซึ่งผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เกิดจากการทดลอง 3 ซ้ำ และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยสถิติตามวิธีของ one-way ANOVA ด้วย SPSS version 18 โดยเมื่อผลทางสถิติให้ค่า *p*-value น้อยกว่า 0.05 จึงเป็นที่ยอมรับได้อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพของ *Lv*crustinA โดยทำการโคลนยีนและผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli* ก่อนจะนำโปรตีนลูกผสมที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งในกลุ่มของแกรมบวกและแกรมลบ

1. การโคลนยีน *Lv*crustinA ของกุ้งขาวและการสร้างพลาสมิดลูกผสม

ในการโคลนยีน *Lv*crustinA ได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *Lv*crustinA โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank (accession No. KY351820) ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำการเพิ่มปริมาณยีนเฉพาะบริเวณที่โปรตีนสามารถทำงานได้ ดังนั้นในการโคลนยีน *Lv*crustinA ในงานวิจัยนี้จะไม่มีบริเวณของเพปไทด์ส่งสัญญาณ หลังจากการเพิ่มปริมาณยีนแล้ว ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pVR500 จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อใช้ในการตรวจสอบความถูกต้อง

*Lv*crustinA เป็นครัสทินที่ประกอบด้วย 468 นิวคลีโอไทด์ ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 155 โมเลกุล มีมวลโมเลกุล 16.29 กิโลดาลตัน มีค่า

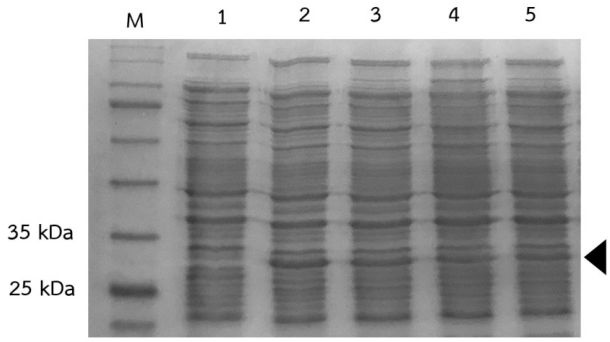
จุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) เท่ากับ 9.69 ซึ่งประกอบด้วยโดเมน WAP ที่มีซิสเตอีน 8 โมเลกุล ที่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิล จากการวิเคราะห์ในการทำนายบริเวณของเพปไทด์ส่งสัญญาณด้วยโปรมแกรม SignalP 4.1 Server พบว่ายีนที่แยกได้มีบริเวณของเพปไทด์ส่งสัญญาณระหว่างกรดอะมิโนอะลานีน (โมเลกุลที่ 16) และกลูตามีน (โมเลกุลที่ 17) ที่บริเวณปลายด้านอะมิโน นอกจากนี้มีบริเวณ Gly-rich ระหว่างเพปไทด์ส่งสัญญาณและโดเมน WAP (ภาพที่ 2) จึงสามารถบอกได้ว่า *Lv*crustinA เป็นยีนของครัสทินชนิดที่ 2 แต่อย่างไรก็ตาม *Lv*crustinA ที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความแตกต่างจากครัสทินชนิดที่ 2 ไอโซฟอร์มอื่น ๆ ซึ่งไม่พบบริเวณ Cys-rich โดยโครงสร้างโดเมนของ *Lv*crustinA ประกอบด้วยเพปไทด์ส่งสัญญาณ Gly-rich และโดเมน WAP ตามลำดับ

```
  1  GTCTCTCCTT CCAGTGCCGG AGTTGCCTTC CTCCGCTGTG AACGTCCACT CTTACAAAAT
 61  TTTATCACGA TGCTGAGAGT GCTGCTGCTG TGCCTGGCCG CGGGGTCGAC CCTCGCCCAG
                M  L  R   V  L  L  L   C  L  A   A  G  S   T  L  A  Q
121  AACACCAACA GCACCAACCA AGGAAACACT CGTATCTTCG GTCTGGGAAA CCTCCTCTCG
      N  T  N   S  T  N   Q  G  N  T   R  I  F   G  L  G   N  L  L  S
181  GGCTTGACTG GGAACCGACC CAACAGACCC TTCAACGGAG GCTTCAACCA GGGAGGCTTC
      G  L  T   G  N  R   P  N  R  P   F  N  G   G  F  N   Q  G  G  F
241  AACCCCGGGT TCAACCAGGG CGGCTTCAAC CAGGGAGGTT TCAACCAGGG AGGCTTCAAC
      N  P  G   F  N  Q   G  G  F  N   Q  G  G   F  N  Q   G  G  F  N
301  CAGGGAGGTT TCAACCAGGG AGGCTTCGGA CAGCTCGGTA ACTTCGTCGG TGGACTCGCT
      Q  G  G   F  N  Q   G  G  F  G   Q  L  G   N  F  V   G  G  L  A
361  GCGGGCATCC TCGGCCAATC AGGCTTCCGA CCTCCCTTCA ACCAAGGAGG CTTCAACCAG
      A  G  I   L  G  Q   S  G  F  R   P  P  F   N  Q  G   G  F  N  Q
421  TTCAAGCCAG GTCGTTGCCC CGCGGTGCGA CCCCAGTGTC CGAACACGAG GTTTGGCAGG
      F  K  P   G  R  C   P  A  V  R   P  Q  C   P  N  T   R  F  G  R
481  CCTCAGGTTT GCTTCAACGA CTTCGCCTGC GCGGGTTCGG ACAAGTGCTG CTTCGACACC
      P  Q  V   C  F  N   D  F  A  C   A  G  S   D  K  C   C  F  D  T
541  TGTCTCGGCG AACGCGTGTG CAAACCCATC TCCAATTTTG GGAAGTGAAT TTCTCATTTG
      C  L  G   E  R  V   C  K  P  I   S  N  F   G  K  -
601  TTATCTTTTT TTTAATGTGT GTGTGCTCGA AAATACAGTT TTATGTATTT GAGAAAAAAA
661  AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAA
```

