การศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีนลูกผสม Shrimp Ovarian Peritrophin domain A (SOP-A) จาก *Fenneropenaeus merguiensis*

Antimicrobial Activity of Shrimp Ovarian Peritrophin Domain A (SOP-A) Recombinant Protein from *Fenneropenaeus Merguiensis*

สุจรรยา อนุชาญ[1,2]*, **เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร**[3] **และ วิไลวรรณ โชติเกียรติ**[1,2]

Sujunya Anuchan[1,2]*, Saowaluk Phongpaijit [3]and Wilaiwan Chotigeat [1,2]

[1]*สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ;* [2]*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ;* [3]*ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112*

[1]*Center for Genomics and Bioinformatics Research;* [2]*Department of Molecular Biotechnology and Bioinformatics;* [3]*Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, 90112*

**Corresponding author: sujunya_ma@yahoo.com*

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยชิ้นนี้เราได้ผลิตและทำการศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีนลูกผสม Shrimp Ovarian Peritrophin domain A (SOP-A) พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 9 kDa และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Vibrio harveyi, Candida albicans* และ *Fusarium oxysporum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.035 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.57mg/ml และ0.015 mg/ml ตามลำดับและค่า MBC/MFCเท่ากับ 0.035 mg/ml, 0.57 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.57 mg/ml และ 0.015 mg/ml ตามลำดับ

ABSTRACT

In this study, we have produced and performed antimicrobial assay of Shrimp Ovarian Peritrophin domain A (SOP-A) protein. The result showed that the molecular weight of purified SOP-A protein is about 9 kDa. Purify SOP-A protein inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli, Vibrio harveyi*, *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* with minimal inhibitory concentrations of 0.035 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.57 mg/ml and 0.015 mg/ml respectively. Minimal Bactericidal/Fungicidal Concentration of SOP-A with *S. aureus*, *E. coli,V. harveyi, C. albicans and F. oxysporum* were 0.035 mg/ml, 0.57 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.57 mg/ml and 0.015 mg/ml, respectively.

คำสำคัญ: SOP-A, การต้านจุลชีพ, *Fenneropenaeus merguiensis*

Keyword: SOP-A, antimicrobial, *Fenneropenaeus merguiensis*

บทนำ

Antimicrobial peptide (AMPs) เป็นสารประกอบที่สำคัญของระบบ innate immune เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียและเชื้อราสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดย AMPs ที่ค้นพบส่วนใหญ่เป็น cysteine-rich antimicrobial peptide ซึ่งจะพบมากในพวก arthropods และ invertebrates (Dimarcq *et al*., 1998) เนื่องจากกุ้งไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive จะมีเฉพาะ innate cellular และ humoral immune response (Bachere *et al*., 2004) จึงมีการสร้าง antimicrobial peptide เพื่อเป็นกลไกในการป้องกันการบุกรุกของ pathogen ต่างๆ ตัวอย่างของ AMPs ที่มีการศึกษาใน Penaeid shrimps ได้แก่ Anti-lipopolysaccharide factor (ALFs), Crustins, Penaeidins และ Stylicins (Antony *et al*., 2011) จากการศึกษาการแสดงออกของยีนเพื่อดูการทำงานของโปรตีนในกุ้งแชบ๊วย *Fenneropenaeus merguiensis* พบว่ามียีนที่น่าสนใจคือShrimp ovarian peritrophin (*Fm*-SOP) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในjelly layer (JL) และ cortical rods (CRs) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันอันตรายของไข่กุ้งจากสิ่งแวดล้อมภายนอกทันทีหลังจากที่กุ้งมีการวางไข่ยีน *Fm*-SOP ประกอบด้วย cysteine-rich domains อยู่หลายตำแหน่งซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่พบใน AMPs หลายชนิดและจากการศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน *Fm*-SOP พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. harveyi* และ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 0.11 mg/ml และ 0.86 mg/ml ตามลำดับ (Loongyai *et al*., 2007) นอกจากนี้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 80-81 ของยีน *Fm*-SOP สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ furin (subtilisin-like endoprotease) ทำให้เกิดเป็น 2 domain คือ domain A เริ่มตั้งแต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-80 และ domain B ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 81-329 ซึ่งทั้ง 2 domain จะมีส่วนที่เป็น cysteine-rich domains อยู่และได้มีการศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพในส่วนของ domain B พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้ง *V. harveyi, S. aureus* และ *F. oxysporum* มีค่า MIC เท่ากับ 0.27 mg/ml, 0.03 mg/ml และ 0.5 mg/ml ตามลำดับ (นรีรัตน์, 2555) ในงานวิจัยชิ้นนี้จะศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน *Fm*-SOP ในส่วนของ domain A เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับ Full length และ domain B เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสาร antibiotics ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน SOP-A ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-SOP-A ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 เลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่มี Amplicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่าประมาณ 0.4-0.6 จึงกระตุ้นแบคทีเรียให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วยสารละลาย 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyronoside) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชม. แยกเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการนำไปหมุนเหวี่ยงแล้วละลายด้วย buffer A (50mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.5) จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงแล้วเก็บส่วนที่เป็นตะกอน (inclusion body) นำมาล้างด้วย washing buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1% Triton x-100) จนตะกอนเปลี่ยนเป็นสีขาว ละลายตะกอนด้วย buffer D (50 mMTris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 5 M Guanidine HCl) จากนั้นตัด GST-tagged ออกด้วย thrombin (GE Healthcare,Thailand) ตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตได้ด้วย 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

