

ผลของรีคอมบิแนนท์ Trypsin-Modulating Oostatic Factor ต่อลูกน้ำยุงลาย

มลฤดี โอปมาวุฒิกุล^{1*} จิระพรรณ จิตติคุณ²

บทคัดย่อ

Trypsin Modulating Oostatic Factor (TMOF) เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนขนาด 10 กรดอะมิโนที่สามารถพัฒนาเป็นสารกำจัดลูกน้ำยุงลายได้ แต่ด้วยการผลิตเปปไทด์นี้มักใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งส่งผลต่อต้นทุนการผลิตเชิงอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตเปปไทด์ TMOF ด้วยวิธีที่ง่ายและประหยัด โดยการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กำหนดเปปไทด์เป้าหมาย แทรกยีนที่สังเคราะห์เข้ากับเวกเตอร์ pET11a ถ่ายพลาสมิด pET11a/*tmof* เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *tmof* สกัดบริสุทธิ์เปปไทด์เป้าหมายด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) จากการศึกษ พบว่า ยีนสังเคราะห์ *tmof* ไม่ก่อพิษต่อโฮสต์เซลล์ อีกทั้งยังได้เปปไทด์เป้าหมายในปริมาณมาก ถึงแม้ไม่สามารถสกัดบริสุทธิ์เปปไทด์เป้าหมายได้สำเร็จ แต่จากผลทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียโคลน (0.001-100 ppm) เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลายระยะที่ 3-4 พบว่า สามารถยับยั้งการเติบโตของลูกน้ำยุงลายที่ทุกความเข้มข้น โดยแบคทีเรียโคลนช่วง 0.1-1 ppm มีผลต่อการเติบโตมากที่สุด สรุปได้ว่า การผลิตเปปไทด์ TMOF ในแบคทีเรียด้วยเทคนิครีคอมบิแนนท์เป็นกระบวนการที่ดี ให้ผลผลิตในปริมาณมากที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของลูกน้ำยุงลาย

คำสำคัญ : Trypsin-Modulating Oostatic Factor รีคอมบิแนนท์ ลูกน้ำยุงลาย *Escherichia coli*

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี อีเมล: mon.opama@gmail.com

²ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล อีเมล: pyjitt@mahidol.ac.th

*ผู้รับผิดชอบหลัก อีเมล: mon.opama@gmail.com

Effect of Recombinant Trypsin-Modulating Oostatic Factor on *Aedes aegypti* Larvae

Monluedee Opamawutthikul^{1*} Jiraphun Jittikoon²

Abstract

Trypsin Modulating Oostatic Factor (TMOF) is a decapeptide hormone possibly developed as a new mosquito larvicide. However, the backbone chemical synthesis of TMOF is expensive at industrial level. We, here, established the convenient and inexpensive method of the peptide production. Oligonucleotides of the gene of interest were synthesised and ligated to expression pET11a vectors. The pET11a/*tmoF* plasmids were then transformed into the *Escherichia coli*, TOP10, followed by expression and purification of rTMOF. Biological effect on *Aedes aegypti* larvae was also observed. We found that the synthesised genes were non-toxic hence brought out the high expression level. The purified recombinant TMOF remained unrecovered. We, then, fed and raised 3rd- 4th instar larvae with the cloned bacteria (0.001-100 ppm). The larval growth was physically retarded at all bacterial concentrations. The high effective concentration range was 0.1-1 ppm. We conclude that production of recombinant TMOF in *E. coli* is a promising process delivering high quantity and high activity for larval growth inhibition.