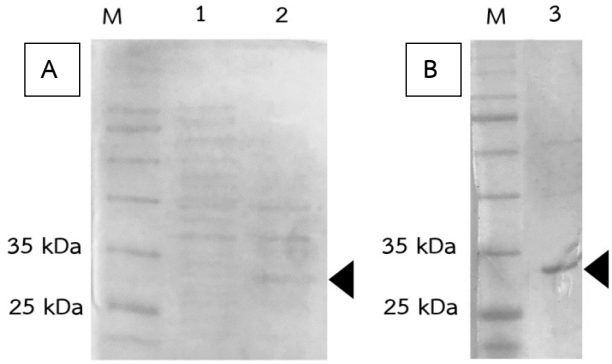
ภาพที่ 2 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของ *Lv*crustinA โดยส่วนที่เป็นแถบสีเทาเป็นส่วนของเพปไทด์ส่งสัญญาณ ส่วนที่เป็นตัวหนาต่อมาเป็นส่วนของ Gly-rich และส่วนที่ขีดเส้นใต้เป็นส่วนของ WAP domain

2. การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ NiCo21(DE3)

จากการผลิต r*Lv*crustinA ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ NiCo21(DE3) และวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 15% SDS-PAGE พบว่า โปรตีนลูกผสมมีขนาด 28 กิโลดาลตัน และมีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมตั้งแต่ชั่วโมงแรกหลังจากเติม IPTG (ภาพที่ 3) ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเฉพาะเซลล์แบคทีเรียลูกผสมซึ่งถูกกระตุ้นให้มีการผลิต r*Lv*crustinA ด้วยการเติม IPTG เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไปทำให้เซลล์แตก เพื่อนำส่วนของสารละลายและตะกอนไปตรวจสอบโปรตีน ผลการทดลองพบว่าโปรตีนลูกผสม r*Lv*crustinA อยู่ในรูปของตะกอน (ภาพที่ 4A) จากการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีชนิด Ni-NTA column พบว่าได้โปรตีน r*Lv*crustinA ที่มีความบริสุทธิ์ (ภาพที่ 4B) พร้อมนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย



ภาพที่ 3 โปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ NiCo21(DE3) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากกระตุ้นด้วย IPTG ทำการวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE แถว M คือ โปรตีนมาตรฐาน แถว 1-5 คือ โปรตีนที่ถูกกระตุ้นที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ บริเวณลูกศรแสดงโปรตีน r*Lv*crustinA ขนาด 28 กิโลดาลตัน