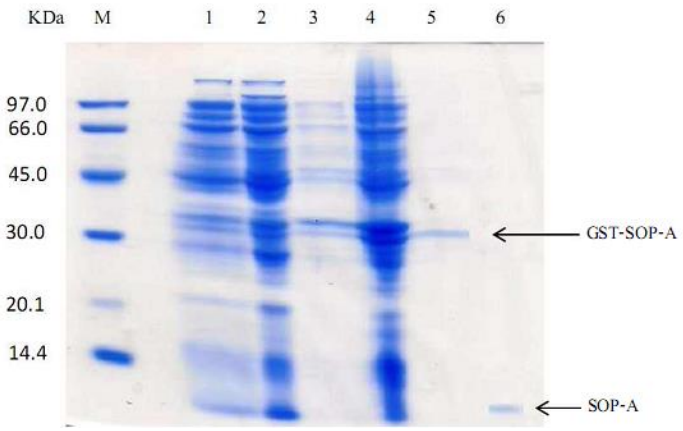
2. การศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน SOP-A

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium, Enterococcus faecalis*, แบคทีเรียแกรมลบ *V. harveyi, E.coli* (ATCC25922), *Enterbacter cloaca, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa* ยีสต์ *C. albicans* และเชื้อรา *F. oxysporum* ใช้วิธี liquid growth inhibition assays (Bond *et al*. 2002; Loongyai *et al*. 2007) โดยนำโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A 10 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้นต่างๆแบบ serial dilution มาบ่มกับ 90 ไมโครลิตรของแบคทีเรียที่ความเข้มข้น $2.5x10^5$ CFU/ml หรือ เชื้อราที่ความเข้มข้น $8x10^3$spores/ml บ่มใน 96 well plate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม. วัดค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นนำหลุมที่ไม่มีการเจริญเติบโตไปเกลี่ยบนอาหารแข็งเพื่อหาค่า MBC/MFC

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน SOP-A ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21

เมื่อกระตุ้นการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-SOP-A ด้วย1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyronoside) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 และทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-SOP-A พบว่าโปรตีน GST-SOP-A มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39 kDa และเมื่อตัด GST ออกด้วย Thrombin พบว่าได้โปรตีน SOP-A มีขนาดประมาณ 9 kDa ดังรูปที่ 1



รูปที่1 แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST-SOP-A ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 และการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE แถว M: Low molecular weight standard marker, แถว1: non induce soluble protein, แถว 2: induce soluble protein, แถว3: non induce insoluble protein, แถว 4: induce insoluble protein, แถว5: โปรตีน GST-SOP-A บริสุทธิ์, แถว6: โปรตีน SOP-A บริสุทธิ์