Keywords : Trypsin-Modulating Oostatic Factor, recombinant, *Aedes aegypti*, *Escherichia coli*

¹Science Program, Faculty of Education, Kanchanaburi Rajabhat University, e-mail: mon.opama@gmail.com

²Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, e-mail: pyjit@mahidol.ac.th

*Corresponding author, e-mail: mon.opama@gmail.com

บทนำ

ยุงลาย (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญทางด้านสาธารณสุข ถึงแม้หลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ทั้งจากกระทรวงสาธารณสุข กรมส่งเสริมการปกครองท้องถิ่น และสถานศึกษา ได้ให้ความสำคัญในการรณรงค์ให้ความรู้แก่ประชาชนในการควบคุมและกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีทั้งการควบคุมทางชีวภาพ การควบคุมทางกายภาพ และการควบคุมทางเคมี แต่ในทางปฏิบัติ การควบคุมที่นิยมมักเน้นในการใช้สารเคมี สารเคมีที่ใช้เป็นสารกำจัดยุงนั้นมี 2 ประเภท คือ สารเคมีที่ได้สังเคราะห์ และสารเคมีจากธรรมชาติ สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาสารออกฤทธิ์กำจัดยุงในระยะลูกน้ำ โดยได้ศึกษากระบวนการผลิตและสกัดเปปไทด์ Trypsin-Modulating Oostatic Factor (TMOF) ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย (Borovsky, 1988) ซึ่งสามารถใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการควบคุมการเติบโตของยุงลายได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อันอาจนำไปสู่การผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้ (Saiful, *et. al*, 2012)

TMOF เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนขนาด 10 กรดอะมิโน (YDPAPPPPPP) ที่พบในสัตว์หลายจำพวก รวมถึงแมลงที่กินเลือดเป็นอาหาร จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า มีเพียงนักวิจัยจากต่างประเทศเท่านั้นที่ทำการศึกษากฎในการกำจัดยุงของเปปไทด์ TMOF ส่วนในประเทศไทยยังไม่พบงานวิจัยเกี่ยวกับเปปไทด์ชนิดนี้เลย TMOF มีฤทธิ์กำจัดยุงลายทั้งในระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัยได้ผลเป็นอย่างดี ฤทธิ์มีความจำเพาะต่อแมลงที่กินเลือดเป็นอาหาร โดยไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Borovsky, 2003) สำหรับวิธีการผลิตเปปไทด์เป้าหมายนี้สามารถทำได้ 3 วิธี คือ การสกัดเปปไทด์เป้าหมายจากยุง การสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาทางเคมี และการผลิตด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาโมเลกุล โดยพบว่าวิธีการผลิตที่นิยม คือ วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี แต่การสังเคราะห์สายเปปไทด์/โปรตีนด้วยวิธีการทางเคมีนั้นมีราคาแพง จึงอาจไม่เหมาะต่อการพัฒนาในเชิงอุตสาหกรรม ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการผลิตเปปไทด์ที่สนใจด้วยเทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

การผลิตด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาโมเลกุลนั้น พบว่า มีรายงานการผลิตด้วยการตัดต่อรหัสพันธุกรรมของเปปไทด์เป้าหมายไปเชื่อมต่อกับรหัสพันธุกรรมของโฮสต์ในหลาย ๆ ระบบ เช่น พืชแปลงพันธุ์ *Nicotiana tabacum* (Borovsky, *et al.*, 2006) แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว (*Chlorella* sp.) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) (Borovsky, 2003) ซึ่งจากรายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า การผลิตเปปไทด์เป้าหมายในแบคทีเรียยังมีข้อมูลอยู่น้อย ทั้ง ๆ ที่การผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์/โปรตีนในแบคทีเรียเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก (Demain, 2009) มีความสลับซับซ้อนในการควบคุมระบบน้อยกว่าการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในโฮสต์อื่น ๆ รวมถึงสามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการในปริมาณมาก ด้วยข้อมูลสนับสนุนว่าการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ TMOF สามารถทำได้ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* (Carlson, *et al.*, 1994) ผนวกกับมีรายงานพบว่า เปปไทด์นี้มีคุณสมบัติทนความร้อน (Borovsky & Carlson, 1991) ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการผลิตเปปไทด์ TMOF ด้วยเทคนิครีคอมบิแนนท์ในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ TMOF ซึ่งผลิตด้วยเทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอในแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีต่อลูกน้ำยุงลาย