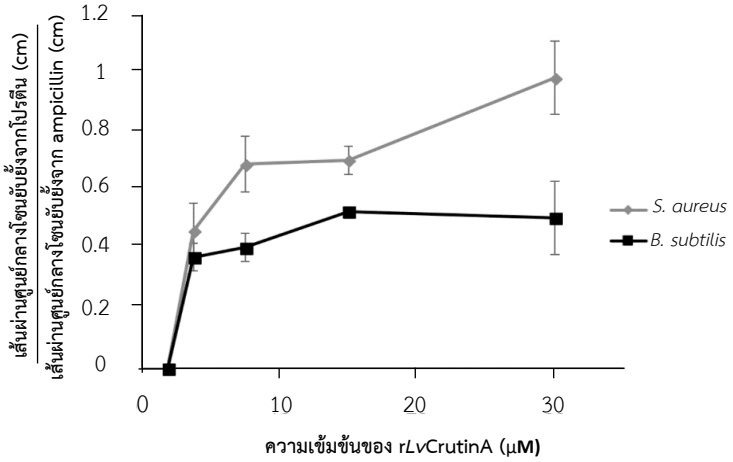


ภาพที่ 4 โปรตีน r*Lv*crustinA วิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE (A) แสดงโปรตีนในส่วนของสารละลาย (แถว 1) และส่วนของตะกอน (แถว 2) แถว M คือ โปรตีนมาตรฐาน (B) แสดงโปรตีน r*Lv*crustinA ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของโปรตีน r*Lv*crustinA โดยวิธี agar diffusion ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก 4 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *B. megaterium*, *M. luteus* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ 5 สายพันธุ์ คือ *E. coli* 363, *V. harveyi* 639, *V. parahaemolyticus, V. parahaemolyticus* (AHPND) และ *K. pneumoniae* โดยใช้ 3 nmol ampicillin ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกับโปรตีน r*Lv*crustinA ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนั้น วัดได้จากเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งของโปรตีน r*Lv*crustinA และ 3 nmol ampicillin

เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟเป็นอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งที่เกิดจาก r*Lv*crustinA กับ ampicillin พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นด้วย (ภาพที่ 5) ซึ่งโปรตีน r*Lv*crustinA มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* และ *B. subtilis*



ภาพที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของโปรตีน *rLv*crustinA ด้วยเทคนิค agar diffusion assay โดยแสดงเป็นอัตราส่วนระหว่างโซนยับยั้งของฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากโปรตีนกับ 3 nmol ampicillin

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ครัสทินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในเพปไทด์ต้านจุลชีพ โดยประกอบด้วยโดเมน WAP ที่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิล และบริเวณของเพปไทด์ส่งสัญญาณที่บริเวณปลายด้านหมู่อะมิโน ครัสทินสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ตามความแตกต่างของกรดอะมิโนระหว่างเพปไทด์ส่งสัญญาณและโดเมน WAP โดยที่ชนิดที่ 1 จะมีกรดอะมิโนซีสเตอีนสูง ชนิดที่ 2 จะมีบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนสูงเพิ่มเข้ามาจากครัสทินชนิดที่ 1 และในชนิดที่ 3 พบเพียงบริเวณที่มีกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จีนีนสูง [8] ซึ่งจากลักษณะของยีน *Lv*crustinA พบว่า มีบริเวณของโดเมน WAP ที่ปลายด้านคาร์บอกซิล และเพปไทด์ส่งสัญญาณที่ปลายด้านหมู่อะมิโน นอกจากนี้กรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างโดเมน WAP และเพปไทด์ส่งสัญญาณนั้น เป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนสูง ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับครัสทินชนิดที่ 2 ดังนั้นจึงสามารถบอกได้ว่า *Lv*crustinA เป็นครัสทินชนิดที่ 2 แต่มีความแตกต่างจากครัสทินชนิดที่ 2 ทั่วไป นั่นคือไม่พบโครงสร้างโปรตีนบริเวณ Cys-rich แต่พบเฉพาะเพปไทด์ส่งสัญญาณ Gly-rich และโดเมน WAP ตามลำดับ

ในการผลิตโปรตีน *rLv*crustinA เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้ pVR500 [12] เป็นเวคเตอร์สำหรับนำยีน *Lv*crustinA เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสม โดยโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้จะมีขนาด 28 กิโลดาลตัน เนื่องจากบริเวณด้านหน้าปลายหมู่อะมิโนของโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้ จะมีส่วนที่เป็น thioredoxin tag เพิ่มเข้ามาบริเวณปลายด้านหมู่อะมิโน เพื่อทำให้โปรตีนมีความเสถียรมากขึ้น ส่งผลให้โปรตีนมีการแสดงออกและนำไปผลิตโปรตีนลูกผสมเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้พยายามทำการผลิตโปรตีนลูกผสมชนิดนี้ในระบบที่มีไม่ thioredoxin tag พบว่าไม่สามารถผลิตโปรตีนลูกผสมชนิดนี้ได้ จึงเป็นไปได้ว่าการเพิ่มส่วนที่เป็น thioredoxin tag อาจช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับโปรตีนนี้ นอกจากนี้ยังมีส่วนของ 6×His-tag ที่บริเวณปลายด้านหมู่อะมิโน เพื่อใช้ในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์อีกด้วย