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของโปรตีน SOP-A

จากการทดสอบ antimicrobial activity ของโปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A ด้วยวิธี MIC และ MBC ในช่วง 0.002 – 0.57 mg/ml พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *V. harveyi*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *F. oxysporum* ส่วนเชื้ออื่นที่เหลือไม่สามารถยับยั้งได้ (ตาราง 1)

ตารางที่1 แสดงค่าMinimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของโปรตีน SOP-A

เชื้อที่ทดสอบ	**ค่า MIC (mg/ml)**	**ค่า MBC (mg/ml)**
Gram-negative bacteria		
Enterobacter cloacae	-	-
Escherichia coli	0.28	0.57
Pseudomonas aeruginosa	-	-
Salmonella typhimurium	-	-
Vibrio harveyi	0.28	0.28
Gram-positive bacteria		
Bacillus megaterium	-	-
Enterococcus faecalis	-	-
Micrococus luteus	-	-
Staphylococcus aureus	0.035	0.035
Yeast		
Candida albicans	0.57	0.57
Fungi		
Fusarium oxysporum	0.015	0.015

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรตีน SOP-A ที่ผลิตได้นั้นมีคุณสมบัติในการเป็นantimicrobial peptide เช่นเดียวกับส่วน Full length (*Fm*-SOP) และ domain B (SOP-B) โดยมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* มีค่า MIC เท่ากับ 0.28 mg/ml เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับโปรตีน*Fm*-SOP มีค่า MIC เท่ากับ 0.11 mg/ml และโปรตีน SOP-B มีค่า MIC เท่ากับ 0.27 mg/ml พบว่าโปรตีน SOP-A มีฤทธิ์น้อยกว่าโปรตีน *Fm*-SOP และ SOP-B ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 0.035 mg/ml เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่า MIC ของโปรตีน *Fm*-SOP และ SOP-B ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.86 mg/ml และ 0.03 mg/ml พบว่าโปรตีน SOP-A มีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่าโปรตีน *Fm*-SOPความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* มีค่า MIC เท่ากับ 0.015 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน *Fm*-SOP ซึ่งมีค่า MIC มากกว่า 1 mg/ml และ SOP-B ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 mg/ml พบว่าโปรตีน SOP-A มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* ได้ดีกว่าโปรตีน *Fm*-SOP และ SOP-B นอกจากนี้โปรตีน SOP-A ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli* และ *C. albicans* ซึ่งส่วนโปรตีน *Fm*-SOP และ SOP-B ไม่สามารถยับยั้งได้

สรุปผลการทดลอง

โปรตีนบริสุทธิ์ SOP-A ที่ผลิตได้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 9 KDa และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus, E. coli, V. harveyi, C. albicans* และ *F. oxysporum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.035 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.57 mg/ml และ 0.015 mg/ml ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากับ 0.035 mg/ml, 0.57 mg/ml, 0.28 mg/ml, 0.57 mg/ml และ 0.015 mg/ml ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

นรีรัตน์ เสียมใหม. คุณสมบัติการต้านจุลชีพของ Shrimp Ovarian Peritrophin Domain B (SOP-B). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ.มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา. 2555

Antony, S.P., Singh, I.S.B., Jose, R.M., Kumar, P.R.A. and Philip, R. Antimicrobial peptide gene expression in tiger shrimp, *Penaeus monodon* in response to gram-positive bacterial probionts and white spot virus challenge.Aquaculture.2011;316:6-12.

Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J.and Romestand,B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates:thepenaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immun.Rev.2004; 198:149–168.

Blond, A., Cheminant,M., Garzon, D.D., Milazzo, I.S., Peduzzi, J., Goulard, C. and Rrbuffat, S. Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native marcrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. J. Biochem.2002;269:6212-6222.

Dimarq, J.-L., Bulet, P., Hetru, C., Hoffmann,J. Cycteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. Biopolymers.1998;47: 465-477.

Loongyai, W., Avarre, J.C., Martine, C., Lubzens, E., Chotigeat ,W. Isolation and functional characterization of a new shrimp ovarian peritrophin (SOP) from the ovary of *Fenneropenaeus merguiensis*. Mar Biotechnol.2007;9:624–637.