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การผลิตรีคอมบิแนนท์ยีน tmof

ออกแบบและสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ยีน tmof โอลิโกนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายซึ่งในธรรมชาติผลิตจากยุงลาย โดยมีลำดับกรดอะมิโน คือ YDPAPPPPP จากนั้นเชื่อมต่อกับลำดับเบสของฮิสติดีนเรสซิว (6X His-tagged) ที่ปลายกรดคาร์บอกซี เพื่อให้การสกัดบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมายเป็นไปอย่างสะดวก ลำดับเบสนี้ถูกนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET11a ที่ตำแหน่ง NdeI และ Bam HI ตามลำดับ (Novagen, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทั้งนี้การสังเคราะห์และเชื่อมต่อยีนสังเคราะห์เข้ากับเวกเตอร์นั้นได้ดำเนินการโดยบริษัท MWG Operon ประเทศเยอรมันนี ตามที่ผู้วิจัยได้ออกแบบ

ตอนที่ 2 การผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ TMOF

ส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอ pET11a/tmof เข้าสู่คอมพลีเทนท์เซลล์ TOP10 ผสมพลาสมิดดีเอ็นเอ pET11a/tmof จำนวน 2 μ l กับคอมพลีเทนท์เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 จำนวน 50 μ l ที่เตรียมจากการใช้แคลเซียมคลอไรด์ วางสารผสมบนน้ำแข็งนาน 20 นาที แช่น้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 90 วินาที แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC 500 μ l ลงในสารผสม จากนั้นเลี้ยงคอมพลีเทนท์เซลล์ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดแล้ว นำเชื้อมา 50 100 และ 200 μ l กระจายให้ทั่วลงบนอาหาร LB ชนิดแข็งที่มีแอมพิซิลิน 100 μ g/ml แบบข้ามคืนที่ 37°C ในตู้บ่มเชื้อ

ชั่งน้ำหนักการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีน tmof เลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียโคลน นำมาเลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ชนิดเหลวที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 200 μ g/L (ความเข้มข้นสุดท้าย) ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ 20 เท่า ในอาหาร LB ชนิดเหลวที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 200 μ g/L ปริมาตร 1 L เลี้ยงต่อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°C จน O.D.₆₀₀ เท่ากับ 0.6 เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ml ก่อนการเติม 1mM IPTG (ความเข้มข้นสุดท้าย) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อที่สภาวะเดิมจนครบ 4 ชั่วโมง ทั้งนี้ให้ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ทุก ๆ ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมงแล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงแบบหนีแรงศูนย์กลางด้วยความเร็ว 9,000 $\times$ g ที่ 4°C นาน 10 นาที แยกส่วนของอาหารเหลวใสกับเซลล์แบคทีเรียที่ตกตะกอน เพื่อนำไปตรวจสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ TMOF ด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE ส่วนเซลล์ตะกอนที่ได้ถูกนำมาใช้ในการสกัดบริสุทธิ์เปปไทด์เป้าหมาย

สกัดบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ TMOF ละลายเซลล์ตะกอนให้เป็นสารแขวนลอยในไลซิสบัฟเฟอร์ (20 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 500 mM โซเดียมคลอไรด์ 20 mM อิมิดาโซล pH 7.4) ที่สัดส่วน 5 ml/g น้ำหนักเปียกของเซลล์ตะกอนที่ผ่านการชักนำด้วย IPTG เติมไลโซไซม์ 200 mg/ml และ 1 mM PMSF (ความเข้มข้นสุดท้าย) จากนั้นวางสารแขวนลอยที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงด้วยความเร็ว 13,000 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที เพื่อแยกเซลล์ตะกอนที่ตายแล้ว (Pellet, P) ออกจากสารสกัดที่ยาที่เป็นของเหลวใส (Supernate, SN) เติมน้ำสารสกัดที่ยาลงในคอลัมน์ HisTrap FF crude ขนาด 1 ml (GE Healthcare, ประเทศสวีเดน) ที่ต่อเข้ากับเครื่องสกัดบริสุทธิ์ AKTA FPLC (GE Healthcare, ประเทศสวีเดน) ด้วยอัตราเร็ว 0.5 ml/min ล้างโมเลกุลที่ไม่ชอบจับกับเรซินออกด้วยบัฟเฟอร์เอ ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์เดียวกับไลซิสบัฟเฟอร์ในปริมาตร 2 เท่าของขนาดคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 1 ml/min จากนั้นชะเอาเปปไทด์เป้าหมายจากการจับกับเรซินโดยเพิ่มความเข้มข้นของอิมิดาโซลด้วยการเติมบัฟเฟอร์บี (บัฟเฟอร์สำหรับชะเปปไทด์: 20 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 500 mM โซเดียมคลอไรด์ 500 mM อิมิดาโซล pH 7.4)