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยการผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli* นั้น โดยส่วนใหญ่แล้วครัสทินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก แต่ครัสทินบางชนิดพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนแกรมลบด้วย จากรายงานของ Wang และคณะ [15] ได้ศึกษา *Sp*Crus2 ซึ่งเป็นยีนของครัสทินชนิดที่ 2 ใน *Scylla paramamosain* พบว่า *Sp*Crus2 มีฤทธิ์ใน

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่จากรายงานของ Vatanavicharn และคณะ [16] ได้ศึกษา crustin*Pm*5 ซึ่งเป็นยีนของครัสทินชนิดที่ 2 ใน *Penaeus monodon* พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของ r*Lv*crustinA ซึ่งพบว่า r*Lv*crustinA มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* และ *B. subtilis*

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของ *Lv*crustinA ซึ่งเป็นครัสทินชนิดที่ 2 ชนิดใหม่ ที่ไม่มีบริเวณ Cys-rich ซึ่งพบเฉพาะบริเวณของ Gly-rich และโดเมน WAP โดยผลการทดลองที่ได้พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แสดงว่าบริเวณของ Gly-rich นั้นมีความสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าจะขาดบริเวณของ Cys-rich ก็ตาม ดังนั้นการศึกษาความสำคัญของเฉพาะส่วนของบริเวณ Gly-rich ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ทำให้ได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับครัสทินชนิดที่ 2 และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากขึ้น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมโรคของกุ้งขาวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2561 (รหัสโครงการ 028/2561) รวมทั้งขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) โดยสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

เอกสารอ้างอิง

1. เศรษฐกิจการเกษตร. นำเข้า-ส่งออกสินค้าที่สำคัญ. [อินเทอร์เน็ต]. 2560 [เข้าถึงเมื่อ 1 มี.ค. 2561]. เข้าถึงได้จาก: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import /export_result.php
2. ชลอ ลิ้มสุวรรณ, พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: เมจิคพับบลิเคชัน; 2547.
3. มลฤดี สนธิ. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล. แว่นเกษตร 2559;44(2):373-82.
4. อรรคพล วณิกสัมบัน. การผลิตโมโนโคลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ; 2556.
5. Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Supungul P, Tang S. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. Fish Shellfish Immunol 2013;34(4):954-67.
6. Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V, Visetnan S, Amparyup P, Somboonwiwat K, Charoensapsri W, et al. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. Dev Comp Immunol 2018;80:81-93.
7. Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Amparyup P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. Dev Comp Immunol 2015;48(2):324-41.

8. Smith VJ, Fernandes JMO, Kemp G, Hauton C. Crustins: enigmatic WAP-containing antibacterial proteins from crustaceans. Dev Comp Immunol 2008;32(7):758-72.
9. Shockey JE, O'Leary NA, Vega E, Browdy CL, Baatz JE, Gross PS. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: an *in vivo* approach. Dev Comp Immunol 2009;33(5):668-73.
10. Visetnan S, Supungul P, Tassanakajon A, Donpudsa S, Rimphanitchayakit V. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* possesses antiproteinase activity against subtilisin and antimicrobial activity against AHPND-inducing *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Shellfish Immunol 2017;68:341-48.
11. Li M, Ma C, Li H, Penga J, Zenga D, Chena X, et al. Molecular cloning, expression, promoter analysis and functional characterization of a new crustin from *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 2018;73:42-49.
12. Donpudsa S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 2009;33(4):481-88.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
14. Donpudsa S, Visetnan S, Supungul P, Tang S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Type I and type II crustins from *Penaeus monodon* genetic variation and antimicrobial activity of the most abundant crustin*Pm*4. Dev Comp Immunol 2014;47(1):95-103.
15. Wang H, Zhang J, Wang Y, Fang W, Wang Y, Zhou J, et al. Newly identified type II crustin (*Sp*Crus2) in *Scylla paramamosain* contains a distinct cysteine distribution pattern exhibiting broad antimicrobial activity. Dev Comp Immunol 2018;84:1-13.
16. Vatanavicharn T, Supungul P, Puanglarp N, Yingvilasprasert W, Tassanakajon A. Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustin*Pm*5, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. Comp Biochem Physiol B 2009;153(3):244-52.