จำนวน 2 เท่าของขนาดคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วเดิม ทำการเก็บแฟรคชันละ 5 ml วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเปปไทด์เป้าหมายจากแฟรคชันที่ได้จากการสกัดบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE

Tricine SDS-PAGE เตรียมเจลที่ใช้ในการแยก (20% Separating gel) และเจลที่ใช้ในการโหลดสารตัวอย่าง (4% Stacking gel) เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว เติมสารตัวอย่างที่ผสมอยู่กับ 1X SDS sample buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8 10% (w/v) SDS 10% (v/v) กลีเซอรอล 0.1% (w/v) บรอมโทมอลบลู) โดยมีโปรตีนมาตรฐานช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 1-26.6 kDa จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 125 V นาน 4 ชั่วโมง ในการแยก นำเจลไปแช่ในสารละลายฟิกซิง (10% กลูตาไรลดีไฮด์) เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 5 ครั้ง นานครั้งละ 20 นาที ทำการย้อมสีเจลในสีย้อมคูแมสซีบลูและล้างสีย้อมออกด้วย 10% เอทานอล และ 10% เมทานอล

ตอนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีต่อลูกน้ำยุงลาย

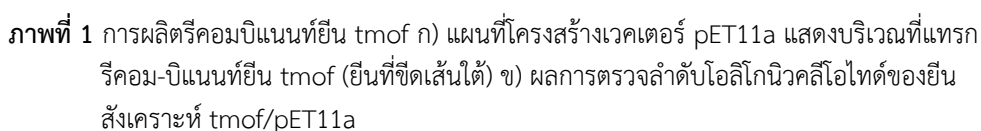
เตรียมลูกน้ำยุงลาย แช่ไข่ยุงลายในน้ำปราศจากสารคลอรีน ประมาณ 2-3 วัน ไข่จะฟักตัวเป็นลูกน้ำระยะที่ 1 ในระยะนี้ให้ทำการเลี้ยงลูกน้ำยุงลายในสภาวะสว่าง 12 ชั่วโมงและมีมืดอีก 12 ชั่วโมง ด้วยอาหารบด โดยให้อาหารวันละ 1 ครั้ง ทำเป็นวงจรเช่นนี้ จนลูกน้ำลอกคราบและเติบโตเป็นลูกน้ำระยะที่ 2 3 และ 4 ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5 วัน นำลูกน้ำยุงในช่วงปลายระยะที่ 3 และ/หรือช่วงต้นระยะที่ 4 ไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์เป้าหมาย

เตรียมสารทดสอบฤทธิ์ ซึ่งเซลล์ตะกอนที่ผ่านการชักนำการแสดงออก 200 mg เติมน้ำกลั่น 20 ml ผสมให้เข้ากันดี ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยที่ 1% หรือมีความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ 10,000 ppm เมื่อต้องการทดสอบจึงทำการเจือจางแบบลำดับ ทีละ 10 เท่า โดยความเข้มข้นสุดท้ายที่ทดสอบอยู่ในช่วงกว้างระหว่าง 0.001-100 ppm

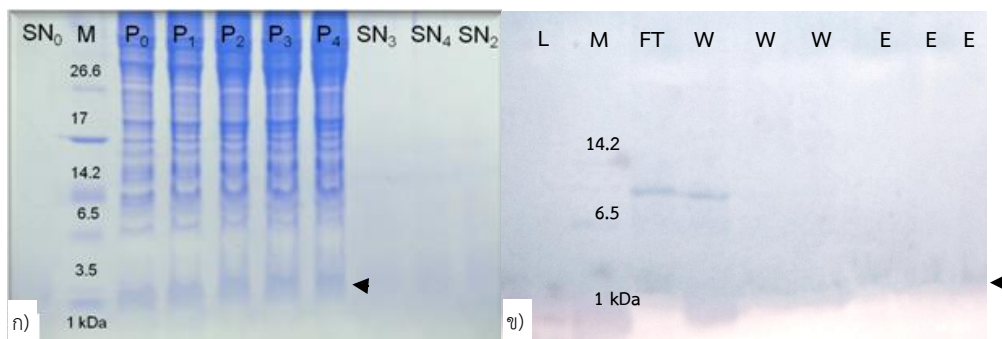
ทดสอบฤทธิ์ที่มีต่อลูกน้ำยุงลาย ในงานวิจัยนี้ ได้ดำเนินการทดสอบฤทธิ์ของ rTMOF ที่มีต่อลูกน้ำยุงลายในระดับห้องปฏิบัติการ ตามขั้นตอนขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, 2005) คัดเลือกลูกน้ำยุงที่แข็งแรงจำนวน 25 ตัว ใส่ลงในแก้วพลาสติกใสที่มีน้ำบรรจุ 100 ml ใส่สารทดสอบลงในภาชนะทดสอบ โดยให้สารมีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 0.001 0.01 0.1 1 10 และ 100 ppm เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ ทั้งนี้ให้ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นละ 4 ชุด จากนั้นเลี้ยงลูกน้ำยุงที่อุณหภูมิ 25-28°C ในสภาวะสว่าง 12 ชั่วโมงและมีมืดอีก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 วัน สังเกตการตายหรือการตอบสนองของลูกน้ำยุง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์ยีน tmof โอลิโกนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการมีลำดับเบส ดังนี้ 5'- TAT GAT CCG GCG CCT CCG CCG CCA CCG CCC CAT CAC CAC CAC CAT CAT -3' มีความยาว 48 เบส ซึ่งในลำดับเบสนี้เป็นลำดับของเปปไทด์ 30 mer คือ TAT GAT CCG GCG CCT CCG CCG CCA CCG CCC และลำดับของเบสที่กำหนดเป็น His-tagged 6 เรสซิดิวอีก 18 mer คือ CAT CAC CAC CAC CAT CAT ซึ่งยีนสังเคราะห์ได้ถูกแทรกเข้าที่ตำแหน่ง Nde I และ BamH I (ภาพที่ 1ก) ซึ่งยืนยันความถูกต้องของลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของยีน tmof ที่สังเคราะห์ทั้ง 48 เบส โดยลำดับเบสจากปลาย 5' ไปปลาย 3' เป็นตำแหน่งของ Nde I ยีน tmof ยีนที่กำหนด His-tagged และ Bam HI ตามลำดับ ซึ่งอยู่ภายใน Open reading frame ที่ถูกต้อง (ภาพที่ 1ข)



การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีน tmof จากการวิเคราะห์สารตัวอย่างทั้งส่วนเซลล์ตะกอน (P) และสารสกัดหยาบที่ของเหลวใส (SN) ซึ่งเก็บทั้งก่อนเริ่ม (ชั่วโมงที่ 0) และหลังการชักนำ (ชั่วโมงที่ 1-4) ด้วย Tricine SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์ยีน tmof สามารถแสดงออกได้ดีใน E. coli อีกทั้งแบคทีเรียยังผลิต รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ได้ในปริมาณมาก ดังเห็นได้จากแถบตำแหน่งของ rTMOF ในช่องสารตัวอย่าง P ณ ชั่วโมงต่าง ๆ ที่ขนาด 2 kDa (ภาพที่ 2ก, แถบที่ P₁ - P₄ ตำแหน่งลูกศรชี้) ถึงแม้จะพบว่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายเกิดขึ้นก่อนการชักนำ (แถบที่ P₀) แต่อย่างไรก็ตามมีผลการทดลองที่บ่งชี้ถึงความไม่เป็นพิษของยีนเป้าหมายต่อโฮสต์เซลล์ โดยพบโคลินีนเป็นจำนวนมากหลังการส่งถ่ายพลาสมิด pET11a/tmof เข้าสู่โฮสต์เซลล์ อีกทั้งอัตราการเติบโตของโคลนแบคทีเรียยังเป็นปกติเมื่อเทียบกับแบคทีเรียก่อนการส่งถ่ายพลาสมิด และเมื่อชักนำการแสดงออกของยีนเป้าหมาย พบปริมาณเปปไทด์มากขึ้นตามช่วงเวลาที่เหมาะสม จึงเห็นได้ว่า E. coli สามารถเป็นโฮสต์เซลล์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ TMOF จากยุงลายได้ ทั้งนี้ที่ผ่านมา มีรายงานการความสำเร็จในการผลิต TMOF ใน E. coli เช่นกัน (Carlson, et al., 1994)



ภาพที่ 2 การผลิตรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ TMOF ก) การแสดงออกของยีนสังเคราะห์ *tmoF* ใน *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 โดยอักษรย่อ M SN และ P แสดงถึง โปรตีนมาตรฐาน ของเหลวใส และเซลล์ตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ส่วน 0, 1, 2, 3 และ 4 แสดงถึงชั่วโมงก่อนและหลังการชักนำด้วยสาร IPTG ลูกศรชี้ให้เห็นตำแหน่งของแถบเปปไทด์เป้าหมาย (2 kDa) เมื่อเทียบกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน และ ข) การสกัดบริสุทธิ์ของเปปไทด์ TMOF ด้วยเทคนิคความชอบจำเพาะในการจับกับโอออนของนิกเกิล อักษรย่อ L FT W และ E แสดงถึง สารสกัดหายาจากแบคทีเรีย TOP10 ที่ผ่านการชักนำการ แสดงออกของยีน *pET11a/tmoF* สารสกัดหายาที่ผ่านคอลัมน์ แพรคชั่นจากการล้างด้วยบัฟเฟอร์เอ และ แพรคชั่นจากการชะด้วยบัฟเฟอร์บี ตามลำดับ

การสกัดบริสุทธิ์เปปไทด์เป้าหมายนั้นยังไม่ประสบความสำเร็จ ดังเห็นจากการพบเปปไทด์เป้าหมายในแฟรคชั่น E ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย (ภาพที่ 2ข) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณเปปไทด์ด้วยวิธี Lowry-Folin แล้ว ไม่สามารถตรวจหาความเข้มข้นของเปปไทด์ได้ จึงทำการปรับค่าความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด ชนิดของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมบัฟเฟอร์ การเพิ่มเวลาในการสัมผัสระหว่างสารสกัดหายาและเรซิน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดบริสุทธิ์ แต่ผลที่ได้อีกคงเป็นไปในทางเดียวกัน ที่เป็นเช่นนั้นเนื่องด้วยเมื่อเปปไทด์ถูกผลิตเป็นจำนวนมาก ทำให้สภาวะสมดุลในการละลายตัวของเปปไทด์เสียไป (Rosano & Ceccarelli, 2014) จึงเกิดการรวมตัวกันของ rTMOF (Inclusion bodies) จนทำให้ฮิสติดีนเรสซิดีวไม่สามารถจับกับเรซิน จึงพบ rTMOF ถูกล้างออกจากเรซินแทนที่จะพบหลังการชะด้วยบัฟเฟอร์บี (ภาพที่ 2ข, แถบที่ W ตำแหน่งลูกศรชี้) ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำโคลนเซลล์ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีต่อลูกน้ำยุงลาย ด้วยมีการศึกษาบ่งชี้ว่า แบคทีเรียสามารถเป็นอาหารสำหรับลูกน้ำยุงได้ (เลาจนา เซวานาติสย, 2544) โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการใช้รีคอมบิแนนท์ยีสต์ (*S. cerevisiae*) ที่มีการเชื่อมต่อยีน *tmoF* จากยุงลาย แล้วนำโคลนเซลล์นั้นมาใช้เป็นผสมเป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงยุง (Borovsky, 2003, Borovsky, et al., 2006)

ฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของลูกน้ำยุงลาย หลังการใส่แบคทีเรียโคลนที่มีเปปไทด์เป้าหมาย (ชุดทดลอง) ลงในภาชนะทดสอบ นาน 2 วัน ไม่พบการตายของลูกน้ำยุง แต่สิ่งที่ปรากฏ คือ ที่ทุกความเข้มข้น (0.001-100 ppm แบคทีเรียโคลน) ลูกน้ำยุง ($n = 25$) มีขนาดตัวเล็กกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 3) โดยมีขนาดตัวยาว 4.05 3.83 3.59 3.57 3.92 และ 3.38 มม. และมีขนาดหัว 0.58 0.48 0.22 0.20 0.45 และ 0.34 มม. ตามลำดับ ทั้งนี้ความเข้มข้น 0.1 และ 1 ppm มีผลต่อการเติบโตมากที่สุด โดยลูกน้ำยุงมีขนาดตัวสั้นกว่าชุดควบคุม 1.43 เท่า และหัวเล็กกว่าชุดควบคุม 4 เท่า อีกทั้งยังเคลื่อนไหวช้ากว่าปกติโดยไม่สามารถดำน้ำหนีเมื่อถูกรบกวน ลักษณะปรากฏนี้เป็นลักษณะของลูกน้ำยุงที่ใกล้ตาย (World Health Organization, 2005)



ภาพที่ 3 ลักษณะของลูกน้ำยุงลายที่เติบโตหลังการเลี้ยง 2 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรียโคลนสายพันธุ์ TOP10 ซึ่งมีโคลนยีน *tmoF* เป็นอาหารที่เข้มข้นตั้งแต่ 0.001-100 ppm โดยที่อักษรย่อ CNT แสดงถึงลูกน้ำยุงลาย ชุดควบคุมที่ได้รับแบคทีเรียที่ไม่มีโคลนยีนเป็นอาหาร

การชะลอการเติบโตของลูกน้ำยุงชดทดลองเกิดจากการออกฤทธิ์ rTMOF ซึ่งยับยั้งการสังเคราะห์ เอนไซม์ทริปซินในกระเพาะอาหาร ส่งผลให้ลูกน้ำยุงไม่สามารถย่อยอาหารที่กินเข้าไปได้ (Borovsky, *et al.*, 2006) จึงขาดสารอาหารจนมีลักษณะปรากฏดังที่แสดง (ภาพที่ 3) เมื่อทำการสังเกตต่อเนื่องอีก 4 วัน พบว่า ลูกน้ำยุงชดทดลองที่ทุกความเข้มข้น (ร้อยละ 80 84 92 92 88 และ 96 ตามลำดับ) ยังคงอยู่ในระยะลูกน้ำ ที่เปลี่ยนแปลงระยะเข้าสู่ตัวมด ในขณะทีลูกน้ำยุงชุดควบคุมทุกตัวเปลี่ยนระยะเป็นตัวเต็มวัยตามระยะเวลาปกติ ของวงจรชีวิต (8-10 วัน จากไข่ถึงตัวเต็มวัย) ทั้งนี้ที่ผ่านมา มีรายงานผลการเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลายระยะที่ 1 ด้วย อาหารเลี้ยงยีสต์ที่มีอนุภาคของ CP-TMOF virion เป็นเวลา 6 วัน ผลปรากฏพบการเติบโตที่ช้ากว่าปกติ โดยมี ขนาดตัวสั้นกว่าลูกน้ำยุงลายที่ได้รับอาหารปกติ 2.38 เท่า (Borovsky, *et al.*, 2006) จึงยืนยันได้ว่า TMOF เป็น สารทางเลือกที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมลูกน้ำยุงลายในเชิงอุตสาหกรรมได้

สรุป

การผลิต TMOF ด้วยเทคนิครีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอในแบคทีเรีย *E. coli* เป็นกระบวนการทางเลือก ที่น่าสนใจ ถึงแม้การสกัดบริสุทธิ์รีคอมบิแนนต์เป้าหมายยังเป็นข้อจำกัดในการศึกษานี้ แต่รีคอมบิแนนต์เปปไทด์ ที่ได้ไม่เป็นพิษต่อโฮสต์เซลล์ อีกทั้งยังสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเติบโตของลูกน้ำยุงลายได้

ข้อเสนอแนะ

การผลิตเปปไทด์เป้าหมายโดยนำไปต่อเข้ากับฟิวชันโปรตีนชนิดอื่นอาจลดการเกิดการรวมตัวของ รีคอมบิแนนต์เปปไทด์ได้ แต่อย่างไรก็ตามควรศึกษาว่าฟิวชันโปรตีนนั้นส่งผลรบกวนการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของเปปไทด์เป้าหมายหรือไม่ การผลิตรีคอมบิแนนต์เปปไทด์ในแบคทีเรียประจำถิ่นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงอาจเพิ่ม โอกาสความเป็นไปได้ในการควบคุมการเพาะพันธุ์ยุงตามธรรมชาติ นอกจากนี้การผลิตรีคอมบิแนนต์ TMOF ให้ ออกฤทธิ์ร่วมกับสารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) ด้วยเทคนิครีคอม- บิแนนต์ดีเอ็นเอ อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาสำหรับทุนอุดหนุนงานวิจัย (ทุน Capacity Building) ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ดำเนินการวิจัย ผศ.ดร.วิเชษฐ์ สีสามันต์ ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในความอนุเคราะห์แบคทีเรีย-เซลล์ และภาควิชากีฏวิทยาทางการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ในความอนุเคราะห์ไข่มูกน้ำยุงลาย

เอกสารอ้างอิง

- เลาจนา เขานาดีสัย. (2544). จุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำยุงลาย: แบคทีเรีย, 20 ตุลาคม 2559.
http://webdb.dmhc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=592.
- Borovsky, D. (1988). Oostatic hormone inhibits biosynthesis of midgut proteolytic enzymes and egg development in mosquitoes. *Arch Insect Biochem Physiol.*, 7, 187-210.
- Borovsky, D. & Carlson, D. A. (1991). Novel compositions and process for inhibiting digestion in blood-sucking insects. US Patent number 5011909A. Retrieved October 20, 2012, from <http://www.google.co.uk/patents/US5011909>.
- Borovsky, D. (2003). Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. *J Exp Biol.*, 206, 3869-3875.
- Borovsky, D., Rabindran, S., Dawson, W.O., Powell, C.A., Iannotti, D.A., Morris, T.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., DeBondt, H.L. & DeLoof, A. (2006). Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: A potential larvicide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 18963-18968.
- Carlson, D.A., Krueger, C.M., Hehman, G., Borovsky, D., Rossi, A. M., Cockburn, A. F., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (1994). Cloning and partial sequencing of the trypsin modulating oostatic factor (TMOF) gene from mosquito genomic libraries, and expression of the TMOF gene in *Escherichia coli*. In: Davey, K. G., Peter, R. E. and Tobe, S. S. (Eds.) *Perspectives in Comparative Endocrinology* (pp. 620-638). Ottawa: National Research Council of Canada.
- Demain, A. L. & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.*, 27(3), 297-306.
- Rosano, G. L. & Ceccarelli E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Retrieved Mar 05, 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029002/pdf/fmicb-05-00172.pdf>.
- Saiful, A. N., Lau, M. S., Sulaiman, S. Hidayatulfathi, O. (2012). Residual effects of TMOF-Bti formulations against 1st instar *Aedes aegypti* Linnaeus larvae outside laboratory. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 2(4), 315-319.
- World Health Organization. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Retrieved April 25, 2012, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf.