



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาความหลากหลายของเปปไทด์ในจระเข้สยาม สัตว์สะเทิน
น้ำสะเทินบก และสัตว์ข้อปล้องที่แสดงบทบาทในภูมิคุ้มกันโดยใช้
เทคนิคโปรตีโอมิกส์และทรานสคริปโตมิกส์

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ศักดา ดาดวง และคณะ

เมษายน พ.ศ. 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาความหลากหลายของเปปไทด์ในจระเข้สยาม สัตว์สะเทิน
น้ำสะเทินบก และสัตว์ข้อปล้องที่แสดงบทบาทในภูมิคุ้มกันโดยใช้
เทคนิคโปรตีโอมิกส์และทรานสคริปโตมิกส์

คณะผู้จัดทำ

รศ.ดร.ศักดา ดาดวง	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ.ดร.สมปอง คล้ายหนองสรวง	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร. นิสาชล แจ่มพรมมา	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ.ดร. อนุพงษ์ ทานกระโทก	คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

“การศึกษาความหลากหลายของเปปไทด์ในจระเข้สยาม สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์ข้อปล้องที่แสดง บทบาทในภูมิคุ้มกันโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์และทรานสคริปโตมิกส์”

ภูมิภาคอาเซียน โดยเฉพาะประเทศไทยนั้นมีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง นอกเหนือจากทรัพยากรน้ำ อาหารและพลังงานแล้ว ทรัพยากรธรรมชาติอื่นๆ ก็มีบทบาทสำคัญต่อการสนับสนุนกิจกรรมทางเศรษฐกิจและวิถีชีวิตที่หลากหลาย ซึ่งเป็นประเด็นสำคัญที่ต้องศึกษาและทำความเข้าใจเพื่อให้เกิดองค์ความรู้ที่สามารถสร้างคุณค่าจากความหลากหลายทางชีวภาพที่มีในท้องถิ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของการใช้ประโยชน์ทางชีวภาพจากทรัพยากรธรรมชาติที่มีในสาขาต่างๆ ของวิทยาศาสตร์ชีวภาพและการแพทย์ เพื่อให้สามารถตอบโจทย์การพัฒนาที่ยั่งยืน ในแง่ของการนำทรัพยากรธรรมชาติมาพัฒนาใช้ในสาขาการวิจัยด้านเภสัชกรรม ที่เชื่อมโยงกับการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการรักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบัน ซึ่งกำลังประสบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ ฉะนั้นการศึกษาเพื่อค้นหาสารชีวภาพชนิดใหม่เพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ เพื่อแก้ไขปัญหาลุกลามของมนุษย์ได้ในระดับโลก ซึ่งพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) เป็นสารชีวภาพที่ได้รับความสนใจศึกษาและพัฒนาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อช่วยลดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน เนื่องจากเปปไทด์ต้านจุลชีพมีหน้าที่และบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ช่วยในการป้องกันการติดเชื้อให้กับสิ่งมีชีวิต และมีบทบาทสำคัญในการทำงานที่หลากหลาย เช่น ลดการอักเสบ ลดอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และการรักษาบาดแผล เป็นต้น โดยพบว่าช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพอย่างกว้างขวางในสัตว์หลายชนิด เช่น กบ กระจับปี่ แมลง รวมถึงสัตว์เลื้อยคลาน

จระเข้จัดเป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีขนาดใหญ่ มีความสามารถในการปรับสภาพร่างกายในการอยู่รอดจากสภาวะที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อจากแหล่งที่อยู่ ซึ่งคาดว่าจะจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูงจึงสามารถดำรงสายพันธุ์ต่อเนื่องมาตั้งแต่ยุคโบราณจนถึงปัจจุบัน ซึ่งเปปไทด์ต้านจุลชีพถือเป็นปราการด่านแรกต่อการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน และจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าจระเข้สามารถสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพในกระแสเลือด ซึ่งเป็นด่านแรกในการยับยั้งการติดเชื้อจากเชื้อก่อโรค และจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้สยาม (*Crocodylus siamensis*) โดยนักวิจัยของศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่าองค์ประกอบของเลือดจระเข้สยาม ได้แก่ ซีรัม พลาสมา สารสกัดเม็ดเลือดขาว และฮีโมโกลบิน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด และเชื่อกันว่า นอกจากนี้นี้ยังพบว่าโปรตีน/เปปไทด์ในเลือดจระเข้สยามมีคุณสมบัติในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านอักเสบอีกด้วย นอกจากนี้ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์ข้อปล้องก็มีการศึกษาถึงบทบาทความสำคัญในแง่ของเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้มีความเข้าใจการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันในจระเข้สยาม และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก รวมถึงสัตว์ข้อปล้อง เทคนิคทรานสคริปโตมิกส์และเทคนิคโปรตีโอมิกส์จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาเพื่อให้ทราบข้อมูลเชิงลึกระดับยีนและระดับโปรตีน ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ จะทำให้ได้ฐานข้อมูลระดับยีนขนาดใหญ่ที่สำคัญ (big data) สำหรับการอธิบายถึงบทบาทการทำงานของโปรตีนหรือเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะเปปไทด์ต้านจุลชีพในจระเข้ ยิ่งไปกว่านั้นแล้วองค์ความรู้ที่ได้ยังสามารถต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนาใช้ประโยชน์จากเปปไทด์ต้านจุลชีพในแง่ของการพัฒนาใช้แทนยาปฏิชีวนะในอนาคต

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ภูมิภาคอาเซียนเป็นภูมิภาคที่มีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง นอกเหนือจากทรัพยากรน้ำ อาหารและพลังงานแล้ว ทรัพยากรธรรมชาติอื่นๆ ก็มีบทบาทสำคัญต่อการสนับสนุนกิจกรรมทางเศรษฐกิจและวิถีชีวิตที่หลากหลาย ซึ่งเป็นประเด็นสำคัญที่ต้องศึกษาและทำความเข้าใจเพื่อให้เกิดองค์ความรู้จนสามารถสร้างคุณค่าจากความหลากหลายทางชีวภาพที่มีในท้องถิ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของการใช้ประโยชน์ทางชีวภาพจากทรัพยากรธรรมชาติที่มีในสาขาต่างๆ ของวิทยาศาสตร์ชีวภาพและการแพทย์ เพื่อให้สามารถตอบโจทย์การพัฒนาที่ยั่งยืน ในแง่ของการนำทรัพยากรธรรมชาติมาพัฒนาใช้ในสาขาการวิจัยด้านเภสัชกรรม ที่เชื่อมโยงกับการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการรักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบัน ซึ่งกำลังประสบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ ฉะนั้นการศึกษาเพื่อค้นหาสารชีวภาพชนิดใหม่เพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจเพื่อแก้ไขปัญหาสุขภาพของมวลมนุษยชาติ ซึ่งพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) เป็นสารชีวภาพที่ได้รับความสนใจศึกษาและพัฒนาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อช่วยลดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน เนื่องจากเปปไทด์ต้านจุลชีพมีหน้าที่และบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ช่วยในการป้องกันการติดเชื้อให้กับสิ่งมีชีวิต และมีบทบาทสำคัญในการทำงานที่หลากหลาย เช่น ลดการอักเสบ ลดอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และการรักษาบาดแผล เป็นต้น โดยพบว่าช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพอย่างกว้างขวางในสัตว์หลายชนิด เช่น กบ กระต่าย แมลง รวมถึงสัตว์เลื้อยคลาน

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุดในบรรดาประเทศสมาชิกอาเซียน เนื่องจากตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศร้อนและชื้น ส่งผลให้มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่สามารถปรับตัวเพื่อความอยู่รอดให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งประเทศไทยมีความหลากหลายทั้งพืชและสัตว์ โดยพบพืชประมาณ 15,000 ชนิดคิดเป็น 8% ของจำนวนพืชทั้งหมดที่พบทั่วโลก และสัตว์มีกระดูกสันหลังมากกว่า 1,721 สายพันธุ์ โดยพบกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานประมาณ 325 ชนิด ในบรรดาสัตว์เลื้อยคลานพบว่างูเป็นกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานที่พบมากที่สุดประมาณ 54.15% ของจำนวนสัตว์เลื้อยคลานทั้งหมดในประเทศไทย รองลงมา ได้แก่ ตุ๊กแก กิ้งก่า คิดเป็นสัดส่วน 36.6% ของสายพันธุ์ทั้งหมดที่พบ ขณะที่จระเข้เป็นกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานที่มีจำนวนน้อยที่สุด และยังพบสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มเต่าอีก 27 ชนิด จากจำนวน 257 ที่พบทั่วโลก นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมากถึง 134 สายพันธุ์ คิดเป็น 95.05% ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบในประเทศไทย ในบรรดาสัตว์ต่างๆ พบว่าสัตว์เลื้อยคลาน สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์ข้อปล้อง มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดี ทำให้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายและมีความหลากหลายทางนิเวศวิทยา เหตุผลประการหนึ่งอาจเนื่องมาจากสัตว์เหล่านี้มีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถดำรงสายพันธุ์ในระบบนิเวศมาอย่างยาวนาน ซึ่งพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพนั้นมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดที่สามารถช่วยป้องกันการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตได้ (Van Hoek, 2014)

เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) ถูกรายงานว่ามีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งในสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอต และยูคาริโอต โดยพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพส่วนใหญ่ถูกแยกมาจากสัตว์ (Pata et al., 2011, Preecharram et al., 2010; Rollins-Smith และ al., 2005; Unckless et al., 2016) ซึ่งลักษณะของเปปไทด์ต้านจุลชีพนั้น มักจะมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กและมีคุณสมบัติทาง

โครงสร้างโมเลกุลที่มีประจุบวกและมีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำและชอบน้ำ ส่งผลทำให้โมเลกุลละลายได้ในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำและสามารถแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ที่เป็นเป้าหมายได้ด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ แล้วทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้เปปไทด์ต้านจุลชีพยังมีบทบาทสำคัญในการทำงานที่หลากหลาย เช่น การสร้างเส้นเลือดใหม่ การรักษาบาดแผล ด้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Izadpanah และ Gallo, 2005) ดังนั้นเพื่อทำความเข้าใจและประเมินศักยภาพของเปปไทด์ต้านจุลชีพ และอธิบายกลไกระดับโมเลกุลเชิงลึกในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลาน สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์ขี้อื้อ โครงสร้างวิจัยนี้จึงเลือกใช้ เทคนิคทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomic) และ เทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomic) เป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกระดับยีนและระดับโปรตีน โดยเฉพาะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในจระเข้ เนื่องจากจระเข้จัดเป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีขนาดใหญ่ มีความสามารถในการปรับสภาพร่างกายในการอยู่รอดจากสภาวะที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อจากแหล่งที่อยู่ ซึ่งคาดว่าจระเข้จะมีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูงจึงสามารถดำรงสายพันธุ์ต่อเนื่องมาตั้งแต่ยุคโบราณ จนถึงปัจจุบัน ซึ่งเปปไทด์ต้านจุลชีพถือเป็นปราการด่านแรกต่อการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน และจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าจระเข้สามารถสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพในกระแสเลือด ซึ่งเป็นด่านแรกในการยับยั้งการติดเชื้อจากเชื้อก่อโรค และจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้สยาม (*Crocodylus siamensis*) โดยนักวิจัยของศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่าองค์ประกอบของเลือดจระเข้สยาม ได้แก่ ซีรัม พลาสมา สารสกัดเม็ดเลือดขาว และฮีโมโกลบิน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด และเชื้อรา นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน/เปปไทด์ในเลือดจระเข้สยามมีคุณสมบัติในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านอักเสบอีกด้วย นอกจากนี้ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์ขี้อื้อก็มีการศึกษาถึงบทบาทความสำคัญในแง่ของเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันเช่นกัน

ดังนั้นเพื่อให้มีความเข้าใจการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันในจระเข้สยาม และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก รวมถึงสัตว์ขี้อื้อ เทคนิคทรานสคริปโตมิกส์และเทคนิคโปรตีโอมิกส์จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาเพื่อให้ทราบข้อมูลเชิงลึกระดับยีนและระดับโปรตีน ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ จะทำให้ได้ฐานข้อมูลระดับยีนขนาดใหญ่ที่สำคัญ (big data) สำหรับการอธิบายถึงบทบาทการทำงานของโปรตีนหรือเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะเปปไทด์ต้านจุลชีพในจระเข้ ยิ่งไปกว่านั้นแล้วองค์ความรู้ที่ได้ยังสามารถต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนาใช้ประโยชน์จากเปปไทด์ต้านจุลชีพในแง่ของการพัฒนาใช้แทนยาปฏิชีวนะในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการตอบสนองของเปปไทด์ในระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้สยามด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์และทรานสคริปโตมิกส์
2. เพื่อค้นหาเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดใหม่จากจระเข้สยาม
3. เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลาน สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์ขี้อื้อ

แผนและทิศทางการดำเนินโครงการ

โครงการวิจัยนี้ เป็นโครงการที่ศึกษาถึงความหลากหลายของเปปไทด์ในจระเข้สยาม รวมทั้งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์ข้อปล้องที่แสดงบทบาทในภูมิคุ้มกัน โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomic) ร่วมกับทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomic) โดยทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*Aeromonas hydrophila*) เพื่อให้จระเข้ติดเชื้อ แล้วติดตามกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันผ่านระบบเลือดของจระเข้ ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับจระเข้ที่ไม่มีการติดเชื้อ (0 ชั่วโมง) โดยการนำตัวอย่างเลือดมาทำการสกัด RNA แล้วส่งวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณยีนและโปรตีนหลังการติดเชื้อ ณ เวลาต่างๆ หลังจากได้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของยีนและโปรตีน จะนำข้อมูลนี้มาวิเคราะห์เพื่อสร้างแบบแผนระบบภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียในจระเข้ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาค้นคว้าข้อมูลของยีนและโปรตีนในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (กบนา) และสัตว์ข้อปล้อง (ต่อหัวเสือ) เพื่อสร้างความสัมพันธ์ในแง่ของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีการแสดงออกเมื่อสัตว์เหล่านี้มีการติดเชื้อ ซึ่งคาดหวังว่าผลลัพธ์ที่เกิดจากโครงการวิจัยนี้จะทำให้สามารถค้นพบเปปไทด์หรือโปรตีนชนิดใหม่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงออกในระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) ที่สามารถสร้างเป็นฐานข้อมูลเปปไทด์/โปรตีนขนาดใหญ่ (big data) เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต ในแง่ของการพัฒนาใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อในอนาคต

ผลที่ได้รับจากโครงการ

1. ได้รูปแบบของฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ (gene) และกรดอะมิโน (protein/peptide) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) ที่สร้างจากสัตว์เลื้อยคลาน สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์ข้อปล้อง
2. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติ อย่างน้อย 3 เรื่อง
3. สามารถสร้างนักวิจัยที่มีศักยภาพ เพื่อเป็นกลไกสำคัญต่อการพัฒนาประเทศ อย่างน้อย 3 คน
4. ได้ความร่วมมือและเครือข่ายการวิจัยกับนักวิจัยต่างประเทศ (ประเทศจีน) เพื่อการแลกเปลี่ยนเรียนรู้และบูรณาการการนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในแง่ของประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพไปพัฒนาใช้เป็นนวัตกรรมที่เป็นประโยชน์ในอนาคต
5. ได้การสร้างเครือข่ายกับบริษัทเอกชนที่จะรับถ่ายทอดองค์ความรู้ในแง่ของการนำผลงานนี้ไปใช้ในการสร้างนวัตกรรมและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในอนาคต

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต

กระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนานนับพันล้านปีก่อน ก่อให้เกิดสิ่งมีชีวิตมากมายหลากหลายรูปแบบ ความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ จุลินทรีย์ ที่มีความเชื่อมโยงกันเป็นสายใยในระบบนิเวศ เรียกโดยรวมว่า ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ซึ่งมีอยู่มากมายในโลก ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตบนโลกจัดว่าเป็นสิ่งมหัศจรรย์อย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นตามกฎเกณฑ์ของธรรมชาติ ประมาณกันว่าสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในโลกนี้มีประมาณ 10 ล้านชนิด แต่ที่ค้นพบแล้วมีเพียงส่วนน้อยหรือประมาณ 2 ล้านชนิด ทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์ ที่ถูกค้นพบและได้รับการตั้งชื่อ ดังนั้นจึงมีสิ่งมีชีวิตอีกเป็นจำนวนมากที่ยังคงรอคอยการค้นพบและตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ เพื่อจำแนกประเภทของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ต่อไป

ประเทศไทยตั้งอยู่ใกล้บริเวณเส้นศูนย์สูตร ซึ่งถือว่าเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทำให้ประเทศไทยเป็นพื้นที่แห่งหนึ่งในโลกที่มีการกระจายตัวของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ซึ่งการก่อเกิดสิ่งมีชีวิตนานาชนิดเป็นผลมาจากกระบวนการทางวิวัฒนาการการปรับตัวและการคัดสรรทางธรรมชาติ จากสิ่งมีชีวิตชนิดแรก (original species) เกิดความแปรผันนำไปสู่สิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (new species) และยิ่งนานวันสิ่งมีชีวิตเริ่มมีความหลากหลายและปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน จนเกิดเป็นความหลากหลายทางชีวภาพขึ้นในที่สุด จากภูมิศาสตร์ของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่เป็นเขตร้อนชื้น และป่าไม้อุดมสมบูรณ์ยังผลให้เกิดความหลากหลายทางธรรมชาติทั้งชนิดของพืชและสัตว์ ซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพนั้นเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ ความหลากหลายของชนิดพันธุ์ (species) ความหลากหลายของสายพันธุ์ (genetic) และการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศวิทยา (ecosystem) ปัจจัยเหล่านี้นำมาซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพที่จำเป็นต้องมีการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิต ทั้ง จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ โดยอาศัยความรู้ในหลักการพันธุศาสตร์ในการแบ่งแยก ซึ่งสามารถแสดงความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตบนโลกและในประเทศไทย ดังตารางที่ 2.1

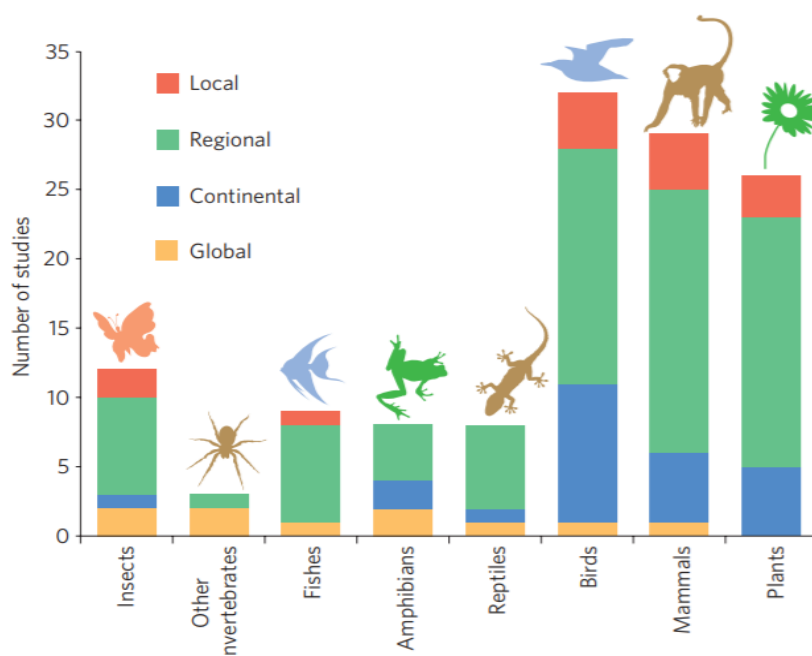
ตารางที่ 2.1 จำนวนชนิดของสิ่งมีชีวิตที่พบแล้วในโลกและในประเทศไทย

ลำดับที่	ชนิดของสิ่งมีชีวิต	จำนวนชนิดพันธุ์ที่พบแล้วโลก	จำนวนชนิดพันธุ์ที่พบแล้วในประเทศไทย
1	แบคทีเรีย	4,000 ชนิด	219 ชนิด
2	เห็ด รา	80,000 ชนิด	6,000 ชนิด
3	สาหร่าย	มากกว่า 20,000 ชนิด	1,600 ชนิด
4	พืช	287,655 ชนิด	12,000 ชนิด
5	ไส้เดือน	8,000 ชนิด	29 ชนิด
6	กลุ่มหอย หอยเม่น หมีก	ประมาณ 300,000 ชนิด	ประมาณ 5,300 ชนิด
7	แมง และแมงมุม	มากกว่า 40,000 ชนิด	มากกว่า 600 ชนิด
8	แมลง	9,600,000 ชนิด	มากกว่า 10,250 ชนิด
9	กิ้งกือ	ประมาณ 12,000 ชนิด	115 ชนิด
10	ปลา	28,500 ชนิด	2,820 ชนิด
11	สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	5,743 ชนิด	137 ชนิด
12	สัตว์เลื้อยคลาน	8,163 ชนิด	350 ชนิด

ลำดับที่	ชนิดของสิ่งมีชีวิต	จำนวนชนิดพันธุ์ที่พบแล้วโลก	จำนวนชนิดพันธุ์ที่พบแล้วในประเทศไทย
13	นก	9,917 ชนิด	982 ชนิด
14	สัตว์เลื้อยลูกด้วยนม	5,416 ชนิด	302 ชนิด

ที่มา: ข้อมูลจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT Magazine December 2008)

อย่างไรก็ตามผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อความหลากหลายทางชีวภาพนั้น มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการมากมายเพื่อประเมินความเปราะบางของสายพันธุ์ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (climate change) ทั้งต่อเนื่องและคาดการณ์ในอีกไม่กี่ปีข้างหน้า เพื่อลดการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพระดับโลก ซึ่งนักอนุรักษ์จำเป็นต้องระบุสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มว่าจะมีความเสี่ยงมากที่สุดต่อผลกระทบของอากาศเปลี่ยนแปลง จากการศึกษาพบว่านกเป็นอนุกรมวิธานที่มีการศึกษามากที่สุด รองลงมาคือ สัตว์เลื้อยลูกด้วยนม และพืช ในขณะที่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แมลง สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก รวมถึงสัตว์เลื้อยคลาน ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ต่อการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศน้อยมาก (รูปที่ 2.1) (Michela et al., 2015) ข้อมูลนี้บ่งชี้ได้ว่าสัตว์กลุ่มนี้ โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานนั้นได้รับผลกระทบน้อยมากจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (climate change) และยังคงลักษณะสัณฐานวิทยาได้อย่างยาวนานในสายวิวัฒนาการ ซึ่งคาดว่าสัตว์กลุ่มนี้น่าจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพอย่างมากในการต่อสู้และป้องกันตัวเองจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก



รูปที่ 2.1 การศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตเพื่อการประเมินความเสี่ยงในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศวิทยา

ที่มา: Michela Pacifici et al., 2015

เมื่อพิจารณาถึงสัตว์เลื้อยคลานซึ่งเป็นสัตว์เลือดเย็นที่มีประวัติยาวนานในอาณาจักรของสิ่งมีชีวิตบนโลก อาศัยอยู่ได้ในสภาพภูมิอากาศหรือสิ่งแวดล้อมตั้งแต่สภาพอากาศหนาวจัดและสภาพภูมิอากาศที่ร้อนในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงสภาพภูมิอากาศร้อนจัดในทวีปแอฟริกา ลักษณะทั่วไปของสัตว์เลื้อยคลาน คือเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีผิวหนังแห้งหรือมีเกล็ด มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ขนาดเล็กคือ จิ้งจก (hauselizard) จนถึงขนาดใหญ่ที่สุด คือจระเข้ (crocodile) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มซึ่งเป็นสัตว์ไม่มีระยางในสายวิวัฒนาการสัตว์เลื้อยคลานมีอายุที่ยาวนานประมาณ 100 ล้านปี เหตุผลประการหนึ่งที่ทำให้สัตว์เลื้อยคลานมีสายวิวัฒนาการยาวนานอาจเนื่องจากมีระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) ที่มีประสิทธิภาพ

2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เลื้อยคลาน (Immunity response of reptile)

สัตว์เลื้อยคลานเป็นกลุ่มสัตว์เลือดเย็นเพียงกลุ่มเดียวที่มีวิวัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่มีประสิทธิภาพและน่าสนใจอย่างมาก จึงมีบทบาทสำคัญต่อการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและวิวัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับระบบนิเวศ นอกจากนี้สัตว์เลื้อยคลานยังมีลักษณะการดำรงชีวิตที่โดดเด่นมากกว่าสัตว์เลือดเย็นอื่นๆ และยังมีวิธีการดำรงชีวิตในการสืบพันธุ์ที่เกิดขึ้นบนบกอย่างเด่นชัด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานเช่นเดียวกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั่วไป อย่างไรก็ตาม สัตว์เลื้อยคลานเป็นกลุ่มสัตว์เลือดเย็นที่มีวิวัฒนาการการดำรงชีวิตที่ยาวนาน โดยอุณหภูมิในร่างกายจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมตามฤดูกาล นอกจากนี้ลักษณะเด่นของสัตว์เลื้อยคลาน คือ ผิวหนังชั้นนอกจะมีเคอราติน (keratin) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งไม่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ การมีชั้นผิวหนังพิเศษนี้ส่งผลให้สัตว์เลื้อยคลานสามารถป้องกันการถูกบุกรุกจากสิ่งแปลกปลอมได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งลักษณะเหล่านี้ย่อมมีผลกระทบต่อวิธีการดำรงชีวิตรวมถึงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มนี้เป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่านักวิจัยจะพยายามศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการวิจัยยังคงต้องมีการเรียนรู้เกี่ยวกับการตอบสนองภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานต่อไป เพื่อให้สามารถอธิบายกระบวนการทำงานที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มนี้อย่างลึกซึ้งมากขึ้น

สำหรับการศึกษาของระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้แม้ว่าจะมีการศึกษาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 โดย Merchant และคณะ (Merchant et al., 2003, Merchant et al., 2005., Merchant et al., 2006) แต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้ได้อย่างชัดเจน มีงานวิจัยหลายเรื่องรายงานว่า ในระบบภูมิคุ้มกันของอัลลิเกเตอร์ประกอบด้วยสารที่ตอบสนองด้านเซลล์ ได้แก่ B-cell และ T-cell ที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเซลล์วิทยาน่าจะมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในจระเข้ อัลลิเกเตอร์อีกด้วย (Mateo et al., 1984) อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานมีลักษณะคล้ายคลึงกับระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตอื่นทั่วไป ซึ่งประกอบด้วย 2 ระบบดังนี้

2.2.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) เป็นกลไกป้องกันตัวเองด่านแรกของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่สืบทอดจากรุ่นพ่อแม่ ที่ใช้ในการต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมที่รับเข้าครั้งแรกและมีการตอบสนองอย่างรวดเร็ว โมเลกุลที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด ได้แก่ ระบบคอมพลีเมนต์ ไลโซไซม์ ทรานส์เฟอริน ออฟโซนิน (opsonin) อินเตอร์เฟอรอน (interferon) ดีเฟนซิน และเปปไทด์ต้านจุลชีพ (Brown, 2002) เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสิ่งแปลกปลอมกระตุ้นจากภายนอกจะส่งผลกระทบให้ร่างกายสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะที่เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) นอกจากนี้ระบบคอมพลีเมนต์ (complement) ยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด ซึ่ง

ประกอบด้วยกลุ่มโปรตีนที่มีอยู่ในพลาสมา มีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า แอนติเจน (antigen) โดยกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยตรง (opsonization) และกระบวนการทำให้เซลล์แตก อย่างไรก็ตามการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์จะเกิดขึ้นโดยผ่านกลไก 3 ทาง ดังนี้

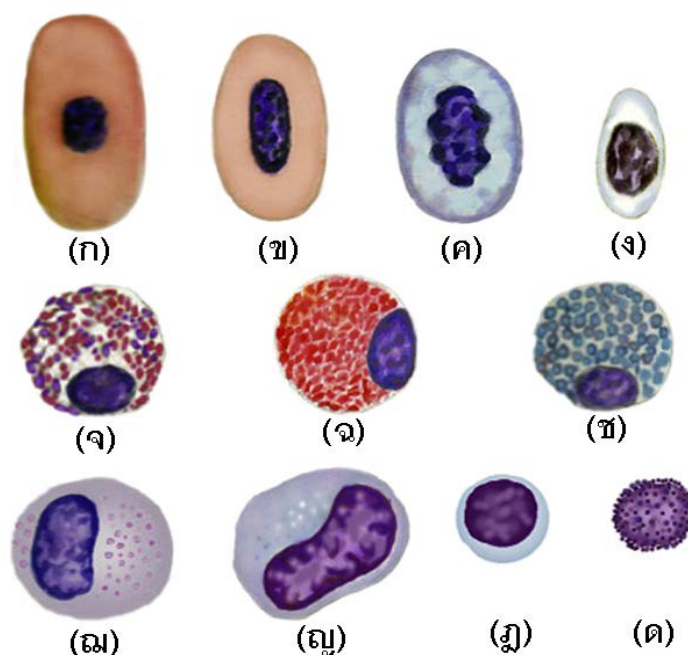
1. Classical pathway เป็นกลไกที่เกิดขึ้นหลังสุด แต่ได้รับการค้นพบก่อนกลไกอื่นๆ กลไกนี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของแอนติบอดีโดยตรงจากการกระตุ้นโดยโปรตีนกลุ่มอิมมูโนโกลบูลินจี (immunoglobulin G; IgG) และ อิมมูโนโกลบูลินเอ็ม (immunoglobulin G; IgM)

2. Alternative pathway เป็นกลไกที่ถูกกระตุ้นด้วยโมเลกุลต่างๆ เช่น ไวรัส ไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย กลไกนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของแอนติบอดี

3. Lectin pathway เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนเลคติน ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตกลุ่มน้ำตาลแมนโนสที่เป็นองค์ประกอบบนผิวเซลล์เมมเบรนแบคทีเรีย

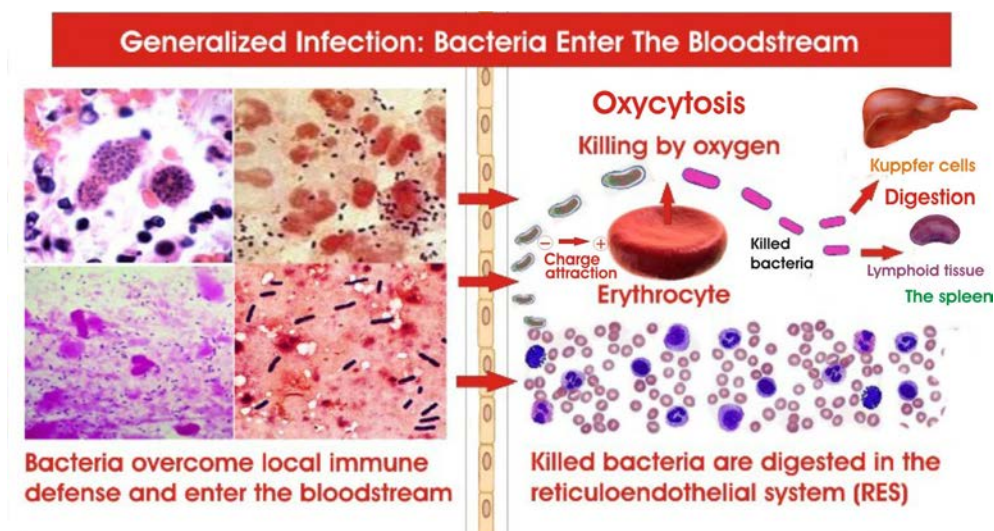
การทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีการศึกษาจนทราบแน่ชัดถึงกระบวนการทำงาน คือ 1) กำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยตรงผ่านการทำงานของ membrane-attack complex (C5b9 complex) 2) กระตุ้นการสร้างสารที่เป็นองค์ประกอบของเคมีแทกติก 3) กระตุ้นให้มีการกำจัดเศษเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ 4) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นให้มีการทำงานได้ดีขึ้น (Gasque, 2004) แต่กระบวนการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ในสัตว์เลื้อยคลานยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาในสัตว์เลื้อยคลานพบว่าจะมีระบบคอมพลีเมนต์เพียง 2 ระบบ คือ classical pathway และ alternative pathway เท่านั้น ส่วนวิถี lectin pathway จะเกิดขึ้นในกลุ่มสัตว์น้ำ อาทิ ปลาไม่มีขากรรไกร สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ฯลฯ ซึ่งสัตว์เหล่านี้มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับสัตว์เลื้อยคลาน จึงมีความเป็นไปได้ว่ากลไกดังกล่าวนี้อาจเกิดในสัตว์เลื้อยคลานได้เช่นกัน แต่ยังไม่พบหลักฐานการศึกษาที่แน่ชัด (Sunyer et al., 1998) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาระบบคอมพลีเมนต์ของจระเข้ในซีรัมของอัลลิเกเตอร์เปรียบเทียบกับซีรัมของมนุษย์พบว่า ซีรัมของจระเข้มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรียได้ดี แต่ซีรัมของมนุษย์ไม่พบคุณสมบัติดังกล่าว ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระบบคอมพลีเมนต์ของจระเข้มีประสิทธิภาพสูงต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรีย นอกจากระบบคอมพลีเมนต์แล้ว กลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ ในระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน ได้แก่ กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocytes) เช่น โมโนไซต์ (monocytes) เฮเทอโรฟิล (heterophil) เบโซฟิล (basophils) และอีโอซิโนฟิล (eosinophils) และกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytes) โดยเซลล์เม็ดเลือดเหล่านี้มีความสำคัญในการทำงานร่วมกันกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลาน เพื่อต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพก่อโรคต่างๆ ซึ่งพบว่ากระบวนการตอบสนองที่เด่นชัด คือ กระบวนการที่เรียกว่า ฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และอุณหภูมิมีอิทธิพลอย่างมากต่อกระบวนการตอบสนองดังกล่าวในสัตว์เลื้อยคลาน นอกจากนี้เฮเทอโรฟิลของสัตว์เลื้อยคลาน นอกจากจะช่วยยับยั้งการเข้าบุกรุกจากเชื้อจุลชีพก่อโรคแล้ว ยังมีอิทธิพลต่อกระบวนการยับยั้งการอักเสบอีกด้วย (Montali, 1988) โดยสามารถแสดงลักษณะรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลานดังรูปที่ 2.2 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่ากลุ่มเซลล์เม็ดเลือดโดยเฉพาะเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลื้อยคลานยังมีนิวเคลียส และมีอายุประมาณ 600-800 วัน (Claver et al., 2009) ซึ่งต่างจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ที่มีอายุเพียง 120 วัน นอกจากนี้หลายงานวิจัย พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งมีโปรตีนสำคัญคือ เฮโมโกลบินสามารถทำหน้าที่เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพได้อีก ข้อสังเกตนี้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์เลื้อยคลานน่าจะมีศักยภาพสูงต่อกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นในแง่ของการทำงานร่วมกันเป็น

ระบบเพื่อต่อต้านจุลชีพก่อโรค ส่งผลให้สัตว์เลื้อยคลานมีความสามารถในการปรับตัวเพื่อให้มีชีวิตรอดได้ดีกว่า สัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ



รูปที่ 2.2 ภาพแสดงเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน (ก) เซลล์เม็ดเลือดแดงจระเข้ (ข) เซลล์เม็ดเลือดแดงอิกัวนา (ค) เซลล์เม็ดเลือดแดงเต่า (ง) เซลล์ทอมโบไซด์ (จ) เฮเทอโรฟิลจระเข้ (ฉ) เฮเทอโรฟิลเต่า (ช) อีโอซิโนฟิลเต่า (ฌ) แอโซโรฟิล (ญ) โมโนไซด์ (ฎ) ลิมโฟไซด์ (ด) เปโซฟิล
ที่มา : สมปอง, 2558

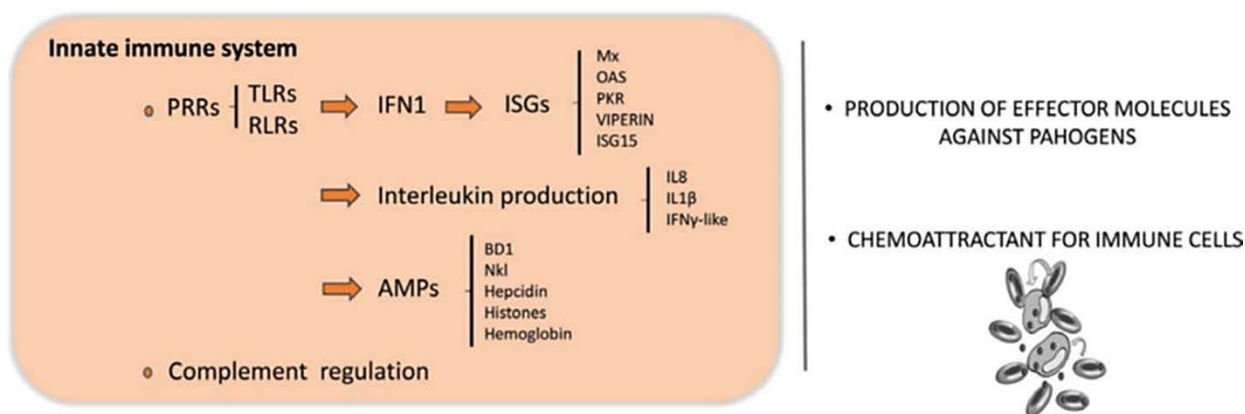
จากลักษณะพิเศษของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลื้อยคลาน ที่ยังคงมีนิวเคลียสพบว่ามีรูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนเป็นหลักแล้ว มีรายงานพบว่าบทบาทสำคัญของเม็ดเลือดแดง คือการทำงานเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Chico et al., 2018) โดยทั่วไปในระบบเลือดของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมจะมีจำนวนเม็ดแดงมากกว่าเม็ดเลือดขาว สำหรับสัตว์เลื้อยคลานมีการศึกษาพบว่า จระเข้ *Crocodylus palustris* มีจำนวนเม็ดเลือดแดงมากกว่าเม็ดเลือดขาว 120 เท่า (Arikan and Cicek, 2014) ซึ่งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยทั่วไป ระบบหมุนเวียนเลือดถือเป็นปราการด่านแรกในการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในการต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอม จึงอาจกล่าวได้ว่าเม็ดเลือดแดงน่าจะมีบทบาทสำคัญมากในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มจระเข้ จากการศึกษาของ Minasyan และคณะ (Minasyan et al., 2018) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถกำจัดแบคทีเรียบูกรุกด้วยกระบวนการ oxyctosis กล่าวคือ ในระบบหมุนเวียนเลือดเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ จะมีการเคลื่อนที่ตลอดเวลาโดยพบว่าเมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเคลื่อนที่จะเกิดการชนกันและชนกับผนังหลอดเลือด ส่งผลให้เกิดประจุทางไฟฟ้าอ่อนๆ ที่บริเวณผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถดักจับเซลล์แบคทีเรียที่มีผนังเซลล์เป็นประจุลบ และอาศัยออกซิเจนที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งเรียกการทำลายแบคทีเรียแบบนี้ว่า oxyctosis ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลายไปพร้อมกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ม้ามและตับ เมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหมดอายุไข (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงการกำจัดแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดด้วยขบวนการ Oxytocytosis
ที่มา: Minasyan, 2018

จากข้อมูลที่กล่าวมา จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสัตว์ที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงมีนิวเคลียส สามารถทำงานตอบสนองต่อการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนและสามารถผลิตโปรตีนเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ ซึ่งต่างจากเม็ดเลือดแดงจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ไม่มีนิวเคลียสและจากการศึกษาของ Chico และคณะ (Chico et al., 2018) พบว่าเมื่อมีการติดเชื้อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจะสร้างโปรตีน PRR (pattern recognition receptors) โดยการถูกกระตุ้นด้วย PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของเชื้อที่บุกรุก เช่น lipopolysaccharides (LPS), bacterial flagellin, lipoteichoic acid from Gram-positive bacteria, peptidoglycan, และ nucleic acid variants เป็นต้น แล้วส่งสัญญาณต่อไปยังกลุ่มโปรตีนที่อยู่ภายใต้การควบคุม คือ Interferon interleukin antimicrobial peptides (รูปที่ 2.4) โดยผ่านขบวนการ transcription และ translation โดยผลสุดท้ายคือ การสร้างสารชีวภาพที่มาทำลายเชื้อที่บุกรุก เช่น การศึกษาในเม็ดเลือดแดงของไก่ เมื่อกระตุ้นด้วยแบคทีเรียพบยีนที่สร้างโปรตีน toll-like receptor (tlr2, tlr4, tlr5 และ tlr21) เพิ่มขึ้น และเม็ดเลือดแดงของปลาเทราต์สายรุ้ง และ แอตแลนติกแซลมอนก็มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน tlr3 และ tlr9 (Wessel et al., 2015)

INVOLVEMENT OF NUCLEATED RBCs IN IMMUNE SYSTEM



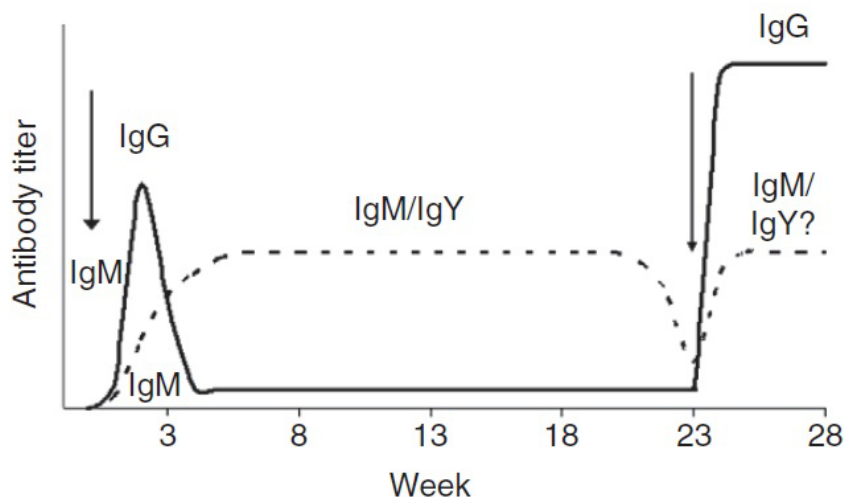
รูปที่ 2.4 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดต่อการติดเชื้อของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส
ที่มา: Chico et al., 2018

อย่างไรก็ตามการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด พบว่าในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังมี Toll-like receptors (TLRs) เป็นส่วนสำคัญในการจดจำสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุก เช่น จุลชีพต่างๆ โดย TLRs สามารถกระตุ้นการตอบสนองทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (Leulier et al., 2008) TLRs ถูกจำแนกได้ 6 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความสามารถในการจดจำลักษณะโมเลกุลหรือรูปแบบของสิ่งแปลกปลอมได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามแม้ว่า TLRs จะมีความสำคัญต่อกระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกันในระยะเริ่มต้น แต่ยังไม่มีความชัดเจนเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ TLRs ในสัตว์เลื้อยคลานใดๆ หน้าที่สำคัญอีกประการของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดคือการตอบสนองเมื่อได้รับบาดเจ็บหรือติดเชื้อผ่านกระบวนการอักเสบ ในสัตว์เลื้อยคลานเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก (extracellular pathogen) เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจะชักนำให้เกิดการสร้างเฮเทอโรฟิลิกแกรนูโลมา (heterophilic granuloma) โดยไปกระตุ้นให้เซลล์มาโครฟาจตอบสนองได้ดีขึ้น ในทางกลับกันเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมจากภายใน (intracellular pathogen) เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจะชักนำให้เกิดการสร้างฮิสติโอซัยติกแกรนูโลมา (histiocytic granuloma) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ มาโครฟาจรวมตัวกันกำจัดสิ่งแปลกปลอมในรูปแบบที่เรียกว่า การตายเฉพาะส่วน (necrosis) กระบวนการดังกล่าวนี้มีความแตกต่างจากการตอบสนองต่อการอักเสบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งจะสร้างน้ำหนองเมื่อเกิดการอักเสบ จากนั้นจะมีการหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) และเคโมไคน์ (chemokine) ตามมาภายหลัง อย่างไรก็ตามยังไม่พบกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับสารเหล่านี้ในสัตว์เลื้อยคลาน (Zimmerman et al., 2009)

2.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (adaptive immunity) ของสัตว์เลื้อยคลานมีลักษณะการตอบสนองคล้ายคลึงกับสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ คือ เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง และมีการจดจำลักษณะของสิ่งกระตุ้น ซึ่งเป็นระบบการทำงานต่อเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อจุลินทรีย์อีกครั้ง ร่างกายจะสามารถตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว โดยการสร้างแอนติบอดีจาก B-cell ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองด้านเซลล์ (cell-mediated immunity) และการตอบสนองด้านสารน้ำ (humoral adaptive immunity) ดังนี้

1) ระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ในสัตว์เลื้อยคลานมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอุณหภูมิและฤดูกาลเป็นสำคัญ โดยจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม T-cell โดยพบว่าสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิดมีการสร้าง T-cell ได้เช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูง ได้แก่ งู ลิซาร์ด เต่า และ ทัวทรา (Burnham et al., 2005) หน้าที่สำคัญของ T-cell คือ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์เป็น 2 ชนิด คือ cytotoxic T-cell (TC) และ T-helper cell (TH) จากการศึกษาโดย Pitchappan และคณะ ในปี พ.ศ. 2520 (Pitchappan et al., 1977) พบว่าต่อมไธมัสในระบบภูมิคุ้มกันของ ลิซาร์ด (*Calotes versicolor*) มีการสร้างทั้ง cytotoxic-like T-cell และ T-helper cell อย่างไรก็ตามในสัตว์เลื้อยคลานไม่มีต่อมน้ำเหลือง ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดปฏิสัมพันธ์ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune cell interactions) เหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงคาดว่า T-helper cell ในสัตว์เลื้อยคลานอาจมีบทบาทความสำคัญที่แตกต่างจาก T-helper cell ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยจะทำหน้าที่ร่วมกับ B-cell เพื่อยับยั้งการติดเชื้อปรสิตและเชื้อก่อโรคอื่นๆ ซึ่งการเพิ่มจำนวนของ T-cell ในสัตว์เลื้อยคลานจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤดูกาลที่เปลี่ยนแปลงไป จากรายงานการตอบสนองด้านเซลล์ในงู striped sand snake (*Psammophis sibilans*) โดย Farag และคณะ ในปี พ.ศ. 2528 (Farag et al., 1985) พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของ T-cell ในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วงมากกว่าฤดูกาลอื่นๆ

2) ระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ จะได้รับการกระตุ้นต่อเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำมีความเกี่ยวข้องกับ B-cells มีหน้าที่ในการผลิตแอนติบอดี โดยทั่วไปแอนติบอดีของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วย แอนติบอดีสายสั้น (light chain) 2 ชนิด ได้แก่ λ และ κ (Das et al., 2008) โดยแอนติบอดีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะสร้างอิมโมโนโกลบูลิน ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ IgM IgG IgA IgD และ IgE แต่ในสัตว์เลื้อยคลานจะสร้างเพียง 2 ชนิด คือ IgM และ IgY (Natarajan et al., 1985) จากการศึกษาพบว่า IgY ของสัตว์เลื้อยคลานเปรียบเสมือน IgG และ IgE ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Leslie et al., 1969) ซึ่ง IgY ของสัตว์เลื้อยคลานมีโครงสร้างแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือในโมเลกุลจะไม่มีบริเวณบานพับ (hinge region) บนแอนติบอดีสายยาว (heavy chain) ส่งผลให้ IgY ของสัตว์เลื้อยคลานมีความยืดหยุ่นน้อยกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ระบบการตอบสนองภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำของสัตว์เลื้อยคลานมีความแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.5 โดยพบว่าการตอบสนองด้านสารน้ำของสัตว์เลื้อยคลานจะเกิดขึ้นช้ากว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน เนื่องจากจะมีการสร้าง IgM ในระยะแฝง (latent period) นานกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมก่อนที่จะมีการกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสร้าง IgY เพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนต่อไป



รูปที่ 2.5 การเปรียบเทียบการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของสารน้ำระหว่างสัตว์เลื้อยคลาน (เส้นประ) และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (เส้นทึบ)

หมายเหตุ : เครื่องหมายลูกศรแสดงถึงระยะเวลาการสร้างภูมิคุ้มกัน

ที่มา : Zimmerman et al., 2009

กระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนผ่านการนำเสนอของ antigen presenting cell (APC) ซึ่งเซลล์กลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนแบบจำเพาะให้กับ T-cell และ B-cell โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนบริเวณของเซลล์ตอบสนอง ที่เรียกว่า major histocompatibility complex (MHC) ลักษณะทั่วไปของเซลล์ MHC จะเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายขององค์ประกอบของเซลล์ (highly polymorphic components) โดยทั่วไปประกอบด้วยยีน 2 ชนิด คือ MHC class I และ MHC class II ซึ่งทำหน้าที่นำส่งชิ้นส่วนแอนติเจน เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เสนอแอนติเจนให้กับ T-cell ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างมากในกระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกัน ด้านเซลล์ในสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิด (Klein, 1986) ยีน MHC class I จะมีการแสดงออกได้ในทุกเซลล์ที่มีนิวเคลียส และจะนำเสนอแอนติเจนที่มาจากภายใน (endogenous pathogens) ให้กับ $CD8^+$ บนผิว T-cell (Bjorkman et al., 1990) ส่วนยีน MHC class II จะนำเสนอแอนติเจนที่มาจากภายนอก (extracellular pathogens) ให้กับ $CD4^+$ บนผิว T-helper cell (Kappes et al., 1988) โดยทั่วไปพบว่า MHC ที่มีการศึกษากันมาก คือ MHC class I และ class II เนื่องจากมีบทบาทสำคัญโดยตรงกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น และเกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของระบบนิเวศอีกด้วย (Piertney et al., 2006; Alcaide et al., 2010) ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับยีน MHC อย่างกว้างขวางในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และปลา แต่มีการศึกษาน้อยมากในสัตว์เลื้อยคลานโดยเฉพาะจระเข้

อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Jaratlerdsiri และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 (Jaratlerdsiri et al., 2014) ทำการศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการของ MHC class I ในจระเข้ 20 สายพันธุ์ โดยทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโครงสร้างยีนของ exon 3, intron 3 และ exon 4 นอกจากนี้ยังพบว่า MHC Class I ของจระเข้มีความผันแปรของการแสดงออกของยีนเป็นอย่างมากในจระเข้สายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน การแสดงออกของยีน MHC class I พบว่ามี 3 กลุ่มในจระเข้ Crocodiliae โดยพบทั้ง 3 ยีนในวงศ์ crocodile แต่พบเพียง 1 ยีนในวงศ์ alligator ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ซึ่งการค้นพบนี้มีความสำคัญต่อการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อต้านทานต่อการติดเชื้อจุลชีพก่อโรคต่างๆ จากการศึกษาข้างนี้บ่งชี้ให้เห็นว่า MHC class I มีบทบาทสำคัญ

อย่างมากต่อการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น ส่งผลให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้มีความแข็งแรงอย่างมากในการต่อต้านจุลชีพต่างๆ ส่งผลให้จระเข้ซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลานดึกดำบรรพ์เพียงชนิดเดียวยังคงสายวิวัฒนาการยาวนานที่สุดจวบจนปัจจุบัน (Jaratlerdsiri et al., 2014)

ตารางที่ 2.2 การค้นพบของ MHC class I ในจระเข้ 20 สายพันธุ์

Family	Species name ^a	Gene Prefix	Class I, (N) ^b	GenBank accession numbers
Crocodylidae	Saltwater crocodile (<i>Crocodylus porosus</i>)	<i>Crpo</i>	4 (2)	HQ158304, HQ158305, HQ158308, HQ158311
	Nile crocodile (<i>Crocodylus niloticus</i>)	<i>Crni</i>	1 (1)	HQ158313
	Orinoco crocodile (<i>Crocodylus intermedius</i>)	<i>Crni</i>	1 (1)	HQ158314
	American crocodile (<i>Crocodylus acutus</i>)	<i>Crac</i>	3 (2)	HQ158325, HQ158328, HQ158329
	Mugger crocodile (<i>Crocodylus palustris</i>)	<i>Crpa</i>	3 (1)	HQ158330–HQ158332
	Siamese crocodile (<i>Crocodylus siamensis</i>)	<i>Crsi</i>	2 (2)	HQ158333–HQ158334
	Cuban crocodile (<i>Crocodylus rhombifer</i>)	<i>Crrh</i>	3 (1)	HQ158345–HQ158347
	Freshwater crocodile (<i>Crocodylus jonsoni</i>)	<i>Crjo</i>	1 (1)	HQ158348
	New Guinea crocodile (<i>Crocodylus novaeguinae</i>)	<i>Crno</i>	2 (1)	HQ158349–HQ158350
	Morelet's crocodile (<i>Crocodylus moreletii</i>)	<i>Crmo</i>	2 (2)	HQ158351, HQ158353
	Philippine crocodile (<i>Crocodylus mindorensis</i>)	<i>Crmi</i>	3 (1)	HQ158354–HQ158356
	Dwarf crocodile (<i>Osteolaemus tetraspis</i>)	<i>Oste</i>	1 (1)	HQ158365
	Dwarf crocodile (<i>Osteolaemus tetraspis</i>)	<i>Oste</i>	1 (1)	HQ158365
Alligatoridae	Cuvier's dwarf caiman (<i>Paleosuchus palpebrosus</i>)	<i>Papa</i>	2 (2)	HQ158315, HQ158317

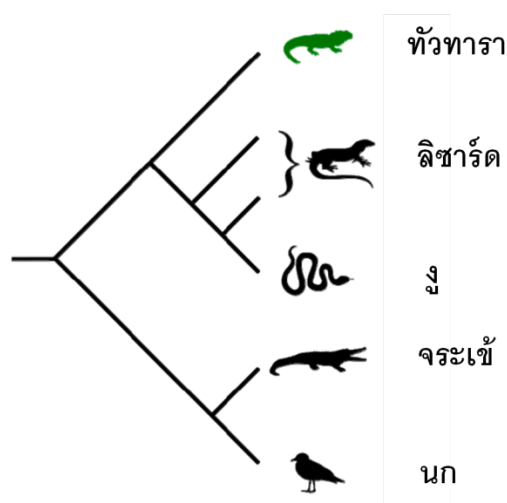
Family	Species name ^a	Gene Prefix	Class I, (N) ^b	GenBank accession numbers
	American alligator (<i>Alligator mississippiensis</i>)	<i>Almi</i>	2 (2)	HQ158319–HQ158320
	Chinese alligator (<i>Alligator sinensis</i>)	<i>Alsi</i>	3 (2)	HQ158339, HQ158341, HQ158342
	Yacare caiman (<i>Caiman yacare</i>)	<i>Caya</i>	2 (1)	HQ158321, HQ158322
	Spectacled caiman (<i>Caiman crocodylus</i>)	<i>Cacr</i>	3 (2)	HQ158335, HQ158336, HQ158338
	Broad-snouted caiman (<i>Caiman latirostris</i>)	<i>Cala</i>	3 (2)	HQ158361, HQ158362, HQ158364
	Black caiman (<i>Melanosuchus niger</i>)	<i>Meni</i>	2 (2)	HQ158357, HQ158358

ที่มา : Jaratlerdsiri et al., 2014

^a ชื่อสามัญ และชื่อวิทยาศาสตร์ของวงศ์จระเข้

^b จำนวนของการผันแปรยีน MHC class I ของจระเข้แต่ละสายพันธุ์

สำหรับยีน MHC class II นั้นมีการศึกษากันมากในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม นก สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และปลา แต่ยังไม่มีการศึกษาในกลุ่มจระเข้ (Kelley et al., 2005) อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มทัวทารา (Sphenodontia) เพียงเท่านั้น และเมื่อพิจารณาในสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (cladogram) พบว่าจระเข้มีความห่างไกลกับทัวทาราในสายวิวัฒนาการค่อนข้างมาก (รูปที่ 2.6) จากข้อมูลนี้อาจเป็นไปได้ว่า MHC class I น่าจะมีบทบาทสำคัญมากกว่า MHC class II ต่อกระบวนการตอบสนองด้านเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นของสัตว์เลื้อยคลานโดยเฉพาะจระเข้



รูปที่ 2.6 แผนภาพวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (cladogram) ของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Van Hoek et al., 2014

2.3 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Immunity response of amphibians)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญในการวิวัฒนาการระหว่างสัตว์มีกระดูกสันหลัง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เชื่อมต่อกับสายพันธุ์ของแหล่งกำเนิดของสัตว์โบราณ (ปลากระดูกอ่อน) ซึ่งกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังระดับนี้มีบรรพบุรุษร่วมกันมากกว่า 350 ล้านปี (Pough et al., 2002) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกประกอบด้วยลักษณะทางกายภาพและชีวภาพที่แตกต่างกันอย่างมาตามสายพันธุ์ เช่น กลุ่มกบและคางคก (anurans) ซาลาแมนเดอร์ (urodeles) และกลุ่มที่ไม่มีขา (legless caecilians) โดยพบว่าการศึกษเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกส่วนใหญ่จะใช้การศึกษากระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกันจากกบ *Xenopus* spp. เพื่อเป็นตัวแทนของกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Jacques, 2016) จากการศึกษาพบว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีความคล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันได้รับการระบุในลำดับจีโนมของ western clawed frog (*Xenopus tropicalis*) และ african clawed frog (*Xenopus laevis*) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะมีต่อมไทมัสซึ่งช่วยกระตุ้นให้ T-cell มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiate) และพบว่าม้ามของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นอวัยวะสำคัญที่เป็นตัวแทนคล้ายต่อมน้ำเหลืองที่มีบทบาทในการเป็นศูนย์กลางการรวมตัวกันของเม็ดเลือดขาวรวมทั้ง B-cell และ T-lymphocytes นอกจากนี้แล้วเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกยังกระจายสะสมอยู่ตามบริเวณตับ ไต และ ลำไส้ และพบว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกไม่มีต่อมน้ำเหลืองที่แท้จริง (true lymph nodes) ซึ่งมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาแอนติเจนในระยะยาวและเป็นสถานที่เซลล์พลาสมาจะผลิตแอนติบอดี (Ab-producing plasma cells) เพื่อกำจัดแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอม อย่างไรก็ตามพบว่าในกบ *Xenopus* spp. จะมีการสร้างและสะสมเซลล์แกรนูโลไซต์ (granulocytes) ที่บริเวณไขกระดูก (bone marrow) ส่วนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythropoiesis) และ B-cell จะสร้างขึ้นบริเวณเซลล์รอบนอกของเซลล์ตับ (periphery of the liver) ซึ่งต่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่จะมีการสร้าง B-cell ที่ไขกระดูก

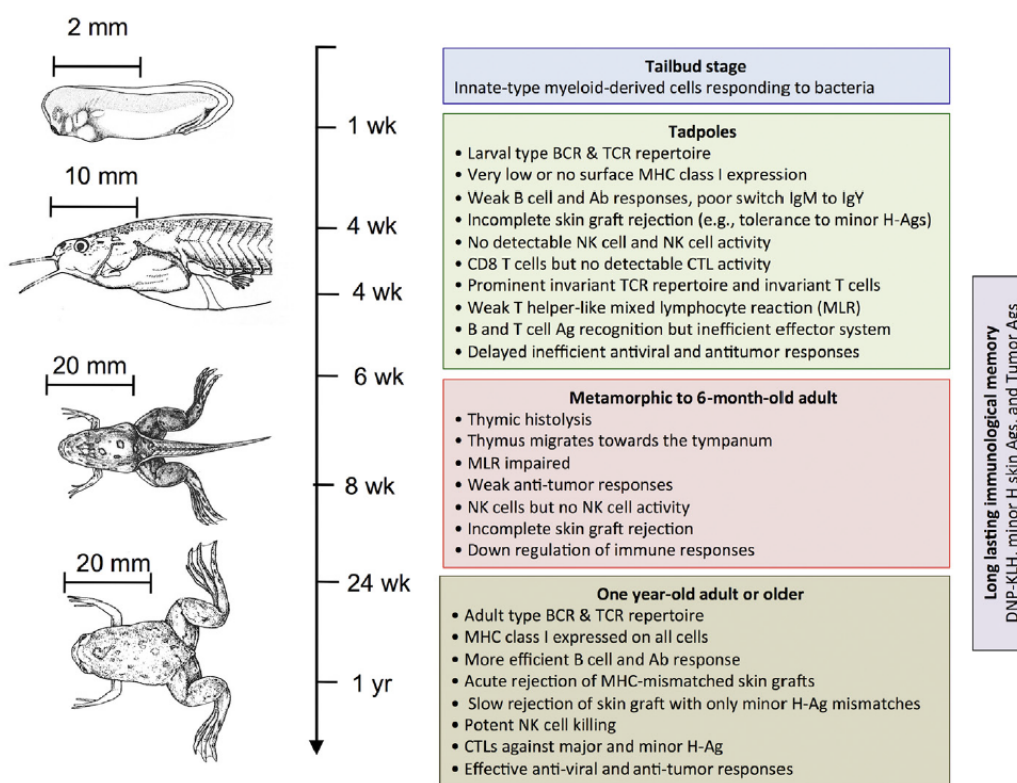
จากการศึกษาพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) มีบทบาทสำคัญด้านแรกในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในการต่อสู้กับแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอม (antigen) ที่สามารถแทรกซึมผ่านทางผิวหนัง เปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (กบ) เช่น เปปไทด์มาแกนิน (magainin) เปปไทด์ซีนีออปซิน (xenopsin) ถูกสังเคราะห์และเก็บไว้ในต่อมเมื่อดผิวหนังและหลั่งออกมาในเมือกเพื่อตอบสนองต่อความเครียด การบาดเจ็บ หรือการติดเชื้อ (Rollins-Smith et al., 2011) ส่วนการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ (complement) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก พบว่ามีลักษณะคล้ายกับสัตว์เลื้อยคลาน ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการตอบสนองแบบ classical pathway, alternative pathway และ lectin pathway โดยพบว่าในสัตว์กลุ่มนี้จะมีการสร้างซีรัมโปรตีนชื่อว่า ficolins (Fujita et al., 2004) ที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า แมคโครฟาจไม่เพียงแต่เป็นศูนย์กลางของภูมิคุ้มกันเท่านั้นยังมีความสำคัญสำหรับการปรับรูปแบบเนื้อเยื่อ (tissue remodeling) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอีกด้วย เช่น การถดถอยของทางระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Godwin et al., 2013)

ส่วนระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (adaptive immunity) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกก็มีลักษณะการตอบสนองคล้ายคลึงกับสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ คือ เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงและมีการจดจำลักษณะของสิ่งกระตุ้น ซึ่งเป็นระบบการทำงานต่อเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด โดยพบว่าการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B-lymphocytes และ T-lymphocytes เมื่อมีการกระตุ้นโดย recombination-activating genes (RAG-mediated somatic) ที่บริเวณตัวรับเฉพาะแอนติเจนที่ผิว B-cell receptor และ T-cell receptor ตามลำดับ แล้วส่งผลไปกระตุ้นโมเลกุล MHC บน antigen

presenting cells (APCs) เพื่อให้เกิดการตอบสนองทางด้านการน้ำต่อไป (Du Pasquier et al., 2002) ซึ่งพบว่าลักษณะโครงสร้างของแอนติบอดี (Immunoglobulin; Ig) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ประกอบด้วยแอนติบอดีสายสั้น (light chain) และแอนติบอดีสายยาว (heavy chain) ได้แก่ IgM, IgX, IgY, IgD, IgF โดยแอนติบอดีสายยาวนี้สามารถเชื่อมโยงกับแอนติบอดีสายสั้น 3 ชนิด ได้แก่ μ - δ - λ -like ส่วน IgM และ IgX เป็นแอนติบอดีที่สร้างขึ้นโดยอาศัยการทำงานของต่อมไธมัส (thymus-independent) ในขณะที่ IgY จะถูกสร้างขึ้นเมื่อมีการตอบสนองจาก T-dependent immune responses ที่ถูกกระตุ้นด้วย cytosine deaminase (AID) จากการศึกษาพบว่า IgX มีความเกี่ยวข้องในการตอบสนองบริเวณลำไส้และเยื่อผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นพิเศษ นอกจากนี้ยังพบว่า พลาสมาเซลล์จะหลั่ง IgM, IgX และ IgY จากม้ามและเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ไต และ ลำไส้ ซึ่งกับ *Xenopus laevis* จะมีการสร้าง B-cells ที่ทำหน้าที่เป็น phagocytic cell ซึ่งสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Li et al., 2006) ข้อมูลดังกล่าวนี้ชี้ให้เห็นว่าในทางวิวัฒนาการของ B-cells และ macrophages อาจมีต้นกำเนิดร่วมกันในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และพบว่าแอนติบอดี IgY ถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีความจำเพาะสูงมากเมื่อมีสาร dinitrophenol เพิ่มขึ้นเพียง 10 ครั้ง ในระหว่างการตอบสนองภูมิคุ้มกันด้านการน้ำของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ซึ่งต่างจากการตอบสนองของ IgY ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ต้องอาศัยการเพิ่มขึ้นของ dinitrophenol ถึง 10,000 เท่า สำหรับการทำงานของ T-cell ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก พบว่า T-cell ประกอบด้วย α , β , γ , δ -T cells ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก precursors ในต่อมไธมัส โดย T-cell receptor (TCR) ในตัวเต็มวัยของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะมีลักษณะที่หลากหลาย (diverse) เช่นเดียวกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย TCR จะมีการส่งสัญญาณไปยัง CD3 γ และ δ , TCR ζ และมีการทำงานร่วมกับ CD28 และ receptors CTLA4 ข้อบ่งชี้นี้แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของ T-cell ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นแบบการทำงานร่วมกัน (cosignaling mechanism) สำหรับการกระตุ้นการทำงานของ T-cell โดย antigen presenting cells (APCs) นอกจากนี้พบว่า CD8 ใน *Xenopus* spp. ถูกศึกษาโดยใช้ mAbs recognizing เพียงสายเดียว คือ α -chain บน receptor ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งแบบ heterodimeric $\alpha\beta$ และ homodimeric $\alpha\alpha$

การก่อกำเนิดของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะมีความแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเนื่องจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นจะเผชิญกับสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคตั้งแต่ยังเป็นตัวอ่อน ดังนั้นการพัฒนาอย่างรวดเร็วของระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญในช่วงตัวอ่อนในช่วงต้นของการเจริญ แม้ว่า *Xenopus* spp. จะปรับระบบภูมิคุ้มกันและพัฒนาค่อนข้างเร็วเมื่อเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตามก็ยังคงใช้เวลา 12 วัน สำหรับการสร้าง B-cell และ T-cell เพื่อปกป้องตัวอ่อนหลังเกิดการปฏิสนธิ (post-fertilization) (รูปที่ 2.7) ซึ่งช่วงเวลาก่อนหน้านี้อ่อนต้องพึ่งพาเม็ดเลือดขาวเพื่อปกป้องตัวเอง (Chen et al., 2009) ในช่วงสัปดาห์แรกตัวอ่อนจะมีการพัฒนาอวัยวะคือ ตับ และไธมัส โดย B-cell ของ *Xenopus* spp. จะมีการสร้างขึ้น 2 ช่วงเวลา ช่วงแรก B-cell จะถูกสร้างขึ้นในวันที่ 2 จนถึง วันที่ 12 หลังเกิดการปฏิสนธิ ในช่วงเวลานี้ IgM และ mature B-cell จะถูกสร้างขึ้นและสามารถถูกตรวจพบได้ประมาณ 10 วัน หลังจากนั้น ช่วงที่สองของ B-cell เริ่มต้น 12 วันหลังจากการปฏิสนธิ เมื่อตัวอ่อนเริ่มมีการพัฒนาการเจริญของม้าม หลังจาก 2 สัปดาห์ของการพัฒนาจะพบ mature B-cell มีการแสดงออกเต็มที่ในตับและม้ามของตัวอ่อน ซึ่งจะพบการแสดงออกของ mature B-cell ในเยื่อเมือกลำไส้ (gut mucosa) ไธมัส และในไขกระดูก โดยจะพบเมื่อตัวอ่อนเจริญเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งเมื่อสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเจริญเต็มวัยครบ 1 ปี ระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะทำงานอย่างสมบูรณ์ ทั้งระบบ B-cell T-cell และระบบคอมพลีเมนต์ MHC class

I รวมถึง NK-cell จะมีการแสดงออกในทุกๆ เซลล์ เพื่อทำงานร่วมกันในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (*Xenopus laevis*)
ที่มา: Jacques, 2016

2.4 บทบาทของโปรตีนและเปปไทด์ต้านจุลชีพในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต

2.4.1 โปรตีนและเปปไทด์ต้านจุลชีพในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลาน

สัตว์เลื้อยคลานเป็นสัตว์ที่มีอายุยืนยาวชนิดหนึ่งในอันดับและอาณาจักรของสิ่งมีชีวิตบนโลก มีความสามารถในการดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการทำงานที่มีประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของสัตว์เลื้อยคลานซึ่งประกอบด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immune system) และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (adaptive immune system) ในระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด โปรตีนและเปปไทด์ต้านจุลชีพถือว่าเป็นองค์ประกอบสำคัญในการรักษาสสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันต้านทานดังกล่าว จากการศึกษาที่ผ่านมาของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลานมีทั้งโปรตีนและเปปไทด์ ได้แก่ ไลโซไซม์ (lysozyme) เฮโมโกลบิน (hemoglobin) คาเธลิซิน (cathelicidin) และดีเฟนซิน (defensin) เป็นองค์ประกอบหลัก รวมถึงโปรตีนและเปปไทด์ออกฤทธิ์อื่นๆ ที่ทำหน้าที่ในการต้านจุลชีพต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายของสัตว์เลื้อยคลาน เช่น ลิวโครซิน (leucocin) เฮปซิดิน (hepcidin) และเฮโมซิดิน (hemocidin)

1) โปรตีนต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสัตว์เลื้อยคลานมีโปรตีนที่มีความสามารถต้านจุลชีพได้ แบ่งเป็น 2 ชนิดหลักๆ คือ โปรตีนไลโซไซม์และเฮโมโกลบิน โดยที่โปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีหน้าที่หลักภายในเซลล์ที่แตกต่างกันดังนี้

ไลโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดที่สำคัญชนิดหนึ่งในสิ่งมีชีวิตหลาย โดยทั่วไปสามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในน้ำตาและสารคัดหลั่งอื่นๆ ซึ่งพบว่าไลโซไซม์มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก สำหรับในมนุษย์ไลโซไซม์ จะถูกสร้างและเก็บไว้ในแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ในกลุ่มของสัตว์ปีกพบไลโซไซม์ในไขขาวและทำหน้าที่เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ ส่วนในสัตว์เลื้อยคลานไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันสืบทอดพบได้ทั้งในเซลล์ไขและเซลล์เม็ดเลือดขาว มีการศึกษาอย่างละเอียดในไขขาวของเต่าและตะพาบหลายชนิด พบว่าเมื่อมีการกระตุ้นไขขาวของเต่าด้วยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจะทำให้มีการทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น และสามารถทำลายเชื้อก่อโรคในสัตว์เลื้อยคลานได้ดี (Ponkham et al., 2010) โดยเฉพาะไลโซไซม์ในตะพาบได้หัวน (*Trionyx sinensis*) และตะพาบสวน (*Amyda cartilaginea*) จากการศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิพบว่า เอนไซม์ไลโซไซม์มีหลายไอโซฟอร์มซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในการทำลายเชื้อจุลชีพที่ต่างกัน

เฮโมโกลบิน เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่มีรายงานว่ นอกจากจะทำหน้าที่หลักในการขนส่งออกซิเจนแล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพได้ด้วย โดยเฉพาะเฮโมโกลบินของสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มจระเข้ ในปี พ.ศ. 2545 Hoffman และคณะ (Hoffman et al., 2002) รายงานว่าเฮโมโกลบินจากอัลลิเกเตอร์ (*Alligator mississippiensis*) สามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบรวมถึงเชื้อรา โดยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ไม่ขึ้นกับหมู่ฮีมที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง นอกจากนี้เมื่อทำการแยกสายเฮโมโกลบินออกเป็นโกลบินสายเดี่ยว ทำให้คุณสมบัติการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเฮโมโกลบินจากจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในปี พ.ศ. 2555 โดย Srihongthong และคณะ (Srihongthong et al., 2012) พบว่าเฮโมโกลบินจระเข้สายพันธุ์ไทยทั้งที่เป็นโปรตีนเต็มเส้น (intact hemoglobin) และชิ้นเปปไทด์ (fragmented hemoglobin) สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี การรายงานนี้สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่า เมื่อเฮโมโกลบินถูกย่อยให้เป็นชิ้นส่วนเปปไทด์ขนาดเล็ก ส่งเสริมให้มีคุณสมบัติการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ดีมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎี “tissue-specific peptide pool” กล่าวคือ เฮโมโกลบินสามารถแตกหักเป็นเปปไทด์สั้นๆ ได้ภายในเม็ดเลือดแดง (Ivanov et al., 1997) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าปัจจุบันจะไม่มีรายงานการพบหน้าที่อื่น ๆ ของเฮโมโกลบินในสัตว์เลื้อยคลาน แต่มีการศึกษาอย่างละเอียดถึงความสามารถในการต้านจุลชีพของเฮโมโกลบินจากสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอื่นๆ เช่น วัว หมู มนุษย์ (Fogaca et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโปรตีนเฮโมไซยานิน (hemocyanin) ที่เป็นโปรตีนหลักในระบบเลือดของสัตว์ข้อปล้อง (arthropod) ที่เรียกว่า “เฮโมลิมพ์” พบว่าเฮโมไซยานินเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยประมาณ 70-75 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนโดยอาศัยการจับระหว่างโมเลกุลออกซิเจนกับไอออนคอปเปอร์ (Cu^{2+}) ส่งผลให้เลือดของสัตว์กลุ่มนี้มีสีน้ำเงิน ซึ่งต่างกับเฮโมโกลบินของสัตว์ชั้นสูงที่จะมีสีแดงจากไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) เฮโมไซยานินทำหน้าที่เป็นโปรตีนต้นกำเนิด (precursor) ของเปปไทด์ต้านจุลชีพได้ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ข้อปล้องอย่างชัดเจน (Munoz et al., 2003) ข้อบ่งชี้ดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มข้อปล้องมีโปรตีนเฮโมไซยานินเป็นโปรตีนสำคัญที่ทำหน้าที่หลากหลายนอกเหนือจากการขนส่งออกซิเจน และพิษจนแล้ว

ว่าเฮโมไซยานินมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบสปีดแต่กำเนิด ในแง่ของการเป็นโปรตีนต้นกำเนิดของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

2) เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน (antimicrobial peptide in reptile)

เปปไทด์ต้านจุลชีพในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานนั้น พบว่ามีอยู่หลากหลายชนิดสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.3 โดยแสดงรายละเอียดในส่วนของเปปไทด์หลักๆ ดังนี้

2.1) เปปไทด์ดีเฟนซิน เป็นเปปไทด์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มของเปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (higher vertebrates) มีความสามารถทำลายได้ทั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัส ดีเฟนซินเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3-4 กิโลดาลตัน มีประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นประจุบวก ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) จำนวน 6 กรดอะมิโน จัดเรียงตัวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) จำนวน 3 พันธะ ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะของเปปไทด์ดีเฟนซิน โดยมากเปปไทด์ชนิดนี้มีโครงสร้างเป็นแผ่นบีตา พบโครงสร้างเป็นเกลียวแอลฟาเพียงเล็กน้อย เปปไทด์นี้จะได้รับการถอดรหัสเริ่มต้นจากจีโนมเป็นโปรตีเพนซิน (pro-defensin) จากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์โปรตีเอสทำให้ได้เปปไทด์ดีเฟนซินที่พร้อมทำงาน ในสัตว์มีกระดูกสันหลังเปปไทด์ดีเฟนซินสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ แอลฟาดีเฟนซิน (α -defensin) บีตา (β -defensin) และซีตา (θ -defensin) สำหรับในมนุษย์พบและแยกเปปไทด์แอลฟาดีเฟนซิน ได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่มีการเข้าคู่ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน ตำแหน่งที่ 1 กับ 6 (Cys1-Cys6) ตำแหน่งที่ 2 กับ 4 (Cys2-Cys4) และตำแหน่งที่ 3 กับ 5 (Cys3-Cys5) (Ganz et al., 1985) ตัวอย่างเปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มนี้ที่รู้จักกันดี เช่น เปปไทด์ HNP-1 หรือแอลฟาดีเฟนซิน 1 ซึ่งมีความสำคัญในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ใช้ในการทำลายเชื้อโรค (Lehrer et al., 2012) ส่วนบีตาดีเฟนซิน พบว่ามีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่มีการเข้าคู่ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน ตำแหน่งที่ 1 กับ 5 (Cys1-Cys5) ตำแหน่งที่ 2 กับ 4 (Cys2-Cys4) และตำแหน่งที่ 3 กับ 6 (Cys3-Cys6) (Sharma et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบรายงานการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของเปปไทด์บีตาดีเฟนซินในเต่าทะเล (*Caretta caretta*) ซึ่งพบว่าการเข้าคู่ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน ตำแหน่งที่ 1 กับ 6 (Cys1-Cys6) ตำแหน่งที่ 2 กับ 5 (Cys2-Cys5) และตำแหน่งที่ 3 กับ 4 (Cys3-Cys4) (Chattopadhyay et al., 2006) จะเห็นได้ว่าการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของเปปไทด์จะแตกต่างกันไป ขึ้นกับแหล่งที่มา โดยทั่วไปแล้วเปปไทด์กลุ่มนี้มีการแสดงออกในเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) และบริเวณอื่นๆทั่วร่างกาย นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์นี้ได้ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น ปลา สัตว์เลื้อยคลาน นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ยังไม่พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สำหรับเปปไทด์ซีตาดีเฟนซิน เป็นเปปไทด์ที่พบการแสดงออกเฉพาะในกลุ่มของไพรเมต (primate) และพบว่าไม่มีการแสดงออกในมนุษย์ (Coronado et al., 2012) ในส่วนของสัตว์เลื้อยคลานยังไม่มีรายงานการพบค้นยีนแอลฟาดีเฟนซินจะพบเพียงบีตาดีเฟนซินเท่านั้น ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับดีเฟนซินของสัตว์ปีกเปปไทด์บีตาดีเฟนซิน เริ่มมีการศึกษาทั้งในกลุ่มเต่า และ จิ้งจกหรือตุ๊กแก และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบยีนบีตาดีเฟนซิน ที่แตกต่างกันถึง 32 ชนิดในจีโนมของกิ้งก่ากรีนอาโนล (Anole carolinensis) (Dalla et al., 2012) นอกจากนี้เมื่อใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AcBD15 ซึ่งเป็นเปปไทด์บีตาดีเฟนซิน ชนิดหนึ่งจากจิ้งจก นำมาตรวจสอบหาบีตาดีเฟนซิน ในสัตว์เลื้อยคลานชนิดต่าง ๆ พบว่ามีการติดสีของ บีตาดีเฟนซินในแกรนูลของเม็ดเลือดขาวของจิ้งจก งู เต่า และตัวทารา (tuatara) แต่ไม่พบในแกรนูลของเม็ดเลือดขาวของจระเข้และไก่อ

ตารางที่ 2.3 เปปไทด์ต้านจุลชีพของสัตว์เลื้อยคลานที่มีรายงานในฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลชีพ

ชื่อเปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	ชนิดของ สิ่งมีชีวิต	ฤทธิ์ต้านจุลชีพ
Defensins			
TBD-1 (Turtle β -defensin 1)	YDLSKNCRLRGGICYIGKCPRRFFRSGSC SRGNVCCLRFG	turtle	G+, G-, F
pelovaterin	DDTPSSRCGSGGWGPCLPIVDLLCIVHV TVGCSGGFGCCRIG	turtle	G-
Cathelicidins			
OH-CATH	KRFKKFFKKLKNSVKKRAKKFFKKPRVIG VSIPF	<i>Ophiophagu s hannah</i> (snake)	G+, G-
derivative OH-CATH30	KFFKKLKNSVKKRAKKFFKKPRVIGVSIPF		G+, G-
derivative OH-CM6	KFFKKLKKAVKKGFKKFAKV		G+, G-
BF-CATH	KRFKKFFKKLKSVKKRAKKFFKKPRVIG VSIPF	<i>Bungarus fasciatus</i> (snake)	Cancer cells
derivative BF-30	KFFRKLKKS VKKRAKEFFKKPRVIGVSIPF	<i>Bungarus fasciatus</i> (snake)	G+, G-
derivative BF-15	KFFRKLKKS VKKRFK	<i>Bungarus fasciatus</i> (snake)	G+, G-
NA-CATH	KRFKKFFKKLKNSVKKRAKKFFKKPKVIG VTFPF	<i>Naja atra</i> (snake)	G+, G-
batroxidin	KRFKKFFKKLKNSVKKRVKKFFRKPRVIG VTFPF	<i>Bothrops atrox</i>	G+, G-
crotalidin	KRFKKFFKKVKKS VKKRLKKIFKKPMVIG VTIPF	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	G ⁺ , G ⁻
Waprin			
omwaprin	KDRPKKPGLCPPRPQKPCVKECKNDDS CPGQQKCCNYGCKDECRDPIFVG	<i>Oxyuranus microlepidot us</i> (snake)	G ⁺

(*) อธิบายตัวย่อของกิจกรรมการทำงานของเปปไทด์ (activity abbreviations):

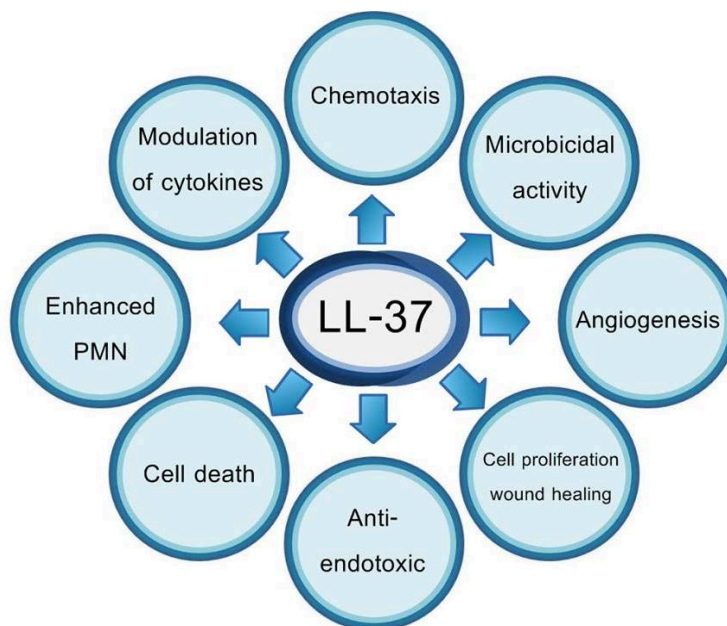
G^+ , G^- คือ สามารถยับยั้งการเจริญทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (G^+) และแกรมลบ (G^-)

G^- คือ สามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

G^+ คือ สามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

F คือ สามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะเชื้อรา

2.2) เปปไทด์คาเธลิซิน เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงพบมากในสัตว์เลื้อยคลาน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบเปปไทด์พิทาติเฟนซินในไขของจระเข้ จากการศึกษาเปปไทด์พิทาติเฟนซินและเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ชนิดอื่น ทำให้ทราบว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดมีวิวัฒนาการก่อนระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น อย่างน้อย 750 ล้านปี ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในแง่ของการเข้าทำงานก่อนระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นและจำเป็นในการทำให้เกิดความจำเพาะของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด ซึ่งเปปไทด์ออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้จะถูกสร้างขึ้นแต่ยังไม่พร้อมทำงาน (pre-propeptide) ก่อน เมื่อได้รับการตัดบางส่วนออกด้วยเอนไซม์ จึงจะสามารถทำงานในการต้านจุลชีพได้ ในมนุษย์ เปปไทด์คาเธลิซิน จะถูกเก็บไว้ในแกรนูโลซุโรฟิลิก (azurophilic granule) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในรูปของเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน เช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูงชนิดอื่นๆ เมื่อถูกตัดบางส่วนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จึงจะอยู่ในรูปเปปไทด์คาเธลิซินที่พร้อมทำงาน เรียกว่า เอชซีเอพี 18 (hCAP18) หรือ LL-37 (LL-37) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน โครงสร้างระดับทุติยภูมิเป็นแอลฟาเฮลิคซ์ มีกรดอะมิโนประมาณ 12-88 กรดอะมิโน เป็นคาเธลิซินที่พบในสัตว์เลื้อยคลานชนิดต่างๆ มีการแสดงออกแบบอนุรักษ์บริเวณปลายอะมิโน (N-terminus) ในเส้นเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน (conserved cathelin domain) (Tongaonkar et al., 2012) ในกรณีของคาเธลิซินจากไก่ จะพบเปปไทด์นี้ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล (heterophils) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลิแซ็กคาไรด์ จากนั้นเปปไทด์จะได้รับการตัดโดยเอนไซม์ซีรีนโปรตีเอส เพื่อปล่อยเปปไทด์คาเธลิซิน ที่พร้อมทำงานออกมา (Wang et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์คาเธลิซินไลค์ (cathelicidin-like) ในไก่สายพันธุ์ *Gallus gallus domesticus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ chCATH-1, chCATH-2 / CMAP27, chCATH-3 และ chCATH-B1/ chCATH-4 (van Dijk et al., 2005) จากการศึกษาเปปไทด์ LL-37 จากเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ ซึ่งสามารถสรุปพบภาพหน้าที่ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานในแง่ของการเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพภายในเซลล์ได้ ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 บทบาทความสำคัญของเปปไทด์ LL-37 ในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต
ที่มา : ดัดแปลงจาก Hiemstra et al., 2013

2.3) เปปไทด์เฮปซิดิน เป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่พบได้ในตับ ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนจำนวน 8 กรดอะมิโน (4 พันธะไดซัลไฟด์) มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้หลายชนิด (Park et al., 2001) ยีนที่มีการถอดรหัสเป็นเปปไทด์เฮปซิดินไลค์ (hepcidin-like) ได้มีการค้นพบในจระเข้สายพันธุ์ไทย (*C. siamensis*) ซึ่งเปปไทด์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 26 กรดอะมิโน (Cshepc) (FNSHFPICSYCCNCCRNKGCGLCRCRT) และคาดว่าเป็นเปปไทด์ส่วนที่พร้อมทำงาน (Hao et al., 2012) นอกจากนี้จากการศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ดังกล่าวในเชื้อยีสต์ พบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ยังไม่ได้ทำการแยกบริสุทธิ์นั้นยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และ *Aeromonas sobria* ได้อีกด้วย นอกจากนี้จระเข้แล้วเปปไทด์เฮปซิดินไลค์ยังพบได้ในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มกิ้งก่าอาโนล์ (anole lizard)

2.4) เปปไทด์แอลอีเอพี (LEAP-2) เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความยาว 40 กรดอะมิโน ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนจำนวน 4 กรดอะมิโน มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก และมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากเปปไทด์เฮปซิดิน (Krause et al., 2003) เปปไทด์แอลอีเอพี 2 พบมีการแสดงออกได้ทั้งในตับและอวัยวะอื่นๆ แต่พบว่าการแสดงออกมากที่สุดในตับ มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา เมื่อเกิดการติดเชื้อจากแบคทีเรีย พบว่าเปปไทด์นี้ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเปปไทด์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์แอลอีเอพี 2 จากกิ้งก่ากรีนอาโนล์ (*A. carolinensis*) มีการแสดงออกในสัตว์เลื้อยคลานอีกหลายชนิด เช่น ตะพาบไต้หวัน (*Pelodiscus sinensis*) เต่าตะวันตก (*Chrysemys picta bellii*) อัลลิเกเตอร์จีน (*Alligator sinensis*) และอัลลิเกเตอร์อเมริกา (*Alligator mississippiensis*) แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านจุลชีพหรือบทบาททางชีวภาพของเปปไทด์ในสัตว์เลื้อยคลานนี้ยังไม่ได้มีการศึกษา

2.5) เปปไทด์โครตามีน (crotamine) เป็นเปปไทด์ที่แยกได้จากงูหางกระดิ่ง มีความยาว 42 กรดอะมิโน ประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีน จำนวน 9 กรดอะมิโน และกรดอะมิโนซิสเทอีน 6 กรดอะมิโน เป็นดเปปไทด์ที่มีประจุบวกบนโมเลกุล และมีบางส่วนของโครงสร้างคล้ายเปปไทด์ดีเฟนซิน โดยเฉพาะส่วนของ gamma-core

motif (Kerkis et al., 2010) ซึ่งเปปไทด์ดังกล่าวนี้สามารถเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยการเจาะเข้าไปในเซลล์ (cell-penetrating peptide) งานวิจัยชี้ชัดว่าเปปไทด์โครตามีนมีการแสดงออกที่บริเวณเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) หรือเยื่อเมือก (mucosal surfaces) แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี และยังสามารถทำให้เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย เกิดความเสียหาย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าโครตามีน เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพของสัตว์เลื้อยคลานชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน

2.6) เปปไทด์ลิวคร็อกซิน เป็นเปปไทด์ที่ค้นพบในเซลล์เม็ดเลือดขาวของจระเข้สยาม (*Crocodylus siamensis*) เปปไทด์กลุ่มลิวคร็อกซินนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบเพียง 7-10 กรดอะมิโน และมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ มีความสามารถต้านเชื้อก่อโรคได้เป็นอย่างดี (Pata et al., 2011) หลังจากทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบแล้ว สามารถแบ่งเปปไทด์กลุ่มนี้เป็นเปปไทด์ลิวคร็อกซิน I (NGVQPKY) มีน้ำหนักโมเลกุล 806.99 ดาลตัน และเปปไทด์ลิวคร็อกซิน II (NAGSLLSGWG) มีน้ำหนักโมเลกุล 956.3 ดาลตัน จากการศึกษาการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่าเปปไทด์ลิวคร็อกซินสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทำให้เกิดความผิดปกติที่เซลล์ เมมเบรนของแบคทีเรียในลักษณะเกิดการพองที่ผิวเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าความเสียหายของเซลล์เมมเบรนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้น (concentration dependence) ที่เพิ่มขึ้นของเปปไทด์ ซึ่งสามารถแสดงลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ลิวคร็อกซินและอนุพันธ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ลักษณะพื้นฐานทางชีวเคมีของเปปไทด์ลิวคร็อกซินและอนุพันธ์ของลิวคร็อกซิน

เปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	ประจุสุทธิ	ความไม่ชอบน้ำ
leucrocine I	NGVQPKY	804.91	+2	43 (%)
NY15	NKKAGLFVWQFPKY-NH ₂	1767.16	+4	40 (%)
KT2	NGVQPKYKWWKWWKWW-NH ₂	2433.92	+7	53 (%)
RT2	NGVQPKYRWWRWRRWW-NH ₂	2545.97	+7	53 (%)

ที่มา : สมปอง, 2558

2.4.2 โปรตีนและเปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (antimicrobial peptide in amphibians)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (กบ) เป็นสิ่งมีชีวิตโบราณที่มีระบบภูมิคุ้มกันที่มีวิวัฒนาการสูง ซึ่งผิวหนังของสัตว์กลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษาสมดุลของของเหลว การหายใจ และการขนส่งไอออนที่จำเป็น และการป้องกันภูมิคุ้มกันของผิวหนังจะมีการทำงานร่วมกันกับการตอบสนองทางสรีรวิทยาของร่างกาย หนึ่งในกลไกการป้องกันตามธรรมชาติของผิวหนังคือ การสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพจากต่อม granular glands ซึ่งการปลดปล่อยสารพิษ (toxin) จาก granular glands จะเริ่มต้นโดยการกระตุ้นของเส้นประสาท sympathetic nerves เพื่อสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพบริเวณผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกให้ทำหน้าที่ในการป้องกันจากเชื้อโรคจุลินทรีย์ที่บุกรุก ดังนั้นผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจึงมีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (adaptive immunity) หลังจากมีการค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ชื่อว่า magainins จากผิวหนังของกบ African clawed frog (*Xenopus laevis*) ซึ่งถูกค้นพบโดย Michael Zasloff และมีการศึกษาเชิงลึกจนทราบกลไกการเข้าทำลายเชื้อจุลชีพที่เมมเบรนโดยมีกลไกการทำลายแบบ toroidal-

pore หลังจากนั้นมา 20 ปีต่อมานักวิทยาศาสตร์ได้มีการค้นคว้าและศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพกันมากขึ้นในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกโดยเฉพาะกบ ซึ่งพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพของผิวหนังกบมีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่ขนาด 8-48 กรดอะมิโน (Michael and Sonnevend, 2011) และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ต้านจุลชีพของกบบ้างจำนวน 11 เปปไทด์ พบว่าบริเวณที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพนั้นมีความอนุรักษ์สูงมาก (conserved) (Abbassi et al., 2010) จากการศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพในกบ พบว่าเปปไทด์เหล่านี้เป็นเปปไทด์ประจุบวก (cationic peptide) โดยทั่วไปจะมีประจุระหว่าง +2 ถึง +6 ที่ค่า pH 7 และในโครงสร้างเปปไทด์ยังพบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีนและมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก 50% โดยจะพบกรดอะมิโนลิซีนและ ไอโซลิวเป็นจำนวนมากในโครงสร้าง ซึ่งการมีคางมหลากหลายทางโครงสร้าง (structure variation) จะส่งผลโดยตรงต่อการทำงานในแง่การเข้าทำลายเชื้อจุลชีพแบบกว้าง (broad spectrum) และความจำเพาะสำหรับจุลินทรีย์ต่าง จากการศึกษาทำให้สามารถค้นพบและสามารถนำเปปไทด์ต้านจุลชีพที่แยกได้จากผิวหนังของกบไปพัฒนาใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลกลุ่มดื้อยาปฏิชีวนะได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 2.5)

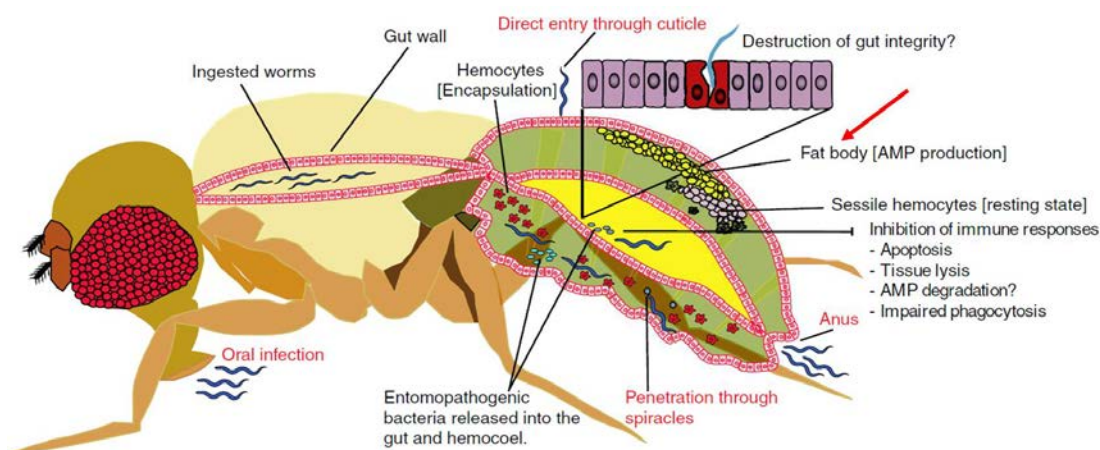
ตารางที่ 2.5 เปปไทด์ต้านจุลชีพที่สร้างจากผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (กบ)

สายพันธุ์กบ	เปปไทด์ต้านจุลชีพ	โครงสร้างเปปไทด์	จุลชีพเป้าหมาย
Midwife toad	Alyteserin-1c	GLKDIFKAGLSLVKGIAAHVAN	Multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> (MDRAB)
Mink frog	Brevinin-2	GIWDTIKSMGKVFAGKILQNL	Multidrug-resistant <i>A. baumannii</i> (MDRAB)
Tailed frog	Ascaphin-8	GFKDLLKGAALKLVKTVLF	Extended-spectrum β - lactamase (ESBL) <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Paradoxical frog	Pseudin-2	GLNALKKVFQGIHEAIKLINNHVQ	Antibiotic-resistant <i>Escherichia coli</i>
African running frog	Kassinatuerin-1	GFMKYIGPLIPHAVKAISDL I	Antibiotic-resistant <i>Escherichia coli</i>
California red-legged frog	Temporin-DRa	HFLGTLVNLAKKIL	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)
Green paddy frog	Brevinin-2	GVIKSVLKGVAKTVALGML	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)
Hokkaido frog	Brevinin-2PRa	GLMSLFKGVLTAGKHIFKNVGG SLLDQAKCKITGEC	Antibiotic-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Foothill yellow-legged frog	Brevinin-1BYa	FLPILASLAAKFGPKLFCLVTKKC	Fluconazole-resistant <i>Candida</i> spp.

ที่มา : ดัดแปลงจาก Michael and Sonnevend, 2011

2.4.3 เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์ข้อปล้อง (antimicrobial peptide in arthropods)

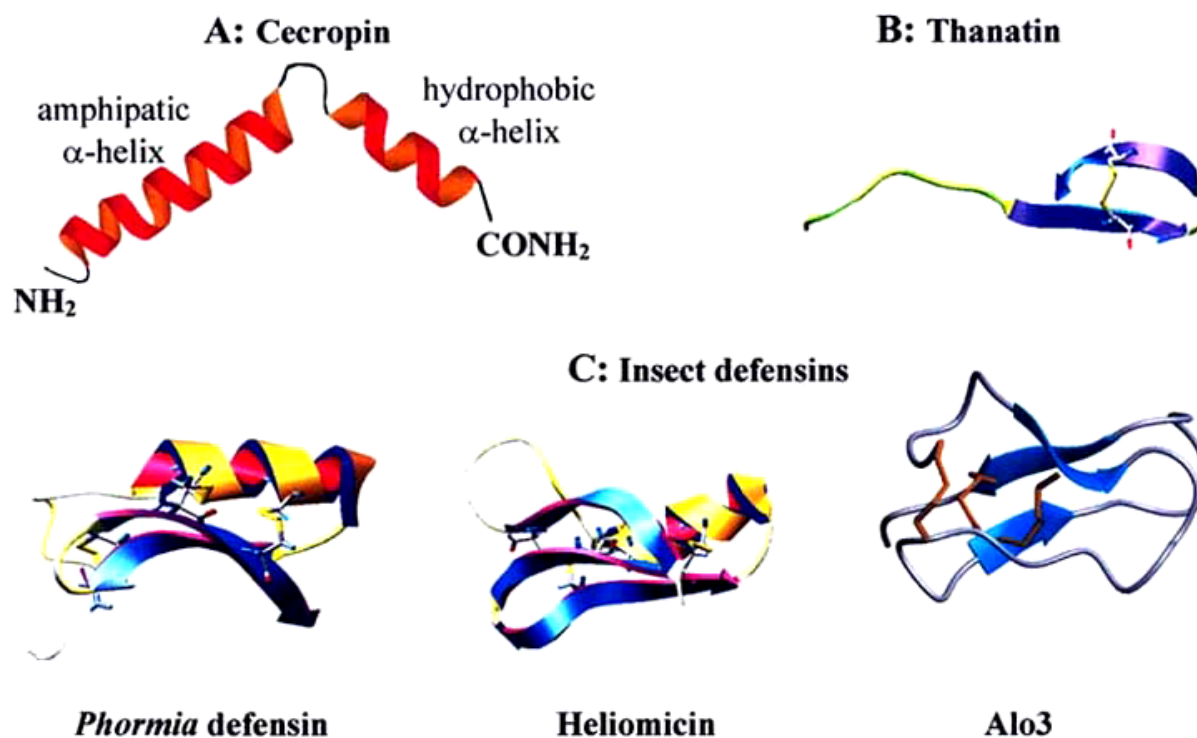
ระบบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) ของสัตว์ข้อปล้อง หรือ อาร์โธรพอด เมื่อมีการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์นั้น มีวิวัฒนาการการที่ซับซ้อน กล่าวคือเมื่อเกิดการติดเชื้อจุลชีพขึ้นภายในร่างกายของสัตว์ข้อปล้อง เปปไทด์ต้านจุลชีพจะถูกสร้างขึ้นเพื่อเข้ามาทำลายเชื้อจุลชีพอย่างรวดเร็ว ในระหว่างนี้สัตว์ข้อปล้องจะมีการสร้างสารพิษจากต่อมพิษ (venom glands) ที่ประกอบด้วย เอนไซม์ต่างๆ สารโมเลกุลขนาดเล็ก (low-molecular-mass compounds) สารกลุ่ม neurotoxins รวมถึง cytolytic peptides จะทำงานร่วมกันเพื่อทำลายเชื้อจุลชีพ ในทำนองเดียวกันเมื่อเกิดการติดเชื้อในสัตว์ข้อปล้องกลุ่ม ครัสเตเชียน (crustaceans) จะมีสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพและเก็บไว้ในเฮโมไซด์ (hemocytes) จากนั้นจะปลดปล่อยโมเลกุลเปปไทด์ออกมาในระบบหมุนเวียนเลือด (hemolymph) ด้วยกระบวนการที่เรียกว่า exocytosis ในขณะที่สัตว์ข้อปล้องกลุ่มแมลงจะสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อจุลินทรีย์บุกรุกตามลักษณะของ immunogenic ของจุลชีพนั้นๆ ซึ่งเปปไทด์เหล่านั้นจะถูกสร้างขึ้นใน fat body ของแมลง (รูปที่ 2.9) โดยถูกกระตุ้นผ่าน 2 วิธี ที่แตกต่างกัน คือ 1) เปปไทด์ต้านจุลชีพถูกกระตุ้นให้สร้างผ่าน Imd pathway ซึ่งควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น 2) เปปไทด์ต้านจุลชีพถูกกระตุ้นให้สร้างผ่าน Toll pathway เมื่อเกิดการติดเชื้อราและแบคทีเรียแกรมบวก (Hoffmann and Reichhart, 2002)



รูปที่ 2.9 สรีรวิทยาของแมลงเมื่อมีการติดเชื้อจุลชีพและมีการสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ fat body
ที่มา : ดัดแปลงจาก Castillo et al., 2011

เปปไทด์ต้านจุลชีพในแมลงมีต้นกำเนิดการศึกษามาจากเปปไทด์ cecropins ซึ่งมีการแยกบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียอย่างกว้างขวางในกลุ่มแมลง หลังจากนั้นมีการค้นพบเปปไทด์ที่เป็นอนุพันธ์ของเปปไทด์ cecropins ได้แก่ เปปไทด์ sarcotoxins เปปไทด์ hyphancin เปปไทด์ enbocin และเปปไทด์ spodopsin รวมถึงเปปไทด์ cecropin-like molecules ซึ่งพบว่าเปปไทด์ cecropins จากแมลงถูกค้นพบครั้งแรกเลือดของผีเสื้อกลางคืน (*Hyalophora cecropia*) โดยทั่วไปเปปไทด์ต้านจุลชีพในแมลงจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 29-42 กรดอะมิโน มีลักษณะเป็นเปปไทด์เส้นตรง (linear-antimicrobial peptides) ที่ไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) เป็นส่วนประกอบ (Steiner et al., 1981) เพื่อให้เข้าใจกลไกการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ ดังนั้นการศึกษาและทำนายโครงสร้างเปปไทด์ทั้งโครงสร้างระดับปฐมภูมิ (primary structure) และโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (secondary structure) จึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่ง

พบว่าปัจจุบันเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ค้นพบจากแมลงได้ถูกศึกษาโครงสร้างของเปปไทด์หลายชนิดดังแสดงในรูปที่ 2.10 และ ตารางที่ 2.6



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะโครงสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพในแมลง
ที่มา : Bulet and Stöcklin, 2005

ตารางที่ 2.6 แสดงลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ต้านจุลชีพจากแมลง

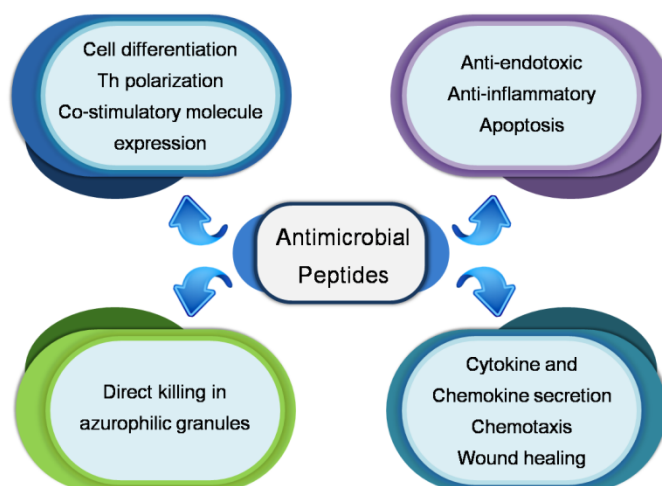
ชนิดแมลง	ชื่อเปปไทด์	โครงสร้างระดับปฐมภูมิ
ผีเสื้อกลางคืน (<i>Hyalophora cecropia</i>)	Cecropin A	KWKLFFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK
แมลงวัน (<i>Sarcophaga peregrine</i>)	Sarcotoxin IA	GWLKKIGKKIERVGQHTRDATIQGLGIAQQAAANVAATAR
แมลงวันทอง (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Cecropin A	GWLKKIGKKIERVGQHTRDATIQGLGIAQQAAANVAATAR
ยุงลาย (<i>Aedes aegypti</i>)	Cecropin A	GGLKKLGKKLEGAGKRVFNAAEKALPVVAGAKALRK
ยุงลายสวน (<i>Aedes albopictus</i>)	Cecropin A1	GGLKKLGKKLEGVGKRVFKASEKALPVAVGKALGK
ยุงก้นปล่อง (<i>Anopheles gambiae</i>)	Cecropin A	GRLKKLGKKIEGAGKRVFKAAEKALPVVAGVKAL
หนอนไหม (<i>Bombyx mori</i>)	Cecropin D	GNFFKDLEKMGQVRDAVISAAPAVDTLAKAKALGQ

ชนิดแมลง	ชื่อเปปไทด์	โครงสร้างระดับปฐมภูมิ
<i>Pachycondylas goeldii</i>	Ponericin G2	GWKDWLKKGKEWLKAKGPGIVKAALQAATQ
<i>Cerratitis capitata</i>	Ceratotoxin	SIGSAFKKALPVAKKIGKAALPIAKAALP
<i>Stomoxys calcitrans</i>	Stomoxyn	RGFRKHFNKLVKVKHTISETAHVAKDTAVIAGSGAAVVAAT
<i>Pseudacanthothermes spiniger</i>	Spinigerin	HVDKKVADKVLLLKQLRIMRLTRL

ที่มา : Bulet and Stöcklin, 2005

2.5 โครงสร้างและกลไกการทำงานของโปรตีนและเปปไทด์ต้านจุลชีพ

เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก ที่ร่างกายผลิตขึ้นหรือเกิดจากการย่อยโมเลกุลของโปรตีนขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันสืบทอด (innate immunity) ซึ่งสร้างได้อย่างรวดเร็วและสามารถทำลายเชื้อก่อโรคอย่างไม่จำเพาะ เปปไทด์ต้านจุลชีพนั้นมีบทบาทสำคัญอย่างมากในกลไกการทำลายสิ่งแปลกปลอมระยะแรกหลังจากเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้เปปไทด์เหล่านี้ยังมีฤทธิ์ทำลายเชื้อก่อโรคหลายชนิด เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัส เป็นต้น นอกจากนี้เชื้อโรคต่างๆ เหล่านี้แล้วยังพบฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งอีกด้วย โดยกลไกการทำลายเชื้อแต่ละชนิดของเปปไทด์จะแตกต่างกันไปตามคุณลักษณะและแหล่งที่เปปไทด์ถูกสร้างขึ้น ตัวอย่างบริเวณที่มีการสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพ ได้แก่ ผิวหนัง ระบบทางเดินอาหาร ระบบเลือด และระบบทางเดินหายใจ นอกจากนี้พบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (adaptive immunity) โดยเฉพาะในสัตว์ชั้นสูง จะเห็นได้ว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ มีบทบาทและหน้าที่ที่หลากหลาย สามารถสรุปเป็นภาพรวมของบทบาทความสำคัญของเปปไทด์ต้านจุลชีพในระบบภูมิคุ้มกันได้ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 บทบาทความสำคัญของเปปไทด์ต้านจุลชีพในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต

ที่มา : สมปอง, 2558

2.5.1 ความหลากหลายทางโครงสร้างของเปปไทด์ด้านจุลชีพ

โครงสร้างของเปปไทด์ด้านจุลชีพถือว่ามีลักษณะเฉพาะและหลากหลาย ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ ในปัจจุบันการศึกษาโครงสร้างของเปปไทด์จะอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า nuclear magnetic resonance (NMR) ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพและความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง ดังนั้นหากอาศัยคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบและลักษณะทางโครงสร้างของเปปไทด์ในการจำแนกประเภทของเปปไทด์ด้านจุลชีพ จะสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1) เปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นประจุลบ (anionic peptides)

เปปไทด์ด้านจุลชีพประจุลบเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 700-800 ดาลตัน มักพบในสารสกัดของผิวหนัง เยื่อเมือกของระบบหลอดเลือด และเซลล์เยื่อผิวของระบบทางเดินหายใจ [17-19] ทั้งนี้เปปไทด์กลุ่มนี้พบเพียงเล็กน้อยในธรรมชาติ สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเปปไทด์นี้จะอาศัยธาตุในกลุ่มโลหะสังกะสี (Zn) เป็นโคแฟกเตอร์ในการออกฤทธิ์ ตัวอย่างของเปปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เปปไทด์แมกซิมินเอช 5 (maximin H5) จากผิวหนังของกบสายพันธุ์ *Bombina maxima* และเปปไทด์เดิร์มซิดิน (dermcidin) ที่แยกได้จากสารคัดหลั่งของต่อมเหงื่อในมนุษย์ เป็นต้น

2) เปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นประจุบวกเป็นเกลียวแอลฟา (linear cationic α -helical peptides)

เปปไทด์ด้านจุลชีพประจุบวกมีลักษณะเป็นสายสั้นๆ ซึ่งมีกรดอะมิโนตั้งแต่ 40 กรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ และเป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพที่ค้นพบมากที่สุด โดยปัจจุบันได้มีการค้นพบแล้วประมาณ 300 ชนิด โดยไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลและมีโครงสร้างที่เรียกว่า kink อยู่ตรงกลางสาย (Tossi et al., 2000) และโครงสร้างเกลียวแอลฟาจะเกิดขึ้นได้ในสารละลายจำเพาะบางชนิด ได้แก่ ไตรฟลูออโรเอทานอล (trifluoroethanol) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate micelles) ถุงฟอสโฟไลพิดและไลโปโซม (phospholipid vesicles and liposomes) และไลพิด A เป็นองค์ประกอบ (Gennaro et al., 2000) ยกตัวอย่าง เช่น เปปไทด์แอลแอล 37 เปปไทด์บูโฟริน II (buforin II) เป็นต้น

3) เปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นประจุบวกและประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเพาะ (cationic peptides enriched for specific amino acids)

เปปไทด์ด้านจุลชีพในกลุ่มนี้ค้นพบแล้วประมาณ 40 ชนิด มีลักษณะโมเลกุลเป็นสายและไม่มีเกลียวแอลฟาในโครงสร้าง ทั้งนี้ยังมีสมบัติเป็นประจุบวกและภายในโมเลกุลมีกรดอะมิโนบางชนิดอยู่ในปริมาณที่สูง (Otvos, 2002) ยกตัวอย่าง เช่น เปปไทด์แบคทีนิซิน (bactenecin) และเปปไทด์พีอาร์ 39 (PR-39) ซึ่งเปปไทด์ทั้งสองชนิดนี้ภายในโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนโพรลีนสูงถึงร้อยละ 33-49 และมีกรดอะมิโนอาร์จินีน ประมาณร้อยละ 13-33 นอกจากนี้ยังมีเปปไทด์อินโดลิซิดิน ซึ่งมีกรดอะมิโนทรีโตนอยล์อยู่ในปริมาณมาก จากการที่มีกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำจำนวนมากในโครงสร้างจึงส่งผลให้เปปไทด์กลุ่มนี้มีสมบัติความไม่ชอบน้ำในโมเลกุลสูง สมบัตินี้มีบทบาทสำคัญในการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรีย

4) เปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นประจุลบและประจุบวกซึ่งมีกรดอะมิโนซิสเทอีนและสร้างพันธะไดซัลไฟด์เป็นองค์ประกอบ (anionic and cationic peptides that contain cysteine and form disulfide bonds)

เปปไทด์ด้านจุลชีพในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีเปปไทด์ที่ค้นพบแล้วประมาณ 380 ชนิด โมเลกุลอาจจะมีสมบัติเป็นทั้งประจุบวกและประจุลบ นอกจากนี้ภายในโมเลกุลจะมีกรดอะมิโนซิสเทอีนเป็น

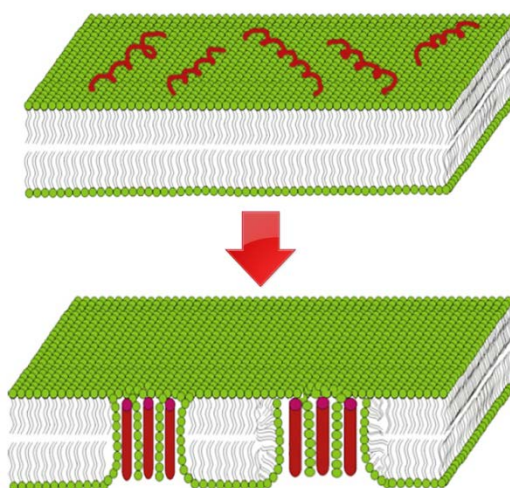
องค์ประกอบทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ที่มีผลต่อความเสถียรของโครงสร้างแบบแผ่นบีตา (Brogden, 2005) ตัวอย่างเปปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เปปไทด์โปรทีกริน (protegrin) ลักษณะโครงสร้างภายในโมเลกุลของเปปไทด์นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน 4 ตำแหน่ง ซึ่งสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ 2 พันธะ นอกจากนี้ยังมีเปปไทด์ในกลุ่มดีเฟนซินซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีบทบาทและหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันสืบทอดอย่างน้อย 3 ชนิด คือ เปปไทด์แอลฟาดีเฟนซิน ซึ่งมีพันธะไดซัลไฟด์จำนวน 3 พันธะภายในโมเลกุล และเปปไทด์ซีตาดีเฟนซินที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ เช่น ลิง นอกจากนี้ พบว่ามีเปปไทด์ชนิดอื่นที่ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์จำนวน 3 พันธะ เช่นเดียวกัน แต่มีโครงสร้างเป็นวง เช่น เปปไทด์ดีเฟนซินจากแมลง เปปไทด์ดีเฟนซินจากพืช เป็นต้น

2.5.2 กลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเข้าทำลายเซลล์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ มีหลายวิธีและต้องใช้หลายเทคนิคประกอบกัน ตามลักษณะเฉพาะของเปปไทด์และเซลล์เป้าหมาย โดยเซลล์เป้าหมายที่นิยมนำมาศึกษาและสามารถอธิบายกลไกการทำลายของเปปไทด์ต้านจุลชีพได้อย่างละเอียด คือเซลล์แบคทีเรีย และไลโปโซม ซึ่งเป็นเซลล์เมมเบรนจำลอง โดยใช้อัตราส่วนของฟอสโฟไลพิดแต่ละชนิดตามสัดส่วนจริงในเซลล์แบคทีเรีย จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ากลไกการทำลายของเปปไทด์สามารถเกิดได้ตั้งแต่บริเวณผิวเซลล์ที่อยู่ภายนอก เช่น การทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลหรือการเกิดรูรั่วที่เซลล์เมมเบรน จนกระทั่งถึงโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น ดีเอ็นเอ หรือโปรตีน ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการรอดชีวิต และกระบวนการเจริญของเซลล์ เป็นต้น (Yang et al., 2011) โดยพบว่าเปปไทด์จะสามารถเข้าไปแทรกในเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย 4 กลไกหลัก ดังนี้

1) แบบจำลอง Toroidal-pore

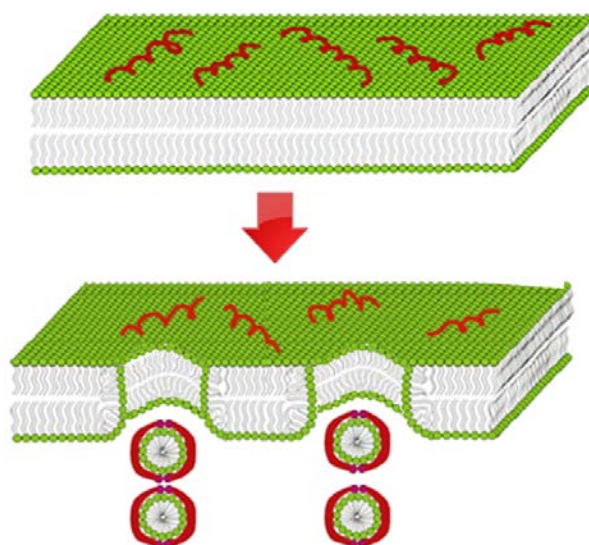
หลังจากเปปไทด์เคลื่อนผ่านชั้นโพลีแซ็กคาไรด์ของผิวเซลล์แบคทีเรียลงไปยังชั้นเซลล์เมมเบรน เปปไทด์จะอาศัยสมบัติความเป็นประจุบวกเข้าจับกับหมู่ฟังก์ชันของไลพิดบนเยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรน จากนั้นโมเลกุลของเปปไทด์ที่อยู่ใกล้กันจะสร้างรู โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการโค้งงอของโมเลกุลของฟอสโฟไลพิดตามแนวการวางตัวของเปปไทด์ที่แทรกตัวผ่านเซลล์เซลล์เมมเบรน ดังรูปที่ 2.12 ตัวอย่างเปปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เปปไทด์อูเรอิน 3.3 (aurein 3.3) เปปไทด์อะเรนิซิน (arenicin) และเปปไทด์มาเจนนิน 2



รูปที่ 2.12 แบบจำลอง toroidal-pore บนผิวเซลล์เมมเบรน
ที่มา : สมปอง, 2558

2) แบบจำลอง Carpet

แบบจำลอง carpet มีลักษณะคล้ายกับ detergent โดยในระยะเวลาที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ต่ำๆ โมเลกุลของเปปไทด์จะวางตัวในแนวขนานไปกับผิวเซลล์เมมเบรนและกระจายตัวออกไปรอบๆ ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เพื่อปกคลุมทั่วผิวเซลล์เมมเบรนในลักษณะปูพรม เมื่อเปปไทด์มีความเข้มข้นสูงขึ้น โมเลกุลของเปปไทด์ที่อยู่ใกล้กันจะทำให้เกิดการโค้งงอของฟอสโฟไลพิดบนเซลล์เมมเบรน จนกระทั่งทำให้เกิดการหลุดออกของเยื่อไขมันสองชั้นบางส่วนในลักษณะไมเซลล์ (micelles) ดังรูปที่ 2.13 ซึ่งทำให้เกิดรูบนเซลล์เมมเบรน จนกระทั่งถึงความเข้มข้นที่สูงพอจะเกิดรูขนาดใหญ่บนเซลล์เมมเบรน (toroidal transient holes) ทำให้โมเลกุลของเปปไทด์ที่เหลือสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ง่ายขึ้น (Brogden, 2005) ตัวอย่างเปปไทด์ที่ใช้กลไกนี้ในการทำลายเซลล์แบคทีเรีย เช่น เปปไทด์พิเอลเอ็น 149 เอ (Pln149a) และเปปไทด์แอลแอล 37 เป็นต้น (Dean et al., 2010)

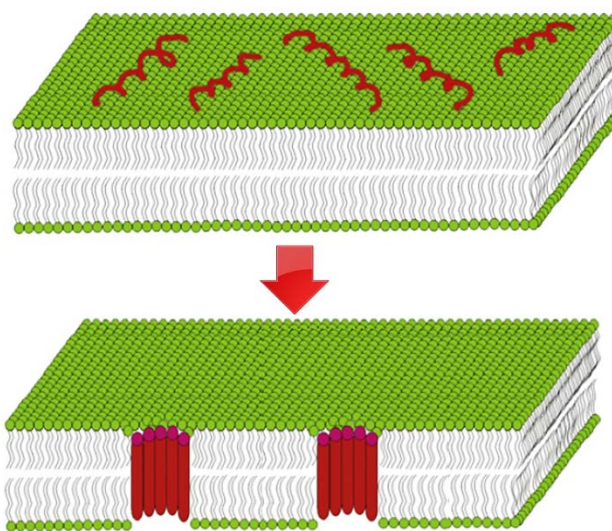


รูปที่ 2.13 แบบจำลอง carpet บนผิวเซลล์เมมเบรน
ที่มา : สมปอง, 2558

3) แบบจำลอง Barrel-stave

แบบจำลองนี้เกิดได้กับเปปไทด์ในกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวแอลฟา โดยโครงสร้างนี้จะมีครึ่งหนึ่งที่มีสมบัติชอบน้ำและอีกครึ่งที่ไม่ชอบน้ำ โดยในระยะแรกโมเลกุลของเปปไทด์ต่างๆ จะวางตัวในแนวขนานไปกับผิวเซลล์เมมเบรนโดยอาศัยแรงดึงดูดระหว่างประจุ จากนั้นโมเลกุลของเปปไทด์ที่อยู่ใกล้กันจะเริ่มสร้างรูที่ผิวเซลล์เมมเบรนโดยโมเลกุลของเปปไทด์จะวางตัวในแนวตั้งฉากและแทรกเข้าสู่เซลล์เมมเบรนโดยอาศัยส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเปปไทด์กับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของฟอสโฟไลพิด หลังจากนั้นจะเกิดแรงผลักระหว่างประจุบวกบนส่วนที่ชอบน้ำของเปปไทด์แต่ละโมเลกุลจนเกิดช่องผ่านของของเหลว (aqueous channel) ขึ้นหลายจุดบนผิวเซลล์เมมเบรน ดังรูปที่ 2.14 ซึ่งการเกิดรูบนเซลล์เมมเบรนในลักษณะนี้ จะนำมาซึ่งความผิดปกติของผนังเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ 1) การเสียสมบัติของการรักษาความเป็นขั้ว (loss of polarization) 2) การหลุดออกของส่วนประกอบภายในเซลล์สู่ภายนอก (leaking of cellular contents) 3) การสูญเสียสมดุลของเซลล์เมมเบรนเนื่องจากการกระจายตัวของไลพิดผิดปกติ หรือ 4) การกระตุ้นประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการเข้าทำลายผนังเซลล์จนทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด ตัวอย่างของเปปไทด์ในกลุ่มนี้ เช่น

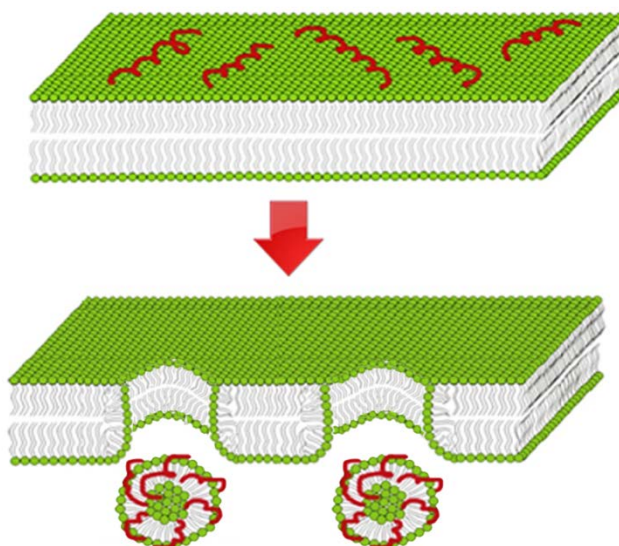
เปปไทด์เอสเค 84 (SK84) เปปไทด์เอชเอฟ 1 (HF-1) และเปปไทด์ซีทีเอกซ์เอชเอ (Ctx-Ha) เป็นต้น (Lu et al., 2010)



รูปที่ 2.14 แบบจำลอง barrel-stave บนผิวเซลล์เมมเบรน
ที่มา : สมปอง, 2558

4) แบบจำลอง Aggregate channel

แบบจำลองนี้ได้นำมาอธิบายภายใต้แนวคิดที่ว่ากลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพไม่น่าจะเกิดได้เพียงแค่การทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของเยื่อเลือกผ่านเท่านั้น แบบจำลองนี้มีกลไกเริ่มต้นจากเปปไทด์เข้าจับแทนที่ไอออนของ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ที่จับอยู่กับโมเลกุลของไลโปโพลีแซ็กคาไรด์บนผิวเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นเปปไทด์เหล่านี้จะทำให้เกิดลักษณะที่ผิดปกติบนเซลล์เมมเบรน (membrane perturbation) ได้แก่ 1) การสร้างบริเวณที่จำเพาะระหว่างเปปไทด์กับไลโปดบนผิวเซลล์เมมเบรน 2) การกระตุ้นให้เกิดการแยกตัวของฟอสโฟไลพิดกลุ่มที่ไม่มีประจุออกจากฟอสโฟไลพิดกลุ่มที่มีประจุลบโดยการทำงานของเปปไทด์ และ 3) การสร้างก้อนไขมันจากฟอสโฟไลพิดกลุ่มที่มีประจุลบต่อเปปไทด์ จนทำให้เกิดช่องบนเซลล์เมมเบรน ดังรูปที่ 2.15 ลักษณะทั้งหมดนี้ส่งผลให้เกิดการรั่วของไอออนต่างๆ จากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ ตัวอย่างของเปปไทด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เปปไทด์มาคูเลติน 1.1 (maculatin 1.1) (Bond et al., 2008)



รูปที่ 2.15 แบบจำลอง Aggregate channel บนผิวเซลล์เมมเบรน
ที่มา : สมปอง, 2558

2.6 แนวโน้มการพัฒนาและการประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพในปัจจุบัน

ด้วยความสามารถในการต้านเชื้อก่อโรคได้หลากหลายชนิดของเปปไทด์ต้านจุลชีพ จึงทำให้มีการนำเปปไทด์ต้านจุลชีพมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการพัฒนาไปสู่การใช้เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคในมนุษย์ นอกจากนี้เปปไทด์ต้านจุลชีพส่วนใหญ่ยังพบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่นเดียวกับมนุษย์ จึงเชื่อว่าเปปไทด์เหล่านี้อาจนำมาใช้กับมนุษย์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆ ดังนั้นในบทนี้ผู้เขียนจึงมีความประสงค์ที่จะแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของการพัฒนาเปปไทด์ต้านจุลชีพสู่การนำไปใช้ประโยชน์ รวมไปถึงการประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพในปัจจุบันโดยทั่วไปการผลิตยาที่ใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์ ต้องอาศัยข้อมูลการศึกษาเชิงพิษวิทยาเภสัชวิทยา และทางคลินิก ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาระยะก่อนทดลองในมนุษย์ (pre-clinical study) และการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ (clinical trials) เพื่อประเมินว่ายาแต่ละขนานมีความปลอดภัยเพียงพอต่อการนำมาใช้หรือไม่ ในปัจจุบันยารักษาโรคที่มีขายตามท้องตลาดส่วนใหญ่มักเป็นยาที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น จากข้อมูลการผลิตยาในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 พบเปปไทด์ต้านจุลชีพประมาณ 500-600 ชนิด อยู่ในขั้นตอนการศึกษาระยะก่อนทดลองในมนุษย์ และมีเปปไทด์อีก 128 ชนิด อยู่ในขั้นตอนการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 1 จำนวน 40 ชนิด ระยะที่ 2 จำนวน 74 ชนิด และระยะที่ 3 จำนวน 14 ชนิด (Lax et al., 2013) ปัจจุบันพบว่า การประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพสำหรับเป็นยารักษาโรคนั้นส่วนใหญ่เป็นเปปไทด์ที่ได้จากการสังเคราะห์และปรับปรุงคุณสมบัติบางประการ ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่มีในเปปไทด์ตามธรรมชาติ เช่น การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของสายเปปไทด์จากรูป L (L-form) เป็นรูป D (D-form) เนื่องจากกรดอะมิโนในรูป L ไม่เสถียร มักถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ เป็นต้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลของเปปไทด์เพื่อเพิ่มความเสถียรให้กับโมเลกุลของเปปไทด์ ได้แก่ การเติมกรดอะมิโนที่ไม่มีในธรรมชาติ (introducing non-natural amino acids) การป้องกันปลายสายเปปไทด์ (terminal protection) การทำให้เกิดโครงสร้างแบบไซคลิก (cyclization) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแกนกลาง (backbone modification) (Li et al., 2013) ซึ่งวิธีการปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีเพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางยาของเปปไทด์ให้ดีขึ้น สำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเปปไทด์

ต้านจุลชีพในปัจจุบันนั้นมีความหลากหลายแต่อย่างไรก็ตามหนังสือเล่มนี้ขอกล่าวถึงการประยุกต์ใช้ประโยชน์ เปปไทด์ต้านจุลชีพใน 4 ประเด็นหลัก ดังต่อไปนี้

2.6.1 การประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อ

เปปไทด์ต้านจุลชีพและอนุพันธ์ต่างๆ ได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์เป็นยาปฏิชีวนะ เนื่องจากคุณสมบัติหลักของเปปไทด์ต้านจุลชีพ คือ การทำลายเชื้อก่อโรคและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของสิ่งมีชีวิต รวมไปถึงการมีกลไกการเข้าทำลายเชื้อของเปปไทด์ที่จำเพาะ เช่น การทำลายผิวเซลล์เมมเบรนของเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสมดุลและการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ รวมไปถึงยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก เป็นต้น จากความจำเพาะและความหลากหลายทางกลไกการทำลายเซลล์เป้าหมาย จึงทำให้ความเสี่ยงในเรื่องการดื้อยาของเชื้อจุลชีพต่อเปปไทด์ลดลง โดยคาดว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพจากธรรมชาติมากกว่า 1,000 ชนิด มีโอกาสสูงที่จะถูกนำมาพัฒนาใช้ได้จริงในอนาคต

ในปัจจุบันตัวอย่างของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้รับการยอมรับและขึ้นทะเบียนเป็นยา เช่น เปปไทด์โพลีไมซินบี (polymyxin B) ซึ่งเป็นเปปไทด์ประจุบวกที่มีไลพิดเป็นองค์ประกอบ แยกได้จากแบคทีเรีย *Bacillus polymyxa* พบว่าเปปไทด์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากอาศัยการเข้าจับกันระหว่างเปปไทด์กับไลโปโพลีแซ็กคาไรด์บนเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นสาเหตุทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกเสียหายอย่างรวดเร็วและตายในที่สุด (Falagas et al., 2005) และเปปไทด์แกรไมซิดิน (gramicidin) แยกได้จากแบคทีเรีย *Bacillus brevis* ซึ่งเป็นยาที่ใช้ร่วมกับสารอื่น ในขณะที่เปปไทด์แดปโตไมซิน (daptomycin) เป็นเปปไทด์ประจุลบที่มีไลพิดเป็นองค์ประกอบและมีลักษณะโครงสร้างเป็นวงกลม สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อทางผิวหนังได้ และเปปไทด์อินโดลิซิดิน (indolicidin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ migenix สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* ซึ่งเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว (McInturff et al., 2005)

นอกจากการใช้ประโยชน์ในแง่ของการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะแล้ว ในปัจจุบันยังมีการประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพร่วมกับยาปฏิชีวนะอีกด้วย โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วยลง ช่วยในการป้องกันการเกิดภาวะดื้อยาที่อาจเกิดขึ้นได้หลังจากมีการใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานาน จากตัวอย่างกรณีศึกษาของ Giacometti และคณะ ในปี พ.ศ.2542 (Giacometti et al., 1999) พบว่าเมื่อมีการใช้เปปไทด์ประจุบวก อาทิเช่น เปปไทด์เซโครปินพีไอ (cecropin PI) เปปไทด์อินโดลิซิดิน และเปปไทด์นินซิน (nisin) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ อาทิโพลีไมซินอี (polymyxin E) และยาคลาริโทรไมซิน (clarithromycin) จะทำให้ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้เมื่อนำเปปไทด์บูฟอริน 1 (butorins-1) และเปปไทด์แรนาเล็กซิน (ranalexin) เชื่อมเข้ากับโมเลกุลของยาเซฟาโซลิน (cefazolin) พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ที่มีการดื้อยาเมธิซิลลิน (methicillin) ได้ดีกว่ายา rifampicin ที่ถูกเชื่อมกับโมเลกุลของยาเซฟาโซลิน หรือดีกว่าการใช้ยาเซฟาโซลินเพียงอย่างเดียว เป็นต้น นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์แล้ว เชื้อราก็เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคอีกหลายชนิด จากการศึกษาทางระบาดวิทยาขององค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่ามีผู้ป่วยโรคทางผิวหนังจากเชื้อรามากถึงร้อยละ 20-25 ของประชากรโลก (Vena et al., 1975) จากข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้การประยุกต์ใช้ เปปไทด์ต้านจุลชีพในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราได้รับความสนใจมากขึ้น ตัวอย่างของ เปปไทด์ที่สามารถต้านเชื้อราได้ เช่น เปปไทด์เซโครปิน ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Fusarium* spp. ได้ (DeLucca et al., 1975) และเปปไทด์เดอมานเซปติน (dermaseptin) ที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อรา

Cryptococcus neoformans นอกจากนี้ยังมีเปปไทด์จากธรรมชาติอีกมากมายที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา

เปปไทด์	แหล่งที่มา	กลไกการทำลาย	เชื้อราที่ถูกทำลาย
Gallinacin-1	ไก่	ทำให้เซลล์แตก	<i>C. albicans</i>
Lactoferricin-B	มนุษย์, โค	ทำให้เซลล์แตก	<i>C. albicans</i>
Defensin NP-1	เซลล์แกรนูโลไซต์ของหนู	ทำให้เซลล์แตก	<i>C. neoformans</i>
Defensin NP-2	เซลล์แกรนูโลไซต์ของหนู	ทำให้เซลล์แตก	<i>A. fumigatus</i>
Defensin HNP-1	เซลล์นิวโทรฟิลของมนุษย์	ทำให้เซลล์แตก	<i>C. albicans</i>
Defensin HNP-3	เซลล์นิวโทรฟิลของมนุษย์	ทำให้เซลล์แตก	<i>C. neoformans</i>
Protegrin	มนุษย์, สุนัข	ทำให้เซลล์แตก	<i>C. albicans</i>
Tripticin	มนุษย์, สุนัข	ทำให้เซลล์แตก	<i>A. flavus</i>
Thanatin	มวนพิฆาตหนอน	-	<i>A. fumigatus</i>
Magainin-2	คางคก	ทำให้เซลล์แตก	<i>C. albicans</i>
Metchnikowin	แมลงหวี่	ทำให้เซลล์แตก	<i>F. oxysporum</i>
Drosomycin	แมลงหวี่	ทำให้เซลล์แตก	<i>F. oxysporum</i>
Dermaseptin	เขียดตะปาด	ทำให้เซลล์แตก	<i>C. neoformans</i>

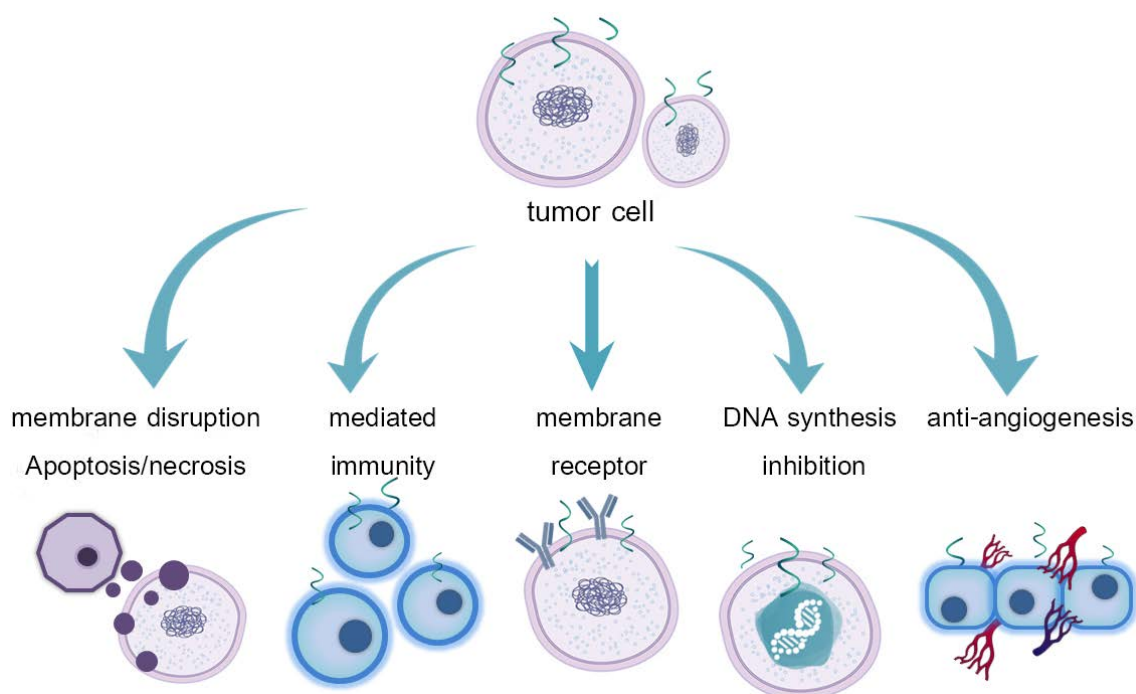
ที่มา : Reddy et al., 2004

2.6.2 การประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคมะเร็ง

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุในอันดับต้นๆ ในการเสียชีวิตของมนุษย์ จากการสำรวจผู้ป่วยโรคมะเร็งทั่วโลก พบว่ามะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นมะเร็งที่พบมากที่สุด แม้ว่าในปัจจุบันเทคโนโลยีในการรักษาโรคมะเร็งจะก้าวหน้าอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นการรักษาโดยการผ่าตัด การฉายรังสี และเคมีบำบัดบริเวณเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่เป็นมะเร็ง อย่างไรก็ตามวิธีการรักษาเหล่านี้มักประสบปัญหาและส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ทั้งความเสี่ยงในการเสียชีวิตระหว่างผ่าตัด หรือเซลล์เนื้อเยื่อปกติที่อยู่รอบเซลล์มะเร็งถูกทำลายจากการฉายรังสี หรือเคมีบำบัดจากปัญหาดังกล่าวจึงมีแนวความคิดในการค้นหาแนวทาง และวิธีการรักษาแบบใหม่มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการรักษาที่มีในปัจจุบัน แนวทางหนึ่งที่กำลังเป็นที่สนใจอย่างมากคือการประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพเนื่องจากมีความเป็นไปได้สูงที่เปปไทด์เหล่านี้จะมีกลไกการเข้าทำลายเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะไม่เกิดผลกระทบต่อเซลล์ปกติที่อยู่ล้อมรอบ เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีการแสดงประจักษ์ลักษณะเป็นลบอย่างมากบนผิวเซลล์คล้ายกับเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นจึงคาดการณ์ว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพเหล่านี้ นอกจากจะยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แล้ว อาจมีกลไกการเข้าทำลายเซลล์มะเร็งเหมือนหรือใกล้เคียงกับการทำลายเซลล์แบคทีเรีย

แต่อย่างไรก็ตามกลไกการเข้าทำลายเซลล์มะเร็งของเปปไทด์ต้านจุลชีพยังไม่มีการศึกษาพิสูจน์แน่ชัด จากข้อมูลหลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่ากลไกการทำลายเซลล์มะเร็งของเปปไทด์ต้านจุลชีพอาจเกิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membranolytic mechanism) และเซลล์เป้าหมายต่างๆ (non-membranolytic mechanism) โดยงานวิจัยของ Hilchie และคณะ ในปี พ.ศ.2554 (Hilchie et al., 2011) สนับสนุนแนวคิดนี้โดยพบว่าเปปไทด์ NRC-03 และเปปไทด์ NRC-07 มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติ และเปปไทด์

ดังกล่าวสามารถเข้าจับที่ผิวของเซลล์มะเร็งได้อย่างดีจากแรงระหว่างประจุที่ตรงข้ามกัน นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ต้านจุลชีพอีกหลายชนิด ได้แก่ เปปไทด์ SVS-I (Gaspar et al., 2012) มาเกินิน II (magainin-II) (Liu et al., 2013) และเปปไทด์ MPI ที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งโดยการสร้างรูพรุนบนผิวเซลล์มะเร็ง นอกจากกลไกการทำลายเซลล์มะเร็งโดยทำให้เกิดความเสียหายที่ผิวเซลล์แล้ว ยังพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพอีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งผ่านการตายแบบเนโครซิส (necrosis) เช่น เปปไทด์เดอมาเซปติน B2 (dermaseptin B2) (Zogge et al., 2012) และการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) เช่น เปปไทด์ RT2 เปปไทด์ KT2 และเปปไทด์ RP9 เป็นต้น เมื่อทำการเชื่อมเปปไทด์มาเกินิน II กับเปปไทด์ Antp พบว่ามีฤทธิ์ในการเข้าทำลายเซลล์มะเร็งสูงขึ้น โดยเปปไทด์ดังกล่าวสามารถเข้าจับได้กับ chondroitin sulfate ที่ผิวเซลล์มะเร็ง รวมถึงมีเปปไทด์ต้านจุลชีพบางชนิดที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ผ่านการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย หรือการยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอ โดยสามารถสรุปภาพรวมของกลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งของเปปไทด์ต้านจุลชีพได้ดังรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 กลไกการทำลายเซลล์มะเร็งของเปปไทด์ต้านจุลชีพ
ที่มา : สมปอง, 2558

2.6.3 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

นอกจากการประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อและโรคมะเร็งแล้ว เปปไทด์ออกฤทธิ์เหล่านี้มีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารด้วย โดยเฉพาะการป้องกันการเน่าเสียของอาหารที่อาจเกิดขึ้นได้จากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ช่วยในการถนอมและรักษาคุณภาพของอาหาร ตัวอย่างของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีการนำมาใช้ในการถนอมอาหาร ได้แก่ เปปไทด์กลุ่มแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เปปไทด์โนซิน และเปปไทด์พรีดิโอซิน PA-1 (prediocin PA-1) โดยเฉพาะเปปไทด์โนซิน และเปปไทด์พรีดิโอซิน PA-1 ถือได้ว่าการนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์นม

และอาหารกระป๋อง (Cleveland et al., 2001) นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้แลคโตเฟอริน โดยการใช้เป็นส่วนผสมในนมผงสูตรดัดแปลงสำหรับทารก ซึ่งแลคโตเฟอรินส่วนใหญ่ที่ทารกได้รับจะดูดซึมผ่านทางลำไส้และเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อทำหน้าที่ในการขนส่งธาตุเหล็กที่ถือว่ามีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของทารกและทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันเชื้อโรคต่างๆ ที่อาจเข้าสู่ร่างกายทารกได้

2.7 การใช้เทคนิค transcriptomic และ proteomics ศึกษาการเปลี่ยนแปลงยีนและโปรตีนในสิ่งมีชีวิต

Transcriptomics technologies เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาข้อมูลยีนทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตทั้ง RNA transcripts ทั้งหมดของเซลล์ ได้แก่ messenger RNA รวมทั้ง non-coding RNA ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนในจีโนม ซึ่งความแตกต่างของการแสดงออกและขบวนการการดัดแปลงของ RNA transcript (RNA processing) ในเซลล์ต่างชนิดและในสภาวะต่างๆ กัน เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความหลากหลายและซับซ้อนของผลผลิตของยีน ความพยายามครั้งแรกในการศึกษาทรานสคริปโตมทั้งหมดเริ่มต้นขึ้นในช่วงต้นทศวรรษ 1990 และได้มีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีตั้งแต่ปลายทศวรรษ 1990 อย่างกว้างขวาง โดยมีสองเทคนิคที่สำคัญ ได้แก่ microarrays และ RNA sequencing (RNA-Seq) การศึกษาการแสดงออกของยีนทำให้ทราบกลไกของยีนในการควบคุมการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ การศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ RNA transcript หรือ ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) มีประโยชน์อย่างมากในสิ่งที่ทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับชีววิทยาของพืช สัตว์และมนุษย์ รวมทั้งกลไกและสาเหตุของโรคต่างๆ ที่อาจจะเกิดจากเปลี่ยนแปลงของทรานสคริปโตม

2.7.1 การศึกษา transcriptomics ในสัตว์เลื้อยคลาน

Trapanese และคณะ (2017) ศึกษาทางด้านความแตกต่างของ transcriptome จาก Italian wall lizard ที่อาศัยอยู่บริเวณแผ่นดินใหญ่ และบนเกาะผลการทดลองพบ transcripts จำนวน 275,310 และ 269,885 ใน gene ontology annotation จาก Italian wall lizard ที่อาศัยอยู่บริเวณแผ่นดินใหญ่และบนเกาะตามลำดับ ในขณะที่พบจำนวน SNPs เท่ากันในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ทั้งสองแห่งดังกล่าว จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจากตัวอย่างทำให้พบยีนที่คาดว่า lizard ที่อาศัยอยู่บนเกาะน่าจะมีแนวโน้มที่จะเกิดโรค Reversed Island Syndrome (RIS) มากกว่า lizard ที่อาศัยอยู่บริเวณแผ่นดินใหญ่ โดยยีนเหล่านั้นได้แก่ Major Histocompatibility Complex class I, Immunoglobulins, Melanocortin 4 receptor, Neuropeptide Y และ Proliferation Cell Nuclear Antigen (Trapanese et al., 2017) การศึกษาของ Tosches และคณะ (2018) ศึกษาการพัฒนาเซลล์ประสาทของสมองของสัตว์ที่มีถุงน้ำคร่ำ (amniotes) ว่ามีความเชื่อมโยงกับการพัฒนาของเซลล์ประสาทของสมองของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมอย่างไร โดยการสร้างแผนที่ของการแสดงออกของยีนของเปลือกสมองจากสัตว์เลื้อยคลานสองสายพันธุ์ ผลการทดลองทางด้าน transcriptomics ระบุว่าชั้นของเซลล์ประสาทของเปลือกสมองประเภท glutamatergic neurons ของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม ถูกสร้างมาจากกระบวนการ ancestral gene-regulatory programs จากเซลล์ชนิดใหม่ ในขณะที่เซลล์ประสาทของเปลือกสมองประเภท GABAergic neurons ของสัตว์เลื้อยคลาน แสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาทของมนุษย์บางประเภทนั้นมีอยู่ในบรรพบุรุษของสมองของสัตว์ที่มีถุงน้ำคร่ำ (amniotes) Yatsu และคณะ (2016) ศึกษาความสัมพันธ์ของเพศของจระเข้สายพันธุ์ *Alligator mississippiensis* ต่อการเกิดเพศจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (temperature-dependent sex determination; TSD) ผลการศึกษาทางด้าน transcriptomics analysis ทำให้สามารถค้นพบยีน TSD ชนิดใหม่ จากตัวอย่างตัวอ่อนของ *A. mississippiensis* ที่บ่มในอุณหภูมิ 33.5 °C และ 30 °C ที่ทำให้ตัวอ่อนกลายเป็นเพศผู้และเพศเมีย

ตามลำดับ การใช้เทคนิคดังกล่าวทำให้สามารถค้นพบความเชื่อมโยงกันระหว่างจีโนมของจระเข้สายพันธุ์ *A. mississippiensis* (American alligator) *Crocodylus porosus* (จระเข้แม่น้ำเค็ม) และ *Gavialis gangeticus* (Indian gharial) ที่วิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษประเภทกิ้งก่า (archosaurs) (Green et al., 2015) นอกจากนี้ Sarker และคณะ (2017) ได้ใช้เทคนิค transcriptomic ในการอธิบายประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกัน แต่กำเนิดของจระเข้เมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัส ผลการทดลองโดยสรุปชี้ว่าเซลล์ของจระเข้มีกลไกการควบคุมการติดเชื้อไวรัส โดยใช้ mammalian TLR และ cytosolic antiviral RNA signaling pathways ซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มการผลิตยีน type I interferon (IFN-omega) ซึ่งเป็น interferon ที่ใช้ต้านไวรัส

2.7.2 การนำข้อมูล transcriptomics ของสัตว์เลื้อยคลานไปใช้ประโยชน์

การศึกษาสัตว์เลื้อยคลานในแง่ของความหลากหลายทางชีวภาพและความซับซ้อนของสายพันธุ์มีประโยชน์อย่างมากในการทำความเข้าใจถึงหน้าที่ ลักษณะทางกายภาพ รวมถึงกลไกในการแสดงออกทางด้านภูมิคุ้มกัน และระยะเวลาในการเกิดการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Burke et al., 2002; Green et al., 2015; Sarker et al., 2017) Trapanese และคณะ (2017) พบว่าการเกิดโรค Reversed Island Syndrome (RIS) ของ Italian wall lizard ที่อาศัยอยู่บนเกาะนั้นมีแนวโน้มมากกว่า lizard ที่อาศัยอยู่บนแผ่นดินใหญ่ ซึ่งสาเหตุดังกล่าวมาจากการแสดงออกของ melancortin receptor genes ในปริมาณมากกว่า ซึ่งส่งผลสัมพันธ์กับการที่ Italian wall lizard ที่อาศัยอยู่บนเกาะมีอัตราการกินอาหาร ความดุร้าย และความสามารถในการแพร่พันธุ์ที่สูงกว่า Italian wall lizard ที่อาศัยอยู่บนแผ่นดินใหญ่ นอกจากนั้นข้อมูลทางด้าน transcriptomics ยังถูกนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ของสัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย Tosches และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษา transcriptomics จาก single-cell ในตัวอย่างเปลือกสมองของเต่า lizard หู และมนุษย์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าบางส่วนของสมองส่วน hippocampus จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีอยู่ในสมองของสัตว์เลื้อยคลาน ไม่เพียงเท่านั้นสัตว์เลื้อยคลานหลายกลุ่มยังเกิดเพศผู้หรือเมียตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ใช้ในการฟักตัว (temperature-dependent sex determination; TSD) ดังนั้น การศึกษาทางด้าน transcriptomics ยังทำให้เข้าใจภาพรวมที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนแบ่งเพศในระหว่างการฟักตัวของสัตว์เลื้อยคลานบางประเภทอีกด้วย (Yatsu et al., 2016)

2.7.3 การศึกษา transcriptomics ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีวิวัฒนาการจากการอาศัยอยู่ในน้ำขึ้นมาอาศัยอยู่บนบก ทำให้สัตว์จำพวกนี้สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำและบนบก ดังนั้นวิวัฒนาการที่ยาวนานในระดับโมเลกุลของสัตว์กลุ่มนี้จึงมีความน่าสนใจ ซึ่งเทคนิค transcriptome เป็นเครื่องมือหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ศึกษาเพื่อเข้าใจในวิวัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก การศึกษาพบว่ามีการใช้ transcriptome ในการศึกษาในเนื้อเยื่อต่างๆ (สมอง ม้าม กล้ามเนื้อ, ตับ, รังไข่, อัณฑะ) ในคางคกยักษ์ออสเตรเลีย Cane toads (*Rhinella marina*) เพื่อใช้อธิบายวิวัฒนาการและการปรับตัวคางคกยักษ์ออสเตรเลีย (Richardson et al., 2018) มีการใช้ transcriptome เพื่ออธิบายเปรียบเทียบความสามารถในการปรับตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มเดียวกัน ซึ่ง transcriptome สามารถอธิบายได้ว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ปรับตัวได้ดีมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ปรับตัวได้ไม่ดีอย่างชัดเจน (Yang et al., 2016)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ transcriptome เพื่อการอธิบายระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอย่างแพร่หลาย ซึ่งพบว่ามีการศึกษาศึกษาเปรียบเทียบ transcriptome ของผิวหนังในกบ 3 กลุ่ม ได้แก่ Megophryidae (*M. sangzhiensis* และ *L. boringii*) Rhacophoridae (*P. megacephalus*, *R.*

dennysi และ *R. omeimontis*) และ Ranidae (*O. margaretae* และ *P. nigromaculatus*) ผลการศึกษาพบว่า สามารถอธิบายถึงกลไกทางชีวภาพพื้นฐานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้เป็นอย่างดี เช่น ระบบป้องกันตัว ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบการหายใจ ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีนต่างของสปีชีส์ภายในกลุ่มเดียวกันมีความเหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม และที่สำคัญการศึกษายังค้นพบเปปไทด์ยับยั้งแบคทีเรียอีกด้วย (Huang et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบ transcriptome ของชาลาแมนเดอร์ยักษ์จีน (*Andrias davidianus*) คางคก (*Bufo gargarizans*) และเขียด (*Rana nigromaculata*) ข้อมูลของ transcriptome ของผิวหนังสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแสดงให้เห็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ของผิวหนัง เช่น กระบวนการเมตาบอลิซึมและระบบภูมิคุ้มกัน และที่มากกว่านั้นยังพบเปปไทด์ยับยั้งแบคทีเรียถึง 26 กลุ่ม (ตารางที่ 2.8) ซึ่งเปปไทด์กลุ่ม Liver-expressed antimicrobial peptide 2 แสดงประสิทธิภาพได้ดีอย่างยิ่งในการยับยั้งแบคทีเรีย (Fan et al., 2017)

ตารางที่ 2.8 แสดงระดับการแสดงออกของ putative AMPs ในผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

Description	FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)		
	<i>A. davidianus</i>	<i>B. gargarizans</i>	<i>R. Hallowell</i>
Amolopin-9LF1	0.85	NF	499.08
Andersonin-9 antimicrobial peptide precursor	NF ^a	4.92	7.23
Andersonin-U1	NF	NF	0.59
Brevinin-1Ed	13.84	13.75	8954.91
Brevinin-2Rc	NF	NF	9.47
Cathelicidin-OH antimicrobial peptide-like	1396.72	1.55	0.74
Esculentin-1A	30.81	12.71	17936.24
Esculentin-1a/b	NF	NF	0.94
Esculentin-2P	29.42	18.92	18173.85
Histone 2A	228.44	124.83	109.37
Liver-expressed antimicrobial peptide 2	2.4	0.69	4.55
Lividin-8	NF	1.4	1732.92
Macrotympainin-E1	NF	NF	18.92
Nigroain-A	NF	NF	456.92
Nigrocin-1	21.65	1.77	5760.43
Odorranain-C7 antimicrobial peptide precursor	NF	0.74	393.16
Odorranain-M1	1.53	NF	475.86
Odorranain-M2	NF	14.07	NF
Odorranain-P2a	NF	NF	0.64
OHTI precursor	NF	NF	3081.13
Palustrin-2GN1 antimicrobial peptide	NF	NF	1.67

Description	FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)		
precursor			
Palustrin-CU-A1	NF	NF	124.15
Pelophylaxin-2	8.97	0.79	10851.88
Proteinase inhibitor PSKP-1	6254.12	8.15	6.65
Ranacyclin Cc	5.75	6.74	NF
Skin peptide tyrosine-tyrosine	0.57	NF	1.74

^a: not found. (Fan et al., 2017)

นอกจากนี้เทคนิค transcriptome ยังถูกใช้ศึกษาเพื่ออธิบายระบบภูมิคุ้มกันระหว่างกบที่ง่ายต่อการติดเชื้อรา *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) และต้านทานการติดเชื้อ เมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อในกบ พบว่ากบที่ไม่ต้านทานต่อการติดเชื้อคือ กบไม้ (*Rana sylvatica*) จะมีการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดเพิ่มขึ้นและมีการลดลงของเมตาบอลิซึมและองค์ประกอบภายในเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดที่ด้อยประสิทธิภาพของกบไม้ (*Rana sylvatica*) ที่ส่งผลให้การสูญเสียหน้าที่ของระบบต่างๆ (physiological dysfunction) ในขณะที่สายพันธุ์ที่ต้านทานการติดเชื้อคือ กบอเมริกันบูลฟร็อก (*Rana catesbeiana*) พบการเปลี่ยนแปลงของยีนในระบบภูมิคุ้มกันเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดที่มีประสิทธิภาพ (Eskew et al., 2018) นอกจากนี้แล้วชาลาแมนเดอร์ยักษ์จีน (*Andrias davidianus*) ยังถูกนำมาศึกษาผลของการติดเชื้อแบคทีเรีย (*Aeromonas hydrophila*) ซึ่ง transcriptome สามารถใช้อธิบายกลไกของระบบภูมิคุ้มกันระหว่างการติดเชื้อทั้งที่เป็นระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังได้อย่างดีอีกด้วย (Qi et al., 2015)

2.7.4 การศึกษา proteome ในสัตว์เลื้อยคลาน

การศึกษาโปรตีโอมในน้ำพิษของงูพิษ ถือเป็นสิ่งสำคัญในแง่การแพทย์ เนื่องจากผู้ที่ถูกงูพิษกัดมักนำไปสู่การเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันได้ ดังนั้นการเข้าใจถึงองค์ประกอบของพิษ จะทำให้ทราบถึงกลไกการเกิดพิษและหาแนวทางในการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการรวบรวมงานวิจัยในพิษงูของ Tasoulis และ Isbister (2017) ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาพบงูที่มีพิษทั้งหมด 132 สปีชีส์ แบ่งเป็น 42 สปีชีส์ จาก 360 สปีชีส์ ในวงศ์พิษเขี้ยวหน้า (Elapidae) 20 สปีชีส์ จาก 101 สปีชีส์ ในวงศ์ย่อยงูแมวเซา (Viperinae) 65 สปีชีส์ จาก 239 สปีชีส์ ในวงศ์ย่อยงูหางกระดิ่ง (Crotalinae) และอีก 5 สปีชีส์ในกลุ่มที่ไม่มีเขี้ยวคู่หน้า (non-front-fanged) จากการศึกษาโปรตีนโดยใช้เทคนิคเช่น reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) และ mass spectrometry (MS) พบว่าประมาณร้อยละ 90 ของพิษงูประกอบด้วยโปรตีน 8 กลุ่มสำหรับวงศ์พิษเขี้ยวหน้า โปรตีน 11 กลุ่มสำหรับวงศ์ย่อยงูแมวเซา และโปรตีน 10 กลุ่มสำหรับวงศ์ย่อยงูหางกระดิ่ง ซึ่งพบโปรตีน 4 กลุ่มที่มีความสำคัญได้แก่ phospholipase A₂ (พบมากที่สุดในกลุ่มที่มีเขี้ยวคู่หน้า) metalloproteases serine proteases และ three-finger toxins จากการศึกษาโปรตีนดังกล่าวทำให้ได้ข้อจำกัดของโปรตีนในพิษงูและสามารถพัฒนายาต้านพิษได้ในอนาคต การศึกษาโปรตีโอมในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มกิ้งก่าเป็นไปเพื่อหาสารชีวภาพจำพวกโปรตีนหรือเปปไทด์นำมาใช้ในการบำบัดหรือรักษาโรคในมนุษย์ นอกจากนี้ยังใช้เป็นต้นแบบเพื่อออกแบบและค้นพบยาในการรักษาพิษที่เกิดจากสัตว์ชนิดนี้ จากการศึกษาของ Fry และคณะ (2010) ได้ค้นพบโปรตีนพิษ (venom protein) ชนิดใหม่ในกิ้งก่าลูกปิด

(Beaded lizard) และกิล่ามอนสเตอร์ (Gila monster) ในสกุล *Heloderma* ทำให้ทราบถึงวิวัฒนาการทางโมเลกุลของโปรตีน และบทบาทสำคัญของพิษ และจากการศึกษาของ Lozito และ Tuan (2017) ได้หาโปรตีนสำคัญในทางของกิ้งก่าที่สามารถสร้างเนื้อเยื่อมาทดแทนที่ถูกทำลายหรือสูญหาย ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการสมานแผลในมนุษย์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโปรตีนในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มเต่า (Testudine) Smith และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาโปรตีนในสมองของเต่า *Chrysemys picta bellii* ที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจน พบว่ามีการลดลงของโปรตีน creatine kinase hexokinase glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และ pyruvate kinase ซึ่งเป็นการตอบสนองของระบบประสาท การค้นพบนี้อาจใช้เป็นแบบจำลองการเกิดความเสียหายในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมเช่นกัน

2.7.5 การศึกษา proteome ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานเป็นสัตว์ที่มีวิวัฒนาการมาอย่างยาวนาน โดยที่สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นเป็นสัตว์กลุ่มแรกที่มีวิวัฒนาการขึ้นมาอาศัยอยู่บนบก ซึ่งยังคงมีร่องรอยของการวิวัฒนาการ เช่น ต้องมีแหล่งอาศัยที่อยู่ใกล้บริเวณของแหล่งน้ำหรือบริเวณที่ชื้นแฉะ มีการจับคู่แล้วมีการผสมพันธุ์ใกล้แหล่งน้ำ ทำการวางไข่ในน้ำ และตัวอ่อนยังคงอาศัยอยู่ในน้ำ เป็นต้น สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะพบได้ในเขตร้อนและสามารถดำรงชีวิตในเขตที่แห้งแล้งเนื่องมาจากผิวหนังที่หนาที่มีการป้องกันความร้อนได้ แต่อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมก็มีผลต่อการแพร่กระจายของสัตว์เหล่านี้ คือ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะมีการใช้ผิวหนังในการแลกเปลี่ยนก๊าซจึงหลบเลี่ยงบริเวณที่มีอากาศเย็น โดยพยายามที่จะทำการหลบซ่อนในบริเวณที่มีความชื้นสูงเมื่อเข้าสู่สภาวะจำศีล (hibernation) (กาญจน์ และอาตุลย์ , 2016) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะมีช่วงชีวิตที่ประกอบด้วยช่วงของลูกอ๊อด (ระยะอ่อน) และช่วงโตเต็มวัย และมีการเปลี่ยนจากช่วงของระยะลูกอ๊อดไปเป็นระยะโตเต็มวัยที่เรียกว่า การเปลี่ยนแปลงลักษณะหรือรูปร่าง (metamorphosis) ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างนั้นจะมีการควบคุมด้วยฮอร์โมนไทรอยด์ (thyroid hormone) (Thekkiniath J, et al., 2015) จากการศึกษาในการติดเชื้อราที่ชื่อว่า *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) จะมีการส่งผลต่อการกินอาหารของลูกอ๊อดเนื่องมาจากการติดเชื้อราชนิดนี้นั้นไม่ส่งผลทำให้ตาย แต่การศึกษามีการรายงานถึงการตายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเกิดขึ้นเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นจากการติดเชื้อ Bd นอกจากนี้ในการติดเชื้อ Bd นั้นได้มีการแสดงออกถึงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีการตอบสนองต่อเชื้อโรค จากการศึกษาล่าสุดได้แสดงถึง Bd subtilisin-like serine protease มีการทำลายต่อเปปไทด์ที่ต่อต้านจุลชีพ ซึ่งอาจทำให้เกิดการไวต่อเชื้อราชนิดนี้ ตัวเชื้อรา Bd จะมีการตอบสนองต่อการได้รับฮอร์โมนไทรอยด์จากโฮสต์ในการศึกษาด้าน proteome ได้มีการทดลองภายในหลอดทดลอง (*in vitro*) ต่อการตอบสนองต่อเชื้อรานี้กับฮอร์โมนไทรอยด์ (T3) และการใช้การศึกษาด้าน proteomics และการศึกษาทางด้าน phenotype เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อรา Bd นี้ต่อการเกิดโรคในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Thekkiniath J, et al., 2015) ในการศึกษาด้าน proteomics ในเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ถึงการทำให้เกิดโรคทางด้านพยาธิสภาพของเชื้อรา เช่น เชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าและเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าและเหี่ยวเฉาและในเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในมนุษย์ เช่น เชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้มีการแสดงถึงการศึกษาด้าน proteomics ในความสำคัญของโปรตีนที่มีการเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนจากการกระจายตัวจากบริเวณผิวหนังเข้าไปในร่างกายของมนุษย์ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคได้ (hyphal-yeast transitions) (Thekkiniath J, et al., 2015)

ยีนในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังจะมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน และสามารถตรวจสอบถึงความหลากหลายของเชื้อโรคที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งในธรรมชาติในภูมิคุ้มกันจะมียีนที่ต้านจุล

ชีพในรูปแบบของการป้องกันในด้านแรก (first line defense) ที่ด้านการเกิดต่อเชื้อจุลชีพที่ก่อพิษ ส่วนของชั้นผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงศ์ Pipidae, Hylidae, Hyperoliidae, Pseudidae และ Ranidae จะมีการสังเคราะห์และหลั่งเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพออกมา ที่มีลำดับกรดอะมิโนความยาวประมาณ 10-50 ตัว มีการหลั่งสารเหล่านี้ออกมาสู่ชั้นผิวหนังภายนอกเพื่อที่จะทำการป้องกันในการทำลายเชื้อจุลชีพอย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการต้านกับจุลชีพที่เป็นอันตราย (Jianxu et al., 2007) มีการศึกษาเกี่ยวกับเปปไทด์จากกบในสกุล *Rana* ที่มีมากกว่า 250 สปีชีส์ และกระจายอยู่ในพื้นที่ของตอนใต้ของทวีปอเมริกาใต้และพบมากในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งเปปไทด์ที่ต้านเชื้อจุลชีพจำนวนประมาณ 160 ชนิดนั้นได้มีการค้นพบขึ้นมา และกบในวงศ์ Ranidae มีการพบเปปไทด์ที่ต้านจุลชีพมากกว่า 20 ชนิด ซึ่งกบในวงศ์นี้ได้มีการสังเคราะห์สารและได้ทำการหลั่งสารออกฤทธิ์ (multiple active components) ตัวอย่างจากกรณีศึกษาในกบ *Rana palustris* พบว่ามีเปปไทด์ที่ต้านเชื้อจุลชีพจำนวน 22 ชนิดเป็นของ 8 กลุ่มที่แตกต่างกันที่พบในบริเวณของผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดนี้ ตัวอย่างเช่น ขนาดของเปปไทด์ที่แตกต่างกัน (size) ประจุ (charge) ความมีขี้ (hydrophobicity) โครงสร้างของเปปไทด์ (conformation) และ spectrum of action จากพื้นฐานของการค้นพบ จะมี 20-30 เปปไทด์ที่ต้านจุลชีพที่มีในกลุ่มของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเหล่านี้ที่มีการพัฒนามาจากกบในวงศ์ Ranidae (Jianxu et al., 2007)

2.7.6 การประยุกต์ใช้งานทางด้านทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics applications)

การศึกษาทางด้านทรานสคริปโตมิกส์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิจัยทางด้านชีวการแพทย์อย่างกว้างขวาง รวมถึงการวินิจฉัยและการจัดทำข้อมูลของโรคต่างๆ โดยการศึกษาทางด้านทรานสคริปโตมิกส์เป็นการศึกษาในวงกว้างในการถอดรหัสอาร์เอ็นเอทั้งหมดภายในเซลล์ รวมทั้งตัวควบคุม และทราบกลไกต่างๆ ที่สำคัญในการเกิดโรคและนำไปสู่ความเข้าใจในการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดโรคนั้นๆ นอกจากนี้การศึกษาด้านทรานสคริปโตมิกส์ยังสามารถระบุโรคที่เกี่ยวข้องกับ single-nucleotide polymorphism และการแสดงออกของอัลลีลที่จำเพาะที่จะทำให้เข้าใจถึงสาเหตุของโรคได้ (Lowe et al., 2017) และการศึกษาทางด้านทรานสคริปโตมิกส์ของเซลล์ที่มีสถานะเป็นโรคก็สามารถนำไปสู่การค้นพบยีนที่มีการแสดงออกที่สัมพันธ์กับโรคนั้นๆ ซึ่งเมื่อทำการศึกษาถึงหน้าที่และบทบาทของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการกำเนิดของโรคอาจนำไปสู่การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยหรือการพยากรณ์โรคที่ดีและแม่นยำขึ้น และการพัฒนายาเพื่อการป้องกันและรักษาโรคได้ การศึกษาของ Ruifang Li และคณะ (2018) ได้มีการนำเทคนิคด้านทรานสคริปโตมิกส์มาใช้ในการศึกษาการคาดการณ์การเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดและไม่เกิดโรควั่น ซึ่งทำให้ผู้วิจัยทราบถึงกลไกในเชิงลึกในการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งของโรควั่นและการศึกษาของ Anita Annese และคณะ (2018) ได้นำเทคนิคทรานสคริปโตมิกส์มาใช้ในการสร้างข้อมูลหรือ transcriptome profiling ของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่ทำให้ได้แหล่งของข้อมูลในเชิงลึกของการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลจนนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ของผู้ป่วย เป็นต้น

2.7.7 การประยุกต์ใช้งานทางด้านโปรตีโอมิกส์ (proteomics applications)

การศึกษาโปรตีโอมิกส์ถือเป็นเทคนิคที่มีความนิยมในการศึกษาอย่างแพร่หลายเพื่อประโยชน์ในเชิงวิชาการ การแพทย์ รวมไปถึงเชิงอุตสาหกรรม ในการเข้าใจถึงกลไกความสำคัญของระบบในสิ่งมีชีวิตและการนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะในทางการแพทย์ (medical applications) เนื่องจากการศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์สามารถบอกถึงการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกลไกหนึ่งๆ ต่อสภาวะหรือปัจจัยที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับปัจจัยนั้น เช่น เกิดการติดเชื้อ

(infection) เป็นโรค (disease) หรือการเกิดสภาวะเครียด (stress) เป็นต้น ซึ่งแนวโน้มการวิจัยทางโปรตีโอมิกส์ในปัจจุบันได้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการเกิดโรคต่างๆ เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรคนั้นๆ หรือที่เรียกว่า “protein marker” เพื่อใช้จำแนกลักษณะของการเป็นโรคต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังใช้ในการหาโปรตีนที่มีความเสถียรสูงต่อการนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคในอุตสาหกรรมยาทางเภสัชกรรม (pharmaceutical industry) อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาโปรตีโอมิกส์ในสิ่งมีชีวิตจึงมีความสำคัญและมีความจำเป็นอย่างมากต่อการพัฒนาและต่อยอดองค์ความรู้ดังกล่าวเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

หากกล่าวถึงวิทยาศาสตร์การแพทย์ในปัจจุบัน การรักษาโรคที่อาศัยการเข้าใจของระบบหรือกลไกการเกิดโรคนั้นถือเป็นเรื่องที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก นอกจากจะช่วยให้เกิดความรวดเร็วในการวินิจฉัยแล้วยังสามารถเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์ และช่วยในการวางแผนเพื่อรักษาโรคที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยได้ ดังนั้นการศึกษาโปรตีโอมิกส์เพื่อให้เข้าใจถึงกระบวนการนั้นจึงเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในแง่ของการรักษา (Liumbruno, 2008) และมีการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของโรคหลากหลายชนิดทั้งแบบติดต่อและไม่ติดต่อ เพื่อใช้ในระบุชนิดของโรคในทางการแพทย์ เช่น โรคหลอดเลือดสมอง (stroke and vascular disease) โรคมะเร็ง (cancers) โรคเบาหวาน (diabetes) โรคเอดส์ (human immunodeficiency virus) โรคเริม (herpes simplex virus) โรคทูลารีเมีย (*Francisella tularensis* infection) และความผิดปกติของระบบสมองส่วนกลาง (central nervous system disorders) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้โปรตีโอมิกส์ทางเวชศาสตร์บริการโลหิต (Transfusion medicine) ในการศึกษาผิวของเม็ดเลือดแดง (erythrocyte membrane protein) ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเม็ดเลือดแดงรูปเคียว (Sickle cell disease) เพื่อใช้ในการจำแนกการเกิดโรคชนิดนี้ ซึ่งพบว่ามีลำดับโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันถึง 44 รูปแบบ จากลำดับของโปรตีนดั้งเดิมทั้ง 22 รูปแบบ (Kakhniashvili et al., 2005) ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปศึกษาถึงความเชื่อมโยงของโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนต่อกลไกการส่งสัญญาณบน receptor ได้ รวมไปถึงสามารถบอกลักษณะที่แตกต่างกันของผิวเม็ดเลือดแดงเมื่อเกิดการติดเชื้อมาลาเรีย (malaria-infected RBCs) ได้อีกด้วย (Florens et al., 2004) จากที่กล่าวไปข้างต้นว่านอกจากจะมีการศึกษาเพื่อระบุชนิดของโรคแล้ว ยังมีการศึกษาเพื่อใช้ในทางเภสัชกรรมในการสร้างตัวยาที่ออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยจากโปรตีนของสิ่งมีชีวิต ที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านต่อปัจจัยที่ทำให้เกิดการสูญเสียหรือทำลายเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งโดยส่วนมากจะมีการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ต่อการต้านเชื้อหรือกำจัดสิ่งแปลกปลอม แล้วนำโปรตีนที่มีการแสดงออกเมื่อเกิดการติดเชื้อมาประยุกต์ใช้ในการผลิตยา เนื่องจากธรรมชาติทางชีวภาพและและสรีระวิทยา มีความแตกต่างจากของมนุษย์ อีกทั้งสัตว์แต่ละชนิดก็มีระบบภูมิคุ้มกันหรือการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันถึงเมื่อเกิดการติดเชื้อ ยกตัวอย่างเช่น การติดเชื้อ *Mycobacterium bovis* ที่มีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนและเป็นเชื้ออันตรายต่อชีวิต หรือที่มักถูกเรียกกันว่าที่ “วัณโรค” ซึ่งการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละประเภทจะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของระบบภูมิคุ้มกันและความสำคัญของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรคได้ และสามารถนำโปรตีนเหล่านั้นมาศึกษาคุณสมบัติและพัฒนาเป็นวัคซีนหรือยาป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทำให้จระเข้สยามติดเชื้อ

A. hydrophila ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Nutrient Broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อประมาณ 1 % ใส่ในอาหาร NB ใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่งค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนเชื้อโดยประมาณ 1×10^9 cells/ml (Reyes-Becerril et al., 2016) จากนั้นแบคทีเรียถูกแบ่งใส่หลอด micro tube ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 1 ml ทำการปั่นเพื่อล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4) 2 ครั้ง สารละลายเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ถูกฉีดเข้าเส้นเลือดจระเข้หรือ inoculation โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญประจำฟาร์ม ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้จระเข้สยาม อายุประมาณ 4 ปี จากบริษัทศรีราชา โมต้า ฟาร์ม จำกัด จังหวัดชลบุรี ตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บก่อนการฉีดเชื้อและหลังฉีดเชื้อ 1 และ 24 ชั่วโมง โดยจะทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดจระเข้ทั้งปริมาณเม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยเครื่อง hemocytometer และทำการเก็บแยกส่วนประกอบของเลือด (เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง ซีรัม และพลาสมา)เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีนด้วยเทคนิคทรานสคริปโตมิกส์ (RNA-Seq)

เซลล์เม็ดเลือดจากเลือดทั้งหมด (whole blood) ถูกสกัด RNA ด้วยชุดสกัดจาก TRIzol™ โดยขั้นตอนการสกัดได้ระบุในฉลากของบริษัท เมื่อได้ total RNA จากนั้นเติม DNAase เพื่อทำลาย DNA ที่อาจจะเป็นอุปสรรคระหว่างขั้นตอนการสกัด RNA แล้วตรวจสอบคุณภาพก่อนที่จะทำ RNA-seq โดยใช้เครื่อง nanodrop spectrophotometer และ Agarose gel electrophoresis จากนั้น RNA ถูกสร้างเป็น cDNA และถูกตัดให้สั้นลงและเชื่อมด้วยตัวเชื่อมต่อ (adapter) ที่ทราบลำดับเบส แล้วทำการแยก cDNA ออกเป็นเส้นเดี่ยว แล้วจึงประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้ด้วยเครื่อง Agilent2100Bio Analyzer นำดีเอ็นเอสายเดี่ยวตรึงบนเมตบีดที่มีไพรเมอร์ที่จำเพาะ โดยดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับอะแดปเตอร์นับเป็นหนึ่งโมเลกุล ซึ่งหนึ่งโมเลกุลนี้จะจับอยู่กับเมตบีดหนึ่งเม็ดเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหยดน้ำมันที่มีสารสำหรับทำพีซีอาร์อยู่ภายใน เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว ในหนึ่งหยดน้ำมันจะมีดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมือนกันเป็นล้านชุดติดอยู่ที่เมตบีด ซึ่งจะนำไปหาลำดับเบสต่อไป ในการหาลำดับเบสใช้วิธีที่เรียกว่า sequencing by synthesis เพื่อหาลำดับเบสดีเอ็นเอ โดยใช้เอ็นไซม์ DNA polymerase ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอสายเดี่ยวให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ เริ่มต้นด้วยการนำดีเอ็นเอที่ติดด้วยเมตบีด ใส่ลงใน PicoTiterPlatetm (PTP) ซึ่ง PTP ประกอบด้วยหลุม โดยหนึ่งหลุมสามารถบรรจุปริมาตรทั้งหมดได้ 75 picoliters และบรรจุได้เพียงเมตบีดเดียวเท่านั้น ดังนั้นหนึ่งเมตบีดจึงเทียบได้กับหนึ่ง reads หลังจากการบรรจุเมตบีดข้างต้นแล้ว ใส่ PTP เข้าเครื่อง 454/Roche ซึ่งเครื่องจะเติมสารละลายต่างๆ รวมถึงเบส A, T, C, G แบบอัตโนมัติโดยเทมนิวคลีโอไทด์เข้าไปทีละตัว ตัวที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบเท่านั้นจึงจะจับและเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่นิวคลีโอไทด์ตัวอื่นก็จะถูกล้างออกไป จากนั้นเมื่อมีการต่อสายดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ DNA polymerase จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางปฏิกิริยาเคมี ซึ่งจะมีการปลดปล่อยสารไพโรฟอสเฟต (PPi) และเอ็นไซม์ sulfurylase จะทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงสารไพโรฟอสเฟต ด้วยการทำปฏิกิริยากับ adenosine 5'-phosphosulfate (APS) ได้พลังงาน ATP ออกมาจากนั้น เอ็นไซม์ luciferase จะใช้พลังงาน ATP เป็นสารตั้งต้นและใช้ luciferin ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร oxyluciferin ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยแสงเป็นสัญญาณออกมา แสงจะถูกบันทึกด้วย CCD camera โดยสัญญาณแสงที่ปลดปล่อยออกมาจะบ่งชี้ถึงสัดส่วนของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ ซึ่งโปรแกรม

จะสร้างกราฟแสดงความเข้มข้นของแสงที่อ่านได้ในแต่ละนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า Flow gram ของแต่ละหลุมที่อยู่ใน PTP นั้น เพื่อทำนายการตอบสนองของจระเข้เมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียและระบุชื่อและหน้าของ unigene 7 ฐานข้อมูลถูกใช้เพื่อระบุชื่อและจัดกลุ่ม unigene ประกอบด้วย NR (NCBI non-redundant protein sequences), GO (Gene Ontology), KOG (euKaryotic Orthologous Groups), KO (KEGG Orthology), Pfam (Protein family) ค่า Read count จากการวัดการแสดงออกของยีน ถูกใช้เพื่อคำนวณและระบุยีนที่แสดงออกแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา โดยถูกแสดงเป็น Volcano plots โดยค่าแสดงออกที่ $\log_2(\text{Fold Change}) > 1$ แสดงว่า เป็นยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นและ < -1 แสดงว่ายีนนั้นแสดงออกลดลง ที่ค่า $q\text{-value} < 0.005$ และได้แสดงจำนวนของ unigene ที่เปลี่ยนแปลงในรูป Venn diagram The threshold was normally set as: $[\log_2(\text{Fold Change})] > \text{or} < 1$ and $q\text{-value} < 0.005$ โดยอาศัยฐานข้อมูล ของ KEGG pathway เพื่อระบุและทำนายกลไกการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียในจระเข้ผ่านการเปรียบเทียบ KEGG โดยจะระบุ 20 pathway แรกที่มีจำนวนมากที่สุด

3.3 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวและซีรัมสำหรับการศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วยเทคนิค proteomics

ทำการเก็บเลือดจากจระเข้ใส่ในหลอดปลอดเชื้อ 15 ml ที่เคลือบด้วย 0.89% EDTA แล้วตั้งไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้ พลาสมา เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงแยกชั้น จากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตที่สะอาดดูดชั้นเม็ดเลือดขาวใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้เม็ดเลือดขาวที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยดูดส่วนที่เป็นพลาสมาและเม็ดเลือดแดงออก ส่วนการแยกเก็บซีรัมจระเข้ทำได้โดยนำเลือดจระเข้ที่ไม่ได้ผสมกับ EDTA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้เกิดการแยกกันระหว่างซีรัมกับตะกอนของเลือด ใช้ sterilized pastures pipette ดูดแยกส่วนที่เป็นซีรัมซึ่งเป็นส่วนของเหลวที่มีการแยกตัวออกมาจากตะกอนเลือดเก็บไว้ และทิ้งส่วนที่เป็นตะกอนเลือดไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000xg นาน 10 นาที ดูดเก็บเอาส่วนที่เป็นของเหลวไว้ว่าซีรัมไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากเม็ดเลือดขาวและซีรัมเพื่อวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนด้วย SDS-PAGE

เติม lysis buffer ซึ่งมีส่วนประกอบคือ 1 % SDS in 50 mM Tris-HCl pH 6.8 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและซีรัม จากนั้นบดโดยใช้เครื่อง homogenizer แรงในการทำให้โปรตีนเนื้อเดียวกันคือ Amplitude = 80% สองครั้ง ครั้งละ 10 วินาที โดยโปรตีนถูกตกตะกอนด้วย อะซิโตนแช่เย็น ที่ผสม 10 (w/v) % trichloroacetic (TCA) และ 0.07 (v/v) % β -mercaptoethanol แล้วแช่ไว้ที่ -20 °C อย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงสารละลายโปรตีน ที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนตะกอนโปรตีน แล้วล้างตะกอนโปรตีนอีกสองครั้ง ด้วย 50 mM Dithiothreitol (DTT) ในอะซิโตนแช่เย็น ตะกอนโปรตีนถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วละลายกลับด้วย 0.1% RapidGest SF surfactant ใน 20 mM Ammonium bicarbonate โปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและซีรัมถูกแยกออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกนำไปวิเคราะห์ proteomics แบบ gel-free proteomics ส่วนที่สอง ตรวจสอบแบบแผนลักษณะโปรตีนและเปปไทด์โดยการแยกด้วย 4-20% gradient SDS-PAGE โดยความเข้มข้นของโปรตีนถูกวัดด้วย Micro BCATM protein assay kit (Thermo Scientific, USA) โดยใช้ Bovine Serum Albumin, Factor V (Sigma, USA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (0-40 $\mu\text{g/ml}$)

3.5 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ trypsin เพื่อระบุชนิดโปรตีนและคำนวณหาปริมาณการแสดงออกของโปรตีน

การทำ in-solution digestion ถูกดัดแปลงตามวิธีของ E-Kobin et al. (2016) โดยทำการเติม 1 mg โปรตีนลงใน 5 mM Dithiothreitol (DTT), 10 mM ammonium bicarbonate ที่ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำลายพันธะ disulfide และทำให้เกิด alkylation ด้วย 15 mM Iodoacetamide (IAA) ใน 10 mM ammonium bicarbonate อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด หลังจากนั้น ตัดโปรตีนให้เป็นเส้นๆ ด้วย trypsin (Promega, Germany); ในอัตราส่วน 1 ng ของ trypsin และ 50 ng ของโปรตีน ที่ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นทำให้สารละลายโปรตีนที่ตัดแห้ง แล้วละลายกลับด้วย 0.1% formic acid แล้วเอาเกลือออกด้วยคอลัมน์ C18-ZipTip (Metler, UK) จากนั้นชะสารในคอลัมน์ออกด้วย 15-60% Acetonitrile/0.1%formic acid แล้วฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS spectrometer (NanoAcquity system)

3.6 คำนวณปริมาณโปรตีนด้วย tandem mass spectroscopy (SynaptHDMS)

เปปไทด์ที่ย่อยแล้วถูก เติม H^+ ด้วย formic acid แล้วฉีดเข้า NanoAcquity system (Waters Corp., Milford, MA) โดยใช้คอลัมน์ C_{18} 5 μm , 180- $\mu m \times 20$ -mm Trap column และ BEH-130 C_{18} 1.7 μm , 100- $\mu m \times 100$ -mm ซึ่งเป็น reversed phase column (Waters Corp., Milford, MA) ใช้อัตราการไหลของสาร 400 nL/min รอบแรกชะด้วย 0.1 % formic acid และครั้งที่ 2 ชะด้วย 100 % Acetonitrile ใน 0.1 % Formic acid โดยใช้ quadrupole เป็นตัววัดน้ำหนักของไอออน ในการวัดปริมาณ intensity เพื่อบอกปริมาณโปรตีนที่แสดงออก จะใช้ DeCyder™ MS 2.0 ซอฟต์แวร์ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสัญญาณ น้ำหนัก/ประจุ ไปเป็น generic format (.mgf) ซึ่งจะถูกเทียบกับฐานข้อมูล NCBI-nr database (update August 07, 2015) โดยใช้ MASCOT algorithm (Matrix Science version 2.2, London, UK) ของ Bruker Daltonics BioTools 2.2 software (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ดังนี้ 1) ตัดด้วยเอนไซม์ trypsin 2) modification with carbamidomethyl Deamidation (NQ), Oxidation (M), Phospho (ST) and Phospho (Y), 3) ตัดผิดพลาดได้หนึ่งครั้ง

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติของผลทรานสคริปโตมิกส์

ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีนในเวลา 0 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง ถูกนำมาคำนวณความแตกต่างทางสถิติ ด้วย pair-wise t -test ที่ 95% (p -value <0.05). ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีนทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงของโปรตีนจาก เม็ดเลือดขาวและซีรัม ถูกสร้างด้วย Hierarchical clustering โดยใช้โปรแกรม TMEV MeV version 4.9.0 software

3.8 การศึกษาการโคลนยีนและศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ Cathelicidin ในกระเพาะอาหาร

3.8.1 การสกัด total RNA จากเลือดกระเพาะ

ผสมเลือดกระเพาะอาหารปริมาตร 250 μl กับน้ำยา TRIzol LS Reagent 750 μl ทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลง นำไปบ่มที่ 15-30 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Chloroform 200 μl แล้วเขย่าหลอดทดลองหรือคว่ำไปมา 15 วินาที บ่มที่ 15-30 °C เป็นเวลา 2-15 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000xg ที่ 2-8 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน tube ใหม่ จากนั้นเติม isopropyl alcohol 500 μl นำไปบ่มที่ 15-30 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000xg ที่ 2-8 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนตะกอนไว้ เติม 75% ethanol 1 ml แล้วเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว

7500xg ที่ 2-8 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งให้แห้ง (air dry) ประมาณ 5-10 นาที แล้วเติม DEPC-treated water 25-50 µl

3.8.2 การกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI

สารละลาย total RNA solution 1-8 µl เติม 10x DNaseI reaction buffer 1 µl และเอนไซม์ DNaseI 1 µl นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม DNase stop solution (EDTA, pH 8.0) 1 µl บ่มต่อที่ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที

3.8.3 การทำ first strand cDNA synthesis

ทำการสังเคราะห์ first strand cDNA โดยใช้ RT-PCR kit, Vivantis ใช้ total RNA template 10 µl oligodT primer 1 µl ปรับปริมาตรด้วย RNase-free water ให้เป็น 12 µl นำไป Heat ที่ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวางบนน้ำแข็ง 1 นาที แล้วเติม Reaction master mix (10X reaction buffer 4 µl, 10 mM dNTP mix 2 µl และ MuLV Reverse transcriptase 1 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 42 °C เป็นเวลา 60 นาที แล้ว Heat ที่ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที

3.8.4 การทำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction หรือ PCR

ออกแบบ primer จากบริเวณที่ conserve ของ ยีนคาเธลิซิน จากนั้นเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10X Taq reaction buffer 5 µl, 10 mM dNTP mix 1 µl, 25 mM MgCl₂ 3 µl, 10 µM forward primer 2 µl, 10 µM reverse primer 2 µl, Taq DNA polymerase (Vivantis) 0.5 µl, cDNA template 5 µl ปรับปริมาตรด้วย RNase-free water เป็น 50 µl เอาเข้าเครื่อง PCR ตามโปรแกรม (ดังตารางที่ 3.1) ตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis ตัดแถบของ PCR product ที่ต้องการ เพื่อทำ gel purify ด้วย GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis)

ตารางที่ 3.1 สภาวะสำหรับการทำ PCR เพื่อวิเคราะห์ยีนคาเธลิซินของจระเข้สยาม

Condition	Temperature (°C)	Time	Cycle
Pre-Denaturation	95	3 min	1
Denaturation	95	30 sec	} 35
Annealing	45-60	30 sec	
Extension	72	45 sec	
Post-extension 72	72	3 min	1
Cooling	4	∞	1

3.8.5 การเชื่อมยีน (Ligation) เข้าสู่พลาสมิด pTG19-T vector

ทำการเชื่อมยีนคาเรลิจิตินเข้าสู่พลาสมิด pTG19-T vector (2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase 5 μ l, pTG19-T vector (50ng) 1 μ l, PCR product 3 μ l, T4 DNA Ligase (3 units/ μ l) 1 μ l ปรับปริมาตรด้วย Nuclease-free water เป็น 10 μ l นำไปบ่มที่ 16 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำ recombinant plasmid ที่ได้ถ่ายโอนเข้าสู่ DH5 α competent cells คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบน LB agar ด้วยวิธี blue-white colony selection บน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin IPTG และ X-Gal ทำการสกัด recombinant plasmid ด้วย GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis) แล้วนำมาตรวจสอบด้วย restriction enzyme โดยตัดด้วย BamHI ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis ส่ง recombinant plasmid หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

3.8.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเรลิจิตินแบบ full-length

ออกแบบ specific forward primer จากผลของ sequencing (partial sequence) ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งแรก จากนั้นทำ PCR อีกครั้ง โดยใช้ oligodT primer เป็น reverse primer ตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis ตัดแถบของ PCR product ที่ต้องการเพื่อทำ gel purify ด้วย GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis) ทำการเชื่อมยีนคาเรลิจิตินเข้าสู่พลาสมิด pTG19-T vector แล้วส่ง recombinant plasmid วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) ออกแบบ specific reverse primer จากผลของ sequencing ที่ได้ แล้วทำ PCR อีกครั้งโดยใช้ NUP primer เป็น forward primer เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ทำการเชื่อม PCR product เข้าสู่พลาสมิด pTG19-T vector แล้วส่ง recombinant plasmid เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มเส้น (full-length)

3.8.7 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเรลิจิติน

จากผลของ full length ของ ยีนคาเรลิจิติน ทำการแปลงจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำผลของลำดับกรดอะมิโนของคาเรลิจิตินไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย C-terminus ที่ทำหน้าที่เป็นคาเรลิจิตินเปปไทด์ เพื่อใช้ลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวในการสังเคราะห์เปปไทด์คาเรลิจิตินสำหรับใช้ในการทดสอบการเป็นเปปไทด์ด้านเชื้อจุลชีพ ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของคาเรลิจิตินจากกระชังสายพันธุ์ไทยกับคาเรลิจิตินอื่นด้วยการทำ Amino acid sequence alignment และ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalOmega ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของคาเรลิจิตินจากกระชังสายพันธุ์ไทยโดยโปรแกรม I-TASSER server และทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์คาเรลิจิติน ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD server ทำนายช่วงลำดับกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็น antimicrobial peptide ด้วย Antimicrobial Sequence Scanning System

3.9 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์คาเทลิซิดินของจระเข้สยาม

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร Mueller-hinton broth (MHB) ที่ 37 °C ให้อยู่ในช่วง mid Log phase แล้วทำการเจือจางเชื้อด้วย PBS buffer ให้ได้สารละลายแบคทีเรีย 10^4 CFU/ml เติมสารละลายแบคทีเรีย 25 μ l ลงใน 96-well microtiter cell-culture plate แล้วเติมสารละลายเปปไทด์จำนวน 25 μ l (เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน) ลงใน 96-well microtiter cell-culture plate (ชุดควบคุมใช้ antibiotic แทนสารละลายเปปไทด์) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม MHB 50 μ l บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.015% resazurin 30 μ l บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แบคทีเรียที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสีของสารละลาย resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู ความเข้มข้นน้อยสุดของเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (สีน้ำเงิน) เรียกว่า Minimal inhibitory concentrations (MICs)

3.10 การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์คาเทลิซิดินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1 จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 100 μ l (10^4 CFU/ml) และสารละลายเปปไทด์ 100 ไมโครลิตร (1:1) ลงใน microtube ขนาด 1.5 ml จากนั้นทำการ incubated ที่ 37 °C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการ fix เซลล์ด้วย 2.5% glutaraldehyde (w/v) ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้ววางบน 0.2 μ m polycarbonate membrane filter (Sartorius AG, Göttingen, Germany) จากนั้นล้างด้วย 10 mM PBS สองครั้ง แล้วนำเซลล์บน membrane มาทำการ dehydrate ด้วย 30% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol และ 90% ethanol อย่างละ 1 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วย 100% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นนำ membrane เข้าเครื่อง CPD แล้วทำการเคลือบทองลงบนผิวเซลล์ และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (LEO1450VP, LEO Electron Microscopy, Cambridge, England)

3.11 การทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์คาเทลิซิดินต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ (hemolytic activity)

นำเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์มาล้างด้วย phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) 3 ครั้ง จากนั้นเจือจางปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย PBS ให้ได้ 2% (w/v) จากนั้นเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงลงในหลอด micro-centrifuge tubes จากนั้นปิเปตสารละลายเปปไทด์ปริมาตร 10 μ l (3.13-200 μ g/ml) ลงไปในสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วน supernatant มาวัดค่า Optical density (OD) ที่ 415 nm โดยในการทดลองใช้ Triton X-100 เป็น positive control แล้วคำนวณหาค่า % hemolytic ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ hemolytic} = ([A_{415 \text{ nm}}, \text{peptide}] / [A_{415 \text{ nm}}, 1\% \text{ [v/v] Triton X-100}]) \times 100$$

3.12 การทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์คาเลซิซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากมนุษย์ (NHDF cell) โดยวิธี MTT assay

ทำการเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μl ใน 96-well plate โดยที่ความหนาแน่นเซลล์ไฟโบรบลาสต์อยู่ที่ 5×10^3 cells/well บ่มในตู้ CO_2 Incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ระหว่างนั้นทำการเจือจางตัวอย่างเปปไทด์ด้วยวิธี two-fold serial dilution ที่ความเข้มข้น 3.13–200 $\mu\text{g/ml}$ ด้วยอาหาร EMEM ที่ไม่เติม FBS เมื่อครบ 16 ชั่วโมงแล้วทำการดูด medium ออกโดยใช้ micropipette และเติมตัวอย่างเลือดจระเข้ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มในตู้ CO_2 Incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารตัวอย่างออกโดยใช้ micropipette แล้วทำการเติม MTT reagent (0.5mg/ml) ปริมาตร 100 μl ลงไปในแต่ละ well ทำการเขย่าเบาๆก่อนนำไปบ่มในตู้ CO_2 Incubator อีกครั้ง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือจนเกิดผลึก formazan ขึ้น ดูดสารละลาย MTT reagent ออกโดยใช้ micropipette จากนั้นเติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 μl ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ผลึก formazan ละลายอย่างสมบูรณ์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader และคำนวณค่าการมีชีวิตของเซลล์ โดยแสดงในรูปร้อยละต่อกลุ่มควบคุม (% of control)

3.13 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านอักเสบของไฮโดรไลเซตฮีโมโกลบินจากจระเข้สยาม

การวิจัยนี้ได้ดำเนินการตามข้อตกลงการวิจัยในสัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ ACUC-KKU-52/60 เลือดจระเข้ถูกเก็บจาก บริษัทศรีราชา โมต้า จำกัด จังหวัดชลบุรี โดยทำการดูดเลือดจากส่วน supravitral branch ของ internal jugular vein ในจระเข้ระหว่างอายุ 1-3 ปี โดยเลือดถูกเก็บในหลอดปลอดเชื้อ ขนาด 15 ml ที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งตัวคือ 0.08 g EDTA จากนั้นเลือดจะถูกเก็บที่ 4 °C เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อให้เกิดการแยกชั้น โดยเมื่เลือดแดงที่อยู่ชั้นล่างจะถูกเก็บไว้ในหลอดปลอดเชื้อใหม่ แล้วล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้ง ด้วย phosphate buffer saline (PBS), pH 7.0 แล้วปั่น 3,000xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วยน้ำเย็น 5 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดแดง จากนั้นเขย่าส่วนผสมด้วยความแรง แล้วปล่อยให้ส่วนผสมตกตะกอนเป็นเวลา 10 นาที ปั่นที่ 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) และนำไปทำให้แห้งด้วยเทคนิค lyophilized และเก็บไว้ที่ -70 °C ก่อนนำตัวอย่างฮีโมโกลบินไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.13.1 การย่อยโปรตีนฮีโมโกลบินด้วยเอนไซม์ trypsin และเอนไซม์ papain

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำตามวิธี Yu (Yu et al., 2006) และคณะคือ สารละลายฮีโมโกลบินถูกย่อยด้วยโปรตีน trypsin และ papain ด้วยอัตราส่วน enzyme ต่อ substrate 1:100 (w/w) ที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 2 4 6 8 ชั่วโมงและต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยการย่อยใช้ pH 7.5 ซึ่งปรับ pH ด้วย 1 M HCl จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,168xg เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บเฉพาะส่วนใสและปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH แล้วนำไปทำให้แห้งและเก็บไว้ที่ -70 °C

3.13.2 การศึกษาระดับการย่อยของโปรตีน (degree of hydrolysis)

วิธีการทำอ้างอิงตามวิธีของ Benjakul และคณะ (Benjakul et al., 1997) คือ 125 μl ของ CHHs (1 mg/ml) ผสมกับ 2.0 ml ของ 0.21 M sodium phosphate buffer, pH 8.2, จากนั้นเติมสารละลาย 0.01% TNBS ส่วนผสมถูกบ่มในอ่างน้ำอุ่น 50 องศาเซลเซียส 30 นาที ในสภาวะมืดแล้วเติม 2 ml ของ 0.1 M sodium sulfite เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นทิ้งให้เย็น 15 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 420 nm ของ α -amino acid content จะแสดงค่าในหน่วยของ L-leucine โดย % ระดับการย่อยโปรตีนมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$DH = [(L_t - L_0)/(L_{max} - L_0)] \times 100$$

โดยกำหนดให้ L_t คือ จำนวน α -amino acid ที่ถูกปลดปล่อยที่เวลาใดๆ

L_0 คือ จำนวน α -amino acid ที่ละลายอยู่ในปฏิกิริยาเริ่มต้น

L_{max} คือ จำนวน α -amino acid ที่เกิดขึ้นเมื่อผ่านการย่อยอย่างสมบูรณ์ ด้วย 5 M HCl ที่ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.13.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสที่ถูกทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity การทดลองนี้เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่ง ใช้สารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) การทดลองเริ่มจากเตรียมตัวอย่างโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 μ l ผสมลงในสารละลาย 0.0004 M DPPH ปริมาตร 50 μ l จากนั้นบ่มในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที วัดสีที่เปลี่ยนแปลงที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm ในการทดลองนี้จะใช้ vitamin C เป็นกลุ่ม positive control โดยใช้น้ำกลั่นเป็นกลุ่ม negative control นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Antioxidant inhibition} = [(Abs_{cont} - Abs_{test})/Abs_{cont}] \times 100$$

3.13.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Power Assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing power ถูกปรับเปลี่ยนจากวิธีการของ Girgih และคณะ (Girgih et al., 2011) ทำได้โดยนำสารละลายโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสปริมาณ 100 μ l เติมนลงใน 0.2 M phosphate buffer pH 6.6 ปริมาตร 250 μ l จากนั้นเติมน้ำสารละลาย potassium hexacyanoferrate 1% (w/v) ปริมาตร 250 μ l สารละลายถูกผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% TCA ปริมาตร 250 μ l และทิ้งไว้ 10 นาที แล้วปั่นที่ 800 $\times$ g 10 นาที นำตัวอย่างจากปฏิกิริยา 30 μ l ผสมกับน้ำ 160 μ l และ 0.1% (w/v) ferric chloride (10 μ l) โดยปฏิกิริยาถูกทดสอบใน 96-well plate จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที การทดลองนี้จะใช้ glutathione เป็น positive control จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm โดยแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ โดยค่าที่วัดได้เป็นเทียบกับค่า Trolox และถูกคำนวณตามสมการเส้นตรงของตัวอย่าง positive control

3.13.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Linoleic Peroxidation Assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี linoleic peroxidation ถูกปรับเปลี่ยนจากวิธีการของ Ledesma และคณะ (Ledesma et al., 2009) ทำได้โดยนำโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสปริมาณ 50 μ l (5–500 μ g/ml) เติมนลงในสารละลาย linoleic acid ปริมาตร 50 μ l ที่ผสมอยู่ในสารละลาย 0.07 M ABAP ปริมาตร 10 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกรด acetic (20% v/v) ปริมาตร 150 μ l บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างจากปฏิกิริยา 20 μ l ผสมกับ 75% ethanol ปริมาตร 160 μ l

ที่มีสารละลาย 15% ammonium thiocyanate ปริมาตร 10 μ l และสารละลาย 10 mM ferrous chloride (10 μ l) โดยปฏิกิริยาถูกทดสอบใน 96-well plate จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm โดยแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ โดยค่าที่วัดได้เป็นเทียบกับค่า Trolox และถูกคำนวณตามสมการเส้นตรงของตัวอย่าง positive control

$$\% \text{ Antioxidant inhibition} = [(Abs_{cont} - Abs_{test})/Abs_{cont}] \times 100$$

3.13.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ (nitric Oxide) และศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability)

ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสโดยการกระตุ้นให้เซลล์ RAW 264.7 ให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ซึ่งมีวิธีการคือ เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในอาหาร RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% (v/v) heat-inactivated FBS และ 1% (v/v) antibiotic ในตู้บ่มเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และแบ่งการทดลองออกเป็นสามกลุ่ม โดยกลุ่มเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (untreated) ได้ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเพียง 1% (v/v) antibiotic กลุ่มควบคุม ได้ทำการกระตุ้นให้เซลล์ทดสอบเกิดการอักเสบด้วย LPS โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร RPMI 1640 ที่มี LPS ความเข้มข้น 100 ng/ml เพียงอย่างเดียว และกลุ่มทดลอง โดยทำการเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในอาหาร RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml ร่วมกับโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ (125-500 μ g/ml) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี CO_2 5 % (v/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจวัดปริมาณ NO จะทำการตรวจวัดได้โดยตรงจากอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วนตะกอนเซลล์จะถูกนำไปศึกษาอัตราการรอดชีวิตด้วยวิธี MTT assay โดยการวัดปริมาณ NO ทำโดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ l ผสมกับสารละลาย Griess [2% (%w/v) N-(1-naphtyl)-ethylenediamine และ 2% (%w/v) sulfanilamide ใน 4% (%w/v) phosphoric acid] ปริมาตร 100 μ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ตะกอนเซลล์ที่เหลืออยู่จะถูกศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ โดยเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 0.5 mg/ml) ปริมาตร 100 μ l/หลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO ปริมาตร 100 μ l และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยแสดงในรูปร้อยละต่อกลุ่มควบคุม (% of control) ดังนี้

$$\% \text{ การมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของหลุมเซลล์ทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของหลุมเซลล์ควบคุม}}$$

3.13.7 การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-10 and IL-6)

นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากการทดสอบในข้อ 3.13.6 มาทำการตรวจวัดปริมาณสารสื่อกลางการอักเสบ โดยในการทดลองนี้จะทำการตรวจวัดปริมาณของ Interleukin 10 (IL-10) และ Interleukin 6 (IL-6) ด้วยวิธี ELISA (R&D, Minneapolis, MN, USA)

3.13.8 วิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) แบบ Dunnett's test (Prism 5.0, GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) หมายถึง เครื่องหมายดอกจัน (*) ที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟหมายถึงไม่แตกต่างกันทางสถิติและเครื่องหมายดอกจันที่แตกต่างกันบนแท่งกราฟแสดงค่าความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)

3.14 การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสจากจระเข้สยาม

การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเส้นเปปไทด์ไฮโดรไลสถูกวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ion-exchange chromatography โดยในการทดลองจะทำการฉีดสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสปริมาณ 100 μL เข้าไปในเครื่อง acid analyzer (Biochrom 30+, Cambridge, UK) โดยใช้ post-column ninhydrin derivation จากนั้นตรวจวัดต่อด้วยเครื่อง spectrophotometric amino acid analyzer แล้วคำนวณปริมาณกรดอะมิโนในหน่วย $\mu\text{mol/L}$

3.15 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีนของกบนาด้วยเทคนิคทรานสคริปโตมิกส์ (RNA-Seq)

ทำการเก็บตัวอย่างกบนาจากบ่อเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ โดยตัดเก็บส่วนปอดและตับแช่ที่ -30°C ทันที จากนั้นเนื้อเยื่อปอดของกบนาถูกนำมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัดจาก TRIzol™ ตามวิธีการของชุดสกัด เพื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงยีนด้วยเทคนิคทรานสคริปโตมิกส์ โดยทำการทดลองตามวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นในหัวข้อ การศึกษาทรานสคริปโตมิกส์ในจระเข้สยาม (หัวข้อ 3.2)

3.16 การศึกษาการแสดงออกของยีนคาเทลิซินในกบนา

3.16.1 การเก็บตัวอย่างกบนา

ทำการเก็บตัวอย่างกบนาจากบ่อเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ (รูปที่ 3.1) โดยตัดเก็บส่วนปอดและตับแช่ที่ -30°C ทันที



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างกบนาที่ใช้ในการศึกษา

3.16.2 การสกัด total RNA

ทำการสกัด total RNA ตามวิธีการของ total RNA extraction kit ของ Vivantis ดังนี้ ชั่งตัวอย่างปอดและตับของกบนา 0.3 กรัม ละลายใน Buffer TR 700 μ l บดให้เซลล์แตก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสลง column แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เติม 80% ethanol 650 μ l จากนั้นปิเปต RNA Binding column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติม Wash Buffer 500 μ l ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ปิเปต DNase I Digestion Mix 70 μ l ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Inhibitor Removal Buffer 500 μ l ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติม Wash Buffer 500 μ l ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม Wash Buffer 500 μ l อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกรอบเพื่อให้แห้ง 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติม RNase-free water ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บส่วนของ total RNA จาก column

3.16.3 การทำ first strand cDNA synthesis

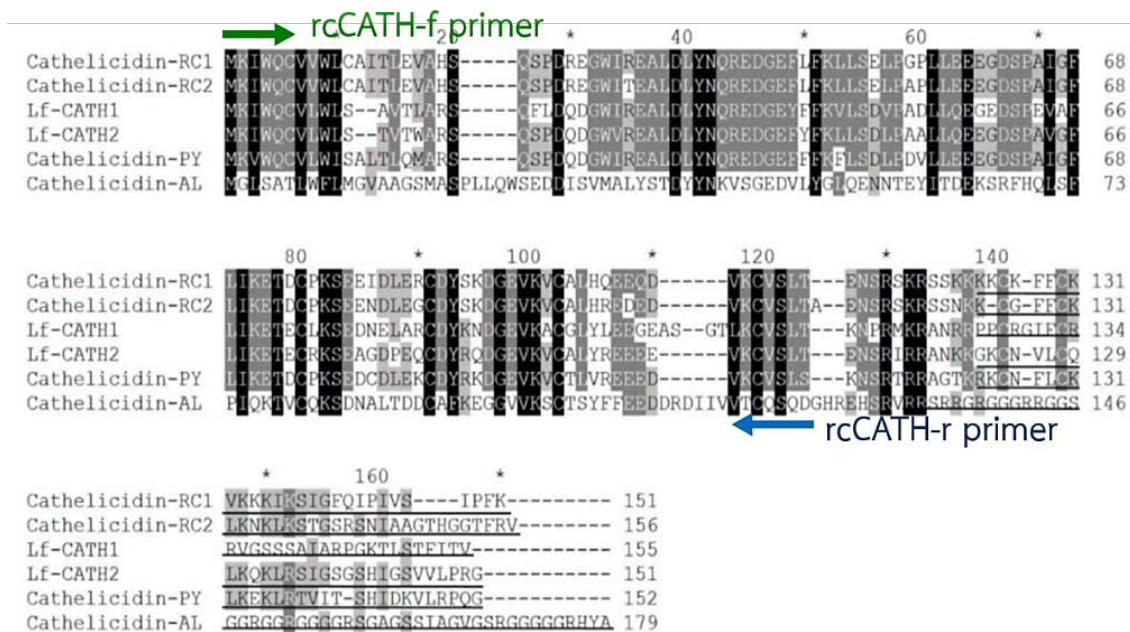
ทำการสังเคราะห์ first strand cDNA โดยใช้ 2-steps RT-PCR kit ของ Vivantis โดยใช้ total RNA template 5 μ l oligo dT primer 1 μ l 10 mM dNTP mix 1 μ l ปรับปริมาตรด้วย Nuclease free water ให้เป็น 10 μ l นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวางบนน้ำแข็ง 2 นาที แล้วเติม 10 μ l ของ cDNA synthesis mix (10X buffer M-MuLV 1 μ l M-MuLV Reverse transcriptase RNase H 1 μ l (200 u/ μ l) 0.5 μ l และ Nuclease free water 8.5 μ l) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 นาทีแล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที

3.16.4 การทำ Polymerase Chain Reaction หรือ PCR

ออกแบบ primer จากบริเวณที่ conserve ของยีนคาเลซิซิน จากนั้นเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10X Taq reaction buffer 5 μ l, 10 mM dNTP mix 1 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 3 μ l, 10 μ M forward primer 2 μ l, 10 μ M reverse primer 2 μ l, Taq DNA polymerase (Vivantis) 0.5 μ l, cDNA template 5 μ l ปรับปริมาตรด้วย RNase-free water เป็น 50 μ l ดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ ตามโปรแกรม (ดังตารางที่ 3.2) ตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis ตัดแถบของ PCR product ที่ต้องการ เพื่อทำ gel purify ด้วย GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis)

ตารางที่ 3.2 สภาวะสำหรับการทำ PCR เพื่อวิเคราะห์ยีนคาเลซิซินของกบนา

Condition	Temperature (°C)	Time	Cycle
Pre-Denaturation	94	2 min	1
Denaturation	94	30 sec	} 35
Annealing	50-57	30 sec	
Extension	72	45-60 sec	
Post-extension 72	72	5 min	1
Cooling	4	∞	1



รูปที่ 3.2 แสดงบริเวณ conserved ของยีนคาเธลิซินที่ใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์

3.16.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเธลิซินเต็มเส้น (full-length) ด้วยเทคนิค RACE-PCR

ออกแบบ specific forward primer (รูปที่ 3.2) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มเส้น (full-length) ด้วยเทคนิค RACE-PCR สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้าน 3'RACE จะใช้ oligo-dT primer เป็น reverse primer ร่วมกับ specific forward primer ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis จากนั้นตัดแถบของ PCR product ที่ต้องการสำหรับการแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอ (gel purification) ด้วย GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis) แล้วส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) ส่วนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้าน 5'RACE ใช้ specific reverse primer ร่วมกับ NUP primer เป็น forward primer เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.16.6 วิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเธลิซินในกบนา

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเต็มเส้น (full-length) ของยีนคาเธลิซิน แล้วทำการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน (amino acid translation) จากนั้นนำผลของลำดับกรดอะมิโนของยีนคาเธลิซินไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย C-terminus ที่ทำหน้าที่เป็นคาเธลิซินเปปไทด์ เพื่อใช้ลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวในการสังเคราะห์เปปไทด์คาเธลิซินสำหรับการทดสอบการเป็นเปปไทด์ด้านเชื้อจุลชีพ ด้วยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซินจากกบนา กับคาเธลิซินอื่นด้วยการทำ Amino acid sequence alignment และ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalOmega ทำนายโครงสร้างตติยภูมิของคาเธลิซินจากกบนาโดยโปรแกรม I-TASSER server

3.17 การออกแบบและการสังเคราะห์เปปไทด์คาเลซิซินของกบนา

ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์คาเลซิซินจากกบนาถูกนำไปจำลองโครงสร้างสองชุดด้วย PEP-FOLD server (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของ เปปไทด์คาเลซิซินในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างชุดให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น การออกแบบเปปไทด์ให้มีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์สูงขึ้น ทำได้โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนบางชนิดในเส้นเปปไทด์ โดยจะคำนึงถึงคุณสมบัติของขนาดโมเลกุล ประจุสุทธิ ค่าความชอบน้ำไม่ชอบน้ำของเปปไทด์สังเคราะห์ รวมทั้งการทำนายความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเปปไทด์ที่ออกแบบใหม่นี้จะถูกนำไปศึกษาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ทางชีวภาพกับเปปไทด์คาเลซิซินแม่แบบ

3.18 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์คาเลซิซิน ด้วยวิธี Broth dilution assay

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ *Bacillus megaterium* TISTR 067, *B. subtilis* TISTR 124, *B. cereus* TISTR 1449, *Staphylococcus aureus* TISTR746, *Enterococcus faecalis* TISTR927, *Escherichia coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* TISTR1287, *Salmonella thyphimurium* TISTR147, *Candida albicans* TISTR5554, *Aeromonas hydrophila* TISTR1321, *Salmonella derby* DMST16881 และ *Edwardsiella tarda* DMST38217 ทำการเลี้ยงเชื้อ 12 สายพันธุ์ในอาหาร Mueller-hinton broth (MHB) ที่อุณหภูมิ 37 °C ให้อยู่ในช่วง mid Log phase แล้วทำการเจือจางเชื้อด้วย PBS buffer pH 7.2 ให้ได้สารละลายแบคทีเรีย 10^4 CFU/ml จากนั้นเติมสารละลายแบคทีเรีย 5 μ l ลงใน tube PCR แล้วเติมสารละลายเปปไทด์ จำนวน 5 μ l ลงใน tube PCR (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเปปไทด์) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหาร MHB 90 μ l บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(OD600 \text{ control} - OD600 \text{ test sample}) / OD600 \text{ control}] \times 100$$

3.19 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีนในน้ำพิษต่อหัวเชื้อด้วยเทคนิคทรานสคริปโตมิกส์

3.19.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากน้ำพิษต่อหัวเชื้อ

ทำการดั่งต่อมพิษของต่อหัวเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml ทำความสะอาดต่อมพิษด้วยการเติมน้ำ DEPC และดูดน้ำออกอย่างระมัดระวัง จากนั้นเติมสาร TRIzol reagent ปริมาตร 1 ml บดตัวอย่างให้ละเอียดและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 μ l ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดเฉพาะสารละลายส่วนใน (supernatant) ใส่ลงในหลอดแล้วนำมาเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 500 μ l ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันและบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใส่ทิ้งเหลือเพียงตะกอนของอาร์เอ็นเอ แล้วเติม 75% เอทานอล ปริมาตร 1 ml เพื่อล้างทำความสะอาดตะกอนของอาร์เอ็นเอ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใส่ทิ้ง ทำการล้างทำความสะอาดตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งก่อนนำไปประเหยแห้งเพื่อกำจัดเอทานอลที่ค้างอยู่ในหลอดที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 25 ml และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ

ด้วยเครื่องนาโนทรอป โดยสังเกตค่า A260/A230 ต้องมีค่าระหว่าง 2.0-2.2 และ A260/A280 มีค่าระหว่าง 1.8-2.0 จากนั้นตรวจสอบผลการสกัดอาร์เอ็นเอเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

3.19.2 การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอคู่สม (cDNA library) และการหาลำดับเบส (sequencing)

ในขั้นตอนนี้ได้ส่งตัวอย่างอาร์เอ็นเอไปยังบริษัท BGI-Tech ประเทศฮ่องกง โดยมีขั้นตอนอย่างย่อ ดังนี้ ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะถูกนำไปเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA; cDNA) ด้วยเอนไซม์ไพรเมอร์โอลิโกดีที (oligo-dT primer) เพื่อเริ่มต้นการสังเคราะห์ cDNA จากเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) และมีการต่อตัวเชื่อม (adapter) เข้าที่ปลายทั้งสองข้างของ cDNA ก่อนนำไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR bridge amplification และทำการหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Illumina Hi-Seq 4000 จากนั้นจะได้ข้อมูลดิบอย่างมหาศาลจึงต้องใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ในการวิเคราะห์และคัดกรองข้อมูล โดยโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ InterPro, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Gene Ontology (GO) Kyoto Encyclopedia of Gene Genomes (KEGG) EuKaryotic Orthologous Groups (KOG) และ SWISS-PROT

3.20 การศึกษาแบบแผนโปรตีนในน้ำพิชต่อหัวเสือด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (Proteomics)

3.20.1 การเตรียมน้ำพิชและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการของ Bradford

ทำการเก็บตัวอย่างต่อหัวเสือจากหมู่บ้านเชียงเซา อำเภอสีสงคราม จังหวัดนครพนม โดยทำการเก็บต่อหัวเสือจากรังด้วยวิธีการที่ปลอดภัย จากนั้นนำต่อหัวเสือแช่แข็งทันที สำหรับขั้นตอนก่อนเก็บน้ำพิชจะใช้ forceps แยกดังต่อพิชออกมาใส่หลอด micro-centrifuge แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บเฉพาะส่วนน้ำพิชเก็บน้ำพิชไว้ที่อุณหภูมิ -30°C จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford (Bradford, 1976) โดยการปิเปตสารละลาย Bradford dye จำนวน 1 ml ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมโปรตีนตัวอย่างจำนวน 1-5 μl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน โดยใช้โปรตีน bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนเบื้องต้นด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.20.2 การศึกษาแบบแผนของโปรตีนในน้ำพิชด้วยเทคนิค 2D-PAGE

3.20.2.1 การทำ First dimension isoelectric focusing (IEF)

นำตัวอย่างน้ำพิชต่อหัวเสือมาทำการแยกโปรตีนในทิศทางแรกซึ่งโปรตีนจะถูกแยกโดยอาศัยสมบัติที่แตกต่างกันของประจุ (pI) บนโมเลกุล โดยจะทำการโหลดโปรตีนลงบน dry strip ในช่วง pH 3-11 ขนาด 7 cm จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วยเครื่อง Ettan IPGphor ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ วาง strip holder ลงบนเครื่อง Ettan® IPGphor (Amersham Biosciences) จากนั้น load สารละลายโปรตีน (20 $\mu\text{g}/\text{strip}$) ที่ทำการผสมกับ Rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2 mM DTT, 0.8% (w/v) IPG buffer and 0.2% bromophenol blue) เติมลงใน strip holder โดยว่าปริมาตรสุดท้ายคือ 250 μl แล้วจึงทำการวาง IPG strip ขนาด 13 เซนติเมตร pH 3-10 ลงใน strip holder โดยคว่ำให้หน้าเจลสัมผัสกับสาร จากนั้น overlay IPG strip ด้วย dry strip cover fluid ประมาณ 700 μl แล้ว run program โดยตั้งค่า program สำหรับ run IEF โดยใช้กระแสไฟฟ้า 9250 Vhr เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.20.2.2 การ Equilibrate IPG strip

Incubate IPG strip ขนาด 7 cm pH 3-11 กับ equilibration solution ปริมาตร 2.5 ml ที่มี DTT 0.025 g เป็น เวลา 15 นาที จากนั้น incubate IPG strip ต่อด้วย equilibration solution ปริมาตร 2.5 ml ที่มี IAA 0.0625 g เป็นเวลา 15 นาที

3.20.2.3 การทำ Second dimension polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

หลังจากแยกโปรตีนในทิศทางแรกแล้วโปรตีนจะถูกแยกอีกครั้งในทิศทางที่สองโดยอาศัยสมบัติของขนาดของโมเลกุลที่ต่างกัน โดยในการทดลองนี้จะโดยใช้ 13% separating gel (SDS-PAGE) โดยการทดลองเริ่มจากเตรียม 13% gel ของ SDS-polyacrylamide gel จากนั้นวาง strip และกระดาษกรองที่ load protein marker (ปริมาตร 2 μ l) ลงด้านบนของเจล ประกอบเจลเข้ากับ Electrophoresis set แล้ว run program ที่ 10 mA เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 20 mA แยกโปรตีนต่อจนแถบของ dry ตกเจลพอดี จากนั้นนำเจลที่ได้มาทำการย้อมโดยใช้ Colloidal Coomassie Brilliant blue G-250

3.20.2.4 การย้อมสีโปรตีนด้วย Colloidal coomassie brilliant blue G-250

นำเจลที่ได้จากการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE มา fix ใน fixing solution (10% acetic acid, 40% ethanol) เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย colloidal coomassie brilliant blue G-250 (8% ammonium sulfate, 0.8% phosphoric acid, 0.08% Coomassie Blue G-250, 20% methanol, 500 ml) ซ้ำมคั้น แล้วทำการ destain โดยใช้น้ำกลั่นจนเห็น spot โปรตีนชัดเจน

3.20.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลจากเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum

เมื่อได้จุด (spot) โปรตีนหลังจากการย้อมสีแล้วทำการสแกนแผ่นเจลและวิเคราะห์ความแตกต่างของจุด (spot) โปรตีนของตัวอย่างแต่ละกลุ่มด้วยโปรแกรม Image master™ 2D platinum version 7.0 เพื่อให้ได้จุดโปรตีนที่สนใจ คือโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น หรือลดลง หรือมีการแสดงออกเฉพาะในบางกลุ่มทดลอง เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนจากเลือดจระเข้ที่ทำให้ติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกับแบบแผนของโปรตีนจากเลือดจระเข้ที่ไม่ติดเชื้อ (control)

3.20.2.6 การระบุชนิดของโปรตีน

เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบแผนการแสดงออกของโปรตีนและเลือกโปรตีนที่มีการแสดงออกเมื่อจระเข้ติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้ว จากนั้นจะทำการตัดจุด (spot) โปรตีนจากเจล แล้วนำมาวิเคราะห์หา peptide mass fingerprint ด้วย Mass spectrometry (LC-MS/MS) แล้วนำข้อมูลของ peptide mass fingerprint ที่ได้ รวมทั้งค่า MW และ pI ของโปรตีนแต่ละตัวมาสืบค้นบนฐานข้อมูลโปรตีน Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) เพื่อระบุชนิดของโปรตีน

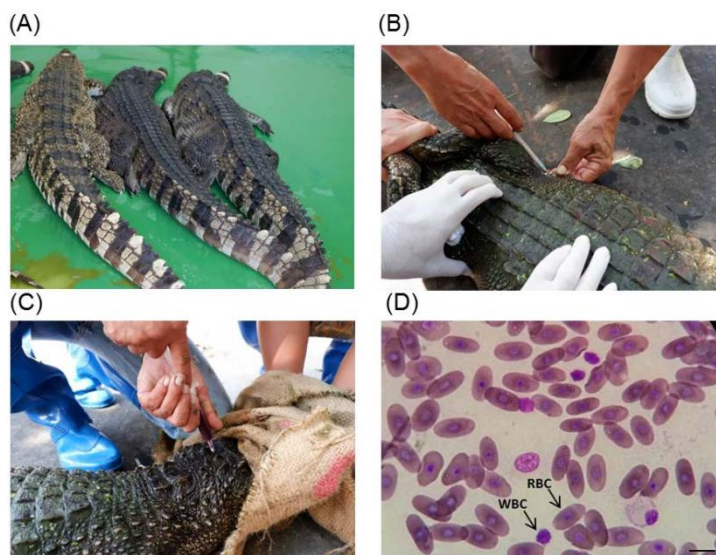
บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัยของจระเข้สยาม

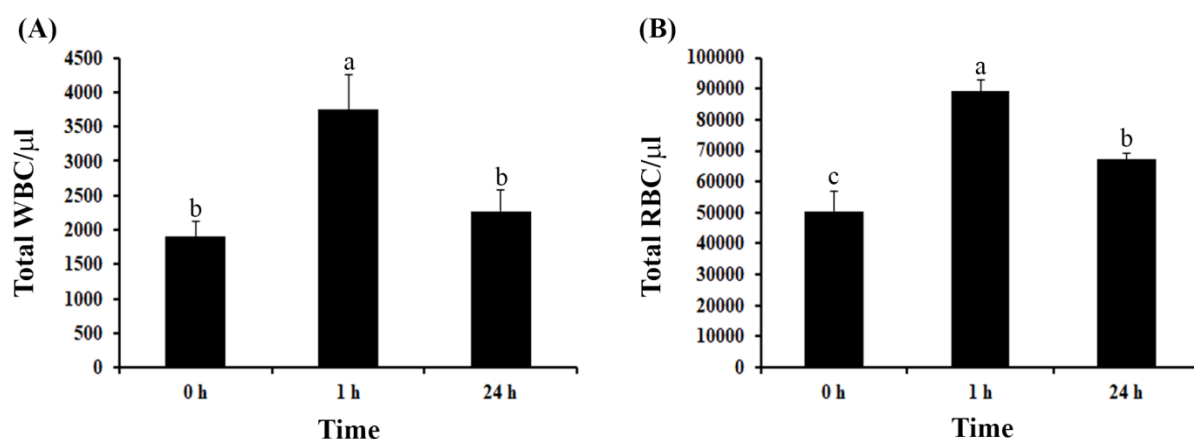
4.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดหลังการติดเชื้อ

สัตว์ใน Order Crocodilia ประกอบด้วย Crocodylidae, Alligatoridae, Gavialidae ถือเป็นกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานที่น่าสนใจในแง่ของความสามารถในการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพยอดเยี่ยม ทั้งนี้เนื่องจากเป็นสัตว์ที่มีต้นกำเนิดมาตั้งแต่ยุคไดโนเสาร์ และสามารถอยู่รอดถึงปัจจุบัน (van Hoek, 2014) ประกอบกับสัตว์ใน Order Crocodilia มีระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาโดยกำเนิดที่มีประสิทธิภาพ จึงเป็นที่มาของนักวิจัยที่มุ่งความสนใจและตั้งสมมุติฐานว่าทั้งยีนและโปรตีนที่กระตุ้นให้แสดงออกเมื่อจระเข้ติดเชื้อมีในระยะเวลาสั้น น่าจะส่งผลต่อกระบวนการการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์จระเข้ โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดที่จะทำงานเป็นเซลล์กลุ่มแรกหากทำให้จระเข้ติดเชื้อโดยการฉีดแบคทีเรียเข้ากระแสเลือดจระเข้ โดยเทคนิคที่ได้นำมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงยีนและโปรตีนคือ transcriptomic และ proteomics ปัจจุบัน เทคนิค transcriptomic แบบ RNA-sequencing นิยมนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงยีนในของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย ก่อนหน้านี้การนำเทคนิคนี้มาใช้กับงานจระเข้มีเพียงไม่กี่งานวิจัย เช่น การหา ยีนที่เปลี่ยนแปลงไปเกี่ยวกับเพศของจระเข้ระหว่างการฟัก (Yatsu et al., 2016) การหาปริมาณเบส GC ใน EST (expressed sequence tag) ของสัตว์ จระเข้ นก และมนุษย์ (Chojnowski et al., 2007) จึงทำให้ปริมาณยีนในจระเข้ที่ยืนยันว่ามีการแสดงออกและรวมทั้งการยืนยันหน้าที่ของยีนเหล่านั้นภายในเซลล์มีน้อย ซึ่งในการทดลองนี้ก็เป็นอีกหนึ่งงานวิจัยที่จะช่วยเพิ่มข้อมูลของยีนที่แสดงออกภายในเซลล์เม็ดเลือดระหว่างการติดเชื้อในจระเข้ได้

ในการทดลองนี้ใช้จระเข้เพศเมียสายพันธุ์สยามอายุประมาณ 4 ปี เพื่อฉีดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และเก็บเลือดหลังฉีด 1 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนและยีน รวมถึงสังเกตลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวในเลือดที่เก็บก่อนฉีดแบคทีเรีย หรือ 0 ชั่วโมง และหลังฉีดแบคทีเรีย จากการสังเกตจระเข้ทั้งก่อนและหลังฉีดเชื้อแบคทีเรีย 1 และ 24 ชั่วโมง พบว่าจระเข้ไม่มีพฤติกรรมหรือลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนไป เมื่อศึกษาถึงลักษณะของเม็ดแดงและเม็ดเลือดขาวผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะของทั้งเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเช่นกัน (รูปที่ 4.1) นอกจากนี้ยังได้ทำการนับจำนวนของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ด้วย hemocytometer ซึ่งพบว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มมากขึ้นประมาณ 2 เท่าในตัวอย่างเลือดติดเชื้อที่เวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างเลือด 0 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวลดจำนวนลงจาก 1 ชั่วโมง โดยมีปริมาณมากกว่าตัวอย่าง 0 ชั่วโมง เพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.2A) สำหรับผลการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงนั้น พบว่ามีการเพิ่มจำนวนขึ้นเช่นเดียวกัน โดยที่ 1 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อได้เพิ่มจำนวนขึ้นเป็นจำนวนประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับ 0 ชั่วโมง แต่ใน 24 ชั่วโมงหลังติดเชื้อจำนวนลงมาที่ใกล้เคียงกับ 0 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2B)



รูปที่ 4.1 ปฏิบัติการณภาคสนาม ของการ inoculation และการเก็บตัวอย่างเลือดจระเข้สยาม (A) ขนาดจระเข้ที่ใช้ในการทดลอง (B) การฉีดแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือดของจระเข้ (C) การเก็บตัวอย่างเลือดโดยดูดจาก internal jugular vein (D) เซลล์เม็ดเลือดของจระเข้เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ WBC=เม็ดเลือดขาว RBC= เม็ดเลือดแดง แถบด้านล่างขวาเท่ากับความยาว 10 μm



รูปที่ 4.2 จำนวนการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดก่อนและหลัง inoculation กับแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ 0 1 และ 24 ชั่วโมง (A) จำนวนของเม็ดเลือดขาว (WBC) (B) จำนวนของเม็ดเลือดแดง (RBC)

หลังการติดเชื้อ 1 ชั่วโมง พบว่าทั้งจำนวนเม็ดเลือดขาวและเม็ดแดงเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับก่อนการติดเชื้อ เมื่อพิจารณาถึงเวลาที่เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นใน 1 ชั่วโมง ถือว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์เหล่านี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาโดยกำเนิดของจระเข้สยามมีประสิทธิภาพสูง เพราะในมนุษย์จำนวนเม็ดเลือดขาวที่จะเพิ่มขึ้นหลังการติดเชื้อนั้น ต้องใช้เวลาหลายชั่วโมงหรือเป็นวัน (Honda et al., 2016) สำหรับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มขึ้น Minasyan (2014) ได้รายงานว่าเม็ดเลือดขาวไม่สามารถทำลายแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพในกระแสเลือดที่แบคทีเรียเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูง แต่เซลล์ที่ทำลายแบคทีเรียได้ดีคือเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้ด้วยผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงมีประจุอ่อนๆ จากการชนกันและชนผนังหลอดเลือด จึงทำให้สามารถจับแบคทีเรียได้ และอาศัยออกซิเจนที่อยู่ในเม็ดเลือด

แดงทำลาย โดยทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งเรียกการทำลายแบคทีเรียแบบนี้ว่า exocytosis (Minasyan 2018) แล้วจะถูกกำจัดเมื่อเม็ดเลือดแดงหมดอายุที่ม้ามและตับ จากจำนวนเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มเป็น 2 เท่าอย่างรวดเร็วยังไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัด เพราะปกติแล้วสัตว์จำพวกปลาเมื่อติดเชื้อจำนวนของเม็ดเลือดแดงก็ไม่ได้เพิ่ม แต่สำหรับสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เซลล์เม็ดเลือดแดงจะเพิ่มขึ้นเมื่อร่างกายมีปริมาณออกซิเจนน้อย ทำให้กระตุ้นการหลั่งสาร glycoprotein cytokine ชื่อว่า erythropoiesis จากไต ไปกระตุ้นเซลล์ไขกระดูกเร่งการสร้างเม็ดเลือดแดง แต่กระบวนการนี้ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3-4 วัน (Major et al., 1997) จึงไม่น่าใช่สาเหตุที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นหลังติดเชื้อในกระชัง นอกจากนั้นยังมี เปปไทด์ที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีน เช่น เปปไทด์ lactoferricin จากการสลายโปรตีนโมเลกุลใหญ่คือ iron-binding lactoferrin ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (Fernaude and Evans 2003) และ เปปไทด์ HbbP-1 ซึ่งเป็นเปปไทด์ในสายเบต้าของโปรตีนฮีโมโกลบินมีฤทธิ์ทำลายเชื้อปรสิต *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) และนอกจากนี้ยังสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้ (Ullal et al., 2008) จึงอาจคาดการณ์ได้ว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงนอกจากออกซิเจนที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ เปปไทด์ที่ได้จากการสลายโปรตีนขนาดใหญ่ เช่น ฮีโมโกลบินน่าจะมีส่วนทำลายแบคทีเรีย *A. hydrophila* เช่นกัน

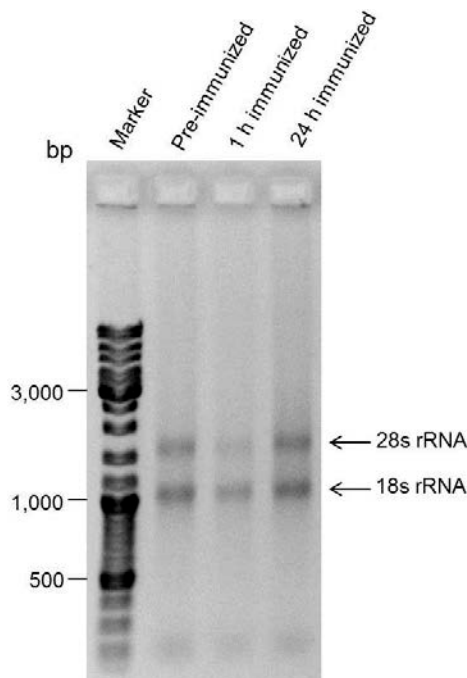
4.2 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีนในเลือดกระชังด้วยเทคนิคทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomic)

เนื่องจากประสิทธิภาพของทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงหรือการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียผ่านการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของหลายยีนในเวลาเดียวกัน และได้ผลที่รวดเร็ว โดยทรานสคริปโตม (transcriptome) หมายถึง RNA transcript ทั้งหมดของเซลล์ (ได้แก่ messenger RNA รวมทั้ง non-coding RNA) ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนต่างๆ ในจีโนม จากข้อมูลการศึกษาจีโนมของมนุษย์ นักวิทยาศาสตร์ได้ประมาณจำนวนยีนของมนุษย์ไว้ราว 30000 ยีน แต่ในความเป็นจริงพบว่าผลผลิตของยีนภายในเซลล์ มีความหลากหลายมากกว่าจำนวนยีนที่ประมาณไว้มาก ซึ่งความแตกต่างของการแสดงออกและขบวนการการดัดแปลงของ RNA transcript (RNA processing) ในเซลล์ต่างชนิดกันและในสภาวะต่างๆ กัน เป็นปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดความหลากหลายของผลผลิตของยีนในมนุษย์ดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ RNA transcript หรือ ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) จึงมีประโยชน์อย่างมากในการที่จะทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับชีววิทยาของสิ่งมีชีวิต (ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์, ม.ป.ป.)

4.3 Transcript Length Distribution

จากการสกัด RNA จากเลือดกระชังทั้งก่อนและหลังได้รับเชื้อก่อโรครดงกล่าวข้างต้น พบว่า RNA ที่สกัดได้นั้นมีคุณภาพดีเมื่อทำการแยกด้วย agarose gel electrophoresis (รูปที่ 4.3) และมีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาต่อในขั้นตอน RNA-seq ด้วยบริษัท Novogene ในประเทศจีน จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างเลือดทั้ง 3 ช่วงเวลา ซึ่งได้แก่ ก่อนฉีดแบคทีเรีย หรือ 0 ชั่วโมง และหลังฉีดแบคทีเรีย 1 และ 24 ชั่วโมง มีจำนวน raw reads (จำนวนชิ้นส่วน mRNA ซึ่งอาจจะไม่เต็มยีนทั้งหมดที่เซลล์ผลิต) total reads (จำนวนชิ้นส่วน mRNA ที่ให้สัญญาณสูงและเชื่อว่าเป็นชิ้นส่วนของยีนที่แสดงออกจริง) และ total mapped (total reads ที่สามารถระบุได้ว่าเป็นช่วงลำดับเบสที่อยู่ใน Genome ของกระชัง) ไม่แตกต่างกันมาก กล่าวคือ raw reads มีประมาณ 60 ล้าน total reads ประมาณ 58-59 ล้าน และ total mapped ประมาณ 48-49 ล้าน

ตารางที่ 4.1 โดยทั้ง 3 ช่วงเวลา มีจำนวน transcripts เท่ากับ 107,679 และ unigenes เท่ากับ 107,592 เมื่อเรียงลำดับความยาวและจำนวน transcripts และ unigenes ที่พบ สามารถจัดเรียงได้ดังนี้ 500-1kbp > 200-500bp > longer 2kbp > 1k-2kbp ตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.3 การตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดจะเข้สายพันธุ์สยาม

ตารางที่ 4.1 จำนวนของ read ใน 3 ช่วงเวลาของการทดลอง

Sample name	Raw Reads	Total reads	Total mapped
0h	60866148	59436942	49655960 (83.54%)
1h	59042408	57560316	47761848 (82.98%)
24h	62101112	60556164	50115898 (82.76%)

จำนวนในวงเล็บคือ % ของ ลำดับเบสของ total read ที่ปรากฏใน genome ของจระเข้

ตารางที่ 4.2 จำนวนของ transcripts และ unigenes ในขนาดความยาวที่แตกต่างกัน

Transcript length interval	200-500 bp	500-1 kbp	1k-2 kbp	>2 kbp	Total
Number of transcripts	27413	34514	20704	25048	107679
Number of unigenes	27326	34514	20704	25048	107592

4.4 การระบุ unigene และการจัดจำแนกตามหน้าที่ด้วย 7 ฐานข้อมูล (Gene Functional Annotation)

Unigene ทั้งหมด 107,592 ถูกระบุชื่อและจัดจำแนกตามหน้าที่ในเซลล์ด้วย 7 ฐานข้อมูล ซึ่งประกอบด้วย 1) Nr (NCBI non-redundant protein sequences) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลลำดับโปรตีนของ NCBI ซึ่งรวมถึงข้อมูลลำดับโปรตีนจาก GenBank, PDB (Protein Data Bank), SwissProt, PIR (Protein Information Resource) และ PRF (Protein Research Foundation) เป็นต้น 2) Nt (NCBI nucleotide

sequences) เป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NCBI ซึ่งรวมถึงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank, EMBL และ DDBJ (แต่ไม่รวมถึงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก EST, STS, GSS, WGS, TSA, PAT, HTG) 3) Pfam (Protein family) เป็นฐานข้อมูลการเปรียบเทียบความคล้ายกันของลำดับเบสหลายสายและโมเดล Hidden Markov (HMMs) ซึ่งครอบคลุมโดเมนของโปรตีนหรือลำดับเบสอนุรักษ์ของโปรตีนมากมาย 4) KOG/COG ทั้ง COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) และ KOG (euKaryotic Orthologous Groups) นั้นมาจากความสัมพันธ์ทางออร์โทโลยีของยีนของ NCBI 5) Swiss-Prot เป็นฐานข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนซึ่งได้จากแหล่งข้อมูลหลายแหล่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แปลมาจากกรดนิวคลีอิก และกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลลำดับกรดอะมิโนหลักของนานาชาติ 6) KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome) เป็นฐานข้อมูลเพื่อศึกษาและเข้าใจถึงหน้าที่ระดับสูง รวมถึงหน้าที่ทางชีวภาพ 7) GO (Gene Ontology) เป็นฐานข้อมูลที่กำหนดขึ้นสำหรับอธิบายประกอบการทำงานของผลิตภัณฑ์ยีน และจำแนกคุณลักษณะการทำงานของผลิตภัณฑ์ยีนดังต่อไปนี้ Biological Process (BP), Molecular Function (MF) และ Cellular Component (CC)

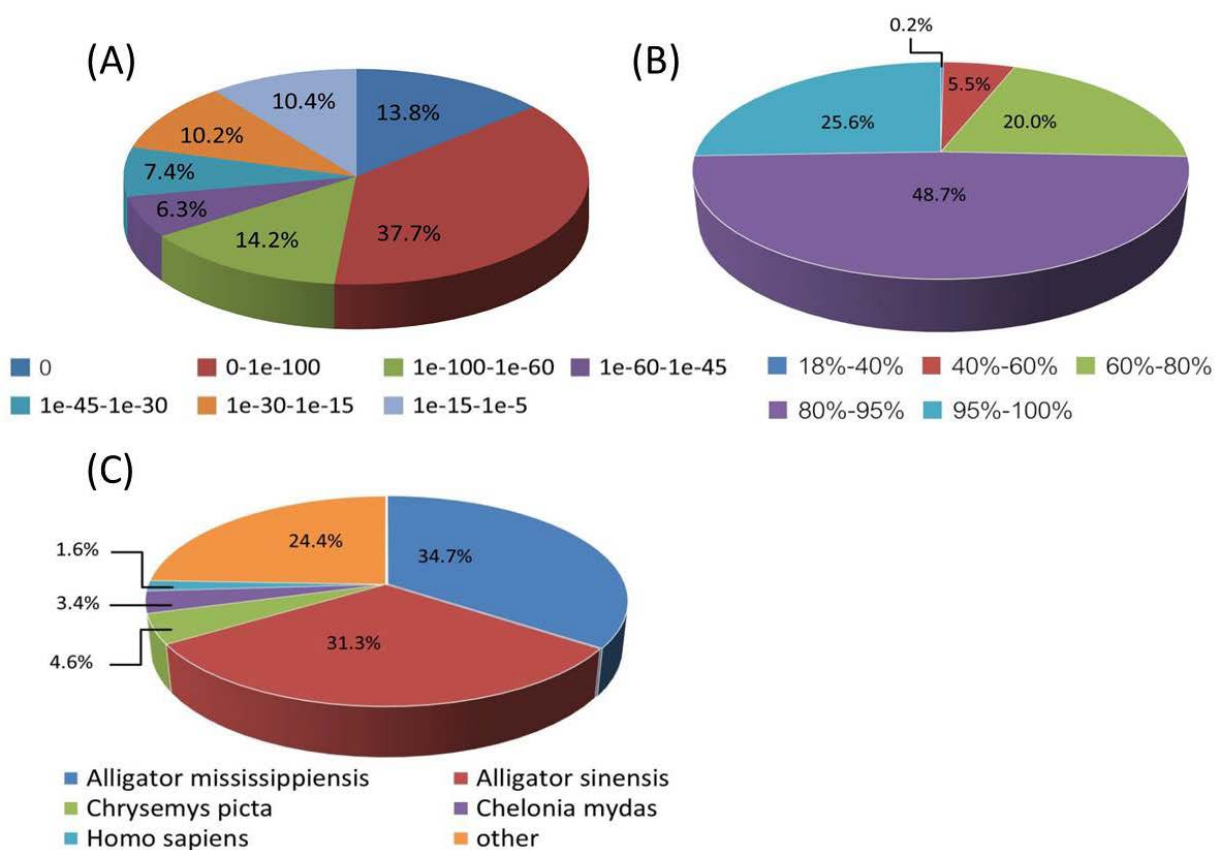
เมื่อนำ Unigene ทั้งหมด 107,592 มาจัดจำแนกตามหน้าที่ในเซลล์ด้วย 7 ฐานข้อมูลดังกล่าวข้างต้น พบว่าสามารถระบุชื่อและหน้าที่ unigene จากเลือดจระเข้สยามด้วยฐานข้อมูล NT ได้ 49.13% ฐานข้อมูล NR ได้ 40.83% ฐานข้อมูล SwissProt ได้ 35.42% ฐานข้อมูล GO ได้ 34.64% ฐานข้อมูล PFAM ได้ 34.56% ฐานข้อมูล KO ได้ 21.02% ฐานข้อมูล KOG ได้ 18.99% โดยพบจำนวน 11,912 unigene หรือคิดเป็น 11.07% ที่สามารถระบุชื่อและหน้าที่ได้ตรงกันจากทุกฐานข้อมูล และ 60,912 unigene ซึ่งคิดเป็น 56.61% ที่สามารถระบุชื่อและหน้าที่ได้อย่างน้อย 1 ฐานข้อมูล (ตารางที่ 4.3) และพบ unigene จำนวน 2,212 unigene ที่สามารถระบุชื่อและหน้าที่ได้ด้วยฐานข้อมูล NR เพียงฐานข้อมูลเดียว และ 9,961 unigene ที่สามารถระบุชื่อและหน้าที่ได้ด้วยฐานข้อมูล NT เพียงฐานข้อมูลเดียว รูปที่ 4.4 โดย unigene ที่ระบุชื่อด้วย 7 ฐานข้อมูลถูกรวบรวมใน (Supplemental excel file A)

ตารางที่ 4.3 สัดส่วนการระบุหน้าที่ของ 107,592 unigene ในแต่ละฐานข้อมูล

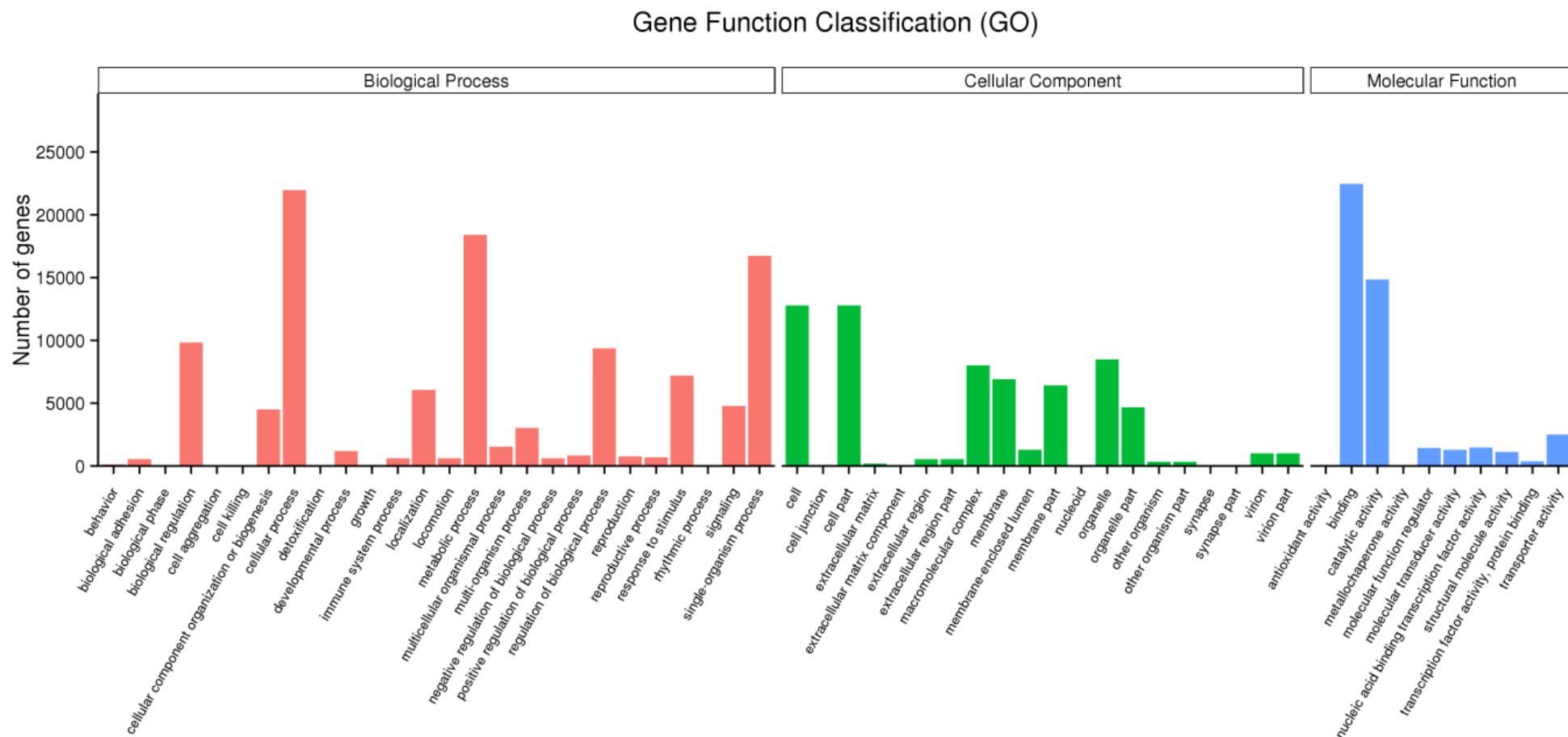
Annotated in	Number of Unigenes	Percentage (%)
NT	52866	49.13
NR	43934	40.83
SwissProt	38118	35.42
GO	37270	34.64
PFAM	37187	34.56
KO	22620	21.02
KOG	20441	18.99
Annotated in all Databases	11919	11.07
Annotated in at least one Database	60912	56.61
Total Unigenes	107592	100

NR (NCBI non-redundant protein sequences), Nt (NCBI nucleotide sequences), KO (KEGG Orthology), Pfam (Protein family), GO (Gene Ontology), KOG (euKaryotic Orthologous Groups)

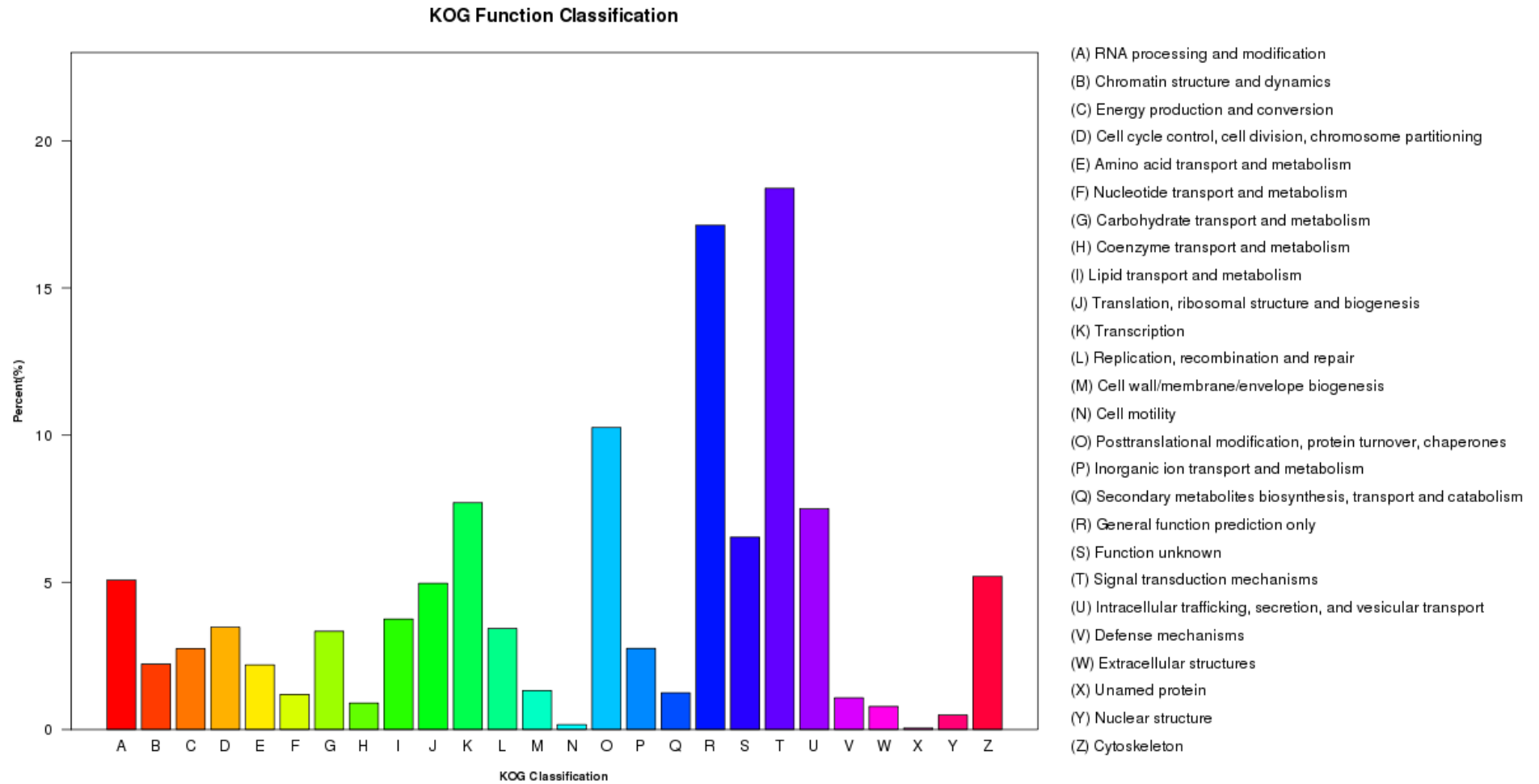
ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงถึงการศึกษาอื่น รวมทั้งการแสดงออกของยีนในจระเข้ยังมีน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงถือว่างานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยลำดับต้นๆ ที่จะสร้างประโยชน์อย่างมากสำหรับนักวิจัยที่จะศึกษาหน้าที่ของยีนหรือโปรตีนของจระเข้ต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะกลุ่มยีนที่แสดงออกตอบสนองต่อการติดเชื้อในแบคทีเรีย ซึ่งถือเป็นภูมิคุ้มกันที่สำคัญ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้สามารถระบุชื่อได้มากถึง 50% จากทั้งหมด 107,592 unigene ซึ่งถือว่ามีจำนวนมาก และเมื่อพิจารณาถึงความเชื่อถือของข้อมูลที่ได้จาก RNA-seq การระบุชื่อของ unigene ด้วยฐานข้อมูล Nr หรือ NCBI ซึ่งเป็นการเทียบเคียงลำดับเบสของ unigene ของจระเข้สยามกับเบสของยีนในฐานข้อมูล NCBI เพื่อคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้ค่า E-value เพื่อการประเมินความน่าเชื่อถือของข้อมูล ด้วยการเอาค่า E-value $<1.0e-45$ เป็นเกณฑ์ของความน่าเชื่อถือของงานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับวิจัยของ Song et al., 2017 เมื่อพิจารณาค่า E-value พบว่ามากถึง 72% ของ unigene เป็นข้อมูลที่น่าเชื่อถือ แต่ E-value อยู่ในช่วง $1.0e-45$ - $1.0e-5$ พบเพียง 28% (รูปที่ 4.5A) สำหรับความคล้ายคลึงกันระหว่างลำดับเบสใน unigene ของจระเข้สยามกับฐานข้อมูล พบว่าที่ความคล้ายคลึงกันในช่วง 80-95% ของ unigenes เทียบกับฐานข้อมูล Nr เท่ากับ 48.7% และความคล้ายคลึงกัน 95-100% เท่ากับ 25.6% ซึ่งถือว่าข้อมูลนี้เป็นข้อมูลที่น่าเชื่อถือมาก (รูปที่ 4.5B) เมื่อนำข้อมูล unigene มาเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ พบว่ายีนส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มจระเข้ โดยคิดเป็น 65% ซึ่งประกอบไปด้วย *Alligator mississippiensis* 34.7% และ *Alligator sinensis* 31.3% จัดอยู่ในเต่า *Chrysemys picta* 4.6% และเต่า *Chelonia mydas* 3.4% จัดอยู่ในมนุษย์ 1.6% และสัตว์อื่นๆ 24.4% (รูปที่ 4.5C) จึงถือข้อมูลชุดนี้มีความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ยังมีการระบุชื่อยีนด้วยฐานข้อมูล Gene Functional Classification (GO) พบว่า unigene ที่อยู่ในกลุ่ม Cellular process Metabolic process และ binding มีจำนวนมากที่สุด (รูปที่ 4.6) เมื่อใช้ฐานข้อมูลของ KOG function classification พบว่ายีนที่อยู่ในกลุ่ม general function prediction และ signal transduction mechanism มีจำนวนมากที่สุด (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.5 การวิเคราะห์ด้วย BLASTX ของ 107,592 unigenes จาก *C. siamensis* transcriptome โดยใช้ฐานข้อมูล nonredundant (Nr) protein database แผนภูมิวงกลมแสดงถึงการกระจายตัวของข้อมูล (A) E-value (B) similarity distribution (C) species classification



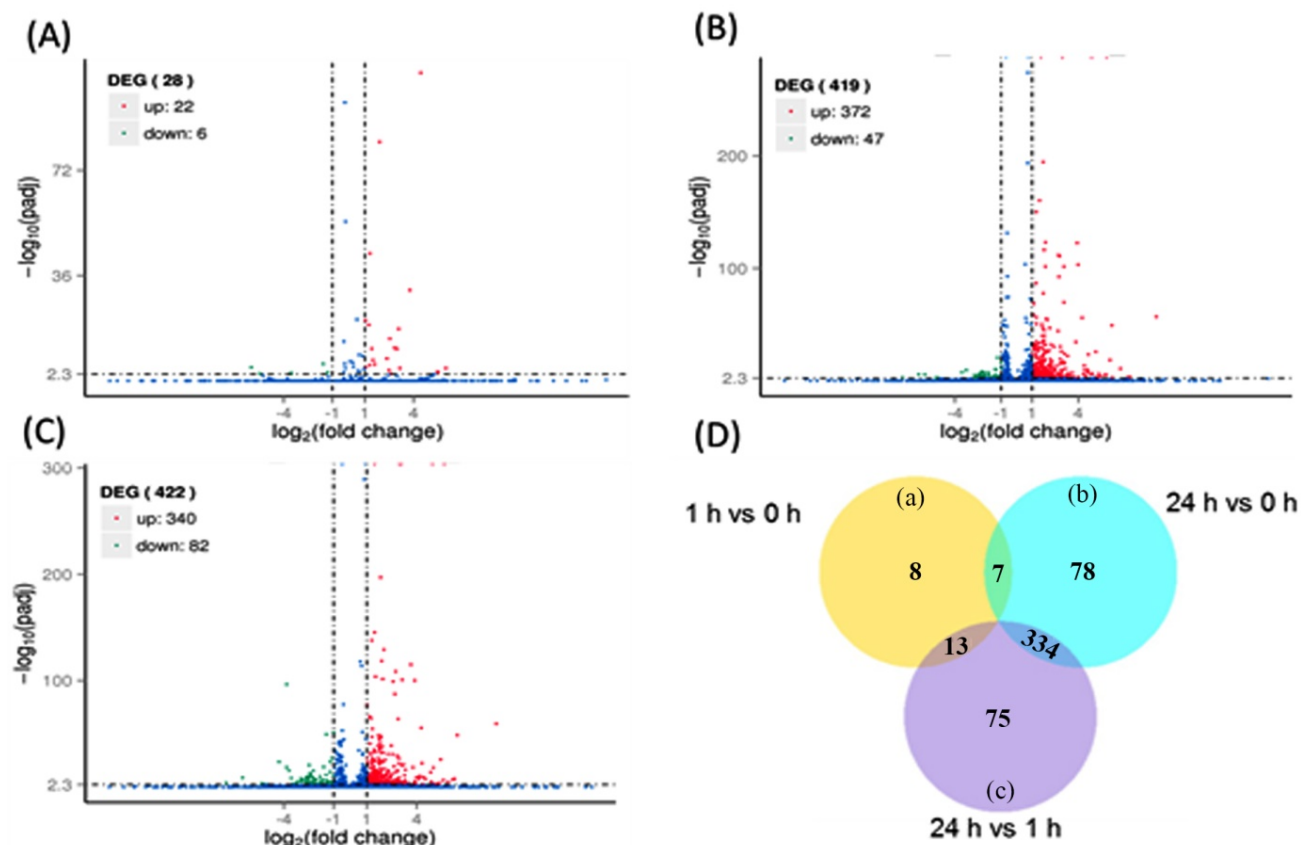
รูปที่ 4.6 ยีนที่ระบุได้และการจัดจำแนกตามหน้าที่ด้วยฐานข้อมูล Gene Function Classification (GO) ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ Biological Process, Cellular Component และ Molecular Function



รูปที่ 4.7 ยีนที่ระบุได้และการจัดจำแนกตามหน้าที่ด้วยฐานข้อมูล KOG

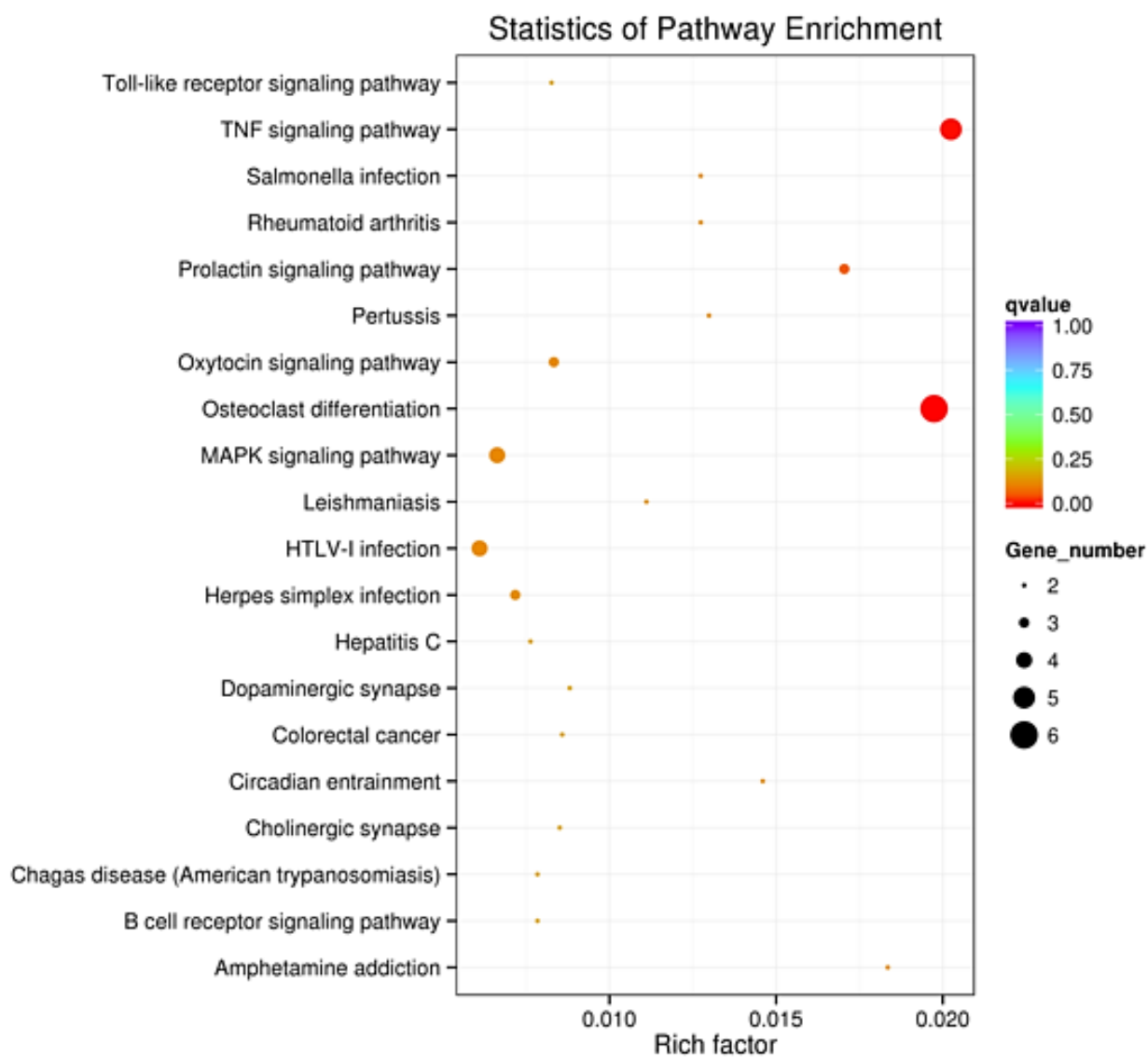
4.5 Unigene ที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากติดเชื้อแบคทีเรีย

ในแต่ละ unigene จาก 0 1 และ 24 ชั่วโมง ถูกนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาระดับการแสดงของยีนที่แตกต่างกันในหน่วย FPKM (Fragments Per Kilobase Million) โดยระดับการแสดงออกของทั้ง 107,592 unigene แสดงใน Supplemental excel file B (ข้อมูลถูกรวบรวมในแผ่นซีดีรอม) ในการหา yin ที่แสดงออกแตกต่างกัน (Differential gene expressions ; DGE) ทั้ง DEG ที่เพิ่มขึ้นและลดลง โดยพิจารณาจากค่า $\log_2$ ของค่าการแสดงออกที่แตกต่างกันของแต่ละ unigene ใน 3 ช่วงเวลาที่ทำการทดลอง หากมีค่าน้อยกว่า -1 แสดงว่า unigene นั้นมีระดับการแสดงออกลดลง และหากมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่า unigene นั้นๆ มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างจำนวนยีนที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงจาก 0 ชั่วโมง กับ 1 ชั่วโมง พบ 22 unigene มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น และ 6 unigene มีระดับการแสดงออกที่ลดลง (รูปที่ 4.8A) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างจำนวนยีนที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงจาก 1 ชั่วโมง กับ 24 ชั่วโมง พบ 372 unigene มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและ 47 unigene มีการแสดงออกลดลง (รูปที่ 4.8B) ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างจำนวนยีนที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงจาก 0 ชั่วโมง กับ 24 ชั่วโมง พบ 340 unigene มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และ 82 unigene ที่มีการแสดงออกลดลง (รูปที่ 4.8C) หากเปรียบเทียบ DEG โดยไม่คำนึงถึงระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงในแต่ละช่วงเวลา แล้วนำมาสร้างแผนภูมิเวนน์ (venn diagram) พบว่า มี 7 unigene ที่ซ้อนทับกันระหว่าง (a) กับ (b) และ 13 unigene ซ้อนทับระหว่าง (a) กับ (c), ขณะที่ unigene ซ้อนทับระหว่าง (b) กับ (c) 334 unigene นอกจากนั้นมีจำนวน unigene ของ (a) (b) และ (c) ที่ไม่มีการซ้อนทับ 8, 78 และ 75 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8D) โดย DEG ทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง ของ 1 เทียบกับ 0 ชั่วโมง 24 เทียบกับ 0 ชั่วโมง และ 24 เทียบกับ 1 ชั่วโมง แสดงใน Supplemental excel file C D E ตามลำดับ (ข้อมูลถูกรวบรวมในแผ่นซีดีรอม)

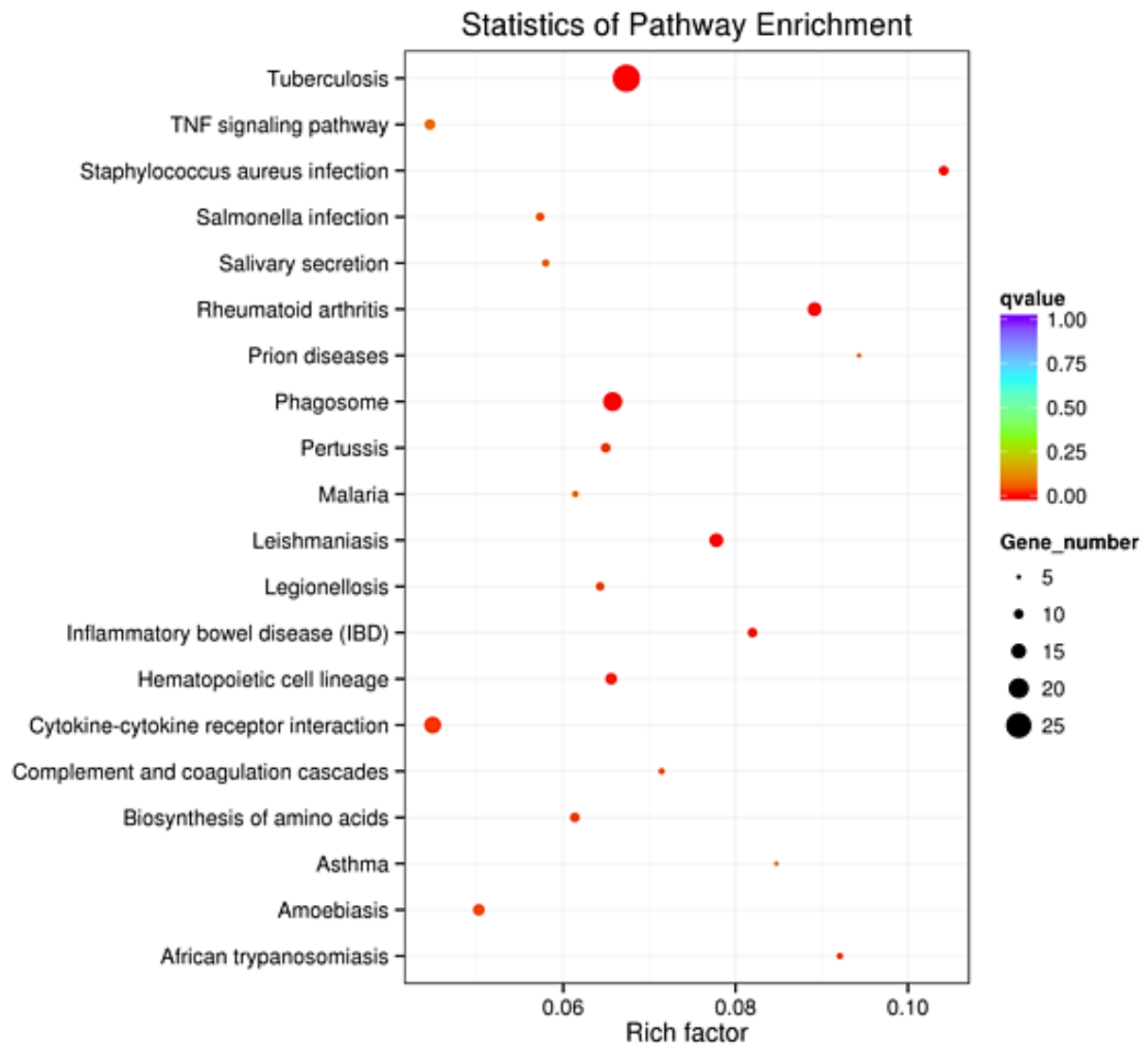


รูปที่ 4.8 การเปรียบเทียบจำนวน DEGs ใน 3 ช่วงเวลาของการทดลอง Volcano plot ของ DEGs ที่มีค่าแตกต่างทางสถิติ $P \leq 0.05$ แกน X แสดงถึงจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงของยีนใน 2 ช่วงเวลา แกน Y คือ ความแตกต่างทาง (A) จำนวนของ DEGs ที่เพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อเปรียบเทียบ 1 ชั่วโมงกับ 0 ชั่วโมง (B) จำนวนของ DEGs เมื่อเปรียบเทียบ 24 ชั่วโมงกับ 0 ชั่วโมง (C) จำนวนของ DEGs เมื่อเปรียบเทียบ 24 ชั่วโมงกับ 1 ชั่วโมง (D) Venn diagram แสดงจำนวนของ DEGs ในแต่ละเวลาและจำนวนที่คาบเกี่ยวระหว่าง 2 เวลา

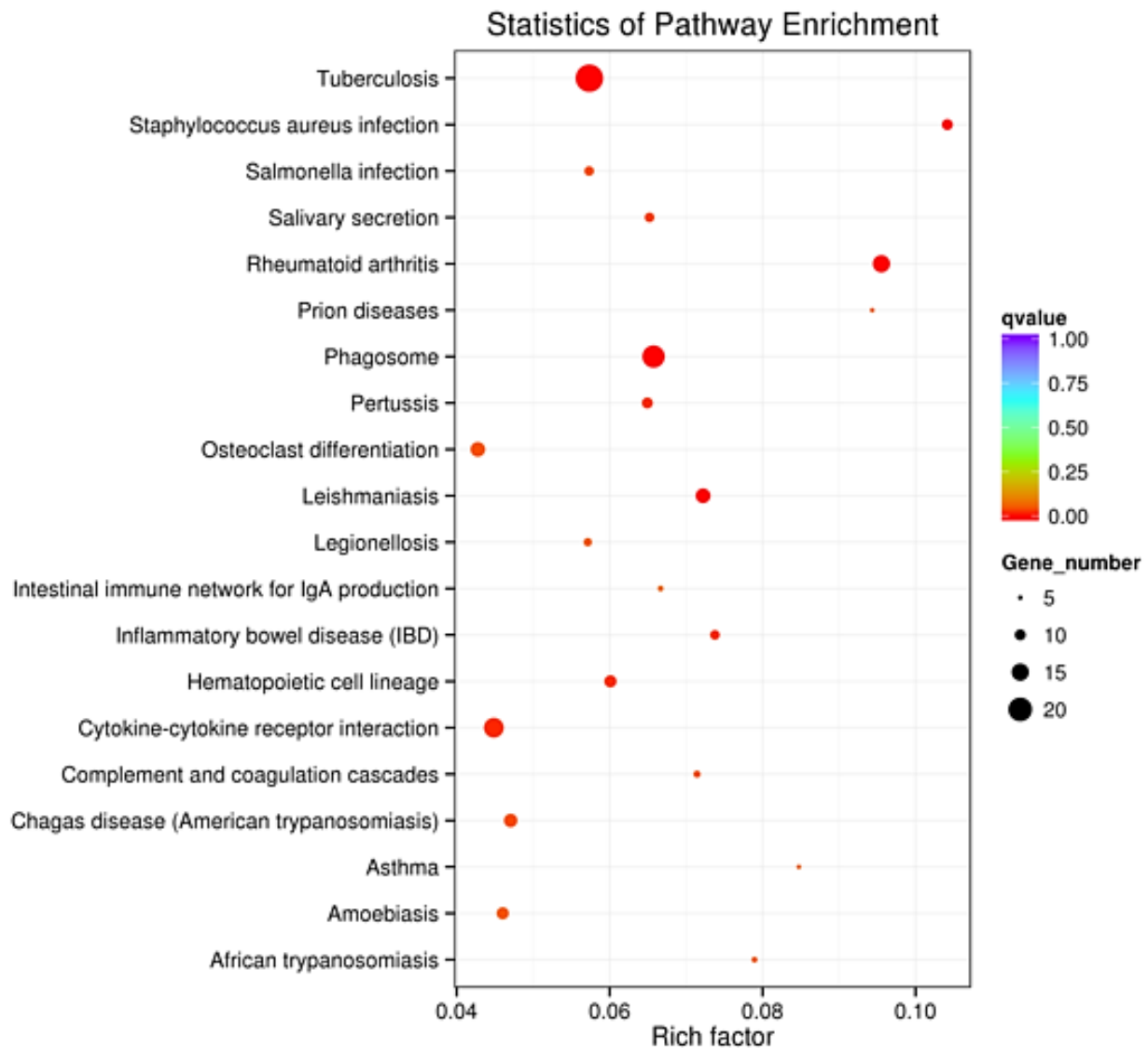
เมื่อทำการวิเคราะห์และจัดหมวดหมู่ของ DGE ด้วย Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการเปลี่ยนแปลงขบวนการต่างๆ ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อในเซลล์ของเม็ดเลือดผ่านการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนพบว่า DEGs ถูกจัดกลุ่มได้หลาย pathway ซึ่ง 20 pathway แรกที่มีค่า $q\text{-value} < 0.05$ ของแต่ละการเปรียบเทียบถูกแสดงใน รูปที่ 4.9, 4.10 และ 4.11 ในการเปรียบเทียบ DGE จาก 0 ชั่วโมง ไป 1 ชั่วโมง พบว่า pathway ที่มากที่สุดคือ TNF signaling pathway และ Osteoclast differentiation Prolactin signal pathway สำหรับ 1 ชั่วโมง ไป 24 ชั่วโมง คือ *Staphylococcus aureus* infection, Rheumatoid arthritis และ *Leishmaniasis* Phagosome และที่ 0 ชั่วโมง ไป 24 ชั่วโมง pathway จะคล้าย 1 ชั่วโมง ไป 24 ชั่วโมง แต่ pathway ที่เพิ่มมาคือ inflammatory bowel disease



รูปที่ 4.9 จำนวนของ DEG ในแต่ละ KEGG pathway ของช่วงเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากจระเข้สยามได้รับเชื้อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับเชื้อ (1 h vs 0 h)



รูปที่ 4.10 จำนวนของ DEG ในแต่ละ KEGG pathway ของช่วงเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากจระเข้สยามได้รับเชื้อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับเชื้อ (24 h vs 0 h)



รูปที่ 4.11 จำนวนของ DEG ในแต่ละ KEGG pathway ของช่วงเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากจะเข้าสู่ยามได้รับเชื้อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากจะเข้าสู่ยามได้รับเชื้อ (24 h vs 1 h)

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเฉพาะ DEG ที่เพิ่มขึ้นในการเปรียบเทียบ 2 ช่วงเวลา พบว่าจาก 0 ชั่วโมง ถึง 1 ชั่วโมง พบกลุ่มยีนที่ผลิต transcription factor หรือ transcription regulator หรือ cell signaling เช่น ที่อยู่ใน pathway Osteoclast differentiation TNF signaling pathway และ Prolactin signaling pathway (ตารางที่ 4.4) โดยในกลุ่ม Osteoclast differentiation TNF signaling pathway มีหลายตัวที่เป็น transcription factor ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดผลิต mRNA เพื่อสร้างโปรตีนที่จะมาทำลายแบคทีเรียที่บุกลุก (ตารางที่ 4.5) แต่สำหรับ DEG ที่เพิ่มขึ้นในการเปรียบเทียบ จาก 0 ชั่วโมง ถึง 24 ชั่วโมง หรือ จาก 0 ชั่วโมง ถึง 24 ชั่วโมง โดย 2 ช่วงเวลานี้ กลุ่ม pathway คือ กลุ่มยีนที่ผลิตโปรตีนที่ทำลายแบคทีเรีย เช่น *Tuberculosis* *Legionellosis* *Leishmaniasis* Malaria และกลุ่มที่กระตุ้นการอักเสบและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น Rheumatoid arthritis Phagosome Complement and coagulation cascades Inflammatory bowel disease (ตารางที่ 4.4) เป็นที่น่าสนใจว่า มีกลุ่มยีนที่สามารถสร้าง anti-microbial peptide หลายกลุ่มจากข้อมูล transcriptomic ของการทดลองนี้ เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme), ดีเฟนซิน (defensin), Liver Expressed Antimicrobial Peptide (LEAP), Bee antimicrobial peptide,

Frog antimicrobial peptide, Diapausin family of antimicrobial peptide, Ant antimicrobial peptide, เปปไทด์ Hecpudin รวมทั้ง เปปไทด์ Cathelicidin (ตารางที่ 4.6) เป็นต้น โดยระดับการแสดงออกของ anti-microbial peptide ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังได้รับเชื้อที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อนได้รับเชื้อแบคทีเรีย (0 ชั่วโมง) จะกำกับด้วยตัวอักษร “b” ทำยเลข Unigene (Cluster) ซึ่งจะได้รายงานผลการศึกษาในรายละเอียดในหัวข้อต่อไป

สำหรับการเปรียบเทียบ DEG เพื่อหา unigene ที่ลดลง ที่เกี่ยวกับ KEGG pathway ต่างๆ พบว่าระหว่าง 0 และ 1 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่าง (ตารางที่ 4.5) แต่เมื่อเปรียบเทียบ 0 กับ 24 ชั่วโมง และ 1 กับ 24 ชั่วโมง พบว่ามี 2 pathway คือ Intestinal immune network for IgA production และ Primary immunodeficiency โดยพบ unigene มากที่สุด คือประมาณ 5-6 unigene ที่มีระดับการแสดงออกของ unigene ใน pathway เปลี่ยนแปลงไป ซึ่ง pathway แรกเกี่ยวกับการสร้าง antibody IgA และอีก pathway เป็นยีนที่เกี่ยวกับและทำงานในระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องชนิดปฐมภูมิ ส่วนยีนที่ทำงานใน pathway อื่นๆ มีจำนวนเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.4 KEGG pathway DEGs ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับในแต่ละช่วงเวลาของการได้รับเชื้อของกระช้ำสยาม

1 h vs 0 h		24 h vs 0 h		24 h vs 1 h	
Pathway	gene number	Pathway	gene number	Pathway	gene number
Osteoclast differentiation	6	Tuberculosis	22	Tuberculosis	18
TNF signaling pathway	5	Pertussis	10	Phagosome	14
Prolactin signaling pathway	3	Rheumatoid arthritis	10	Salivary secretion	9
Amphetamine addiction	2	Biosynthesis of amino acids	10	Rheumatoid arthritis	9
MAPK signaling pathway	4	Phagosome	13	Complement and coagulation cascades	7
Circadian entrainment	2	Cytokine-cytokine receptor interaction	15	Cytokine-cytokine receptor interaction	13
Oxytocin signaling pathway	3	Complement and coagulation cascades	7	Pertussis	8
HTLV-I infection	4	Salivary secretion	8	Prion diseases	5
Pertussis	2	Legionellosis	8	Biosynthesis of amino acids	8
Salmonella infection	2	Leishmaniasis	9	Staphylococcus aureus infection	6
Rheumatoid arthritis	2	Prion diseases	5	Legionellosis	7
Herpes simplex infection	3	Malaria	7	Malaria	6
Leishmaniasis	2	Inflammatory bowel disease	7	Inflammatory bowel disease	6
Dopaminergic synapse	2	TNF signaling pathway	10	Leishmaniasis	7
Colorectal cancer	2	Staphylococcus aureus infection	6	Collecting duct acid secretion	3
Cholinergic synapse	2	Osteoclast differentiation	11	Amoebiasis	8
Toll-like receptor signaling	2	Galactose metabolism	5	Chagas disease	8
B cell receptor signaling	2	African trypanosomiasis	5	Galactose metabolism	4
Chagas disease	2	Amoebiasis	9	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	4
Hepatitis C	2	Salmonella infection	7	Starch and sucrose metabolism	4

ตารางที่ 4.5 DEGs ที่สร้าง transcription factors ที่เพิ่มขึ้นหลังจาก 1 ชั่วโมงของการติดเชื้อแบคทีเรียแล้วลดลงที่ 24 ชั่วโมง

Unigene (Cluster) ^a	Accession ^b	% query cover ^c	% Identity ^d	Reptile reference ^e	Ortholog gene ^f	0h (FPKM)	1h (FPKM)	24h (FPKM)	fold change 1h/0h	fold change 24h/0h
2754.36308	XM_019484413.1	74	95	<i>Alligator mississippiensis</i>	Jun B proto-oncogene (JUNB)	172.78	462.57	274.99	2.68	1.59
2754.41660	XM_019478752.1	37	95	<i>Alligator mississippiensis</i>	Transcription factor complex	2.92	24.68	6.08	8.45	2.08
2754.39612	XM_026655036.1	71	85	<i>Terrapene mexicana</i>	Transcription factor jun-D	82.18	221.19	61.88	2.69	0.75
2754.36667	XM_019552283.1	74	99	<i>Crocodylus porosus</i>	Proto-oncogene c-Fos	1.88	18.11	2.03	9.63	1.08
2754.35538	XM_019552283.1	92	99	<i>Crocodylus porosus</i>	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	9.99	234.11	16.61	23.43	1.66

^aCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่ผลิต transcription factors

^bAccession number ของยีนสิ่งมีชีวิตอื่นที่ใกล้เคียงกับ Unigene ของ *C. siamensis*

^c% query cover ของลำดับเบสใน unigene ของ *C. siamensis* เทียบกับ Accession number

^d% Identity ของลำดับเบสใน unigene ของ *C. siamensis* เทียบกับ Accession number

^e Accession number ของสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิด

^fชื่อยีนที่ Accession number นั้นๆ ผลิต

ตารางที่ 4.6 ระดับการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพเมื่อจระเข้สยามมีการติดเชื้อในแต่ละช่วงเวลา

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
12297.0	6356	0.55	0.75	0.71	Chorion protein S19 C-terminal//BTB/POZ domain//Plant antimicrobial peptide
19408.0	429	0.52	1.44	0.99	TMPIT-like protein//Frog antimicrobial peptide//Lipoprotein leucine-zipper//Fibrinogen alpha/beta chain family//Golgi transport complex subunit 5
21219.0	2515	0.32	0.38	0.57	Ant antimicrobial peptide
21343.0	827	0.73	1.08	0.57	Frog antimicrobial peptide//Popeye protein conserved region
23279.1	471	0.82	0.45	0.59	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
23520.0	994	0.44	0.59	0.84	TMEM9//Spider antimicrobial peptide
2355.0	581	1.44	0.71	0.51	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
24076.0	526	0.47	1.87	0.84	Nematode antimicrobial peptide
27043.0	822	0.59	0.7	0.5	Glutamine synthetase, catalytic domain//Diapausin family of antimicrobial peptide
2754.10995	10301	2.88	2.6	2.71	Pseudin antimicrobial peptide//DNA polymerase (viral) C-terminal domain//ATP synthase protein 8//Plasmid replication protein
2754.11417	3048	4.81	4.45	5.94	Tetratricopeptide repeat//Tetratricopeptide repeat//Tetratricopeptide repeat//TPR repeat//RNA helicase (UPF2 interacting domain)//Tetratricopeptide
2754.11788	1599	0.33	2.38	2.01	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase//Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase//Bee antimicrobial peptide
2754.13178	5813	2.17	1.83	3.08	SSXRD motif//Cyclin, C-terminal domain//Tetratricopeptide repeat//TPR repeat//Tetratricopeptide repeat//Frog antimicrobial peptide
2754.13356	1420	4.08	4.76	5.99	Bee antimicrobial peptide
2754.13567	1234	1.13	1.41	0.58	Frog antimicrobial peptide
2754.15467	2959	0.81	0.52	0.35	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.15581	4924	1.15	1.38	1.69	Diapausin family of antimicrobial peptide
2754.15864	3182	0.51	0.58	0.55	Bee antimicrobial peptide
2754.17745	4328	2.08	1.99	1.36	Nematode antimicrobial peptide//B-box zinc finger//Bromodomain//PHD-finger//zinc-RING finger domain
2754.18501	2074	1.61	2.01	2.3	Armadillo/beta-catenin-like repeat//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.19290	4630	1.02	1.04	1.32	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Sulfotransferase domain
2754.19532	1877	2.89	2.97	3.4	BTB/POZ domain//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.20602	4475	1	0.61	0.74	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Sulfotransferase domain
2754.24447	632	0.56	0.84	0.33	Ant antimicrobial peptide
2754.24571	4527	6.39	6.28	7.64	Sulfotransferase domain//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.25118 ^b	881	47.8	55.68	811.1	Adenylate kinase, active site lid//Cathelicidin//Cystatin domain//Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)
2754.25966	6250	5.8	5.25	5	PLAT/LH2 domain//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.26519 ^b	2828	35.5	36.2	83.85	Vitamin K-dependent carboxylation/gamma-carboxyglutamic (GLA) domain/ Frog antimicrobial peptide
2754.26759 ^b	869	5.28	4.56	196.85	Cathelicidin//Cystatin domain//Adenylate kinase, active site lid//Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)
2754.26885	5561	0.64	0.55	0.48	Diapausin family of antimicrobial peptide
2754.27118	4579	8.04	6.63	9.83	Diapausin family of antimicrobial peptide
2754.28622	2745	0.52	1.22	0.97	Pardaxin//Frog antimicrobial peptide
2754.2876	1454	0.7	0.35	1.04	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.29639	628	0.46	0.49	0.33	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.29658	4840	3.29	2.73	2.15	Diapausin family of antimicrobial peptide
2754.30053	1632	59.7	65.15	58.6	Prefoldin subunit//RNA polymerase II transcription mediator complex subunit 9//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Autophagy protein
2754.30284	1516	0.49	2	2.4	Fibronectin type III domain//Plant antimicrobial peptide
2754.32503 ^b	670	795.55	811.78	24464.57	Phosphoribosyl-dephospho-CoA transferase MdcG//Cathelicidin
2754.32765	4915	6.81	8.2	10.42	Protein-tyrosine phosphatase//Fibronectin type III domain//Plant antimicrobial peptide//Phage shock protein B//Dystroglycan (Dystrophin-associated glycoprotein 1)//Dual specificity phosphatase, catalytic domain
2754.34614	3765	9.32	9.89	8.69	Bee antimicrobial peptide
2754.3473	4686	1.72	1.37	2.3	P53 transactivation motif//Microfibril-associated glycoprotein (MAGP)//Frog antimicrobial peptide
2754.35703 ^b	1523	742.13	787.64	1939.17	Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)//Cathelicidin
2754.36610	4421	48.34	195.11	72.99	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar)//Protein prenyltransferase alpha subunit repeat//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.36631 ^b	1784	1141.36	1322.49	3673.06	Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)//Fibronectin-attachment protein (FAP)//Cathelicidin
2754.37224 ^b	1321	1635.88	1850.03	2661.23	Cathelicidin//Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)
2754.37864	5074	38.06	34.72	34.52	Protein serine/threonine phosphatase 2C, C-terminal domain//Ribosome associated membrane protein RAMP4//Protein phosphatase 2C//Frog antimicrobial
2754.37926	5401	6.39	6.65	6.7	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.38759	2800	17.58	16.96	18.02	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.40045	5054	0.58	0.87	1.2	Diapausin family of antimicrobial peptide

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.4278	4585	3.26	3.63	2.72	ERCC4 domain//Type II secretion system (T2SS), protein M subtype b//Ant antimicrobial peptide
2754.44291	2894	11.53	11.13	19.94	Pardaxin//Frog antimicrobial peptide
2754.45037	1866	1.97	2.44	2.05	Bee antimicrobial peptide
2754.46550	1423	1.09	0.92	1.9	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.46822	4870	2.11	1.34	0.62	Diapausin family of antimicrobial peptide//Gap junction alpha-8 protein (Cx50)
2754.47196	5814	3.58	3.05	4.91	EF hand//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//EF hand//EF-hand domain//Copper transport outer membrane protein, MctB//EF-hand domain pair//EF-hand domain pair
2754.48282	4034	0.39	0.49	0.31	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Sulfotransferase domain
2754.48444	2670	8.98	9.82	6.87	Nematode antimicrobial peptide
2754.50358	3501	0.9	1.19	6.75	EF hand//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//EF-hand domain//EF hand//EF-hand domain pair//Copper transport outer membrane
2754.50809	5365	2.83	1.69	1.65	Diapausin family of antimicrobial peptide
2754.50862	1394	0.5	1.51	1.49	Nematode antimicrobial peptide
2754.51009	3717	1.32	1.31	1.05	Protein of unknown function (DUF3628)//Bee antimicrobial peptide
2754.51627	1500	1.07	0.78	0.89	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.55078	4198	0.45	0.37	1.86	Nuclear transport factor 2 (NTF2) domain//Type III secretion needle MxiH, YscF, SsaG, Eprl, PscF, EscF//Frog antimicrobial peptide
2754.56903	909	2.08	2.03	3.19	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.56972	533	0.47	0.51	0.6	Nematode antimicrobial peptide
2754.57603	408	1.8	4.02	3.68	Diapausin family of antimicrobial peptide

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.57674	2308	7.89	10.84	13.92	Diapausin family of antimicrobial peptide
2754.58619	7370	0.36	0.43	0.37	Frog antimicrobial peptide//Microfibril-associated glycoprotein (MAGP)
2754.59032	1674	0.81	0.69	0.82	Bee antimicrobial peptide
2754.59161 ^b	2216	0.79	0.91	21.21	Cathelicidin
2754.61004	4597	6.02	6.49	5.78	Diapausin family of antimicrobial peptide//Anticodon nuclease activator family//Uncharacterised protein family (UPF0182)//DHHC palmitoyltransferase
2754.67055	477	0.79	0.43	0.38	Nematode antimicrobial peptide//Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, dimerisation domain
2754.67397	2640	0.38	0.36	0.64	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//P5-type ATPase cation transporter//TIR domain//TIR domain
2754.67399	2353	0.81	0.61	0.51	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//TIR domain//P5-type ATPase cation transporter//TIR domain
2754.7998	3580	1.3	2.03	1.71	FtsK/SpolIIE family//Type II/IV secretion system protein//AIG1 family//Ferrous iron transport protein B//Ras family//50S ribosome-binding GTPase//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Septin//Protein of unknown function, DUF258
2754.9437	1791	0.5	0.81	0.86	Diapausin family of antimicrobial peptide//Picornavirus core protein 2A
28365.0	1030	0.69	0.34	0.79	Nematode antimicrobial peptide
29047.0	769	0.9	0.52	0.64	Nematode antimicrobial peptide//Neural proliferation differentiation control-1 protein (NPDC1)
30109.3	384	0.36	0.82	2.38	Bee antimicrobial peptide
30752.0	1249	0.98	0.89	0.85	Redoxin//Mycothioli maleylpyruvate isomerase N-terminal domain//Nematode antimicrobial peptide//AhpC/TSA family

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
4045.0	803	0.84	0.97	1.04	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
5679.0	657	0.32	0.56	0.51	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
7119.0	1197	0.7	0.78	0.73	Astacin (Peptidase family M12A)//TilS substrate binding domain//Frog antimicrobial peptide
2754.19709 ^b	2118	2.07	1.75	3.32	Protein tyrosine kinase//Hepcidin//Lipopolysaccharide kinase (Kdo/WaaP) family//Protein kinase domain
2754.19716	2060	1.72	1.89	1.11	Protein tyrosine kinase//Hepcidin//Protein kinase domain
2754.29609 ^b	634	3.13	6.83	4.9	Hepcidin
2754.37440 ^b	7574	1.57	2.07	2.1	MIF4G domain//eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon//NAD:arginine ADP-ribosyltransferase//Hepcidin
2754.41095 ^b	4491	0.45	0.41	0.87	Hepcidin//ABC transporter transmembrane region 2//ABC transporter//AAA domain, putative AbiEii toxin, Type IV TA system//IstB-like ATP binding protein
2754.47554 ^b	2239	18.78	20.5	21.86	Syntaxin//Type III secretion basal body protein I, YscI, HrpB, PscI//SNARE domain//Methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) signalling domain//Synaptobrevin//Hepcidin//ABC transporter C-terminal domain//DASH complex subunit Dad4//cGMP-dependent protein kinase interacting domain
2754.56380	6424	2.74	2.62	1.37	tRNA pseudouridine synthase//IPT/TIG domain//Hepcidin//GTPase-activator protein for Ras-like GTPase//Sema domain//Fungal cellulose binding domain//Plexin repeat

^aCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง antimicrobial peptide

^bระดับการแสดงออกของเปปไทด์ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังได้รับเชื้อทั้งที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อนได้รับเชื้อแบคทีเรีย (0 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4.7 KEGG pathway DEGs ที่ลดลงเทียบกับในสองช่วงเวลา

24 h vs 0 h		24 h vs 1h	
Pathway	gene number	Pathway	gene number
Intestinal immune network for IgA production	5	Primary immunodeficiency	6
Primary immunodeficiency	5	Intestinal immune network for IgA production	5
Asthma	4	Rheumatoid arthritis	6
Hematopoietic cell lineage	6	Asthma	4
Dilated cardiomyopathy	5	Leishmaniasis	6
Viral myocarditis	5	Hematopoietic cell lineage	6
Staphylococcus aureus infection	4	B cell receptor signaling pathway	7
Allograft rejection	4	Staphylococcus aureus infection	4
Autoimmune thyroid disease	4	Allograft rejection	4
Leishmaniasis	5	Autoimmune thyroid disease	4
Phagosome	6	Systemic lupus erythematosus	4
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	4	Salmonella infection	4
Systemic lupus erythematosus	4	Viral myocarditis	4
Rheumatoid arthritis	4	Toll-like receptor signaling pathway	5
B cell receptor signaling pathway	5	T cell receptor signaling pathway	5
Hypertrophic cardiomyopathy	3	Phagosome	5
Inflammatory bowel disease	3	Inflammatory bowel disease	3
Tuberculosis	5	Osteoclast differentiation	5
African trypanosomiasis	2	HTLV-I infection	8
Graft-versus-host disease	2	Colorectal cancer	4

4.5.1 ระดับการแสดงออกของ Unigene ดีเฟนซิน (defensin)

ดีเฟนซินจัดเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3-4 กิโลดาลตัน ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 12-50 กรดอะมิโน และมีประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นประจุบวก (cationic peptide) จากกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) และไลซีน (lysine) แล้วในโมเลกุลยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) จำนวน 6 กรดอะมิโนในสัตว์มีกระดูกสันหลังและ 6 กรดอะมิโนในกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและพืช จัดเรียงตัวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์จำนวน 3 พันธะ ทำให้มีโครงสร้างแบบ β -sheet ที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของเปปไทด์ชนิดนี้ ซึ่งในการเกิดพันธะไดซัลไฟด์แต่ละคู่ของกรดอะมิโนซิสเทอีนนี้จะเป็นตัวกำหนดชนิดของดีเฟนซิน โดยในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังสามารถพบดีเฟนซินได้ 3 รูปแบบคือ α -defensin มีรูปแบบการเชื่อมพันธะไดซัลไฟด์ของกรดอะมิโนซิสเทอีนตำแหน่งที่ 1 กับตำแหน่งที่ 6 ตำแหน่งที่ 2 กับตำแหน่งที่ 4 และตำแหน่งที่ 3 กับตำแหน่งที่ 5 β -defensin มีรูปแบบการเชื่อมพันธะไดซัลไฟด์ของกรดอะมิโนซิสเทอีนตำแหน่งที่ 1 กับตำแหน่งที่ 5 ตำแหน่งที่ 2 กับตำแหน่งที่ 4 และตำแหน่งที่ 3 กับตำแหน่งที่ 6 และ θ -defensin เป็นรูปแบบที่มีความแตกต่างจากดีเฟนซินทั้งสองรูปแบบแรกเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นรูปแบบที่ถูกตัดแต่งและเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโนจนมีรูปแบบที่เป็นวงกลมและเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นจากส่วน 9 กรดอะมิโนแรกของส่วน mature α -defensin peptide และรูปแบบ θ -defensin นี้สามารถพบได้เฉพาะในกลุ่มของ primate เท่านั้น (Li et al., 2014)

เปปไทด์ดีเฟนซินสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิต ทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง รวมไปถึงพืชก็สามารถพบเปปไทด์ดีเฟนซินได้ โดยในกลุ่มของสัตว์ต่างๆ เปปไทด์ดีเฟนซินพบได้ในเซลล์และเนื้อเยื่อที่มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการถูกบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่สามารถพบเปปไทด์ดีเฟนซินได้ในกลาณูลของเม็ดเลือดขาว เมื่อเม็ดเลือดขาวได้จับกินจุลินทรีย์แปลกปลอมเข้าไปใน phagocytic vacuoles กลาณูลจะทำหน้าที่ขนส่งเปปไทด์ดีเฟนซินไปยังถุงที่มีเชื้อจุลินทรีย์และปล่อยเปปไทด์ดีเฟนซินให้ออกมาทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินด้วยกระบวนการ phagocytosis และในกลุ่มของ paneth cell ที่มีการหลั่งกลาณูลเพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในการปกป้องเซลล์ของลำไส้เล็ก นอกจากนั้นยังพบเปปไทด์ดีเฟนซินในกลุ่มของ epithelial cell ที่มีการผลิตเปปไทด์ดีเฟนซินขึ้นเพื่อใช้ในการตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ (Li et al., 2014)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ดีเฟนซินพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อรา และรวมถึงไวรัสบางชนิด ซึ่งมีการยับยั้งการเจริญได้หลายรูปแบบ ซึ่งมีกลไกการยับยั้งทางตรงที่เกิดจากคุณสมบัติการมีประจุบวกและความเป็น hydrophobic ของเปปไทด์ดีเฟนซินทำให้สามารถเกิด interaction กับ anionic phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย หลังจากนั้นจะเกิดการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย และทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ขึ้น นอกจากนี้เปปไทด์ดีเฟนซินยังสามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเพื่อเข้าทำการยับยั้งการสังเคราะห์ RNA DNA รวมไปถึงโปรตีนของแบคทีเรีย และกลไกทางอ้อมของดีเฟนซินสามารถกระตุ้น immune cell ให้เข้ายับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งใน innate immune และ adaptive immune รวมไปถึงการกระตุ้นและควบคุมการแสดงออกของ cytokines และ chemokines ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย

(Ulm et al., 2012) นอกจากการเข้ายับยั้งแบคทีเรียแล้ว ดีเฟนซินยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การลดการอักเสบ การสมานแผลและการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Ulm et al., 2012) การยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Yang et al., 2002) เป็นต้น

สำหรับการทดลองในครั้งนี้ พบ unigene ของ defensin มากถึง 69 unigene โดยพบ Unigene Cluster 19154.3, 20270, 2754.22019, 2754.30007, 2754.303, 2754.36967, 2754.40936, 2754.42731, 2754.59689, 2754.6284, 2754.24604, 2754.32036, 2754.34283, 2754.38406, 2754.40290, 2754.41258, 2754.41259, 2754.41261, 2754.47999, 2754.49186, 2754.52185, 2754.61223, 6034, 2754.30575, 10104, 10267, 15595, 2754.28141, 2754.5332, 2754.53224, 30122.0, 4076.0, 2754.62579, 5592.0, 25944, 2754.9461 ที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหลังได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (1 h) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับเชื้อ (0 h) ซึ่งพบ Unigene Cluster 19154.3, 20270, 2754.30005, 2754.303, 2754.36967, 2754.40936, 2754.42731, 2754.59689, 2754.24604, 2754.34283, 2754.38406, 2754.41261, 2754.47999, 6034, 10104, 10267, 15595, 2754.28141, 2754.9461 ที่มีการตอบสนองเมื่อจะระคายเคืองได้รับเชื้อก่อโรค โดยเพิ่มระดับการแสดงออกอย่างรวดเร็วเมื่อจะระคายเคืองได้รับเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และระดับการแสดงออกของ Unigene เหล่านี้จะมีระดับลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังจากจะระคายเคืองได้รับเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้แล้วยังพบ Unigene Cluster 2754.37463, 2754.47711, 2754.66528, 18521, 2754.24926, 2754.41256, 29538, 2754.4638, 2754.53097 ที่มีการตอบสนองด้วยการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ส่วน Unigene Cluster 2754.22019, 2754.6284, 2754.32036, 2754.4029, 2754.41259, 2754.49186, 2754.52185, 2754.61223, 2754.30575, 2754.5332, 30122.0, 4076.0, 2754.62579, 5592.0 นั้นพบระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นทั้งหลังได้รับเชื้อที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อนได้รับเชื้อแบคทีเรีย (0 ชั่วโมง) (ตารางที่ 4.8)

จากผลการแสดงออกของ Unigene ดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า defensin เป็นเปปไทด์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของจะเข้ โดยพบ defensin ที่ตอบสนองในหลากหลายรูปแบบ เช่นกลุ่ม Unigene ที่ตอบสนองอย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 ชั่วโมงเมื่อจะเข้ได้รับเชื้อเพื่อช่วยในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคที่จะเข้ได้รับ และมีระดับการแสดงที่ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lorenzo Alibardi และคณะ (2012) ที่พบบริเวณแผลของกิ้งก่ามีการแสดงออกของ β -defensin ที่มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial barrier เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งรายงานผลการทดลองของ Lorenzo Alibardi และคณะ (2013) ซึ่งได้ทำการศึกษา β -defensin (Tu-BD-1) จากผิวและ subdermal granulocytes ของเต่า พบว่า TU-BD-1 เป็นองค์ประกอบหลักใน granulocytes ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่ผิวหนังและจะมีการแสดงออกเมื่อเกิดบาดแผล

4.5.2 ระดับการแสดงออกของ Unigene เฮปซิดิน (Hepcidin)

เฮปซิดิน (hepcidin) เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีประจุบวก ถูกค้นพบครั้งแรกในมนุษย์ โดยพบว่าทำหน้าที่ในการกำจัดแบคทีเรีย (antibacterial) และเชื้อรา (antifungal) (Hao et al., 2012) ข้อมูลจากผลการทดลองครั้งนี้ พบยีนเฮปซิดินมากถึง 7 Unigene ซึ่งได้แก่ Cluster 2754.19709, 2754.19716, 2754.29609, 2754.37440, 2754.41095, 2754.47554 และ 2754.56380 โดยพบ Cluster 2754.29609, 2754.37440 และ 2754.47554 ที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากจะเข้สยามได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ซึ่ง Cluster 2754.29609 และ 2754.37440 นั้นมีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.9) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเฮปซิดิน cluster เหล่านี้จะเป็นเปปไทด์ต้านแรกที่ตอบสนองเพื่อกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในกระเพาะ จากรายงานการทดลองของ Hao et al. (2012) ซึ่งได้ค้นพบเฮปซิดินในกระเพาะสยาม (*C. siamensis*) โดยเปปไทด์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 26 กรดอะมิโน (Cshepc) (FNSHFPICSYCCNCCRNKGCGLCRT) และคาดว่าเป็นเปปไทด์ส่วนที่พร้อมทำงาน นอกจากนี้จากการศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ดังกล่าวในเชื้อยีสต์ พบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ที่ยังไม่ได้ทำการแยกบริสุทธิ์นั้น มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และ *Aeromonas sobria* ได้อีกด้วย (Hao et al., 2012)

ตารางที่ 4.8 ระดับการแสดงออกของเปปไทด์ดีเฟนซิน (defensin) ในกระชังสยามที่มีการติดเชื้อในแต่ละช่วงเวลา

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
19154.3	2278	0.9	1.3	0.75	Defensin propeptide
20270.0	2480	0.63	0.74	0.47	Potassium channel Kv1.4 tandem inactivation domain//Peroxisome biogenesis factor 1, N-terminal//Big defensin//Aspartyl beta-hydroxylase N-terminal region
2754.22019 ^b	2166	1.95	2.4	3.1	Big defensin
2754.30005	2749	7.53	7.21	5.93	Armadillo/beta-catenin-like repeat//Importin beta binding domain//Proteasome non-ATPase 26S subunit//Big defensin
2754.30007	2632	19.67	21.87	21.42	Big defensin//Proteasome non-ATPase 26S subunit//Armادillo/beta-catenin-like repeat//Importin beta binding domain
2754.303	3348	1.55	1.87	1.61	ATP1G1/PLM/MAT8 family//Dystroglycan (Dystrophin-associated glycoprotein 1)//Flavivirus non-structural protein NS4A//Big defensin
2754.34007	4329	154.64	158.99	159.05	Defensin-like peptide family
2754.36912	861	203.05	194.68	177.33	Big defensin//Protein kinase domain//Protein tyrosine kinase
2754.36967	4507	41.77	44.65	38.97	Defensin-like peptide family
2754.37070	1991	4.32	3.05	3.43	Cobalamin biosynthesis protein CobT//Centromere protein H (CENP-H)//DHHA1 domain//Beta defensin//RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP
2754.37463	2934	4.18	3.56	4.46	Defensin-like peptide family
2754.40936	1436	2.69	4.47	1.02	Defensin-like peptide family
2754.41308	1910	12.53	12.34	10.62	Molybdopterin-binding domain of aldehyde dehydrogenase//Big defensin
2754.42731	649	6.05	11.95	1.68	Defensin-like peptide family//FlgN protein

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.46734	889	7.42	6.31	4.13	Big defensin
2754.47359	3471	1.5	1.55	1.59	Defensin-like peptide family
2754.47711	1499	0.59	0.52	1.13	Defensin-like peptide family
2754.59689	4319	0.75	1.41	1.06	HECT-domain (ubiquitin-transferase)//Defensin-like peptide family
2754.6284 ^b	3300	4.59	4.87	18.92	EF hand//EF-hand domain//EF-hand domain pair//EF-hand domain pair//Defensin-like peptide family//EF hand
2754.66528	960	0.8	0.79	1.34	Big defensin//Protein of unknown function (DUF972)
3069.0	3318	0.79	0.63	0.5	Zinc finger, C4 type (two domains)//Ligand-binding domain of nuclear hormone receptor//Big defensin
31152.0	440	2.43	1.88	0.46	Big defensin
6306.0	1073	0.61	0.58	0.35	Big defensin//Lipoxygenase
18521.0	426	2.38	0.59	2.01	Beta defensin
2754.19385	445	0.67	0.44	0.38	Beta defensin//Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain
2754.24604	3453	0.52	0.81	0.71	Beta defensin
2754.24926	647	0.43	0.35	0.63	Beta defensin
2754.32036 ^b	1004	0.33	0.41	0.76	Beta defensin//S4 domain
2754.34283	4883	49.95	52.46	35.37	Beta defensin
2754.38260	3037	1.6	0.77	1.54	Beta defensin//Immunoglobulin domain
2754.38406	3297	3.59	4.36	2.56	Adenylate cyclase associated (CAP) N terminal//Beta defensin
2754.40290 ^b	2271	0.88	1.03	1.46	Transducer of regulated CREB activity, N terminus//Beta defensin//Bunyavirus non-structural protein NS-s
2754.41256	4486	1.8	0.65	2.16	PA26 p53-induced protein (sestrin)//Cobalamin biosynthesis protein

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
					CobT//Autophagy protein Apg6//RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)//Frog antimicrobial peptide//Prolactin-releasing peptide//DHHA1 domain//Beta defensin//Centromere protein H (CENP-H)//RING-H2 zinc finger
2754.41258	2155	2.59	3.33	3.31	Beta defensin//DHHA1 domain//Centromere protein H (CENP-H)//Cobalamin biosynthesis protein CobT//RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)//PA26 p53-induced protein (sestrin)//Autophagy protein Apg6
2754.41259 ^b	2030	3.67	6.5	10.47	Beta defensin//DHHA1 domain//Cobalamin biosynthesis protein CobT//Centromere protein H (CENP-H)//Autophagy protein Apg6//PA26 p53-induced protein (sestrin)//RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)
2754.41261	2458	3.13	3.66	3.02	Centromere protein H (CENP-H)//Cobalamin biosynthesis protein CobT//Beta defensin//DHHA1 domain//RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)//Autophagy protein Apg6//PA26 p53-induced protein (sestrin)
2754.44068	3160	1.6	1.58	1.19	Immunoglobulin domain//Beta defensin
2754.46071	667	1.94	1.27	0.31	Beta defensin
2754.47999	2913	1.11	1.44	1.19	Bunyavirus non-structural protein NS-s//Beta defensin//Transducer of regulated CREB activity, N terminus
2754.48377	2003	2.4	2.2	2.3	Beta defensin//DHHA1 domain//Cobalamin biosynthesis protein CobT//RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)//Autophagy protein Apg6//PA26
2754.49186 ^b	818	5.38	6.21	10.33	Beta defensin

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.52185 ^b	2042	5.09	5.81	8.54	RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)//Autophagy protein Apg6//PA26 p53-induced protein (sestrin)//DDHD domain//DHHA1 domain//Beta
2754.53580	4293	1.07	1.02	0.6	AhpC/TSA family//Beta defensin
2754.5798	1073	0.96	0.37	0.64	Beta defensin
2754.58310	2811	1.99	2	3.65	Bunyavirus non-structural protein NS-s//Transducer of regulated CREB activity, N terminus//Beta defensin
2754.61223 ^b	1383	0.65	1.14	1.49	Beta defensin//Metal binding domain of Ada
29538.0	2239	0.84	0.73	1.03	Beta defensin//MIZ/SP-RING zinc finger
6034.0	551	0.44	0.94	0.56	Beta defensin
2754.30575 ^b	6644	13.22	16.52	63.06	EAT repeat//Mammalian defensin//Adaptin N terminal region//Man1-Src1p-C-terminal domain//Beta2-adaptin appendage, C-terminal sub-domain//Apoptosis
10104.0	664	0.62	1.1	0.4	Arthropod defensin
10267.0	1034	0.42	0.5	0.47	Arthropod defensin
15595.0	2927	0.53	0.73	0.69	Arthropod defensin
2754.28141	1845	3.06	3.3	2.2	Arthropod defensin
2754.46380	419	2.77	1.54	3.15	Arthropod defensin
2754.53097 ^b	2081	8.16	6.7	9.53	WD domain, G-beta repeat//Arthropod defensin
2754.5332 ^b	1164	7.48	8.42	12.71	Arthropod defensin//Peptidyl-tRNA hydrolase PTH2//Protein kinase domain
2754.53224	1711	3.36	3.7	3.43	Arthropod defensin
2754.5331	1244	0.99	0.7	0.43	Arthropod defensin//Protein kinase domain//Peptidyl-tRNA hydrolase PTH2
30122.0 ^b	806	0.45	0.56	0.59	Arthropod defensin

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
4076.0 ^b	668	0.41	0.44	0.6	Arthropod defensin
2754.62579 ^b	2781	0.39	1.12	2.11	Myotoxin, crotonamine
5592.0 ^b	5561	0.61	0.71	0.77	Myotoxin, crotonamine//GDA1/CD39 (nucleoside phosphatase) family
25944.0	773	0.65	1.03	0.32	Viral DNA topoisomerase I, N-terminal//Myotoxin, crotonamine
2754.55873	5296	0.68	0.4	0.33	Ctr copper transporter family//Protein kinase domain//Protein tyrosine kinase//Myotoxin, crotonamine
2754.62577	7131	2.12	1.47	1.29	Myotoxin, crotonamine//WD domain, G-beta repeat
2754.62580	3895	1.53	1.41	1.45	Myotoxin, crotonamine//WD domain, G-beta repeat
2754.9461	2058	0.82	1.18	0.78	Myotoxin, crotonamine//TNFR/NGFR cysteine-rich region
2754.55874	5307	1.72	1.44	0.87	Protein tyrosine kinase//Myotoxin, crotonamine//Protein kinase domain//Ctr copper transporter family
2754.55873	5296	0.68	0.4	0.33	Ctr copper transporter family//Protein kinase domain//Protein tyrosine kinase//Myotoxin, crotonamine

^aCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง defensin peptide

^bระดับการแสดงออกของเปปไทด์ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังได้รับเชื้อทั้งที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อนได้รับเชื้อแบคทีเรีย (0 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4.9 ระดับการแสดงออกของเปปไทด์เฮปซิดิน (hepcidin) ในกระช้ำสยามที่มีการติดเชื้อในแต่ละช่วงเวลา

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.19709	2118	2.07	1.75	3.32	Protein tyrosine kinase//Hepcidin//Lipopolysaccharide kinase (Kdo/WaaP) family//Protein kinase domain
2754.19716	2060	1.72	1.89	1.11	Protein tyrosine kinase//Hepcidin//Protein kinase domain
2754.29609	634	3.13	6.83	4.9	Hepcidin
2754.37440 ^b	7574	1.57	2.07	2.1	MIF4G domain//eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon//NAD:arginine ADP-ribosyltransferase//Hepcidin
2754.41095	4491	0.45	0.41	0.87	Hepcidin//ABC transporter transmembrane region 2//ABC transporter//AAA domain, putative AbiEii toxin, Type IV TA system//IstB-like ATP binding protein
2754.47554 ^b	2239	18.78	20.5	21.86	Syntaxin//Type III secretion basal body protein I, YscI, HrpB, PscI//SNARE domain//Methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) signalling domain//Synaptobrevin//Hepcidin//ABC transporter C-terminal domain//DASH complex subunit Dad4//cGMP-dependent protein kinase interacting domain
2754.56380	6424	2.74	2.62	1.37	tRNA pseudouridine synthase//IPT/TIG domain//Hepcidin//GTPase-activator protein for Ras-like GTPase//Sema domain//Fungal cellulose binding domain//Plexin repeat

^aCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง Hepcidin peptide

^bระดับการแสดงออกของเปปไทด์เฮปซิดินที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง หลังมีการติดเชื้อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการติดเชื้อ (0 ชั่วโมง)

4.5.3 ระดับการแสดงออกของ Unigene แอลอีเอพี 2 (LEAP-2)

โดยเปปไทด์แอลอีเอพี 2 (LEAP-2) เป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีความยาว 40 กรดอะมิโน โดยประมาณ ประกอบด้วยกรดอะมิโนสี่ชนิดอื่นจำนวน 4 กรดอะมิโน มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก และมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากเปปไทด์เฮปซีดิน (Krause et. al., 2003) เปปไทด์แอลอีเอพี 2 พบมีการแสดงออกได้ทั้งในตับและอวัยวะอื่น ๆ แต่พบว่าการแสดงออกมากที่สุดในระดับ มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ข้อมูลจากผลการทดลองครั้งนี้ พบยีนแอลอีเอพี 2 ถึง 28 Unigene ดังแสดงในตารางที่ 4.10 โดยพบ Unigene Cluster 2754.30053, 2754.3661 และ 2754.7998 ที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหลังได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (1 h) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับเชื้อ (0 h) และระดับการแสดงออกของ Unigene เหล่านี้จะมีระดับลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังจากจะเข้าสู่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบ Unigene Cluster 2754.18501, 2754.19290, 2754.19532, 2754.20641, 2754.23168, 2754.38759, 2754.50358 ที่มีการตอบสนองด้วยการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนหลังได้รับเชื้อทั้งที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อนได้รับเชื้อแบคทีเรีย (0 ชั่วโมง) (ตารางที่ 4.10)

จากผลการแสดงออกของ Unigene ดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าแอลอีเอพี 2 เป็นเปปไทด์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้ โดยการตอบสนองสามารถพบได้ในหลากหลายรูปแบบ เช่นกลุ่ม Unigene ที่ตอบสนองอย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 ชั่วโมงเมื่อจระเข้ได้รับเชื้อ เพื่อช่วยในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคที่จระเข้ได้รับอย่างทันที และมีระดับการแสดงที่ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อเกิดการติดเชื้อจากแบคทีเรีย เปปไทด์แอลอีเอพี 2 นี้ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเปปไทด์เพิ่มขึ้น (Sang et.al., 2006; Hocquelllet et.al., 2010; Henriques et.al., 2010)

ตารางที่ 4.10 ระดับการแสดงออกของเปปไทด์ LEAP-2 ในกระชี่สยามที่มีการติดเชื้อในแต่ละช่วงเวลา

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
23279.1	471	0.82	0.45	0.59	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2355.0	581	1.44	0.71	0.51	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.15467	2959	0.81	0.52	0.35	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Phage small terminase subunit//Mediator complex subunit MED14//Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)
2754.18501 ^b	2074	1.61	2.01	2.3	Armadillo/beta-catenin-like repeat//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.19290 ^b	4630	1.02	1.04	1.32	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Sulfotransferase domain
2754.19532 ^b	1877	2.89	2.97	3.4	BTB/POZ domain//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.20602	4475	1	0.61	0.74	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Sulfotransferase domain
2754.20641 ^b	1568	4.28	4.32	4.58	Prefoldin subunit//RNA polymerase II transcription mediator complex subunit 9//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Sensor protein DegS//Sigma-70 factor, region 1.1
2754.23168 ^b	1838	21.94	23.85	24.5	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.24571	4527	6.39	6.28	7.64	Sulfotransferase domain//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.25966	6250	5.8	5.25	5	PLAT/LH2 domain//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.2876	1454	0.7	0.35	1.04	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.29639	628	0.46	0.49	0.33	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.30053	1632	59.7	65.15	58.6	Prefoldin subunit//RNA polymerase II transcription mediator complex subunit 9//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Autophagy protein

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
					Apg6//Outer membrane protein (OmpH-like)//Sensor protein DegS
2754.36610	4421	48.34	195.11	72.99	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar)//Protein prenyltransferase alpha subunit repeat//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.37926	5401	6.39	6.65	6.7	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.38759 ^b	2800	17.58	16.96	18.02	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.46550	1423	1.09	0.92	1.9	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.47196	5814	3.58	3.05	4.91	EF hand//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//EF hand//EF-hand domain//Copper transport outer membrane protein, MctB//EF-hand domain pair//EF-hand domain pair
2754.48282	4034	0.39	0.49	0.31	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Sulfotransferase domain
2754.50358 ^b	3501	0.9	1.19	6.75	EF hand//Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//EF-hand domain//EF hand//EF-hand domain pair//Copper transport outer membrane protein, MctB//EF-hand domain pair
2754.51627	1500	1.07	0.78	0.89	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.56903	909	2.08	2.03	3.19	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
2754.67397	2640	0.38	0.36	0.64	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//P5-type ATPase cation transporter//TIR domain//TIR domain
2754.67399	2353	0.81	0.61	0.51	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//TIR domain//P5-type ATPase cation transporter//TIR domain
2754.7998	3580	1.3	2.03	1.71	FtsK/SpoIIIE family//Type II/IV secretion system protein//AIG1 family//Ferrous iron transport protein B//Ras family//50S ribosome-binding GTPase//Liver-expressed

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
					antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)//Septin//Protein of unknown function, DUF258
4045.0	803	0.84	0.97	1.04	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)
5679.0	657	0.32	0.56	0.51	Liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor (LEAP-2)

^aCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง LEAP-2 peptide

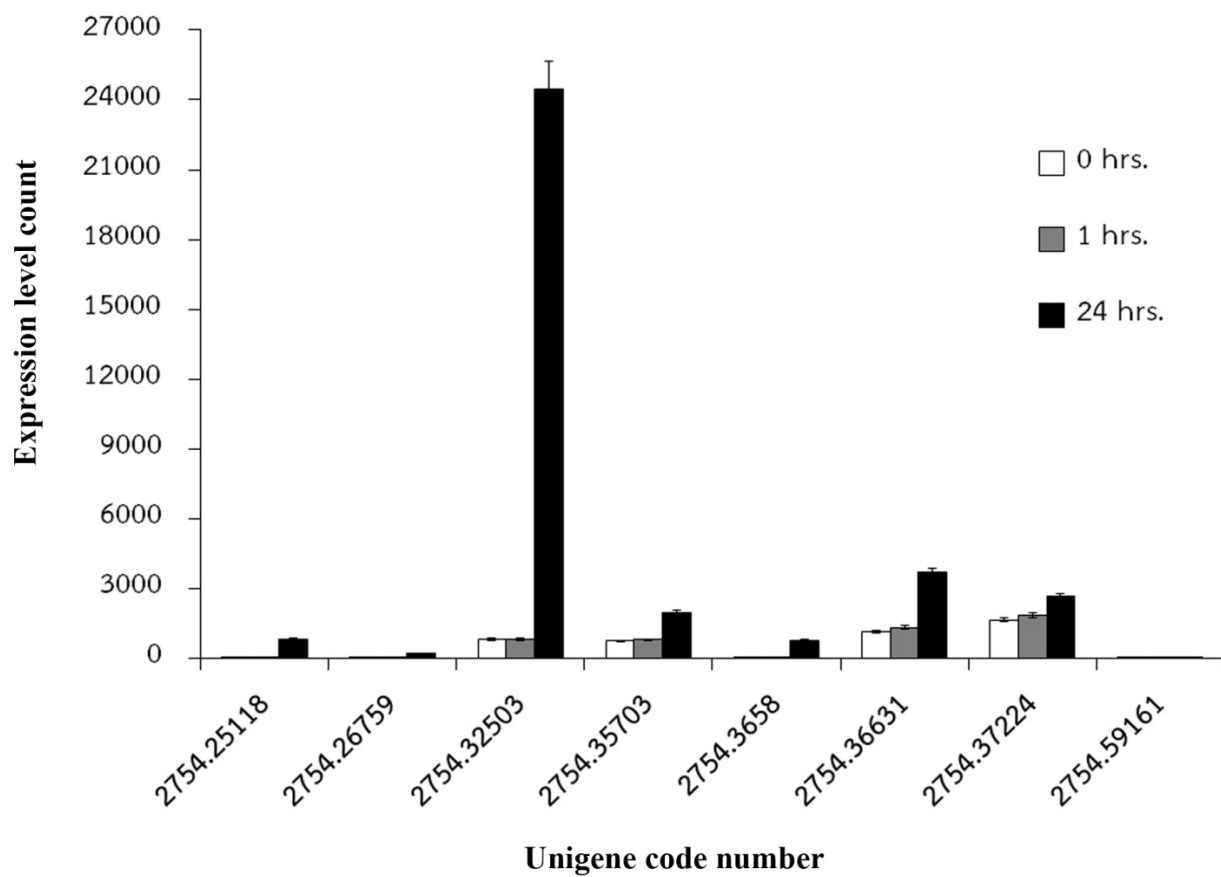
^bระดับการแสดงออกของเปปไทด์ LEAP-2 ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง หลังมีการติดเชื้อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการติดเชื้อ (0 ชั่วโมง)

4.5.4 ระดับการแสดงออกของ Unigene คาเธลิซิน (Cathelicidin)

แคธลิซินเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเปปไทด์ชนิดนี้พบมากในสัตว์เลื้อยคลาน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบเปปไทด์แคธลิซินในไข่ของจระเข้ จากการศึกษาเปปไทด์แคธลิซินและเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ ในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ชนิดอื่น ทำให้ทราบว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดมีวิวัฒนาการก่อนระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น อย่างน้อย 750 ล้านปี ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในแง่ของการเข้าทำงานก่อนระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นและจำเป็นในการทำให้เกิดความจำเพาะของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด ซึ่งเปปไทด์ออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้จะถูกสร้างขึ้นในรูปที่ไม่พร้อมทำงาน (pre-propeptide) ก่อน เมื่อได้รับการตัดบางส่วนออกด้วยเอนไซม์ จึงจะสามารถทำงานในการต้านจุลชีพได้ ในมนุษย์เปปไทด์แคธลิซิน จะเก็บไว้ในแกรนูลอะซิวโรฟิลิก (azurophilic granule) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในรูปของเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน เช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูงชนิดอื่นๆ เมื่อถูกตัดบางส่วนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (เอนไซม์อีลาสเทส หรือ ซีรีนโปรตีเอส) จึงจะอยู่ในรูปเปปไทด์แคธลิซินที่พร้อมทำงาน ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ไม่มีการดอเมมิโนซิสเตอีน โครงสร้างระดับทุติยภูมิเป็นแอลฟาเฮลิกซ์ มีการดอเมมิโนประมาณ 12-88 กรดอะมิโน เป็นแคธลิซินที่พบในสัตว์เลื้อยคลานชนิดต่าง ๆ มีการแสดงออกแบบอนุรักษบริเวณปลายอะมิโน (N-terminus) ในเส้นเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน (conserved cathelin domain) (Tongaonkar et al., 2012)

ข้อมูลจากผลการทดลองครั้งนี้ พบยีนแคธลิซินมากถึง 10 Unigene ซึ่งได้แก่ Cluster 2754.32503, 2754.57712, 2754.37224, 2754.35703, 2754.59161, 2754.36580, 2754.36631, 2754.36595, 2754.25118 และ 2754.26759 โดยพบ 8 Unigene ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงเมื่อจระเข้สยามได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 4.11 โดยทั้ง 8 พบระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นทั้งหลังได้รับเชื้อที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อนได้รับเชื้อแบคทีเรีย (0 ชั่วโมง) (ตารางที่ 4.11) เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนแคธลิซินแต่ละ Cluster ในแต่ละช่วงเวลาพบว่า Cluster 2754.32503 มีระดับการแสดงออกของยีนที่เวลา 24 ชั่วโมงเมื่อจระเข้สยามได้รับเชื้อมากที่สุด (รูปที่ 4.12)

จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของคาเธลิซินซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่พร้อมทำงาน (pre-propeptide) พบว่าบริเวณปลาย N ของคาเธลิซินประมาณ 30 กรดอะมิโนเป็นส่วนของ signal sequence หลังจากนั้นประมาณ 90 กรดอะมิโนจะเป็นบริเวณของกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์สูง (cathelin-like domain) และในส่วนของปลาย C พบว่าเป็นลำดับกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์ต่ำ (heterogeneous C-terminal antimicrobial domain) ซึ่งทำหน้าที่เป็น mature peptide สำหรับการยับยั้งแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังพบการอนุรักษ์กรดอะมิโนซิสเตอีนถึง 4 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของคาเธลิซิน (Gao et al., 2015) (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของเปปไทด์คาเทลิซิน (cathelicidin) ในจระเข้สยาม (*C. siamensis*) ที่มีการติดเชื้อในแต่ละช่วงเวลา

ตารางที่ 4.11 ระดับการแสดงออกของเปปไทด์คาเทลิซิน (cathelicidin) ในกระช้ำสยามที่มีการติดเชื้อในแต่ละช่วงเวลา

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.25118 ^b	881	47.8	55.68	811.1	Adenylate kinase, active site lid//Cathelicidin//Cystatin domain//Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)
2754.26759 ^b	869	5.28	4.56	196.85	Cathelicidin//Cystatin domain//Adenylate kinase, active site lid//Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)
2754.32503 ^b	670	795.55	811.78	24464.57	Phosphoribosyl-dephospho-CoA transferase MdcG//Cathelicidin
2754.35703 ^b	1523	742.13	787.64	1939.17	Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)//Cathelicidin
2754.36580 ^b	562	9.8	8.9	744.67	Mediator complex subunit 3 fungal//Cystatin domain//Cathelicidin//Procyclic acidic repetitive protein (PARP)
2754.36631 ^b	1784	1141.36	1322.49	3673.06	Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)//Fibronectin-attachment protein (FAP)//Cathelicidin
2754.37224 ^b	1321	1635.88	1850.03	2661.23	Cathelicidin//Secreted phosphoprotein 24 (Spp-24)
2754.59161 ^b	2216	0.79	0.91	21.21	Cathelicidin

^aCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง Cathelicidin peptide

^bระดับการแสดงออกของเปปไทด์คาเทลิซินที่เพิ่มขึ้นที่เวลาต่างๆ

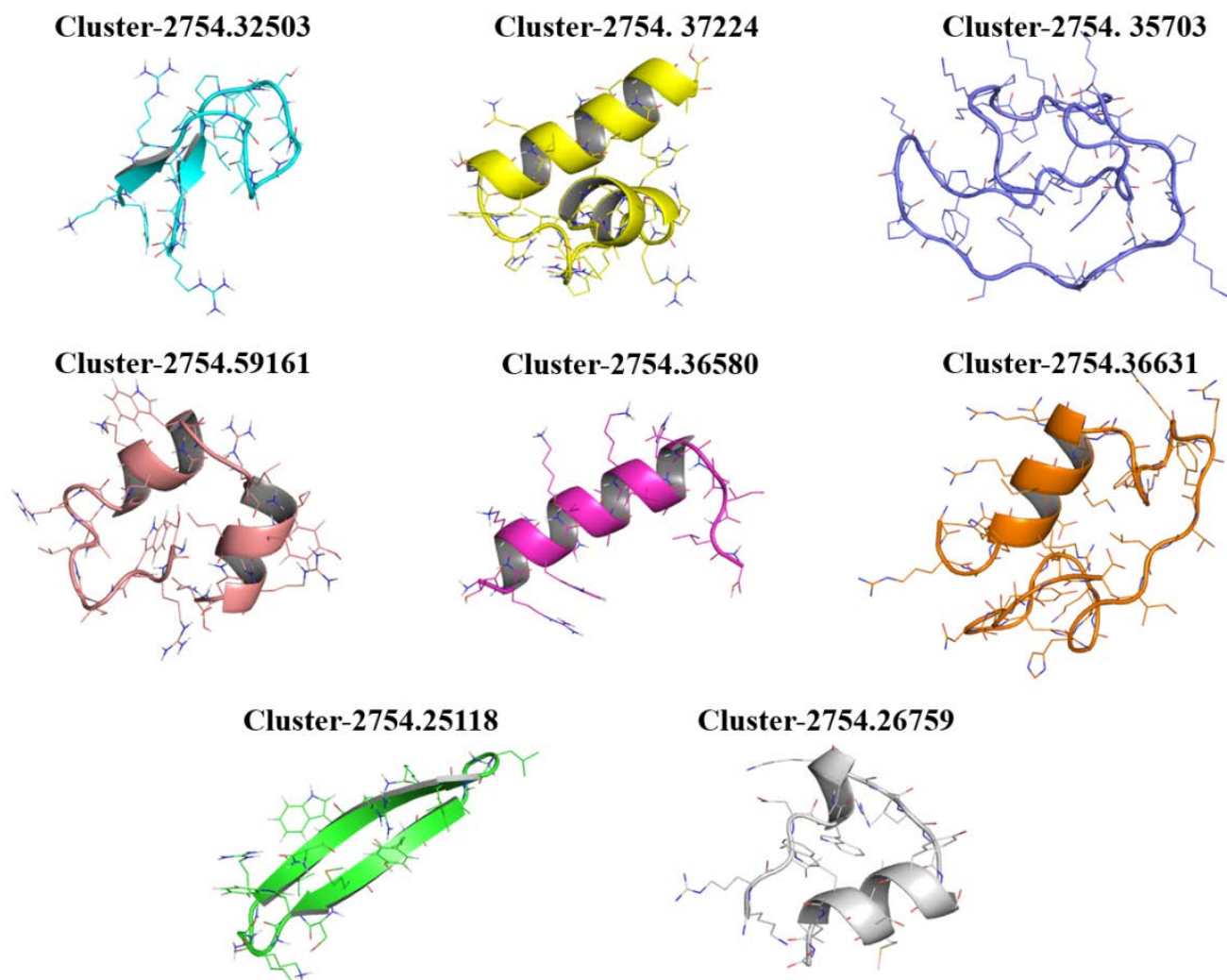
Cluster-2754.32503	-----PTPSYAQALATAVDVYNRSGVDVAFRVLEA	31
Cluster-2754.57712	---MKG--CWALVVLVGCM--APAAAQSQLSSNEAISLAVDFYNRGLAVNNTFQLLRA	52
Cluster-2754.59161	---MKG--CWALVVLVGCM--APAAAQSQLSSNEAISLAVDFYNRGLAVNNTFQLLRA	52
Cluster-2754.35703	---MGR--GWVLLGLLATLVAALASQRKLLSYGEAASFAVDFYNQPGVDHTFRLLDV	55
Cluster-2754.37224	---MGR--GWVLLGLLATLVAALASQRKLLSYGEAASFAVDFYNQPGVDHTFRLLDV	55
Cluster-2754.36631	---MGR--GWVLLGLLATLVAALASQRKLLSYGEAASFAVDFYNQPGVDHTFRLLDV	55
Cluster-2754.36595	---MGR--GWVLLGLLATLVAALASQRKLLSYGEAASFAVDFYNQPGVDHTFRLLDV	55
Cluster-2754.36580	-----AQAQASYETAVATAVDIYNQEPGLAQAYRLLEA	33
Cluster-2754.25118	MQPCPRALLVLALVLAAGAVAVAVAPAPPAPSGYQEAALAAVDTYNRESGQPQAYRLLEA	60
Cluster-2754.26759	MQPCPRALLV---LGAAVAVAVAPAPPAPSGYQEAALAAVDTYNRESGQPQAYRLLEA	56
	. * : *** **: . .::* .	
Cluster-2754.32503	ESRDDWDASQDPLRQLEFTLKETECFVGDDQPLDQC GFKDGGAVIDCTATFSCSEASLMV	91
Cluster-2754.57712	APDGDVVSQKPFERRLNFTIMETTCFVAGQLPSEPCQFKENGLVRACVGFFSAQQVAPLI	112
Cluster-2754.59161	APDGDVVSQKPFERRLNFTIMETTCFVAGQLPSEPCQFKENGLVRACVGFFSAQQVAPLI	112
Cluster-2754.35703	EPQPAWDTMAKSCQEVRFVRETVCPRADPPASECDFQDNGLVNRNCTWLFSTKLKLPAS	115
Cluster-2754.37224	EPQPAWDTMAKSCQEVRFVRETVCPRADPPASECDFQDNGLVNRNCTWLFSTKLKLPAS	115
Cluster-2754.36631	EPQPAWDTMAKSCQEVRFVRETVCPRADPPASECDFQDNGLVNRNCTWLFSTKLKLPAS	115
Cluster-2754.36595	EPQPAWDTMAKSCQEVRFVRETVCPRADPPASECDFQDNGLVNRNCTWLFSTKLKLPAS	115
Cluster-2754.36580	EPQDSWNPASQAAPLKFVTKETTCPIAQKGNLQCCDFKENGLIKDCSGLFTAGKKPPVT	93
Cluster-2754.25118	EPQPPWDPASQPVQPLRFSEIKETTCLVSEKRDVGQC PFKDEGLVKDCTGIYSAEKKPPIV	120
Cluster-2754.26759	EPQPPWDPASQPVQPLRFSEIKETTCLVSEKRDVGQC PFKDEGLVKDCTGIYSAEKKPPIV	116
	. : . * : * * . . * * : * : * : :	
Cluster-2754.32503	LVACQPAEPPPTDRRGLFKKLKKIKKAFKKVFKRLPPVG-----VGI	135
Cluster-2754.57712	VVTCEEAPSE-----	122
Cluster-2754.59161	VVTCEEAPSEPVTRW-----IG-----LVRGGLKL-AGWGLR---T	146
Cluster-2754.35703	IITCDTMTPGKDVHAKPKPKP-----GKDERGWPMSG-----SWIGKGTFF	156
Cluster-2754.37224	IITCDTATPPPQGLCKGPVDL-----ASRLHQRPAAPLLRGS-----SWGQLGQGL	161
Cluster-2754.36631	IITCDTMTPGKHARVRRS-GW-----RDRIKRRRGFGSRRGRFTLIAHGKKKGHN	165
Cluster-2754.36595	IITCDTMTPGKHARVRRS-GW-----RDRIKRRRGFGSRRGRFTLIAHGKKKGHN	165
Cluster-2754.36580	DVKCVDSAQEPPELVTRR--KW-----WKT-----ALK---IAHDVI-LG----	126
Cluster-2754.25118	TAVCKDAGQEPPELVKRV--NW-----RKI-----GLG---ASYVMSWLG----	154
Cluster-2754.26759	TAVCKDAGQEPPELVKRV--NW-----RKI-----GLG---ASYVMSWLG----	150
	*	
Cluster-2754.32503	SVPLAGRR--	143
Cluster-2754.57712	-----	122
Cluster-2754.59161	YLNRRQ----	152
Cluster-2754.35703	SFPITKKPVG	166
Cluster-2754.37224	MDAAA-----	166
Cluster-2754.36631	YGNIA-----	170
Cluster-2754.36595	YGNIA-----	170
Cluster-2754.36580	-----	126
Cluster-2754.25118	-----	154
Cluster-2754.26759	-----	150

รูปที่ 4.13 Amino acid sequence alignment ของคาเลลิซิน

เมื่อศึกษาสมบัติของ mature peptide พบว่า mature peptide มีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 19-40 กรดอะมิโน (มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 2019.469-4609.254 g/mol) มีประจุสุทธิที่ pH 7 ตั้งแต่ +1 ถึง +12 และมี hydrophobic ratio ตั้งแต่ 21-45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.12) ประจุบวกและความเป็นไฮโดรโฟบิกของเปปไทด์ดังกล่าวมานี้เป็นสมบัติซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของคาเลลิซินเปปไทด์ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มประจุบวก (cationic antimicrobial peptide) อย่างไรก็ตามพบว่า Cluster-2754.57712 นั้นไม่สามารถที่จะวิเคราะห์เส้นเปปไทด์ได้ ส่วน Cluster-2754.36631 และ Cluster-2754.36595 นั้นพบว่าทั้ง 2 ยีน ถอดรหัสได้เปปไทด์ที่ลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันคือ RRSWDRRIKRRRGFGSRRGRFTLIAHGKKKGHN NYGNIA (ตารางที่ 4.12)

เมื่อทำการทำนายถึงโครงสร้างทุติยภูมิของส่วนที่ทำหน้าที่เป็น mature peptide พบว่า mature peptide มีโครงสร้างทุติยภูมิแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มมีโครงสร้างเป็นแบบ α -helix (Cluster-2754.37224, Cluster-2754.59161, Cluster-2754.36580, Cluster-2754.36631, และ Cluster-2754.26759) แบบ β -sheet (Cluster-2754.32503 และ Cluster-2754.25118) และแบบ random coil

(Cluster-2754.35703) (รูปที่ 14) ซึ่งลักษณะโครงสร้างทั้งสามแบบที่กล่าวมานี้เป็นโครงสร้างที่สามารถพบได้ในเปปไทด์กลุ่มคาเธลิซินและมีบทบาทสำคัญในการแสดงกลไกในการยับยั้งแบคทีเรีย (Ling et al., 2014; Tomasinsig and Zanetti, 2005)



รูปที่ 4.14 โครงสร้างทุติยภูมิของ Candidate เปปไทด์คาเธลิซินจากจระเข้สยาม

ตารางที่ 4.12 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเปปไทด์คาเทลิซิน

Name	Cathelicidin Peptide	Number of residues	Net charge at pH 7	Molecular weight (g/mol)	hydrophobic ratio (%)
Cluster-2754.32503	FKRLPPVGVGISVPLAGRR	19	+4	2019.469	42
Cluster-2754.57712	-	-	-	-	-
Cluster-2754.37224	DLASRLHQRPAPELLRGSSWGQLGQGLMDAAA	32	+1	3370.851	40
Cluster-2754.35703	HAKPKPKPGKDERGWPGSGSWIGKGTPFSFPITKKPVG	38	+6	4058.678	21
Cluster-2754.59161	TRWIGLVRGGLKLAGWGLRITYLNRNQ	26	+5	2999.52	38
Cluster-2754.36580	TRRKWWKTALKIAHDVILG	19	+4	2292.75	47
Cluster-2754.36631	RRSGWRDRIKRRRGFGSRRGRFTLIAHGKKKGHGNYGNIA	40	+12	4609.254	22
Cluster-2754.36595	RRSGWRDRIKRRRGFGSRRGRFTLIAHGKKKGHGNYGNIA	40	+12	4609.254	22
Cluster-2754.25118	KRVNWRKIGLGASYVMSWLG	20	+4	2321.773	45
Cluster-2754.26759	KRVNWRKIGLGASYVMSWLG	20	+4	2321.773	45

4.5.5 ระดับการแสดงออกของ Unigene ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Autophagy และ Apoptosis

จากการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้สยามโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันผ่านการฉีดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อประเมินระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่อระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้สยาม พบว่าหนึ่งในกลไกที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียที่น่าสนใจคือ กลไกของการเกิด autophagy ซึ่งถือเป็นการแสดงออกในระดับ innate immunity อีกประเภทหนึ่ง โดยทั่วไปกลไกหลักของการเกิด autophagy จะเป็นการรักษาสมดุลของเซลล์ในการย่อยสลายโปรตีนและการนำกรดอะมิโนกลับมาใช้ใหม่เพื่อการอยู่รอด รวมไปถึงการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือแบคทีเรียที่เข้าสู่เซลล์ได้อีกด้วย (Valdor and Macian, 2012) ซึ่งโปรตีนที่มีความสำคัญหลักในการเกิดการจัดเชื้อแบบ autophagy ได้แก่ autophagy-related protein (Atg), LC3, p62 (sequestosome), polyubiquitin และ Beclin-1 โดยโปรตีนเหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการสร้าง autophagosome ซึ่งกระบวนการแรกในการเกิดการทำลายเชื้อแบบ autophagy จะมีการสร้าง phagophore โดยมีโปรตีนที่สำคัญได้แก่ conjugated Atg5-Atg12 และ LC3 หลังจากนั้นจะมีการสร้างให้เป็นถุงหุ้มหรือที่เรียกว่า autophagosome จากการทำงานและการส่งสัญญาณของโปรตีน Beclin-1, p62 และ polyubiquitin ในการหุ้มสิ่งแปลกปลอม autophagosome จะหลอมรวมเข้ากับ lysosome และมีการย่อยทำลายเชื้อในที่สุด หรือที่เรียกว่า autophagic flux (Gump and Thorburn, 2011) นอกจากนี้ยังมีการระบุว่า Atg มีความสำคัญอย่างมากต่อการเกิด autophagy โดย Atg1, Atg6 และ Atg8 ซึ่งพบการศึกษาเช่นกันว่ามีความสำคัญต่อการสร้าง phagophore โดยการจับโปรตีนตัวอื่นๆ ได้แก่ Atg6/Beclin 1, Atg1/Ulk1 และ Atg8/LC3 (Deretic et al., 2013) จากผลการทดลองพบระดับการแสดงออกของโปรตีน Atg5 Atg6 Atg8 Atg12 และ LC3 มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นที่ 1 ชั่วโมงแรกหลังจากการฉีดเชื้อ และมีระดับการแสดงออกลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.13) และพบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน p62 และ polyubiquitin มีลักษณะไปในทิศทางเดียวกันคือมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน 1 ชั่วโมงแรก และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.14 และ 4.15) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน Beclin-1 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 4.16) จากผลการทดลองเป็นไปได้ว่าเมื่อจระเข้มีการติดเชื้อ ระบบภายในร่างกายพยายามที่จะฟื้นฟูและรักษาสมดุลของเซลล์ที่ได้รับเสียหายโดยใช้กลไกของการเกิด autophagy ในขณะเดียวกันก็มีการกำจัดเชื้อแบคทีเรียผ่านการสร้าง autophagosome ดังนั้นจึงพบระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด autophagy สูงในชั่วโมงแรก และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงกลับมีการแสดงออกลดลง ซึ่งจากการศึกษาระบบของการเกิด autophagy ที่ผ่านมานั้น ยังมีการกล่าวถึงความสัมพันธ์ของระบบ autophagy และระบบการตายแบบ apoptosis ร่วมด้วย โดยระบบของ autophagy สามารถควบคุมการเกิด apoptosis ได้ ในขณะเดียวกัน การเกิด apoptosis ก็สามารถควบคุมการเกิด autophagy ได้เช่นเดียวกัน (Thorburn 2008; Gump and Thorburn, 2011) ดังนั้นผลการทดลองจึงได้ทำการวิเคราะห์ Unigene ที่เกี่ยวข้องต่อการเกิดการตายแบบ apoptosis ร่วมด้วย ได้แก่ caspase-8, BH3 interacting-domain (BID), Bcl-2, Fas-associated protein death domain (FADD), Death associated protein kinase (DAPK),

Cytochrome C, Jun kinase, inhibition of apoptosis protein (IAP) และ DIABLO (Elmore, 2007; Gump and Thorburn, 2011) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า Unigene ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis แบบ extrinsic pathway หรือการตายเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าภายนอก ได้แก่ caspase-8, BID, FADD, DAPK, cytochrome C และ Jun kinase มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ในขณะที่ 1 ชั่วโมงแรกมีการแสดงออกลดลงหรือคงที่ ดังแสดงในตารางที่ 4.17, 4.18, 4.20, 4.21, 4.22 และ 4.23 ตามลำดับ และยังพบว่า Unigene IAP ที่มีหน้าที่ในการยับยั้งการเกิด apoptosis มีระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย หรือมีการแสดงออกเพิ่มเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.24) ในขณะที่ DIABLO ที่เป็นเป็นตัวยับยั้ง IAP ก็มีลักษณะการแสดงออกของยีนคล้ายกับ IAP อีกด้วย (ตารางที่ 4.25) แสดงให้เห็นว่า Unigene ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis มีการแสดงออกของระดับยีนเพิ่มขึ้นเมื่อทำการฉีดเชื้อที่ระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า Unigene Bcl-2 ซึ่งมีบทบาทในการยับยั้งการเกิด autophagy และ apoptosis มีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง และมีการแสดงออกลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.19) ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อจะเข้ามีการติดเชื้อ ภายในช่วงเวลา 1 ชั่วโมงแรกจะมีการกระตุ้นการรักษาสสมดุลของเซลล์และการกำจัดเชื้อแบบที่เรียผ่านระบบของ autophagy พร้อมกับสร้างโปรตีนที่ใช้ในการกระตุ้นการเกิด apoptosis ควบคู่กันไปด้วย ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงจะมีการกระตุ้นให้เกิดการทำลายแบบ apoptosis โดยที่มีการลดระดับของการเกิด autophagy รวมด้วย เนื่องจากโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิด autophagy และ apoptosis มีระดับการแสดงออกที่สอดคล้องกัน เช่น การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่พบว่ามีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นที่ 1 ชั่วโมงแรก ซึ่ง Bcl-2 มีบทบาทในการยับยั้งการเกิด autophagy โดยการยับยั้งการทำงานของ Beclin-1 ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งการเกิด apoptosis โดยการยับยั้งการปลดปล่อย cytochrome C ภายในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) หรือการแสดงออกของโปรตีน p62 ในการกระตุ้นให้เกิด apoptosis โดยการกระตุ้นการทำงานของ caspase-8 และสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยการจับกับโปรตีน Atg ในระบบ autophagy จึงทำให้พบระดับการแสดงออกของยีนของโปรตีน Atg ที่สูงขึ้นใน 1 ชั่วโมงแรก เป็นต้น (Gump and Thorburn, 2011)

Autophagy

ตารางที่ 4.13 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน autophagy protein หรือ LC3 ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
1112.0	3207	1.47	2.17	1.8	Autophagy protein Apg5//PAXNEB protein
13996.0	3531	0.51	0.71	0.8	ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10 [<i>Alligator sinensis</i>]
1973.0	519	0.88	1.94	0.74	Autophagy protein Apg6//FemAB family
2754.18425	3410	10.26	10.04	10.29	Exonuclease VII, large subunit//Cyclin, C-terminal domain//Autophagy protein Apg6//SecA DEAD-like domain//Lipid-A-disaccharide synthetase
2754.18427	3561	2.55	2.55	2.87	Autophagy protein Apg6//Cyclin, C-terminal domain//Syntaxin 6, N-terminal//Exonuclease VII, large subunit//Ezrin/radixin/
2754.18651	1019	0.89	0.74	0.49	autophagy-related protein 16-like [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.19941	3647	0.57	1	0.36	ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10 [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.21666	405	3.98	2.75	1.45	Alligator sinensis autophagy related 14 (ATG14), mRNA
2754.23745	2855	7.23	6.96	10.41	cysteine protease ATG4C isoform X1 [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.24292	1158	2.69	2.83	1.48	GABARAP, ATG8, LC3
2754.24293	3373	19.76	19.82	12.45	Ubiquitin-like autophagy protein Apg12; LC3
2754.26892	4710	0.73	1.1	1.27	Cysteine protease ATG4A, partial [<i>Struthio camelus australis</i>]
2754.29744	1767	17.94	17.62	41.63	ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3 [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.29745	964	0.43	1.02	1.62	ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3 isoform X1 [<i>Sarcophilus</i>]

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
					<i>harrisi</i>]
2754.29746	897	2.05	0.78	1.18	ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3 isoform X1 [<i>Sarcophilus harrisi</i>]
2754.32168	2675	7.73	8.04	11.63	autophagy-related protein 2 homolog A [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.33017	1729	32.25	31.45	18.76	<i>Alligator sinensis</i> autophagy related 101 (ATG101), transcript variant X1, mRNA
2754.35873	2526	1.26	1.24	2.29	cysteine protease ATG4D [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.38594	1572	15.13	17.67	15.1	cysteine protease ATG4D [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.38654	888	261.71	238.27	190.26	Ubiquitin-like autophagy protein Apg12; LC3
2754.41073	6380	9.36	11.59	12.83	autophagy-related protein 2 homolog A [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.41467	2437	4.03	5.82	5.9	cysteine protease ATG4D [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.43558	2506	0.47	0.48	0.45	cysteine protease ATG4D [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.43559	2457	4.67	3.7	7.54	cysteine protease ATG4D [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.48428	3045	4.11	3.5	6.35	Ubiquitin-like autophagy protein Apg12
2754.49738	1667	4.81	5.43	13.6	autophagy-related protein 16-2-like [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.60349	3082	2.18	3.15	2.96	cysteine protease ATG4B [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.66114	3635	1.02	0.77	0.62	ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10 [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.6718	4173	1.28	1.4	2.58	ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7 [<i>Alligator mississippiensis</i>]

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.6719	682	0.89	0.95	1.83	<i>Alligator sinensis</i> autophagy related 7 (ATG7), transcript variant X2, mRNA
2754.7495	2931	1.73	0.48	0.68	cysteine protease ATG4B [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.7497	3137	1.18	0.64	0.46	cysteine protease ATG4B [<i>Alligator mississippiensis</i>]
33603.0	3299	0.54	0.71	1.27	Autophagy protein Apg5//PAXNEB protein
33603.4	1653	0.67	0.54	1.06	Autophagy protein Apg5
876.0	2032	0.47	0.59	0.6	SOH1//Autophagy protein Apg6//Growth-arrest specific micro-tubule binding//Exonuclease VII, large subunit//Vacuolar sorting 38 and autophagy-related subunit 14

^aCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง autophagy protein หรือ LC3

ตารางที่ 4.14 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน p62 ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^b	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.18051	3961	0.95	1	2.15	Protein tyrosine kinase//Cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region//Cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region//Dynactin p62 family//Protein kinase domain
2754.23468	5561	10.56	10.7	18.56	Dynactin p62 family
2754.26463	6828	2.07	2.51	1.46	TilS substrate binding domain//Non-structural protein NS3/Small envelope protein E//Dynactin p62 family
2754.27994	2028	22.28	22.74	16.55	nuclear pore glycoprotein p62-like [<i>Alligator sinensis</i>]

Unigene (Cluster) ^b	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.32998	7660	2.58	2.1	2.68	Non-structural protein NS3/Small envelope protein E//TiLS substrate binding domain//Dynactin p62 family
2754.37613	2640	21.79	22.9	73.68	Cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region//DNA polymerase III beta subunit, C-terminal domain//Cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region//Dynactin p62 family
2754.4981	1740	0.52	0.46	0.43	Homo sapiens sequestosome 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:3897870)
30715.1	617	1.06	0.5	0.34	Dynactin p62 family
2754.37233	1639	224.21	235.97	159.31	<i>Alligator mississippiensis</i> sequestosome 1 (SQSTM1), transcript variant X1, mRNA

^bCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง p62 protein

ตารางที่ 4.15 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน Polyubiquitin ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^c	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
26883.0	753	0.34	0.63	0.9	Proteasome subunit
2754.11901	526	0.8	1.08	1.08	Ubiquitin family//Ubiquitin-like domain//RNA methyltransferase
2754.14046	590	2.81	3.67	5.07	Ubiquitin family//Ubiquitin-like domain//RNA methyltransferase
2754.36057	532	2967.64	3092.61	2399.79	Ribosomal protein S30//Ubiquitin family
2754.36256	214	3638.8	4501.86	2900.18	Ubiquitin family//RNA methyltransferase//Ubiquitin-like domain
2754.36586	228	15957.22	18059.28	12150.65	RNA methyltransferase//Ubiquitin-like domain//Ubiquitin family
2754.37207	513	153.99	150.46	122.56	Ubiquitin-like domain//Ubiquitin family
2754.37290	436	2.73	2.48	1.42	Ribosomal protein S30//Ubiquitin family
2754.48829	251	14.33	17.42	5.93	Ubiquitin-like domain//Ubiquitin family
2754.60838	465	1.05	2.31	2.83	Ubiquitin family//Ubiquitin-like domain

^cCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง Polyubiquitin

ตารางที่ 4.16 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน Beclin-1 ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^d	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.18425	3410	10.26	10.04	10.29	beclin-1 [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.18427	3561	2.55	2.55	2.87	beclin-1 [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.47120	3845	4.13	4.92	4.52	<i>Alligator sinensis</i> autophagy/beclin-1 regulator 1 (AMBRA1), transcript variant X4, mRNA
2754.49259	5003	4.28	4.44	3.81	<i>Alligator sinensis</i> autophagy/beclin-1 regulator 1 (AMBRA1), transcript variant X4, mRNA
2754.49260	5273	5.39	4.5	4.59	<i>Alligator sinensis</i> autophagy/beclin-1 regulator 1 (AMBRA1), transcript variant X1, mRNA
2754.51904	4196	1.16	1.67	1.31	<i>Alligator sinensis</i> autophagy/beclin-1 regulator 1 (AMBRA1), transcript variant X4, mRNA
2754.52668	6324	1.44	1.92	0.74	<i>Alligator mississippiensis</i> RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin 1-interacting protein (RUBCN), transcript variant X3, mRNA
2754.52669	4045	3.32	3.38	3.16	run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.52670	6249	0.85	0.42	0.97	<i>Alligator mississippiensis</i> RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin 1-interacting protein (RUBCN), transcript variant X4, mRNA

^dCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง Beclin-1

Apoptosis pathway

ตารางที่ 4.17 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน Caspase ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^e	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
21140.0	918	0.5	0.4	0.8	CASP8-associated protein 2 [<i>Notothenia coriiceps</i>]
2754.19227	2234	0.65	0.46	0.65	Caspase domain
2754.19382	2153	2.09	2.35	2.62	MYM-type Zinc finger with FCS sequence motif//Death effector domain//Caspase domain
2754.27873	6556	1.19	1.38	1.87	<i>Alligator sinensis</i> CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR), transcript variant X4, mRNA
2754.27874	7423	5.76	7.06	5.5	Caspase domain//Death effector domain
2754.27875	7584	4.07	2.76	2.54	Death effector domain//Caspase domain
2754.53048	2419	5.91	5.94	7.93	Caspase domain//Death effector domain
2754.53049	4063	3.71	4.26	3.63	Caspase domain//Death effector domain
5366.0	2624	0.92	1.3	1.31	CASP8-associated protein 2 [<i>Alligator sinensis</i>]

^eCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง Caspase protein

ตารางที่ 4.18 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน BID ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^f	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.29714	10564	0.85	1.07	1.65	Type III secretion system, cytoplasmic E component of needle//BTK motif//BH3 interacting domain (BID)//Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family//Translation initiation factor IF-3, N-terminal domain
2754.29715	10405	2.35	2.64	3.17	BH3 interacting domain (BID)//Type III secretion system, cytoplasmic E component of needle//Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family//Translation initiation factor IF-3, N-terminal domain
2754.33066	10381	2.36	2.05	2.34	Type III secretion system, cytoplasmic E component of needle//BH3 interacting domain (BID)//Translation initiation factor IF-3, N-terminal domain//Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.34714	15916	1.74	2.24	2.1	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family//Translation initiation factor IF-3, N-terminal domain//NHR1 homology to TAF//BH3 interacting domain (BID)//Type III secretion system, cytoplasmic E component of needle
2754.36711	15053	0.83	0.39	0.58	Translation initiation factor IF-3, N-terminal domain//Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family//BH3 interacting domain (BID)//Type III secretion system, cytoplasmic E component of needle

Unigene (Cluster) ^f	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.48993	10590	2.59	2.54	2.07	Translation initiation factor IF-3, N-terminal domain//Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family//Type III secretion system, cytoplasmic E component of needle//BH3 interacting domain (BID)
2754.55077	2251	0.55	0.53	0.93	BH3 interacting domain (BID)

^f Cluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง BID protein

ตารางที่ 4.19 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน Bcl-2 ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^g	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
27531.0	697	1.14	0.81	1.21	Nickel-containing superoxide dismutase//Bcl-2 homology region 4
2754.10866	2999	9.15	10.12	8.77	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.10867	2987	3.53	1.46	4.4	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.15166	4240	3.99	4.53	6.15	Protein phosphatase 2C//Stage II sporulation protein E (SpolIE)//Bcl-2-binding component 3, p53 upregulated modulator of apoptosis
2754.15169	6228	0.55	0.31	0.36	Bcl-2-binding component 3, p53 upregulated modulator of apoptosis//Protein phosphatase 2C
2754.15594	6446	1.46	1.25	1.2	Transcriptional activator TraM//Laminin Domain II//Bcl-2 homology region 4//RNA polymerase III RPC4//Reovirus core-spike protein lambda-2 (L2)
2754.16310	1714	2.03	1.96	1.29	Alphaherpesvirus glycoprotein E//Bcl-2 homology region 4
2754.17183	2239	26.34	23.54	22.41	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family

Unigene (Cluster) ^g	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.17186	2112	5.57	5.8	4.54	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.19707	2591	3.87	5.6	2.44	Beta-amyloid peptide (beta-APP)//Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family//Transcriptional activator TraM//Amyloid A4 N-terminal heparin-binding//Prominin//Copper-binding of amyloid precursor, CuBD//Exonuclease VII, large subunit//Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain
2754.19714	2537	5.43	5.69	3.18	Prominin//Copper-binding of amyloid precursor, CuBD//Amyloid A4 N-terminal heparin-binding//Transcriptional activator TraM//Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family//Beta-amyloid peptide (beta-APP)//Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain//Exonuclease VII, large subunit
2754.20582	1302	2.65	4.12	1.8	Alphaherpesvirus glycoprotein E//Bcl-2 homology region 4
2754.23423	3610	5.1	5.44	4.54	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family//Origin recognition complex subunit 6 (ORC6)
2754.30218	2292	5.05	5.59	5.66	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.30575	6644	13.22	16.52	63.06	HEAT repeat//Mammalian defensin//Adaptin N terminal region//Man1-Src1p-C-terminal domain//Beta2-adaptin appendage, C-terminal sub-domain//Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.31260	1540	15.99	15.66	22.66	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.33165	1540	15.99	15.66	22.66	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.42572	1699	20.1	18.29	17.03	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.61302	918	1.94	2.63	2.53	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family

Unigene (Cluster) ^g	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.61304	580	1.62	1.18	0.87	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.61306	567	3.02	2.17	2.66	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family
2754.8052	877	1.57	1.7	1.45	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family

^gCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง Bcl-2

ตารางที่ 4.20 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน FADD ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^h	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.15685	2242	2.23	1.53	3.39	protein FADD [<i>Alligator mississippiensis</i>]

^hCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง FADD (Fas-associated protein with death domain)

ตารางที่ 4.21 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน DAP kinase ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ⁱ	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
11084.0	559	1.08	1.7	3.54	Ras family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase
12485.4	964	1.35	1.28	2.67	Ras family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family
15411.0	1083	0.71	2.08	1.96	Ras family//ADP-ribosylation factor family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase
2754.11046	2015	1.39	2.06	2.41	Archaeal ATPase//Ras family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase
2754.16512	2135	12.64	10.7	6.82	Ras family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//SOCS box//50S ribosome-binding GTPase

Unigene (Cluster) ⁱ	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.16961	1155	7.77	8.99	18.75	Ras family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family
2754.16962	453	10.8	11.64	26.02	50S ribosome-binding GTPase//6-phosphofructo-2-kinase//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//Ras family
2754.19667	2376	0.35	0.58	0.77	Ras family//ADP-ribosylation factor family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase
2754.20707	3230	0.51	0.84	0.77	Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//Ras family
2754.24127	1272	23.39	27.99	55.94	ADP-ribosylation factor family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//50S ribosome-binding GTPase//G-protein alpha subunit//Ras family//Gtr1/RagA G protein conserved region//Herpesvirus polymerase accessory protein//6-phosphofructo-2-kinase
2754.2651	2211	5.76	6.28	5.51	50S ribosome-binding GTPase//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//Ferrous iron transport protein B//Protein of unknown function, DUF258
2754.26547	3682	6.99	7.14	9.61	50S ribosome-binding GTPase//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//ATPase family associated with various cellular activities (AAA)//G-protein alpha subunit//Gtr1/RagA G protein conserved region//Ras family
2754.27480	3010	1.74	3.37	8.78	Ras family//Ethanolamine utilisation - propanediol utilisation//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family
2754.27898	2095	12.41	12.65	28.06	Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//50S ribosome-binding GTPase//Protein of unknown function, DUF258//emp24/gp25L/p24

Unigene (Cluster) ⁱ	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
					family/GOLD//ABC transporter//RNA helicase//Gammaherpesvirus latent membrane protein (LMP2) protein//AIG1 family//Ferrous iron transport protein B
2754.34438	5670	14.36	13.28	17.32	Presenilin//Protein tyrosine kinase//Photosystem II 10 kDa polypeptide PsbR//Protein kinase domain//Ankyrin repeat//Death domain//G-protein alpha subunit//Ankyrin repeat//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//Lipopolysaccharide kinase (Kdo/WaaP) family//ABC transporter
2754.36295	2383	621.15	563.15	436.49	G-protein alpha subunit//50S ribosome-binding GTPase//ADP-ribosylation factor family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//Protein of unknown function, DUF258//Ethanolamine utilisation - propanediol utilisation//AIG1 family//Guanylate-binding protein, N-terminal domain//Ferrous iron transport protein B//Ras family
2754.36876	2170	54.88	50.96	28.61	G-protein alpha subunit//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//50S ribosome-binding GTPase//Protein of unknown function, DUF258//Nucleolar GTP-binding protein 1 (NOG1)//AIG1 family//Ferrous iron transport protein B//Ras family//Sprouty protein (Spry)
2754.37165	1423	232.25	272.87	360.37	Gtr1/RagA G protein conserved region//Ras family//ADP-ribosylation factor family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase
2754.38532	2788	19.55	24.87	24.35	Protein of unknown function, DUF258//Gtr1/RagA G protein conserved region//Ras family//Ferrous iron transport protein B//ADP-ribosylation factor family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//50S ribosome-binding GTPase

Unigene (Cluster) ⁱ	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.41079	6330	8.3	5.94	13.39	Protein of unknown function, DUF258//Peptidase M66//50S ribosome-binding GTPase//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//OB-fold nucleic acid binding domain//Ras family//FYVE zinc finger//Ferrous iron transport protein B
2754.43628	1010	55.84	49.39	60.31	Protein of unknown function, DUF258//Ras family//Ferrous iron transport protein B//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family
2754.45055	2217	27.55	28.99	47.6	Protein of unknown function, DUF258//RNA helicase//G-protein alpha subunit//50S ribosome-binding GTPase//Septin//ADP-ribosylation factor family//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//Threonylcarbamoyl adenosine biosynthesis protein TsaE//Gtr1/RagA G protein conserved region//Ras family
2754.50239	2057	38.16	38.29	70.81	Ras family//Ethanolamine utilisation - propanediol utilisation//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family
2754.41019	288	1.37	6.58	7.13	Ras family//G-protein alpha subunit//50S ribosome-binding GTPase//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family
2754.39143	2837	69.58	81.18	50.71	Ras family//Gtr1/RagA G protein conserved region//CCCH zinc finger in TRM13 protein//6-phosphofructo-2-kinase//LEM3 (ligand-effect modulator 3) family / CDC50 family//G-protein alpha subunit//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//50S ribosome-binding GTPase
2754.42570	1674	51.84	50.54	65.64	Ras family//Protein of unknown function, DUF258//Ferrous iron transport protein B//ADP-ribosylation factor family//Ras of Complex, Roc, domain of

Unigene (Cluster) ⁱ	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
					DAPkinase//50S ribosome-binding GTPase//Thiamine pyrophosphate enzyme, central domain
2754.38918	1602	26.4	24.36	38.52	Ras family//Protein of unknown function, DUF258//Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//50S ribosome-binding GTPase//G-protein alpha subunit
2754.39590	1090	64.14	52.23	48.52	Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//50S ribosome-binding GTPase//G-protein alpha subunit//Ethanolamine utilisation - propanediol utilisation//Gtr1/RagA G protein conserved region//Ras family
2754.50316	1031	15.59	14.58	21.43	Ras of Complex, Roc, domain of DAPkinase//ADP-ribosylation factor family//50S ribosome-binding GTPase//Ras family//Protein of unknown function, DUF258

ⁱ Cluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง DAP kinase

ตารางที่ 4.22 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน Cytochrome C ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^j	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
10753.0	2236	5.15	5.56	7.72	Cytochrome c oxidase assembly protein CtaG/Cox11//Ubiquitinol-cytochrome C reductase Fe-S subunit TAT signal
11050.1	2992	3.45	3.74	3.97	Cytochrome c oxidase assembly protein COX16
20348.0	387	0.71	0.4	1.33	Cytochrome c oxidase subunit VIa//ATP synthase alpha/beta family, beta-barrel domain
21215.4	649	0.5	0.38	0.66	Autophagy protein Apg6//Cytochrome c
2754.10421	399	3.12	2.85	10.24	Cytochrome c oxidase subunit VIa
2754.1473	361	1.36	2.6	2.09	Cytochrome c oxidase subunit VIc
2754.14876	1332	14.93	17.95	28.98	Cytochrome c oxidase subunit VIc//NAD dependent epimerase/dehydratase family//3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family//Saccharopine dehydrogenase NADP binding domain//PEP-utilising enzyme, mobile domain//short chain dehydrogenase
2754.15036	6008	1.65	2.39	2.6	Cytochrome c oxidase subunit IV
2754.15038	5864	1.17	0.78	3.88	Cytochrome c oxidase subunit IV
2754.17531	2545	4.91	4.48	3.93	Cytochrome oxidase c subunit VIII
2754.17628	5359	0.4	0.55	0.72	Cytochrome oxidase c subunit VIII//Ring finger domain//RING-H2 zinc finger//zinc-RING finger domain//Region in Clathrin and VPS//RING-like zinc finger//Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
2754.17672	484	3.45	2.93	2.95	Cytochrome oxidase c subunit VIII//Ribosomal L37ae protein family
2754.18512	3311	2.61	1.82	2.4	Cytochrome c/c1 heme lyase

Unigene (Cluster) ^j	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.18531	1407	4.66	2.81	1.7	Cytochrome c oxidase subunit VIIc
2754.18532	1334	6.44	6.18	13.31	Cytochrome c oxidase subunit VIIc
2754.18694	724	1.61	1.24	2.01	Ubiquinol-cytochrome C reductase Fe-S subunit TAT signal
2754.18743	5243	3.56	3.57	4.73	Ubiquinol-cytochrome c reductase 8 kDa, N-terminal
2754.18785	441	1.45	1.86	0.46	Cytochrome c oxidase subunit VIa
2754.20164	2925	2.55	2.95	2.12	Cytochrome C oxidase assembly factor 2
2754.20167	820	1.55	2.19	0.72	Cytochrome b(C-terminal)/b6/petD
2754.20478	1107	1.74	2.06	2.33	Ubiquinol-cytochrome C reductase Fe-S subunit TAT signal
2754.20549	1125	1.47	1.39	1.44	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex, 6.4kD protein//Primase zinc finger
2754.21272	991	0.62	0.47	0.39	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III//Cytochrome c//Cytochrome C1 family
2754.24184	1791	9.55	9.66	16.99	Eukaryotic cytochrome b561//Cytochrome oxidase assembly protein
2754.26360	879	121.75	110.41	191.82	Cytochrome C oxidase chain VIIB
2754.29929	699	11.57	10.4	7.31	TMEM9//Cytochrome C oxidase subunit II, transmembrane domain
2754.30091	408	0.9	1.34	2.55	Cytochrome C oxidase assembly factor 2
2754.30486	11295	1.14	0.88	1.87	Cytochrome C oxidase chain VIIB
2754.31419	3408	0.49	0.71	0.61	Cytochrome c/c1 heme lyase
2754.33042	3074	79.4	77.6	100.02	Cytochrome c oxidase subunit IV
2754.33175	9958	4.47	4.64	4.42	Cytochrome c oxidase subunit VIIc//Histone acetylation protein//Fatty acid desaturase//Zinc finger, ZZ type//Bromodomain//KIX domain//Creb binding//KIX domain//TAZ zinc finger

Unigene (Cluster) ^j	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.33372	3221	0.42	0.66	0.59	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III
2754.34475	568	151.77	132.83	108.64	Cytochrome C oxidase copper chaperone (COX17)//Outer membrane protein (OmpH-like)//NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit (NDUFB7)
2754.34574	6351	5.99	5.27	6.15	Cytochrome Cytochrome b558 alpha-subunit
2754.34850	450	318.16	323.49	286.04	Cytochrome C oxidase copper chaperone (COX17)
2754.35664	647	315.62	320.73	407.42	Cytochrome c oxidase subunit Vb//Adenovirus minor core protein PV
2754.36868	5121	1553.58	1526.72	2846.85	NADH dehydrogenase//Cytochrome C oxidase subunit II, transmembrane domain//RNA polymerase Rpb5, C-terminal domain//Cytochrome C and Quinol oxidase polypeptide I
2754.37171	966	22.47	19.23	13.08	Cytochrome c oxidase subunit IV
2754.37250	901	158.73	144.63	179.74	Cytochrome c oxidase subunit VIc//Glycosyl hydrolase family 71
2754.37523	921	928.36	905.06	680.33	Cytochrome C oxidase copper chaperone (COX17)//Cytochrome oxidase c subunit VIb
2754.38894	754	187.55	207.73	402.63	Cytochrome c oxidase subunit Va
2754.39503	1732	45.4	42.93	57.58	Cytochrome c//Cytochrome C1 family//Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III
2754.41054	2033	2.11	2.32	4	Cytochrome c oxidase subunit VIa
2754.41594	3142	0.71	1.19	1.72	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III
2754.41817	294	8.45	1.45	4.23	Cytochrome oxidase c subunit VIII
2754.44749	529	1.26	1.54	0.76	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III//Cytochrome c
2754.45156	594	445.64	457.27	605.07	Cytochrome oxidase c subunit VIb

Unigene (Cluster) ^j	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.45339	3601	3.91	3.2	1.71	Cytochrome c/c1 heme lyase
2754.45340	4373	0.44	1.02	0.74	Cytochrome c/c1 heme lyase
2754.45522	1089	66.24	67.65	158.81	Cytochrome c oxidase subunit VIa
2754.45576	541	267.37	239.76	446.22	Cytochrome oxidase c subunit VIII
2754.45752	11196	1.13	0.96	1.46	Cytochrome C oxidase chain VIIB
2754.45948	1980	11.76	12.62	25.54	Cytochrome C oxidase copper chaperone (COX17)//Septation ring formation regulator, EzrA//Anti-sigma-K factor rskA
2754.46058	1433	3.33	4.87	4.41	Cytochrome c oxidase subunit VIc
2754.46439	1485	7.79	9.54	10.29	Cytochrome oxidase c subunit VIb
2754.47955	3307	1.97	1.29	1.96	Cytochrome c oxidase subunit VIc
2754.48254	726	2.39	2.13	1.84	Cytochrome oxidase c subunit VIb
2754.56810	4579	0.93	1.17	0.65	Cytochrome c oxidase subunit IV//Late nodulin protein//DEAD/DEAH box helicase//Type III restriction enzyme, res subunit//Type II/IV secretion system protein
2754.5683	462	0.43	0.71	0.41	Cytochrome c oxidase subunit IV
2754.56988	393	1.35	1.14	2.53	Cytochrome oxidase c subunit VIII
2754.58898	1957	15.36	14.93	27.99	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14kD subunit
2754.60567	875	36.67	42.82	79.82	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III//Di-haem cytochrome c peroxidase//Cytochrome c//Fibronectin-attachment protein (FAP)
2754.60640	1092	0.89	1.92	1.45	Cytochrome C oxidase copper chaperone (COX17)
2754.62416	601	0.49	1.19	2.51	Cytochrome C oxidase assembly factor 2
2754.62590	670	3.05	3.26	2.28	Cytochrome C oxidase subunit II, transmembrane domain

Unigene (Cluster) ^j	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.67303	642	0.33	1.17	0.75	Cytochrome c//Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III
5029.0	457	1.1	0.48	0.63	Cytochrome c oxidase subunit VIa
8259.0	394	1	0.38	1.26	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14kD subunit

^jCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง Cytochrome C

ตารางที่ 4.23 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน Jun kinase ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^k	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
17003.0	1084	0.59	0.91	1.05	<i>Alligator sinensis</i> JNK1/MAPK8-associated membrane protein (JKAMP), mRNA
2754.19556	2538	2.2	2.48	1.25	Protein tyrosine kinase//Protein kinase domain//Helicase associated domain (HA2)
2754.22518	2047	0.32	0.6	0.4	Protein kinase domain//Helicase associated domain (HA2)//Protein tyrosine kinase
2754.35514	5212	21.51	20.38	25.81	TRAF3-interacting JNK-activating modulator [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.37416	2052	20.7	20.31	19.59	TRAF3-interacting JNK-activating modulator [<i>Alligator sinensis</i>]
2754.37418	1375	10.8	10.59	8.85	TRAF3-interacting JNK-activating modulator [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.380	907	0.89	0.87	0.82	Jun-N-terminal kinase (JNK)
2754.39121	2180	0.79	1.64	0.52	TRAF3-interacting JNK-activating modulator [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.3937	1867	0.59	0.41	0.74	Jun-N-terminal kinase (JNK)
2754.40723	2026	0.71	0.36	1.19	TRAF3-interacting JNK-activating modulator [<i>Alligator mississippiensis</i>]
2754.55450	2490	4.64	4.6	2.93	Mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase MKK7/JNKK2

Unigene (Cluster) ^k	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.56891	1024	0.64	0.85	0.58	TRAF3-interacting JNK-activating modulator OS=Mus musculus GN=Traf3ip3 PE=1 SV=2
2754.9215	2388	3.83	3.74	4.71	<i>Alligator mississippiensis</i> JNK1/MAPK8-associated membrane protein (JKAMP), mRNA

^kCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง Jun kinase

ตารางที่ 4.24 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน IAPs ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^l	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
23974.0	378	1.06	1.81	1.51	<i>Alligator mississippiensis</i> X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase (XIAP), transcript variant X2, mRNA
2754.22373	4334	0.48	0.57	0.92	<i>Alligator mississippiensis</i> TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1 (TRIAP1), mRNA
2754.22374	3841	5.28	4.52	4.06	<i>Alligator mississippiensis</i> TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1 (TRIAP1), mRNA
2754.28817	1002	10.52	12.84	20.48	<i>Alligator mississippiensis</i> inhibitor of apoptosis protein-like (LOC102562735), mRNA
2754.32693	7679	10.24	11.26	20.56	<i>Alligator sinensis</i> inhibitor of apoptosis protein-like (LOC102368067), mRNA
2754.53999	1642	0.65	1.05	1.16	<i>Alligator mississippiensis</i> X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase (XIAP), transcript variant X2, mRNA
2754.54009	5698	3.25	3.12	3.08	<i>Alligator sinensis</i> X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase

Unigene (Cluster) ^l	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
					(XIAP), mRNA
2754.7063	4873	0.56	1.51	1.5	<i>Alligator sinensis</i> X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase (XIAP), mRNA
2754.7063	4873	0.56	1.51	1.5	<i>Alligator sinensis</i> X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase (XIAP), mRNA
2754.17702	618	0.59	0.63	0.34	<i>Alligator mississippiensis</i> baculoviral IAP repeat-containing protein 1e-like (LOC106737353), mRNA
2754.26010	1085	0.79	0.63	0.98	Apoptosis inhibitor IAP1 and related BIR domain proteins
2754.33178	6641	0.69	0.73	2.22	<i>Alligator sinensis</i> baculoviral IAP repeat-containing protein 1-like (LOC102388542), partial mRNA
2754.3536	814	8.9	11.15	21.82	Apoptosis inhibitor IAP1 and related BIR domain proteins
2754.35824	5577	6	4.91	6.38	<i>Alligator mississippiensis</i> baculoviral IAP repeat containing 6 (BIRC6), mRNA
2754.36790	4908	1.38	1.1	1.19	<i>Alligator sinensis</i> baculoviral IAP repeat containing 6 (BIRC6), mRNA
2754.42436	4964	0.81	0.34	0.35	<i>Alligator sinensis</i> cytokine induced apoptosis inhibitor 1 (CIAPIN1), transcript variant X1, mRNA
2754.42437	4865	1.52	2.32	1.96	<i>Alligator sinensis</i> cytokine induced apoptosis inhibitor 1 (CIAPIN1), transcript variant X1, mRNA
2754.42438	4737	18.95	18.78	20.73	<i>Alligator sinensis</i> cytokine induced apoptosis inhibitor 1 (CIAPIN1), transcript variant X1, mRNA
2754.42440	4708	3.91	3.98	2.61	<i>Alligator sinensis</i> cytokine induced apoptosis inhibitor 1 (CIAPIN1), transcript variant X1, mRNA

Unigene (Cluster) ^l	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.51660	3357	0.37	0.58	0.63	<i>Alligator sinensis</i> baculoviral IAP repeat-containing protein 1 (LOC102372974), mRNA
2754.59363	2489	1.75	1.16	3.23	<i>Alligator sinensis</i> XIAP associated factor 1 (XAF1), mRNA

^lCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง IAPs (Inhibition of apoptosis protein)

ตารางที่ 4.25 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน DIABLO ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^m	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.34290	6141	3.98	4.21	4.16	<i>Alligator mississippiensis</i> diablo, IAP-binding mitochondrial protein (DIABLO), mRNA
2754.38804	5960	3.31	2.7	4.63	<i>Alligator mississippiensis</i> diablo, IAP-binding mitochondrial protein (DIABLO), mRNA
2754.40427	8394	0.8	0.7	0.61	<i>Alligator mississippiensis</i> diablo, IAP-binding mitochondrial protein (DIABLO), mRNA
2754.49509	8686	0.72	0.45	1.29	<i>Alligator mississippiensis</i> diablo, IAP-binding mitochondrial protein (DIABLO), mRNA

^mCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง DIABLO protein

4.5.6 ระดับการแสดงออกของ Unigene ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ inflammation

หากร่างกายได้รับแบคทีเรียหรือจุลชีพแปลกปลอม จะมีการหลั่งสารบางชนิดออกมา เช่น lipopolysaccharide (LPS) และ lipoteichoic acid (LTA) เกิดการกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวโดยผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ (receptor) เกิดการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ต่างๆ ที่เกี่ยวกับการอักเสบ (Margetic, 2012) หลังจากจระเข้ได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 1 และ 24 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของยีน toll-like receptor type 2 และ 4 เพิ่มขึ้น เมื่อ receptor ได้รับการกระตุ้นจากองค์ประกอบของแบคทีเรียจะส่งสัญญาณผ่านโปรตีนชื่อ myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) และ tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TRAF6) ตามลำดับ ทำให้เกิดกระบวนการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบขึ้นมา ในจระเข้มีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในการลดการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกาย โดยระบบภูมิคุ้มกันพยายามควบคุมกระบวนการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบผ่านทาง AP-1 pathway หลังจากการติดเชื้อ 1 ชั่วโมงพบการแสดงออกของ mitogen-activated protein kinase 14 ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน p38 มีหน้าที่สำคัญคือควบคุมการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบได้แก่ $\text{TNF-}\alpha$ $\text{IL-1}\beta$ และ COX-2 (Schieven, 2005) เพิ่มขึ้น แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง Unigene เหล่านี้มีการแสดงออกลดลง และยังสอดคล้องกับการแสดงออกของ c-jun และ AP-1 complex-associated regulatory protein ที่เป็น transcription factor สำคัญ (ตารางที่ 4.26) โดยการแสดงออกที่ลดลงของ Unigene ดังกล่าวหลังจากได้รับแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพของจระเข้

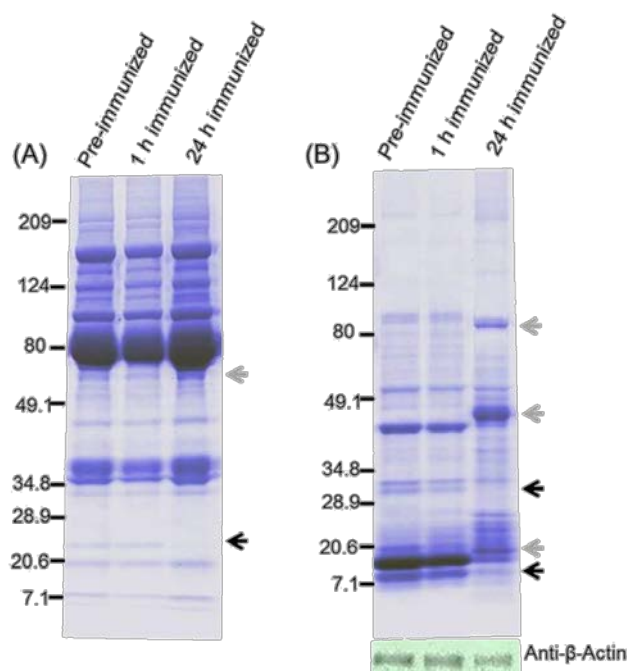
ตารางที่ 4.26 ระดับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีน DIABLO ของจระเข้สยามที่มีการติดเชื้อ

Unigene (Cluster) ^a	Gene Length	Expression level			Protein/peptide
		0 h	1 h	24 h	
2754.15052	2480	0.49	1.21	2.58	toll-like receptor 4
2754.39757	4589	14.41	19.47	43.57	toll-like receptor 2
2754.39063	3424	6.71	7.35	10.87	myeloid differentiation primary response 88 (MyD88)
10785.1	2176	3.01	3.39	5.75	tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TRAF6)
2754.15935	1448	3.33	6.44	2.03	c-jun
5357.0	751	1.62	2.38	0.82	AP-1 complex-associated regulatory protein
2754.26380	3400	0.71	1.24	0.89	mitogen-activated protein kinase 14-like, partial

^aCluster ของ unigene ใน *C. siamensis* ที่สร้าง inflammation factor

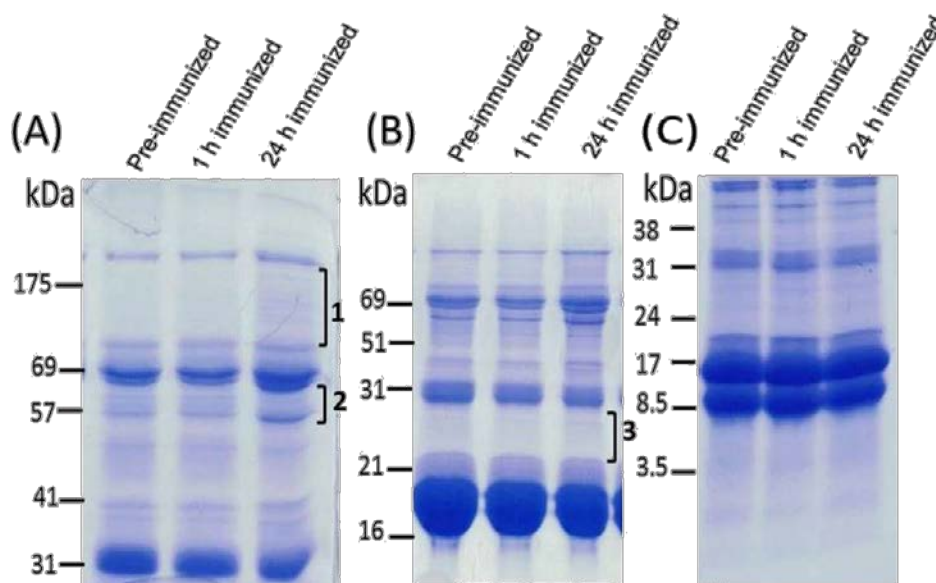
4.6 การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนหลังการติดเชื้อ

นอกจากการศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาโดยกำเนิดโดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับยีนโดยใช้เซลล์จากเลือดทั้งหมด (whole blood) ซึ่งส่วนใหญ่คือเซลล์เม็ดเลือดแดง โครงการวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนโดยใช้เทคนิค proteomics อีกด้วย แต่ใช้โปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและซีรัม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนเพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล transcriptomics และใช้เป็นแบบแผนอ้างอิงการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของเม็ดเลือดขาวและซีรัมหลังการติดเชื้อในกระเพาะไซมาม โปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและซีรัมถูกแยกออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกนำไปวิเคราะห์ proteomics แบบ gel-free proteomics ส่วนที่สอง ตรวจสอบแบบแผนลักษณะเปปไทด์หรือโปรตีนโดยการแยกด้วย 4-20% gradient SDS-PAGE ผลการวิจัย พบว่าแบบแผนของโปรตีนจากซีรัมมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อกระเพาะไซมามได้รับเชื้อ (รูปที่ 4.15A) แต่โปรตีนช่วงขนาด 25 kDa จากตัวอย่างที่ inoculation 24 ชั่วโมง (หลังกระเพาะไซมามได้รับการติดเชื้อ 24 ชั่วโมง) ลดลงอย่างชัดเจน ดังแสดงด้วยลูกศร สีดำ ในขณะที่โปรตีนขนาดประมาณ 70 kDa มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในตัวอย่าง 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่าง 0 และ 1 ชั่วโมง ดังแสดงด้วยลูกศรสีเทา แต่ในตัวอย่างโปรตีนจากเม็ดเลือดขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะโปรตีนที่แตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ 0 หรือ 1 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (รูปที่ 4.15B)



รูปที่ 4.15 ลักษณะแบบแผนโปรตีนของเลือดกระเพาะไซมามทั้งก่อนและหลัง inoculation ด้วยแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่เวลาต่างกัน (A) โปรตีนจากซีรัม (B) โปรตีนจากเม็ดเลือดขาว ถูกแยกด้วย 4-20% gradient SDS-PAGE ลูกศรสีดำคือบริเวณที่โปรตีนลดลง ในตัวอย่าง Immunization และสีเทา คือ ช่วงโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อน Immunization

มีบทความรายงานโดยใช้ข้อมูลทาง transcriptomics ว่าเม็ดเลือดแดงมีส่วนช่วยในระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นจึงตรวจสอบแบบแผนโปรตีน โดยเทคนิค Tris-glycine SDS-PAGE จากรูปที่ 4.16 เมื่อแยกโปรตีนด้วย 10 และ 12.5% Tris-glycine SDS-PAGE พบโปรตีนใน 3 ช่วงดังระบุตัวเลข คือ ขนาด 80 ถึง 200 kDa และในช่วง 57 ถึง 69 kDa (รูปที่ 4.16A) และ ช่วง 25 kDa ถึง 30 kDa (รูปที่ 4.16B) มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ กับตัวอย่าง 0 และ 1 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ส่วนรูปที่ 4.16C ซึ่งแยกด้วย 18% Tris-glycine SDS-PAGE ถึงแม้โปรตีนมีลักษณะไม่แตกต่างกันมากนัก แต่จุดที่น่าสนใจคือ ขนาดเปปไทด์ที่เล็กกว่า hemoglobin (<8.5 kDa) เนื่องจากเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กที่อาจจะแสดงคุณสมบัติเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่สำคัญ (antimicrobial peptide)



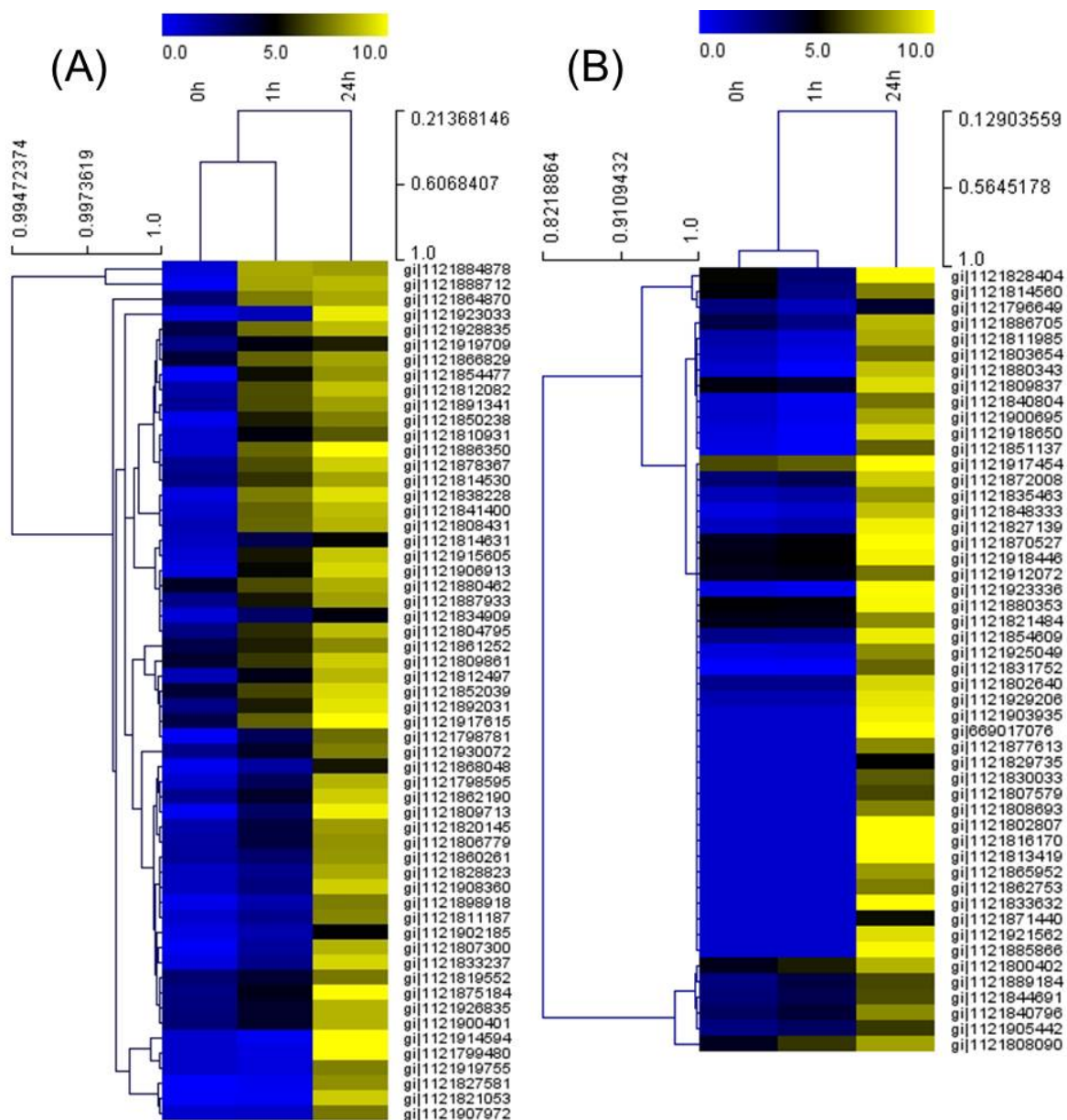
รูปที่ 4.16 โปรตีนจากเม็ดเลือดแดงถูกแยกด้วยเทคนิค Tris-glycine SDS-PAGE ด้วยเปอร์เซ็นต์เจลที่แตกต่างกัน (A) 10% Tris-glycine SDS-PAGE (B) 12.5% Tris-glycine SDS-PAGE (C) 18% Tricine-glycine SDS-PAGE โดยแถบสีดำข้างเจลขาวมือนพร้อมตัวเลขคือช่วงขนาดโปรตีนที่เปลี่ยนแปลง

4.6.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

โปรตีนอีกส่วนหนึ่งที่ถูกแยกออกมาเพื่อระบุชื่อโปรตีนพร้อมทั้งวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงหลังการติดเชื้อ พบว่าหลังจากการย่อยโปรตีนด้วย trypsin แล้วฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS spectrometer เมื่อได้ spectrum ของโปรตีนแล้วทำการสืบค้นว่า spectrum ที่ได้มาตรงกับโปรตีนชนิดไหนโดยใช้โปรแกรม Mascot search engine (<http://www.matrixscience.com/>) ซึ่งโปรตีนเกือบทั้งหมดที่ระบุชื่อได้ตรงกลับจะเข้าน้ำเค็ม *Crocodylus porosus* จึงถือว่าเป็นข้อมูลที่น่าเชื่อถือ เนื่องจากจะเข้าสู่สายพันธุ์สยามและจะเข้ น้ำเค็มมีความใกล้เคียงกันในสายวิวัฒนาการมาก คืออยู่ใน Genus *Crocodylus* เหมือนกัน จากนั้นพิจารณาว่ามีโปรตีนชนิดใดเพิ่มขึ้นหรือลดลงหลังการติดเชื้อ โดยพิจารณาถึงค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง ของระดับการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละตัวที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS spectrometer เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกในเวลา 0, 1 และ 24 ชั่วโมงหลังจากจะเข้าสู่สยามได้รับเชื้อก่อโรค หากการแสดงของโปรตีนใดมากกว่า หรือน้อยกว่า 1.5 เท่าเมื่อเทียบกับ 0 ชั่วโมงถือว่าเป็นโปรตีนที่แสดงเพิ่มขึ้นหรือลดลงหลังการติดเชื้อตามลำดับ

และนอกจากนั้นต้องมีค่า $p < 0.05$ อีกด้วย ในโปรตีนจากเม็ดเลือดขาวจะเห็น หากพิจารณาเพียงโปรตีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงหลังการติดเชื้อโดยไม่ได้คำนึงถึงการเพิ่มขึ้นที่ช่วงเวลา 1 หรือ 24 ชั่วโมง พบว่ามีโปรตีน 109 ชนิดที่เพิ่มขึ้นและ 7 ชนิดที่ลดลง เมื่อจัดจำแนกโปรตีนตามหน้าที่ในการทำงานภายในเซลล์ ตามฐานข้อมูล UniProtKB <https://www.uniprot.org/uniprot/> หรือฐานข้อมูล NCBI สามารถจัดโปรตีนออกเป็น 6 กลุ่ม

เมื่อแบ่งกลุ่มโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นหลังการติดเชื้อในเม็ดเลือดขาว สามารถแบ่งออกได้สองกลุ่ม คือ กลุ่มที่แสดงออกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (ตารางที่ 4.27) และกลุ่มที่แสดงเพิ่มขึ้นหลังการติดเชื้อ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.28) โดยกลุ่มแรกมี 59 โปรตีน ประกอบด้วยโปรตีนที่ทำหน้าที่ใน 1) cytoskeleton/ช่วยในการขนส่งโปรตีน/ช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ 2) เกี่ยวกับกระบวนการ transcription translation 3) ขบวนการเมตาบอลิซึม 4) การส่งสัญญาณ (signal transduction) 5) ทำงานอื่นๆ 6) ไม่สามารถระบุหน้าที่ได้ และอีกกลุ่มมีโปรตีนจำนวน 50 โปรตีน และเมื่อสร้างความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีนที่มีลักษณะการแสดงออกคล้ายกันสามารถจัดได้ตามรูปที่ 4.17 เป็นที่น่าสนใจว่ามีโปรตีนบางตัวมีลักษณะการแสดงออกที่น่าสนใจคือเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อและการแสดงของโปรตีนนั้นคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.18 โดยถือว่าเป็นกลุ่มโปรตีนที่สำคัญต่อการตอบสนองการติดเชื้อแบบที่เรียวยาระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ ซึ่งในกลุ่มนี้มีโปรตีนทั้งหมด 7 ชนิด โดยโปรตีน 4 ใน 7 ชนิด เป็นโปรตีนที่ทำงานในการช่วยผลิตและผลิตยีนอื่น คือ mRNA transcription factor และ transcription regulator ประกอบไปด้วย Transcription initiation factor TFIIID subunit 1, Zinc finger protein castor homolog 1, Importin-9, signal transduction associated protein 1 (รูปที่ 4.18) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มโปรตีนที่แสดงออกลดลงหลังการติดเชื้อในเม็ดเลือดขาวอีก 7 ชนิด แสดงดังตารางที่ 4.29



รูปที่ 4.17 การแบ่งกลุ่มข้อมูลของระดับการแสดงออกของโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในเม็ดเลือดขาว (A) DEPs ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อ เทียบกับก่อนฉีดเชื้อ (B) DEPs ที่เพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อ เทียบกับก่อนฉีดเชื้อ โดยใช้ โปรแกรม MeV software ระดับการแสดงออกของโปรตีนแสดงด้วยสี โดยสีน้ำเงินแสดงถึงการแสดงออกที่ต่ำสุด (0.0) สีดำคือแสดงออกในระดับกลาง (5.0) และสีเหลืองคือระดับการแสดงออกมากที่สุด (10.0) ชื่อโปรตีนแสดงโดย GI numbr

ตารางที่ 4.27 โปรตีนจากเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นหลังการติดเชื้อ 1 ชั่วโมง

GI number	Protein	0h	1h	24h
Cytoskeleton/Trafficking/Cell movement				
gi 1121928835	actin, aortic smooth muscle	3.55	7.22	8.74
gi 1121868048	actin, cytoplasmic 2	0.28	1.87	5.44
gi 1121908360	actin-like	1.23	2.51	9.08
gi 1121914594	alpha-adducin	0.00	0.22	10.07
gi 1121798595	armadillo repeat-containing protein 4	0.00	3.21	8.55
gi 1121923033	coiled-coil domain-containing protein 141	0.44	1.33	9.67
gi 1121878367	diacylglycerol kinase iota	2.45	6.53	9.06
gi 1121919709	dynein heavy chain 7	2.40	4.66	5.61
gi 1121860261	formin-binding protein 1	1.90	2.81	7.98
gi 1121820145	kinesin-like protein KIF2C	1.58	3.74	8.07
gi 1121814631	mitotic-spindle organizing protein 1	1.23	3.48	5.10
gi 1121862190	nephrocystin-4	2.17	4.17	9.03
gi 1121875184	protein piccolo	2.43	4.52	10.24
gi 1121810931	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1	0.00	4.73	6.76
gi 1121902185	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2	0.54	1.59	4.98
Gene expression regulator				
gi 1121809861	breast cancer type 2 susceptibility protein	4.09	6.10	9.02
gi 1121854477	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B	0.07	5.31	7.90
gi 1121827581	endonuclease 8-like 1	0.01	0.28	7.84
gi 1121852039	fibrosin-1-like protein	3.96	6.38	9.30
gi 1121799480	glucocorticoid-induced transcript 1 protein	0.00	0.54	10.42
gi 1121828823	high affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A	1.18	2.25	8.36
gi 1121809713	histone H2A-beta, sperm-like	0.23	3.01	9.80
gi 1121880462	histone H2B 7	4.26	6.50	8.44
gi 1121884878	importin-9	0.74	8.32	8.11
gi 1121866829	integrator complex subunit 1	3.93	6.95	8.23

GI number	Protein	0h	1h	24h
Gene expression regulator				
gi 1121891341	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	2.01	6.51	8.14
gi 1121887933	kin of IRRE-like protein 3	2.30	5.47	8.14
gi 1121821053	LOW QUALITY PROTEIN: plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	0.06	0.20	9.02
gi 1121807300	RNA-binding protein 7	0.10	1.93	8.52
gi 1121886350	RRP12-like protein	0.00	7.04	10.53
gi 1121812082	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 3	1.70	6.56	8.82
gi 1121838228	transcription initiation factor TFIID subunit 1	0.57	7.47	9.45
gi 1121806779	vitamin D3 receptor	1.79	3.78	7.90
gi 1121861252	zinc finger and BTB domain-containing protein 26	3.53	5.57	7.74
gi 1121930072	zinc finger protein 135-like	2.25	4.18	7.50
gi 1121864870	zinc finger protein castor homolog 1	2.73	7.47	8.32
Metabolism				
gi 1121819552	15 kDa selenoprotein	2.80	4.01	7.39
gi 1121841400	acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	0.00	6.97	8.73
gi 1121906913	aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	0.53	5.14	9.25
gi 1121878367	diacylglycerol kinase iota	2.12	6.53	9.06
gi 1121915605	NEDD4-binding protein 2	0.88	5.47	8.90
gi 1121898918	phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein isoform X3	0.36	1.56	7.48
gi 1121917615	sepiapterin reductase, partial	3.56	6.92	11.15
Signal transduction				
gi 1121834909	alveolar macrophage chemotactic factor-like	0.79	2.94	4.70
Signal transduction				
gi 1121850238	ankyrin-3	0.30	5.55	7.50
gi 1121814530	ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5	2.35	6.01	8.25

GI number	Protein	0h	1h	24h
gi 1121812497	gamma-taxilin	1.43	4.50	8.61
gi 1121811187	intersectin-1	0.00	2.17	7.64
gi 1121808431	pro-interleukin-16-like	1.40	7.04	8.54
gi 1121919755	receptor tyrosine-protein kinase erbB-4	0.00	0.67	7.53
gi 1121926835	rho GTPase-activating protein 22	2.54	4.14	8.56
gi 1121804795	serine/threonine-protein kinase Sgk3	2.38	5.88	8.72
gi 1121888712	spexin-like	0.19	8.26	8.63
Miscellaneous protein				
gi 1121892031	ficolin-3	2.42	5.55	9.50
gi 1121833237	probable phospholipid-transporting ATPase VB	0.57	2.29	9.21
gi 1121798781	sickle tail protein homolog isoform X11	0.12	3.24	7.17
Unknown function proteins				
gi 1121824667	uncharacterized protein LOC109308304	0.00	1.51	3.39
gi 1121900401	uncharacterized protein LOC109319854	2.68	4.19	8.56
gi 1121907972	uncharacterized protein LOC109320983	0.00	1.05	7.37

ตารางที่ 4.28 โปรตีนจากเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นหลังการติดเชื้อ 24 ชั่วโมง

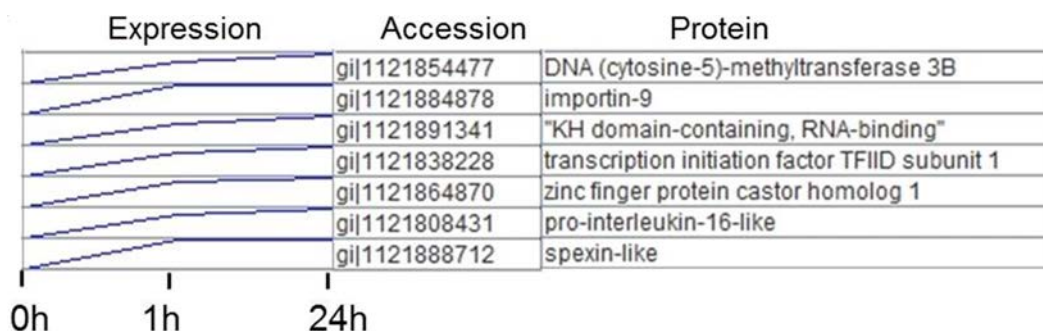
GI number	Protein	0h	1h	24h
Cytoskeleton/Trafficking/Cell movement				
gi 1121903935	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	0.00	0.00	9.75
gi 669017076	ATP synthase F0 subunit 8 (mitochondrion)	0.00	0.00	11.38
gi 1121917454	cilia- and flagella-associated protein 99	6.48	6.89	10.87
gi 1121844691	dystonin	2.67	3.43	6.55
gi 1121877613	F-actin-capping protein subunit alpha-3	0.00	0.00	7.73
gi 1121835463	hydrocephalus-inducing protein homolog	1.45	1.78	7.98
gi 1121929206	kinesin-like protein KIF11	1.53	1.52	9.54
gi 1121814560	LIM domain only protein 7	4.85	2.45	7.53
gi 1121831752	lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	0.02	0.09	7.00

GI number	Protein	0h	1h	24h
gi 1121829735	microtubule-associated protein 1A	0.00	0.00	5.02
gi 1121870527	myosin-10	4.45	4.88	10.63
gi 1121918650	nebulin	0.68	0.14	9.22
gi 1121918446	obscurin-like protein 1	4.70	5.02	9.84
gi 1121848333	paralemmin-1	0.60	0.00	8.82
gi 1121828404	protein unc-13 homolog C	5.12	2.69	10.03
gi 1121827139	spatacsin, partial	1.25	1.66	9.76
gi 1121796649	vimentin	2.53	1.39	4.14
gi 1121809837	WD repeat and FYVE domain-containing protein 2	4.69	4.14	9.35
gi 1121811985	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator	1.72	0.83	8.38
Gene expression regulator				
gi 1121830033	adenosine deaminase domain-containing protein 1	0.00	0.00	6.79
gi 1121800402	CCR4-NOT transcription complex subunit 10	4.46	5.56	8.56
gi 1121802640	chromodomain Y-like protein	2.23	2.26	9.20
gi 1121923336	doublesex- and mab-3-related transcription factor 2	0.64	0.31	11.13
gi 1121807579	Fanconi anemia group M protein	0.00	0.00	6.41
gi 1121880353	histone H1.01-like	4.93	4.75	9.91
gi 1121880343	histone H1-like	0.00	0.02	8.82
gi 1121840796	histone H1x	3.11	3.93	7.73
gi 1121808693	histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	0.00	0.00	7.58
gi 1121889184	histone-lysine N-methyltransferase KMT5B	2.50	3.72	6.43
gi 1121872008	KRR1 small subunit processome component homolog	2.68	3.36	9.06
gi 1121821484	single-stranded DNA-binding protein 2	4.54	4.50	7.75
gi 1121802807	zinc finger protein 40	0.00	0.00	10.47
gi 1121854609	zinc finger SWIM domain-containing protein	2.29	2.13	9.68

GI number	Protein	0h	1h	24h
Metabolism				
gi 1121816170	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	0.00	0.00	10.29
gi 1121813419	LOW QUALITY PROTEIN: lysozyme g-like	0.00	0.00	10.40
gi 1121865952	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	0.00	0.00	8.04
Signal transduction				
gi 1121886705	adenylate cyclase type 10-like	3.60	2.38	8.61
gi 1121803654	AFG3-like protein 2 isoform X2	1.41	0.58	7.16
gi 1121840804	collagen alpha-1(VII) chain	0.00	0.26	7.28
gi 1121912072	SNW domain-containing protein 1	4.40	4.59	7.30
Miscellaneous protein				
gi 1121925049	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	0.64	0.82	7.75
gi 1121900695	HEAT repeat-containing protein 5B	0.00	0.37	8.26
gi 1121862753	MORN repeat-containing protein 1	0.00	0.00	7.45
Miscellaneous protein		0h	1h	4h
gi 1121833632	PRELI domain-containing protein 2	0.00	0.00	11.25
gi 1121851137	probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4	0.54	0.13	6.93
gi 1121871440	putative ciliary rootlet coiled-coil protein 2	0.00	0.00	5.27
gi 1121905442	retinoblastoma-like protein	2.50	3.12	6.14
gi 1121921562	solute carrier family 15 member 2	0.00	0.00	9.39
gi 1121885866	solute carrier family 26 member 9	0.00	0.00	9.94
Unknown function proteins				
gi 1121808090	uncharacterized protein LOC109324692	4.36	6.06	8.18

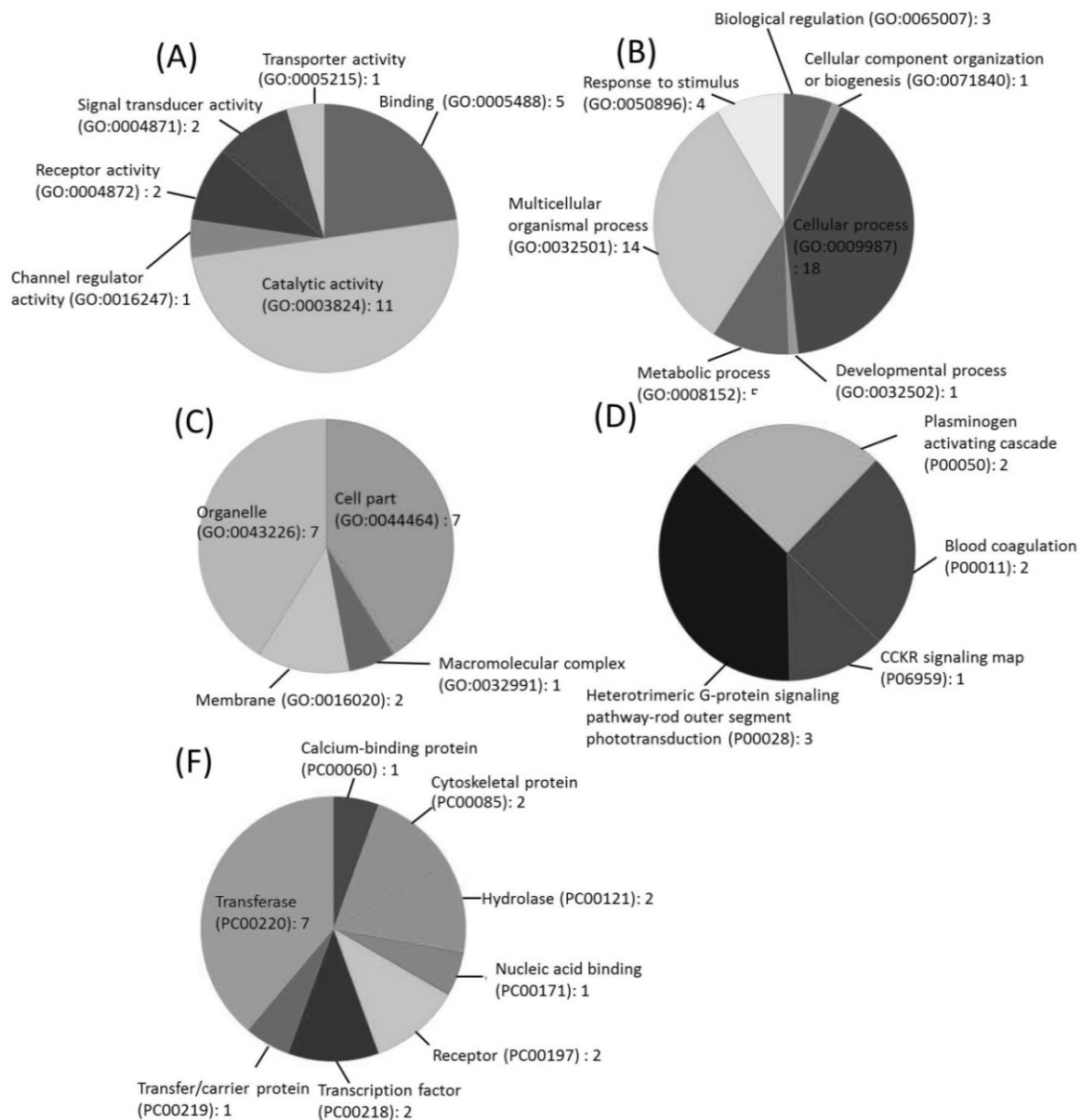
ตารางที่ 4.29 โปรตีนจากเม็ดเลือดขาวที่ลดลงหลังการติดเชื้อ

GI number	Protein	0h	1h	24h
Down-regulated protein				
gi 1121916820	Alstrom syndrome protein 1	8.97	8.90	5.94
gi 1121907253	cation channel sperm-associated protein subunit beta	10.46	9.79	5.72
gi 1121821684	coiled-coil domain-containing protein 68	11.71	10.92	7.59
gi 1121832357	high mobility group protein B2	7.04	7.51	2.99
gi 1121829845	la-related protein 1B	5.68	5.08	3.00
gi 1121875030	PRKC apoptosis WT1 regulator protein, partial	6.06	8.06	4.01
gi 1121859423	syntaxin-binding protein 1	11.12	12.90	7.04



รูปที่ 4.18 โปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 แล้วคงที่จนถึง 24 ชั่วโมงของการติดเชื้อในเม็ดเลือดขาว

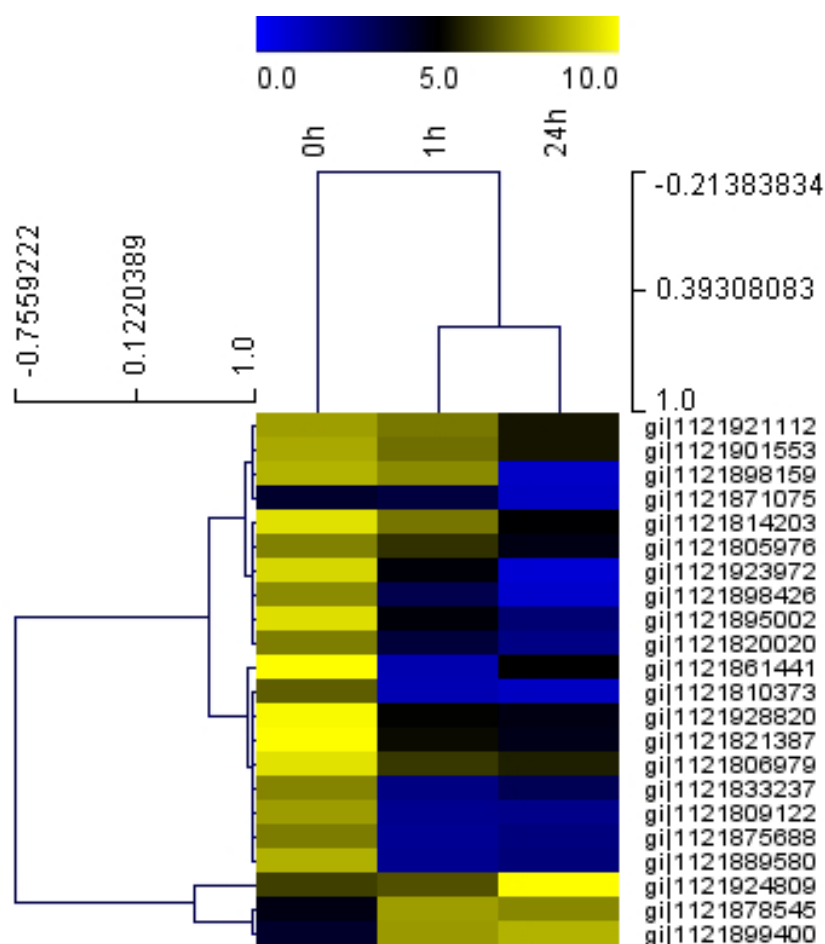
แม้ว่าโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBC) ได้ถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มที่แตกต่างกัน โดยอาศัยฐานข้อมูลจาก UniProtKB Protein และ NCBI แต่การจำแนกนั้นใช้โปรตีนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น มนุษย์ หรือหนูเป็นฐานข้อมูล ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ห่างไกลจากจระเข้ ดังนั้นจึงมีการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลอีกครั้งโดยใช้ โปรแกรม Panther (<http://pantherdb.org/>) เทียบกับข้อมูลโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกับจระเข้ คือ ไก่ (*Gallus gallus*) และกิ้งก่าจิ้งจก *Anolis carolinensis* เนื่องจากสัตว์สองชนิดนี้ถูกจัดกลุ่มอยู่ใน Sauria ซึ่งจระเข้ก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ โดยโปรตีนจาก WBC ของ *C. siamensis* จำนวน 112 โปรตีนมีลักษณะคล้ายคลึงกับ 78 โปรตีนจากไก่และกิ้งก่า จากนั้น 78 โปรตีนถูกจัดหมวดหมู่เป็น 5 กลุ่มตาม PANTHER ontology ดังนี้ (A) Molecular function (B) Biological process (C) cellular component (D) Pathway (F) Protein class รูปที่ 4.19 จากรูปนี้ทำให้สามารถระบุหน้าที่ของโปรตีนจระเข้จากเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นหลังติดเชื้อได้แม่นยำมากขึ้น เนื่องจากฐานข้อมูลที่ใช้เป็นฐานข้อมูลจากสัตว์ที่ใกล้เคียงจระเข้มากที่สุด



รูปที่ 4.19 การแยกกลุ่มของโปรตีนจากเม็ดเลือดขาวที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับหลังฉีดเชื้อด้วย Panther classification system โดยเทียบกับฐานข้อมูลของไก่ โดยใช้เกณฑ์การแยกดังนี้ (A) Molecular function (B) Biological process (C) cellular component (D) Pathway (E) Protein class ตัวเลขและจำนวนในวงเล็บบอกถึง Gene Ontology ID ตัวเลขหลังวงเล็บแสดงถึงจำนวนโปรตีนของจะเข้ที่ตรงกับฐานข้อมูลของไก่

4.6.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในซีรัมด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

ลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในซีรัมจะแตกต่างกับเม็ดเลือดขาว หากพิจารณาระดับการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิดโดยไม่คำนึงถึงเวลาในการติดเชื้อ (1 หรือ 24 ชั่วโมง) พบว่ามีโปรตีนจำนวน 19 ชนิดที่แสดงออกลดลง และ 3 ชนิดที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนติดเชื้อให้ระยะไข้สยาม (0 ชั่วโมง) (รูปที่ 4.20) ซึ่งรายชื่อโปรตีนและหน้าที่ภายในเซลล์แสดงดังตารางที่ 4.30

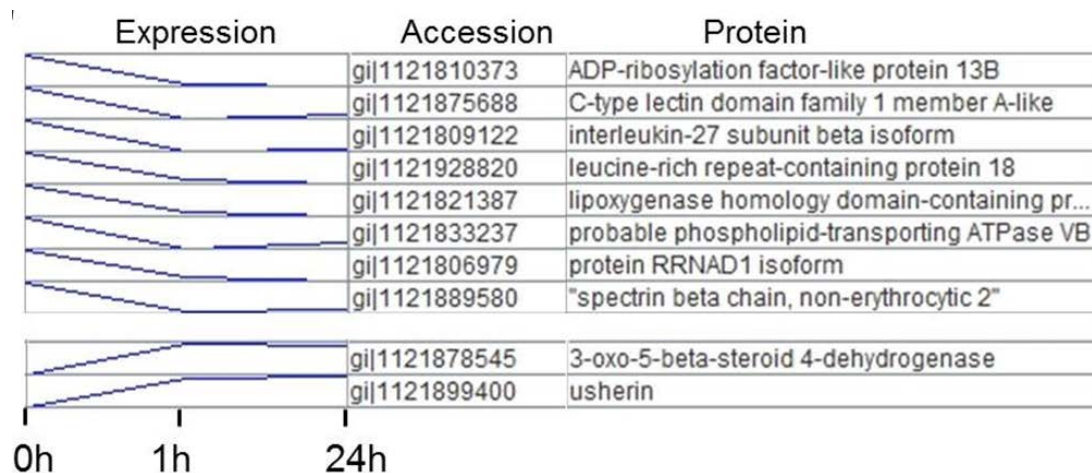


รูปที่ 4.20 การแบ่งกลุ่มข้อมูลของระดับการแสดงออกของโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในซีรัม โดยใช้โปรแกรม MeV software ระดับการแสดงออกของโปรตีนแสดงด้วยสี โดยสีน้ำเงินแสดงถึงการแสดงออกที่ต่ำสุด (0.0) สีดำคือแสดงออกระดับกลาง (5.0) และสีเหลืองคือระดับการแสดงออกมากที่สุด (10.0) ชื่อโปรตีนแสดงโดย GI number

ตารางที่ 4.30 โปรตีนจากซีรัมที่เปลี่ยนแปลงปริมาณหลังติดเชื้อ

GI number	Protein	0h	1h	24h
Down-regulated				
gi 1121921112	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase	8.13	7.38	5.42
gi 1121861441	actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	10.78	1.56	4.98
gi 1121810373	ADP-ribosylation factor-like protein 13B	6.88	1.50	1.16
gi 1121805976	beta-1-syntrophin	7.56	5.99	4.60
gi 1121898426	cilia- and flagella-associated protein 36	7.75	3.48	0.00
gi 1121901553	constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma	8.33	7.21	5.43
gi 1121875688	C-type lectin domain family 1 member A-like	7.47	2.13	2.52
gi 1121898159	EH domain-binding protein 1	8.51	7.74	1.11
gi 1121809122	interleukin-27 subunit beta	8.08	2.18	2.32
gi 1121814203	KDEL motif-containing protein 1	9.45	7.33	4.95
gi 1121928820	leucine-rich repeat-containing protein 18	9.91	5.07	4.63
gi 1121821387	lipoxygenase homology domain-containing protein 1	10.24	5.22	4.52
gi 1121871075	ovotransferrin-like	4.12	3.75	1.16
gi 1121923972	perilipin-2	9.22	4.83	0.82
gi 1121895002	piggyBac transposable element-derived protein 5	9.38	4.82	2.75
gi 1121833237	probable phospholipid-transporting ATPase	7.62	2.44	3.35
gi 1121806979	protein RRNAD1	9.46	6.10	5.61
gi 1121820020	protein SZT2	7.49	3.86	2.38
gi 1121889580	spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	8.49	2.19	2.64
Up-regulated protein				
gi 1121878545	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	4.62	8.11	7.70
gi 1121924809	acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 1-like	6.27	6.59	11.13
gi 1121899400	usherin	4.17	8.05	8.52

นอกจากนี้ยังพบโปรตีนจำนวน 8 ชนิด แสดงดังรูปที่ 4.21 ที่มีระดับการแสดงออกลดลงหลังจากติดเชื้อ 1 ชั่วโมงและไม่เปลี่ยนแปลงจนกระทั่งถึง 24 ชั่วโมง ซึ่งโปรตีน 3 ใน 8 ชนิดนี้ ทำหน้าที่เกี่ยวกับขบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ประกอบด้วย ADP-ribosylation factor-like protein, lipoxygenase homology domain-containing protein 1 probable phospholipid-transporting ATPase VB function in lipid metabolism จากหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าวข้างต้น มีความเป็นไปได้สูงที่ในช่วงเริ่มต้นของการติดเชื้อ จะชะลอกระบวนการเมตาบอลิซึม เพื่อเก็บพลังงานเพื่อใช้ในกระบวนการอื่นในการทำลายจุลชีพที่บุกรุก



รูปที่ 4.21 โปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างสูงสุดและต่ำสุดตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 1 ของการติดเชื้อในซีรัม

จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบการศึกษาการจำลองการตอบสนองของจระเข้ต่อการติดเชื้อแบคทีเรียโดยการฉีด lipopolysaccharide ของแบคทีเรีย เข้ากระแสเลือด โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ (Merchant et al., 2009) พบว่าจำนวนโปรตีนที่สามารถระบุชื่อได้มีประมาณ 10 ชนิด และเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการระบุจำนวนโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างจระเข้ติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจากการทำให้จระเข้ติดเชื้อโดยการฉีดแบคทีเรียทำให้จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าที่ 1 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เพราะปกติในมนุษย์ต้องใช้เวลาหลายชั่วโมงหรือเป็นวัน ซึ่งน่าจะเป็นหนึ่งในกลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาโดยกำเนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในจระเข้ และเม็ดเลือดขาวเองก็เป็นกลุ่มเซลล์ที่รับผิดชอบโดยตรงในการทำลายจุลินทรีย์ที่บุกรุกร่างกาย ซึ่งนำไปสู่คำถามต่อว่าโปรตีนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร ที่ 1 และ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อเปรียบเทียบกับก่อนการติดเชื้อหรือ 0 ชั่วโมง โดยเมื่อวิเคราะห์โปรตีนหลังติดเชื้อ 1 ชั่วโมง พบว่ามีโปรตีนจำนวน 59 ชนิด ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 เท่า ซึ่งกลุ่มนี้ก็น่าสนใจเพราะจะช่วยสร้างความเข้าใจโดยการเปรียบเทียบจำนวนและปริมาณของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในจระเข้และสัตว์ชนิดอื่นและนำไปสู่การอธิบายระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาโดยกำเนิดอันมีประสิทธิภาพสูงในจระเข้ โดยโปรตีนที่เพิ่มขึ้นจะมีสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cytoskeleton/Trafficking/Cell movement) และโปรตีนเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่ช่วยผลิตโปรตีนขึ้นมา (Gene expression regulator) ตัวอย่างโปรตีนในกลุ่มแรกที่พบคือ actin ซึ่งมี 3 ตัวที่เพิ่มขึ้นคือ Actin aortic smooth muscle Actin cytoplasmic 2, Actin-like ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนคอมเพล็กซ์ microfilament (Lu et al., 2016) และนอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่นคือ

kinesins และ dyneins โดย Kinesins จะเคลื่อนที่บน microtubules ในการขนส่งโปรตีนจากแหล่งผลิตไปยัง organelle หรือออกนอกเซลล์โดยทำงานร่วมกับโปรตีน dynein (Henry et al., 2006) ซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้จะช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังแบคทีเรียที่บุกรุก หรือจับแบคทีเรียแล้วเกิดขบวนการ phagocytosis เพื่อทำลายแบคทีเรีย ส่วนกลุ่มโปรตีนที่เป็น Gene expression regulator ที่เพิ่มขึ้นใน 1 ชั่วโมงแรกของการติดเชื้อคือ กลุ่ม transcription factor เช่น Zinc finger BTB domain-containing protein, Zinc finger protein 135-like, Zinc finger protein castor homolog 1 ซึ่งช่วยในขบวนการ transcription เพื่อผลิต mRNA ใหม่ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ (Fu and Blackshear., 2017; Gupta et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบ RRP12-like protein and fibrosin-1-like protein ที่เกี่ยวกับการขนส่งโปรตีนที่ใช้ในนิวเคลียสเข้าสู่นิวเคลียส เพื่อใช้ในขบวนการ transcription (Jäkel et al., 2002; Matsumiya 2013) และพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึม เช่น Acyl-CoA dehydrogenase family member 9 mitochondrial Aldehyde dehydrogenase family 16 ซึ่งจะเข้าใช้โปรตีนเหล่านี้เพิ่ม ATP เพื่อเป็นพลังงานของ cytoskeleton โปรตีนระหว่างเคลื่อนที่ และเกิด phagocytosis

จากโปรตีน 7 ชนิดที่เพิ่มขึ้นใน 1 ชั่วโมง แล้วการแสดงออกนั้นก็คงที่ไปจนถึง 24 ชั่วโมง โดย 4 โปรตีน มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเร่งให้เกิดขบวนการ transcription โดย KHDRBS1 และ IPO9 เป็นโปรตีนช่วยเร่งขบวนการ transcription และ TAF1, CASZ1 เป็น transcription factor โปรตีนเหล่านี้จะจับหรือทำงานร่วมกับโปรตีนตัวอื่น เพื่อทำงานร่วมกับโปรตีนอื่นที่ในการสร้าง mRNA ส่วนโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงหลังติดเชื้อในเม็ดเลือดขาวนั้น ส่วนใหญ่ยังเป็นกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ และโปรตีนเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่ช่วยผลิตโปรตีนขึ้นมาใหม่ สำหรับกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ เช่น F-actin-capping protein, nebulin, และ myosin-10 โดย F-actin-capping protein จะจับกับ actin filaments แล้วไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง nebulin, myosin-10 and actin จะจับกัน เพื่อสร้างความแข็งแรง (Root and Wang, 1994) เพื่อให้ขบวนการ phagocytosis มีประสิทธิภาพ

สำหรับ histone นั้นพบว่ามี 3 isoforms คือ histone H1.01-like, histone H1-like, histone H1x ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว histone จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงโครมาตินแล้วทำให้เซลล์มีอายุนานขึ้น โดยการเพิ่มจำนวนของโปรตีนกลุ่มนี้ในยีสต์พบว่ายีสต์มีอายุนานขึ้น (Feser et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบโปรตีน 2 ชนิดคือ คือ histone-lysine N-methyltransferase ASH1L และ histone-lysine N-methyltransferase KMT5B ที่ช่วยย้ายกลุ่ม methyl group ไปยัง lysine and arginine residues ใน histone ซึ่งเป็นขั้นตอนในขบวนการควบคุม transcription

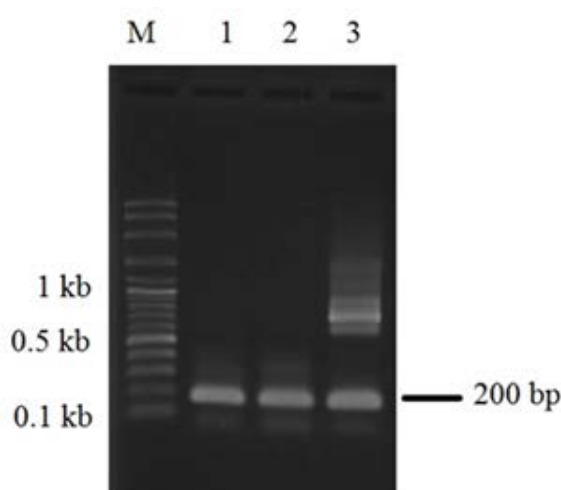
4.7 การโคลนยีนและศึกษาเปปไทด์ Cathelicidin ในจระเข้สยาม

4.7.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเทลิซินของจระเข้สยาม (*C. siamensis*)

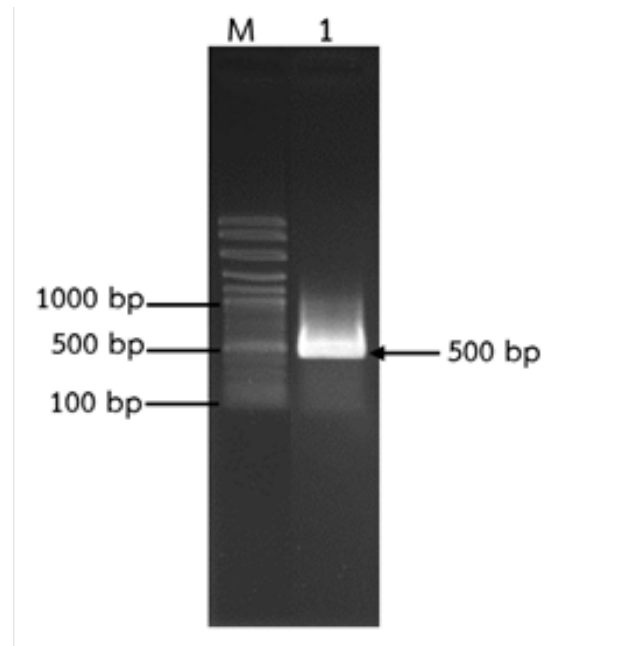
นำตัวอย่างเลือดของจระเข้หลังจากฉีดยากระตุ้นด้วยเชื้อ *Edwardsiella tarda* 24 และ 72 ชั่วโมง มาเก็บแยกส่วนของ whole blood และ red blood cell แล้วนำมาตรวจหายีนคาเทลิซินด้วย RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ conserve ของยีนคาเทลิซินของ *C. porosus* ผลแสดงดังรูปที่ 4.22 ซึ่งพบแถบ PCR product ขนาด 200 bp เมื่อนำ PCR product นี้มาศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอดังกล่าว มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ predicted cathelicidin-OH (CPORG002468) ของ *C. porosus* 98% โดยให้ชื่อยีนคาเทลิซินจากเลือดจระเข้ชื่อว่า csCATH

ดังนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CPORG002468 ของ *C. porosus* เพื่อที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเธลิซินทางด้าน 5' และ 3' โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากทางด้าน 3' ของยีนคาเธลิซิน CPORG002468 ของ *C. porosus* (CP_2468_3UTR-r) ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ RBC_24h-f (csCATH2 specific forward primer) (รูปที่ 4.23) โดยเมื่อตรวจวัด PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นลำดับทางด้าน 3' ของยีนคาเธลิซิน ซึ่งในลำดับต่อไป ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวในการออกแบบ specific reverse primer (csCATH2_specfstop-r) เพื่อใช้ร่วมกับไพรเมอร์ที่ออกแบบจากทางด้าน 5' ของยีนคาเธลิซิน CPORG002468 ของ *C. porosus* (CP_2468_5UTR2-f) และเมื่อตรวจวัด PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp (รูปที่ 4.24) จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ทั้ง 3 ปฏิกริยา (RACE-PCR) ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเธลิซินจากเลือดจระเข้ขนาด 501 เบส และแปลไปเป็น 166 กรดอะมิโน แสดงในรูปที่ 4.25

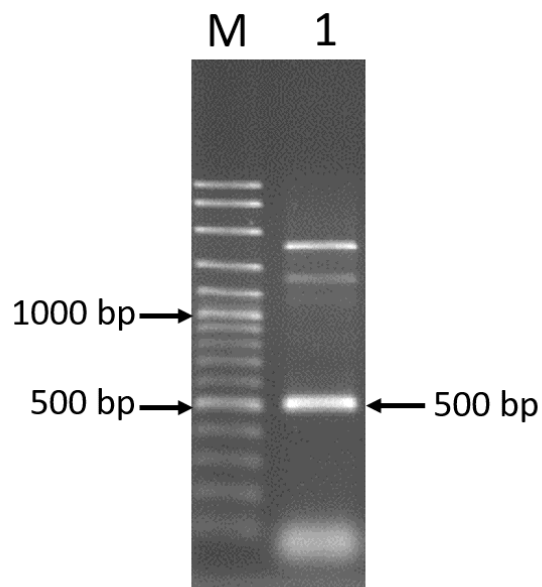
นอกจากนี้ เมื่อนำ cDNA ของเลือดจระเข้ ทั้งส่วนของเซลล์เม็ดทั้งหมด (whole blood) และเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell) เมื่อให้จระเข้ติดเชื้อ *A. hydrophila* เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง มาศึกษาอัตราการแสดงออกของยีน Cs-CATH ด้วยเทคนิค Real-time PCR (SYBR-Green I fluorescence) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Cs-CATH-F primer (5'- CATGCCAAGCCAAAACCGAA-3') และ Cs-CATH-R primer (5'- TGGGGAATGAAAACGGGGTT-3') พบว่าเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่ 24 และ 72 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ พบการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับก่อนติดเชื้อ สำหรับเม็ดเลือดแดงหลังติดเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่าการแสดงออกของยีน Cs-CATH เท่ากับ 9 เท่า แต่หลังติดเชื้อการแสดงออกของยีนลดลงที่ประมาณ 2 เท่า รูปที่ 4.26



รูปที่ 4.22 ผลของการทำ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ conserve domain ของยีนคาเธลิซินจาก *C. porosus* (Lane 1 และ 2; whole blood 24 h และ 72 h, Lane 3; red blood cell 24 h หลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Edwardsiella tarda*)



รูปที่ 4.23 ผลของการทำ 3'-RACE-PCR ด้วยไพรเมอร์ csCATH2_specific1(RBC_24h)-f กับ CP2468_3UTR-r



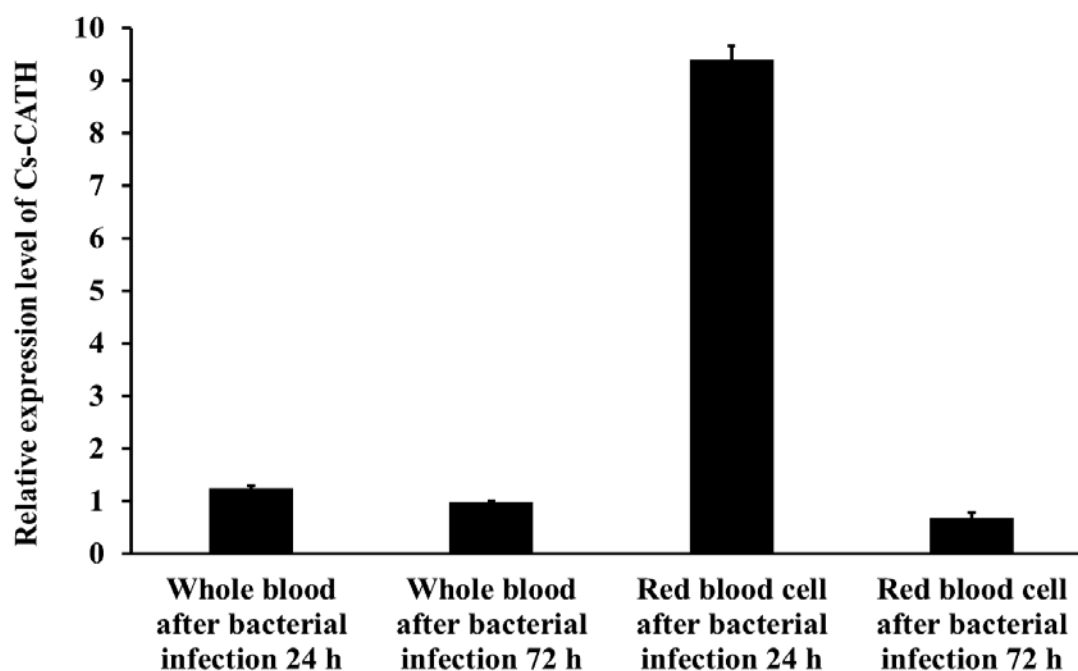
รูปที่ 4.24 ผลของการทำ 5'-RACE-PCR ด้วยไพรเมอร์ CP2468_5UTR2-f กับ csCATH2_specfstop-r

```

atggggcgccgcggttggtggtgttgctgggcttgccacgcttggtggcgccgccttg 60
M G R R G W V V L L G L A T L V A A A L 20
gcttctcagcgcaagttgctgagctacggagaggccgcgtcggttcgctgtcgacttctac 120
A S Q R K L L S Y G E A A S F A V D F Y 40
aaccaacagccgggtgtagaccacaccttcgggtcctcgatggtgaaccacagcccgcg 180
N Q Q P G V D H T F R L L D V E P Q P A 60
tgggacacgatggccaagtcagtgaggtgagggttcggttcggtgagaccgtgtgc 240
W D T M A K S C Q E V R F V V R E T V C 80
ccgcggacccacaagctcccagccagcgagtgcgacttcaaggacaacgggctggtcagg 300
P R T H K L P A S E C D F K D N G L V R 100
aactgcacgtggctgttctccacgaagctcaagttgccgcctccatcatcacctgcgac 360
N C T W L F S T K L K L P A S I I T C D 120
acaatgacccccggggaaggacatccatgccaaagccaaaacccgaaacctgggaaagatgaa 420
T M T P G K D I H A K P K P K P G K D E 140
aggggacggcctggatctggctcctggattggaaagggaaccccgttttcattccccata 480
R G R P G S G S W I G K G T P F S F P I 160
acaaaaaaacccgtggggtag 501
T K K P V G * 166

```

รูปที่ 4.25 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเรลซิดินจากจระเข้สยาม csCATH โดยลำดับกรดอะมิโนในกรอบสีเทาคือ mature peptide กรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้คือช่วงที่เป็น signal peptide และเครื่องหมายดอกจัน (*) ระบุตำแหน่งของ stop codon



รูปที่ 4.26 ระดับการแสดงออกของยีน Cs-CATH ในเซลล์จากเลือดทั้งหมดและเซลล์เม็ดเลือดแดงหลังจระเข้ติดเชื้อ 24 และ 72 ชั่วโมง

4.7.2 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของคาเทลิซินของจระเข้สยาม (*C. siamensis*)

จากภาพการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเทลิซินสามารถ encode ให้ลำดับกรดอะมิโน 166 residue (รูปที่ 4.25) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปวิเคราะห์ด้วย ExPASy พบว่าคาเทลิซินของจระเข้สยามมีขนาด 18.24 kDa และมีค่า pI เท่ากับ 9.54 ผลการวิเคราะห์ด้วย SignalP 4.0 Server แสดงส่วนของ signal peptide บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 1 ถึง 20 (N-terminus site) และส่วนของเปปไทด์คาเทลิซิน Cs-CATH (KP36) ทางด้าน C-terminal ความยาว 36 amino acid residue (Theoretical pI/Mw: 10.73 /3.82 kDa) (ตารางที่ 4.31)

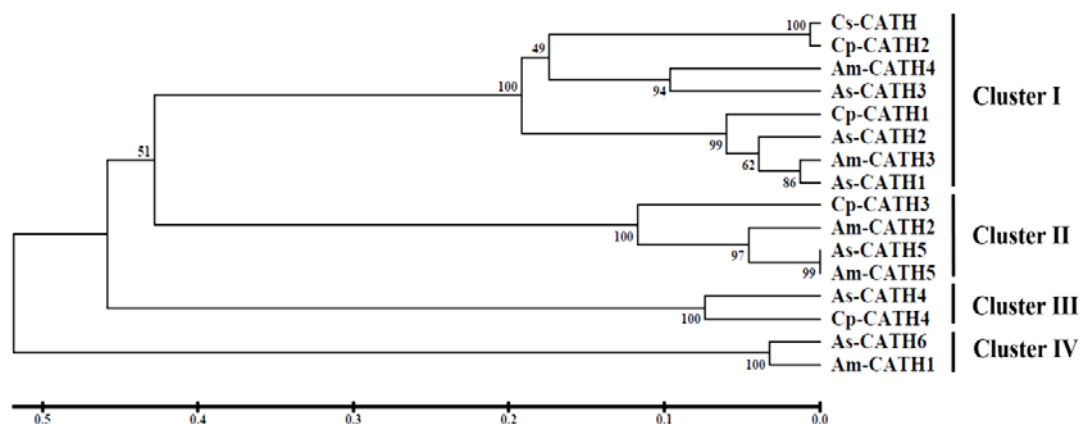
ตารางที่ 4.31 คุณสมบัติทางกายภาพของเปปไทด์คาเทลิซิน (Cs-CATH) จากจระเข้สยาม

Peptide	Sequence	Length	Net charge	Theoretical pI	Mw	Hydrophobic ration (%)
SRN15	RNCTWLFSTKLKLP	15	+3	10.06	1778.15	46
SI16	SIITCDTMTPGKDIHA	16	-1	5.19	1702.96	37
KP36	KPKPKPGKDERGRPGSGSWI GKGTPFSFPITKKPVG	36	+7	10.73	3820.46	16

จากผลการทำ alignment พบว่า prepro-Cs-CATH มีความเหมือนกับ *C. porosus cathelicidin* CPORG002468 (*Cp-CATH2*) ถึง 99% และมีความเหมือนกับ *A. sinensis cathelicidin* (ASN73763.1) (*As-CATH3*) และ *A. mississippiensis cathelicidin* (KYO44087.1) (*Am-CATH4*) 75% และ 72% ตามลำดับ (รูปที่ 4.27) จะเห็นได้ว่าทางด้าน N-terminal cathelin domain จะมีลักษณะ conserve อย่างมาก โดยเฉพาะลำดับกรดอะมิโนที่มาจากสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ด้าน C-terminal cathelicidin domain แสดงให้เห็นถึงความผันแปรของลำดับกรดอะมิโน จากผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของคาเทลิซินจากจิ้งจอก *Alligator* และ *Crocodylus* (รูปที่ 4.28) จากรูป phylogenetic tree สามารถแบ่ง crocodilian cathelidins ออกได้เป็น 4 cluster โดย cluster I เป็น cluster ที่ใหญ่ที่สุด ประกอบด้วย Cs-CATH, Cp-CATH1-2, As-CATH1-3, และ Am-CATH3-4 ส่วน cluster II ประกอบด้วย Cp-CATH3, As-CATH5, Am-CATH2 และ Am-CATH5 สำหรับ cluster III และ cluster IV นั้นประกอบไปด้วยคาเทลิซิน 2 ชนิด ซึ่งเป็นคาเทลิซินที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากคาเทลิซินอื่นๆ โดย cluster III ประกอบด้วย As-CATH4 และ Cp-CATH4 ส่วน cluster IV ประกอบด้วยคาเทลิซิน 2 ชนิดจาก alligator คือ Am-CATH1 และ As-CATH6

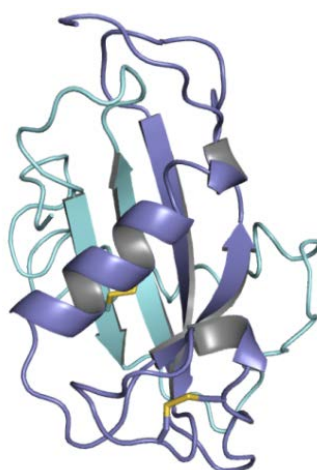
Cs-CATH	MGRRGWVVLGLATLV AALAS-----	22
Cp-CATH1	MGRRGWVVLALATLA GALGS-----	22
Cp-CATH2	MGRRGWVVLGLATLV AALAS-----	22
Cp-CATH3	-MGTCLRLVLGVAT GLTPP-----ARAQAQAQAQAQ-----	33
Cp-CATH4	-MQTCWVVLPLLGA STELP-----TTGTVPFQ-----	29
Am-CATH1	-MKSCWALVLVGCMSAATAQ-----	21
Am-CATH2	-MQPCCYQEALAAVNTYNQESGLPQAYRLLEAEQPQWDPSQPAQLKFSIKETECLVSEKRDVSQCFFKDKGLVKDCCKGLYAEKEPFVITAKCEDA	99
Am-CATH3	-----MLV SASAS-----	9
Am-CATH4	MGCRGWVVLGLATLV AASAS-----	22
Am-CATH5	-METCLCLVLGVAT VAT-----AQAQAQAQTQSQ-----	31
As-CATH1	MGRWGWVVLGLAMLV SASAS-----	22
As-CATH2	MGRWGWVVLGLATLV VALGS-----	22
As-CATH3	MGRWGWVVLGLATLV AASAS-----	22
As-CATH4	-MQTCWVVLPLLGA STELP-----TFGTDPFQ-----	29
As-CATH5	-METCLRLVLGVAT VAT-----AQAQAQAQTQSQ-----	31
As-CATH6	-MKSCWGLVLVGCMSAATAQ-----	21
Cs-CATH	-----QRKLLSYGEAASFAVDYNGQPVDHTERILLQVE QPA DTMAKSCQEVREVVRETVCPATHKLPAS CDND GLVNCITWLFSTKL	110
Cp-CATH1	-----QHRTLSEYEAASFAVDYNGQPDHAEIRLLRAD QPA DM SQPRQELREVVRETVCPAQDPPAS CDND GLVNCITWLFSTKL	97
Cp-CATH2	-----QRKLLSYGEAASFAVDYNGQPVDHTERILLQVE QPA DTMAKSCQEVREVVRETVCPATHKLPAS CDND GLVNCITWLFSTKL	110
Cp-CATH3	-----AQAQYETAVATAVDYNGQPDHAEIRLLQVE QDS NPASQAQQLKESVRETVCPAQKGNLQ CDNE GLVDCSGLFTAGK	119
Cp-CATH4	-----PTPSYACALATAVNYNGSGVDIABRVLEAESRDD DA QDPLRQLEETRETECEVGGDDQLD CGDGGGHHY-CLHK VC--	112
Am-CATH1	-----SQLMNEAASFAVDYNGRGLAVNTEQLLRTA SGDVVS PSEFFRLNFTIMETTCVGGSQPTQELCO NE GLVACVGFSTQ	107
Am-CATH2	GQEPQLVKRVNWPQSQACYEDAVTTAVDHFNESTPQAMRLLEAE QSE NP SQAQQLKESVRETVCPAQKGNLK CDNE GLVDCSGLFTAGK	199
Am-CATH3	-----QHKMLSYEAASFAVDYNGQPDHAEIRLLRAD QPA DM SKPRQELREVVRETVCPAQDPPAS CDND GLVNCITGLFSTER	97
Am-CATH4	-----QRKMLTYEAAALFAVDYNGQPDHTEQLLQVE QPVPTD SKSRQELREVVRETVCPADNHPDS CNIEF GLVNCIMWLLSTE	110
Am-CATH5	-----SQACYEDAVTTAVDHFNESTPQAMRLLEAE QSE NP SQAQQLKESVRETVCPAQKGNLK CDNE GLVDCSGLFTAGK	117
As-CATH1	-----QHKTLSEYEAASFAVDYNGQPDHAEIRLLRAD QPA DM SKPRQELREVVRETVCPAQDPPAS CDND GLVNCITGLFSTER	110
As-CATH2	-----QHKTLSEYEAASFAVDYNGQPDHAEIRLLRAD QPA DM SKPRQELREVVRETVCPAQDPPAS CDND GLVNCITGLFSTER	110
As-CATH3	-----QRKTLTYGEAASFAVDYNGQPDHTEQLLQVE QPV DT SKSRQELREVVRETVCPASNHPAS CNIEF GLVNCITGLFSTER	110
As-CATH4	-----LTPTYACALATAVDYNGQPDHAEIRLLQVE QDS NP SQAQQLKESVRETVCPAQKGNLK CDNE GLVDCSGLFTAGK	115
As-CATH5	-----SQACYEDAVTTAVDHFNESTPQAMRLLEAE QSE NP SQAQQLKESVRETVCPAQKGNLK CDNE GLVDCSGLFTAGK	117
As-CATH6	-----SQLMNEAASFAVDYNGRGLAVNTEQLLRTA SGDVVS PSEFFRLNFTIMETTCVGGSQPTQELCO NE GLVACVGFSTQ	107
Cs-CATH	KLASITITCDTMTPGKDIHA PKPKPGKDERGRPGSGSWIGKGTFFSFPIITKKPVG-----	166
Cp-CATH1	-----CGAQT-----WTQS-----SSCG-LTSAA-----	115
Cp-CATH2	KLASITITCDTMTPGKDIHA PKPKPGKDERGRPGSGSWIGKGTFFSFPIITKKPVG-----	166
Cp-CATH3	KPVTIDKVDASQEPFLVT---KKWKKVLKGAIKTALK-----	157
Cp-CATH4	-----LM-----	114
Am-CATH1	VALIVITCEEAPSEPRVT-----WLWLLRGGLKAAGWGIRAHNRNQ-----	152
Am-CATH2	KPVTAKCEDTSQEPFLVT---RKFWKKILNGALKIAPFFLG-----	240
Am-CATH3	ESPTVITITCDTVPQGHVRV-RSGWNNRSKRRRGSGSRGRFISHAHGGRK-----GHER-----IAR--V-	156
Am-CATH4	KLASITITCDTVPQGHVRV-RSGWNNHGHKRRRGSGTRRGFRFISHAHGGRK-----GHER-----IA	167
Am-CATH5	KPVTAKCEDTSQEPFLVT---RKFWKKILNGALKIAPFFLG-----	158
As-CATH1	ESPTVITITCDTVPQGHVRV-RSGWNNHGHKRRRGSGSRHGYSSSTKYGGRKRPRKPRGSGSWLSHDTPHVAPIAKGHVG	189
As-CATH2	ESPTVITITCDTVPQGHVRV-RSGWNNHGHKRRRGSGTRRGFRFISHAHGGRK-----GHER-----IA	167
As-CATH3	KSPSTITITCDTVPQGHVPA PKPRPGK---LSSFTLHLPAGSD-GKPRCHYP-----	159
As-CATH4	ASLMVLITCPAEPPDRVRGLFKLLRRKKKGFKKIFKRLPPVGVGVSIPLAGRR-----	172
As-CATH5	KPVTAKCEDTSQEPFLVT---RKFWKKILNGALKIAPFFLG-----	158
As-CATH6	VALIVITCEEAPSEPRVT-----WLWLLRGGLKAAGWGIRAHNRNQ-----	152

รูปที่ 4.27 ผลของการทำ amino acid alignment ของคาเทลิซินของจระเข้สยาม (Cs-CATH) เทียบกับ ลำดับกรดอะมิโน ของคาเทลิซินจากจระเข้สายพันธุ์อื่น *A. mississippiensis* cathelicidin (Am-CATH1<KYO43834.1>, Am-CATH2< KYO43835.1>, Am-CATH3<KYO44086.1>, Am-CATH4<KYO44087.1> and Am-CATH5<XP014466014.1>), *A. sinensis* cathelicidin (As-CATH1<ASN73761.1>, As-CATH2<ASN73762.1>, As-CATH3<ASN73763.1>, As-CATH4<ASN73764.1>, As-CATH5<ASN73765.1> and As-CATH6<ASN73766.1>), *C. porosus* cathelicidin (Cp-CATH1<CPORG000270>, Cp-CATH2<CPORG002468>, Cp-CATH3<CPORG005374> and Cp-CATH4<CPORG009296>) and *C. siamensis* cathelicidin (Cs-CATH< MH425517>)



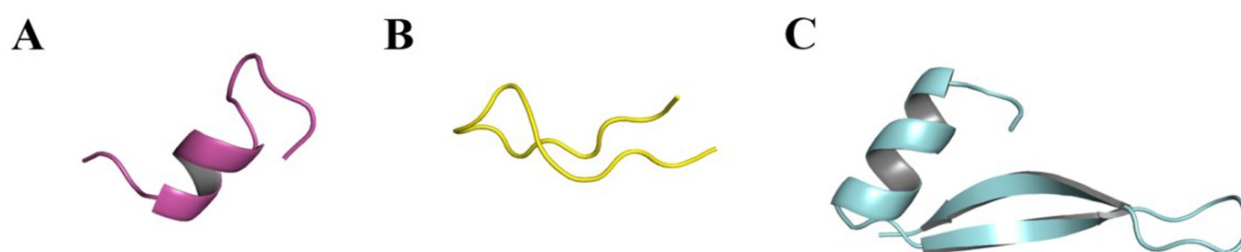
รูปที่ 4.28 Phylogenetic analysis ของ *A. mississippiensis* cathelicidin (Am-CATH1<KYO43834.1>, Am-CATH2< KYO43835.1>, Am-CATH3<KYO44086.1>, Am-CATH4<KYO44087.1> and Am-CATH5<XP014466014.1>), *A. sinensis* cathelicidin (As-CATH1<ASN73761.1>, As-CATH2<ASN73762.1>, As-CATH3<ASN73763.1>, As-CATH4<ASN73764.1>, As-CATH5<ASN73765.1> and As-CATH6<ASN73766.1>) and *C. porosus* cathelicidin (Cp-CATH1<CPORG000270>, Cp-CATH2<CPORG002468>, Cp-CATH3<CPORG005374> and Cp-CATH4<CPORG009296>) and *C. siamensis* cathelicidin (Cs-CATH< MH425517>)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ Cs-CATH มาทำนายโครงสร้างตติยภูมิด้วยโปรแกรม I-TASSER server โครงสร้างสามมิติโดยทั่วไปมีลักษณะเหมือนกันคาเทลิซินอื่นๆ ที่มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติมาแล้ว โดยเฉพาะส่วน N-terminal cathelin domain ที่มีลักษณะ conserve แต่เนื่องจาก C-terminal cathelicidin domain ของแต่ละสปีชีส์นั้นมีความแตกต่างกัน ทำให้โครงสร้างของ CsCATH ประกอบด้วย α -helix 1 สาย และ β -strand 4 สาย อีกทั้งพันธะไดซัลไฟด์ 2 พันธะ ปรากฏดังรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.29 การทำนายโครงสร้างตติยภูมิของคาเทลิซิน csCATH ด้วยโปรแกรม I-TASSER server (N-terminal cathelin domain; สีน้ำเงิน และ C-terminal cathelicidin peptide; สีฟ้า)

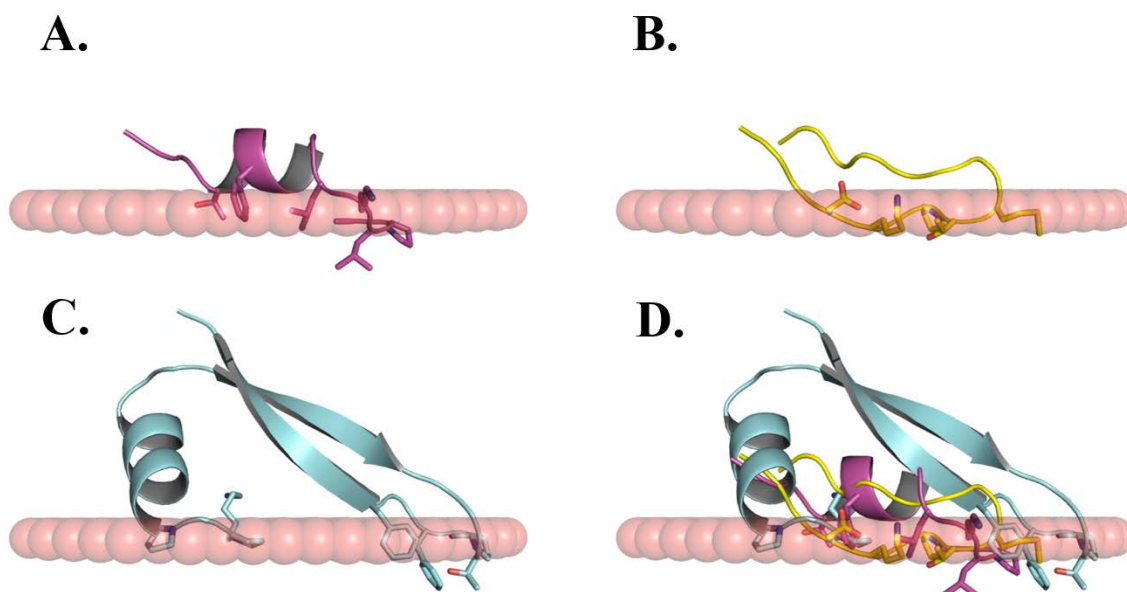
เป็นที่ทราบกันดีว่าเอนไซม์ elastase จะมีตำแหน่งตัดหลังกรดอะมิโนวาเลอีน (Val) หรือ อะลานีน (Ala) จากลำดับกรดอะมิโนของ Cs-CATH เมื่อถูกตัดด้วย Elastase จะทำให้ได้ mature peptide จาก cs-CATH สามเส้นคือ RN15: NH₂-RNCTWLFSTKLKPA-COOH, SI16: NH₂-SIITCDTMTPGKDIHA-COOH from cathelin domain และ KP36: NH₂-KPKPKPGKDERGRPGSGSWGIGKTPFSFPITKKPVG-COOH โดยเปปไทด์ RN15 ประกอบด้วย 15 กรดอะมิโน มีประจุสุทธิ +3 และมี hydrophobic ratio เท่ากับ 46% เปปไทด์ SI16 ประกอบด้วย 16 กรดอะมิโน ประจุสุทธิ -1 และมี hydrophobic ratio เท่ากับ 37% ส่วนเปปไทด์ KP36 ประกอบด้วย 36 กรดอะมิโน มีประจุสุทธิ +7 และมี hydrophobic ratio เท่ากับ 16% จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นพบว่า RN15 นั้นมีค่า hydrophobic ratio ใกล้เคียงกับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีรายงานก่อนหน้านี้ที่สุด และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ทั้งสามเส้นมาทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD server ผลปรากฏดังรูปที่ 4.30



รูปที่ 4.30 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์คาเธลิซิน RN15 (A), SI16 (B) และ KP36 (C) ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD server

จากรูปที่ 4.30 จะเห็นได้ว่าเปปไทด์ทั้งสามเส้นมีลักษณะของโครงสร้างทุติยภูมิที่แตกต่างกัน โดยที่ RN15 มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ α -helix SI16 มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ random coil และ KP36 มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ α -helix และ β -sheet อย่างไรก็ตามเปปไทด์ที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ α -helix นั้นมีแนวโน้มในการเป็นโครงสร้างทุติยภูมิของ antimicrobial peptide ประกอบกับผลจากการนำลำดับกรดอะมิโนของ Cs-CATH เมื่อวิเคราะห์บริเวณที่สามารถเป็น antimicrobial peptide ด้วย Antimicrobial Sequence Scanning System พบว่าลำดับกรดอะมิโนบริเวณ NH₂-RNCTWLFSTKLK-COOH มีลักษณะของ bactericidal stretches ด้วย 14% probability ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนตรงกับเปปไทด์ RN15 ดังนั้นจึงได้ทำการสังเคราะห์ RN15 เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป

เปปไทด์ Cs-CATH ถูก simulate เข้ากับเมมเบรนด้วยโปรแกรม PPM server แสดงให้เห็นถึงทิศทางการจับกับเมมเบรนของเปปไทด์ Cs-CATH ผลปรากฏดังรูปที่ 4.31 แสดงให้เห็นว่า residue ของ Thr4 Phe7 Leu11 Lys12 Leu13 และ Pro14 ของเปปไทด์ RN15 สามารถยึดเกาะเข้าไปในเมมเบรน จากโมเดลเปปไทด์ RN15 สามารถแทรกลงไปชั้นเมมเบรนได้เช่นเดียวกับกับเปปไทด์ KP36 ซึ่งสามารถแทรกลงไปชั้นเมมเบรนได้ลึก 4.6-4.5 อังสตรอม ในขณะที่เปปไทด์ SI16 สามารถแทรกลงไปชั้นเมมเบรนได้ลึก 2.5 อังสตรอม



รูปที่ 4.31 โมเดลการยึดเกาะเมมเบรนของเปปไทด์คาเทลิซิดิน RN15 (A), SI16 (B), KP36 (C) และ superimposition ของทั้ง 3 เปปไทด์ (D)

4.7.3 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์คาเทลิซิดินของจระเข้สยาม

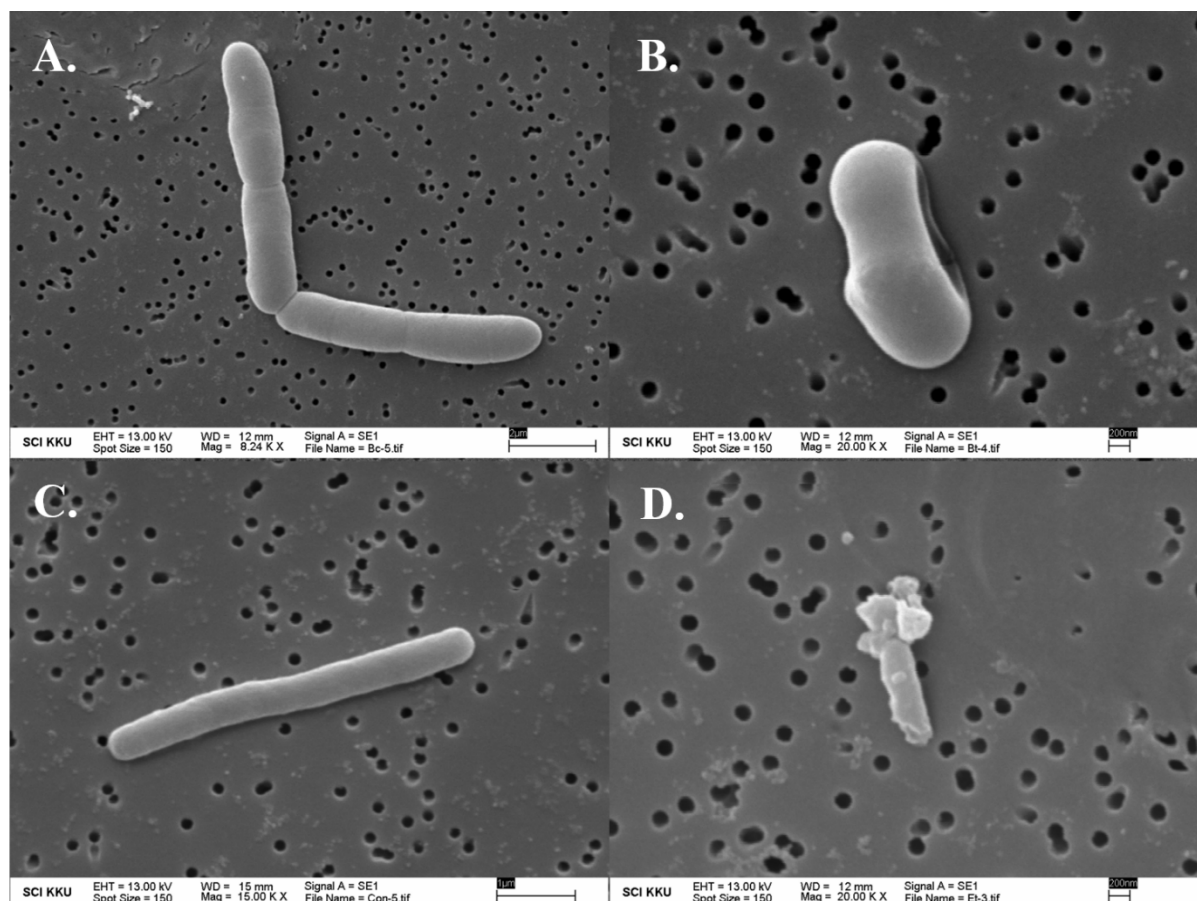
เปปไทด์ RN15 ที่ได้จากการสังเคราะห์ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ที่ใช้ในการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.32 โดยผลการทดลองพบว่าเปปไทด์ RN15 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเปปไทด์ RN15 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเปปไทด์ RN15 ต่อเชื้อแบคทีเรียนั้นๆ ดังจะเห็นได้จากค่า MIC ที่ต่ำต่อเชื้อแกรมบวก *B. megaterium* TISTR067 and *B. subtilis* TISTR1248 (MICs = 12.5-25 $\mu\text{g/ml}$) แต่มีค่า MIC ที่สูงต่อเชื้อ *B. cereus* TISTR1449 (MICs = 400 $\mu\text{g/ml}$) (ตารางที่ 4.32)

ตารางที่ 4.32 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ RN15 ในการทำลายจุลชีพ (Minimum inhibition concentration; MIC)

Microorganism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	RN15	Ampicillin
<u>Gram-positive bacteria</u>		
<i>Bacillus megaterium</i> TISTR067	12.5	1.56
<i>Bacillus subtilis</i> TISTR1248	25	1.56
<i>Bacillus cereus</i> TISTR1449	400	50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	400	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR746	400	1.56
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR927	100	12.5

Microorganism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	RN15	Ampicillin
<u>Gram-negative bacteria</u>		
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	200	12.5
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	200	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TISTR1287	>400	>50
<i>Salmonella thyphimurium</i> TISTR1472	>400	>50
<u>Fungi</u>		
<i>Candida albicans</i> TISTR5554	>400	>50
<u>Aquatic pathogenic bacteria</u>		
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR1321	>400	1.56
<i>Salmonella derby</i> DMST16881	>400	1.56
<i>Edwardsiella tarda</i> DMST38217	>400	1.56

เมื่อนำแบคทีเรีย RN15 ที่ความเข้มข้นของค่า MIC ต่อแบคทีเรีย *B. megaterium* TISTR067 และ *E. coli* DH5 α มาทดสอบผลของเปปไทด์ต่อเมมเบรนของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ด้วยกล้อง scanning electron microscope (SEM) พบว่าเมื่อแบคทีเรีย RN15 รวมกับเชื้อทั้ง 2 ชนิด เป็นเวลา 15 นาที ผิวเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะผิดรูปไปอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.32)

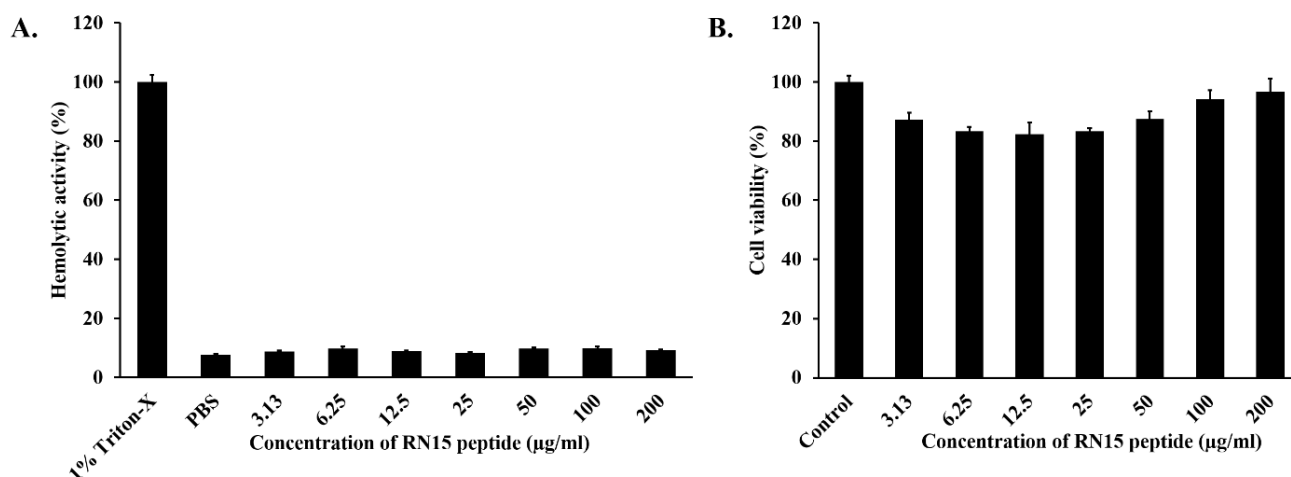


รูปที่ 4.32 ผลของเปปไทด์ RN15 ต่อผิวเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope (SEM)) (A) เชื้อ *B. megaterium* ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับเปปไทด์ RN15 (B) เชื้อ *B. megaterium* บ่มร่วมกับเปปไทด์ RN15 ที่ความเข้มข้น MIC เป็นเวลา 15 นาที (C) เชื้อ *E. coli* ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับเปปไทด์ RN15 (D) เชื้อ *E. coli* บ่มร่วมกับเปปไทด์ RN15 ที่ความเข้มข้น MIC เป็นเวลา 15 นาที

4.7.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของเปปไทด์ RN15 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงและเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)

เมื่อนำเปปไทด์สังเคราะห์ RN15 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงจากมนุษย์ โดยวิธี hemolytic assay จากการทดลองพบว่าเปปไทด์ RN15 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 3.13-200 µg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงต่ำ โดยทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงประมาณ 5-10% เมื่อเทียบกับ 1% Triton X-100 (รูปที่ 4.33A)

เมื่อนำเปปไทด์สังเคราะห์มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากมนุษย์ (NHDF cell) โดยวิธี MTT colorimetric assay จากการทดลองพบว่าเปปไทด์ RN15 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ NHDF ต่ำ โดยที่ความเข้มข้นระหว่าง 3.13-200 µg/ml อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับเปปไทด์มีค่ามากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ NHDF ที่เลี้ยงปกติโดยที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเปปไทด์ RN15 (รูปที่ 4.33B)

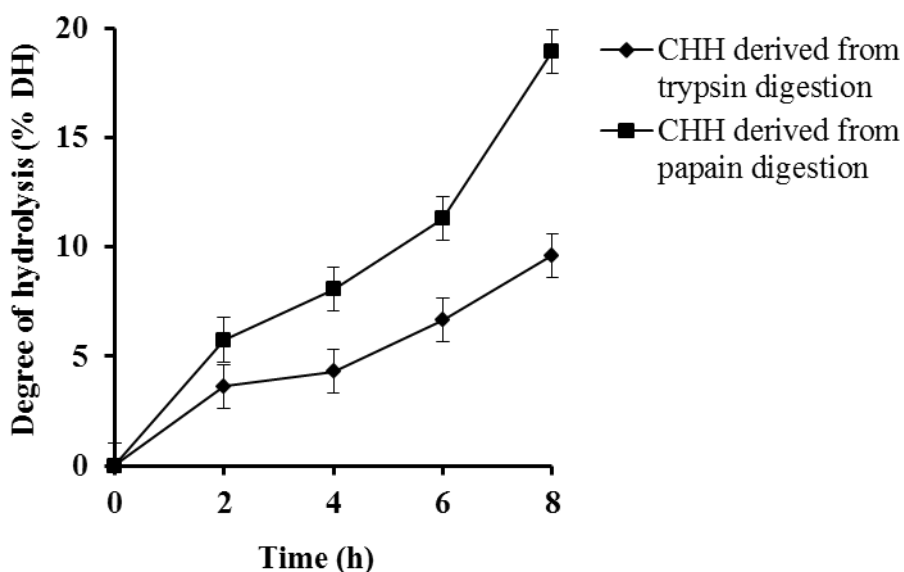


รูปที่ 4.33 แสดงความเป็นพิษของเปปไทด์ RN15 เซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (A) ในรูปแบบร้อยละการเกิด hemolysis และความเป็นพิษของเปปไทด์ RN15 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากมนุษย์ (NHDF cell) ในรูปแบบร้อยละการรอดชีวิตเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับเปปไทด์ (B)

4.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory activity) ของโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสจากจระเข้สยาม

4.8.1 ระดับของการย่อย (Degree of Hydrolysis (DH))

เพื่อให้ได้ protein fragments ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ crocodile hemoglobin จึงถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) และปาเปน (Papain) ที่เวลา 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง โดยทริปซินจะเข้าไปย่อยที่ N-terminal ของ Arg และ Lys ในขณะที่ปาเปนจะเข้าไปย่อยที่กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Tavano, 2013) ทริปซินเป็นเอนไซม์ที่ผลิตในลำไส้และเป็นเอนไซม์หลักในระบบย่อยอาหารของสัตว์และมนุษย์ ทริปซินมักจะถูกใช้เพื่อจำลองกระบวนการย่อยอาหาร ส่วนปาเปนเป็นเอนไซม์ที่ได้จากการค้าที่ถูกใช้เพื่อผลิต active peptides ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis (DH)) แสดงถึงสัดส่วนของพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่ถูกย่อย โดยวิธี TNBS เป็นการวัดระดับการย่อยโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ primary amino groups กับ trinitro-benzene-sulfonic acid (TNBS) reagent (Adler-Nissen 1979) จากผลการทดลองพบว่า hemoglobin ถูกย่อยด้วยทริปซินด้วยระดับการย่อยเป็น 3.64%, 4.31%, 6.65% และ 9.61% ที่เวลา 2 h, 4 h, 6 h และ 8 h ตามลำดับ ในขณะที่การย่อยด้วยปาเปน hemoglobin ถูกย่อยด้วยระดับการย่อยเป็น 5.75%, 8.05%, 11.27% และ 18.94% ที่เวลา 2 h, 4 h, 6 h และ 8 h ตามลำดับ (รูปที่ 4.34) ผลการย่อยแสดงให้เห็นว่าการเกิดกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีมากขึ้นเมื่อเวลาการย่อยเพิ่มมากขึ้น ระดับการย่อยเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น การย่อยด้วยทริปซินมีความจำเพาะมากจึงส่งผลให้ระดับการย่อยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปาเปน หลายงานวิจัยรายงานว่า การย่อยด้วยทริปซินและปาเปนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Li et. al., 2015; Shu et. al., 2015; Afify et al., 2018) และต้านการอักเสบ (O' Sullivan et. al., 2017) และฤทธิ์ดังกล่าวยังเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น

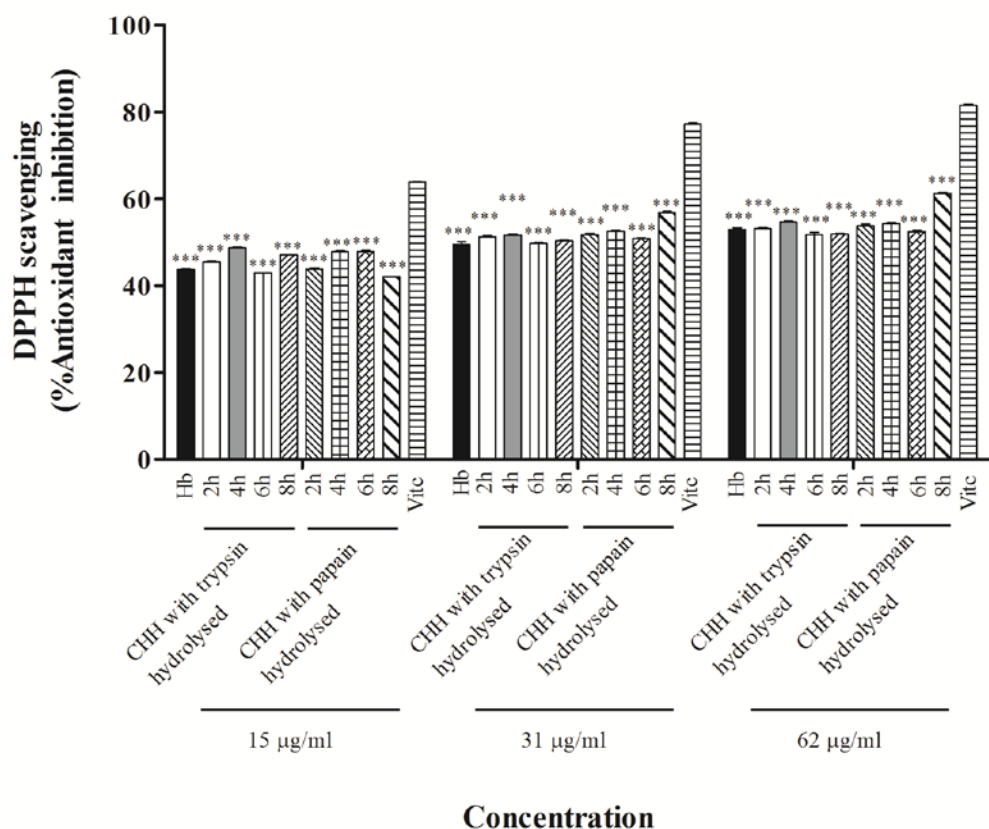


รูปที่ 4.34 แสดงระดับการย่อยของโปรตีนฮีโมโกลบินจากเลือดจระเข้สยาม

4.8.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.8.2.1 ผลการยับยั้ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

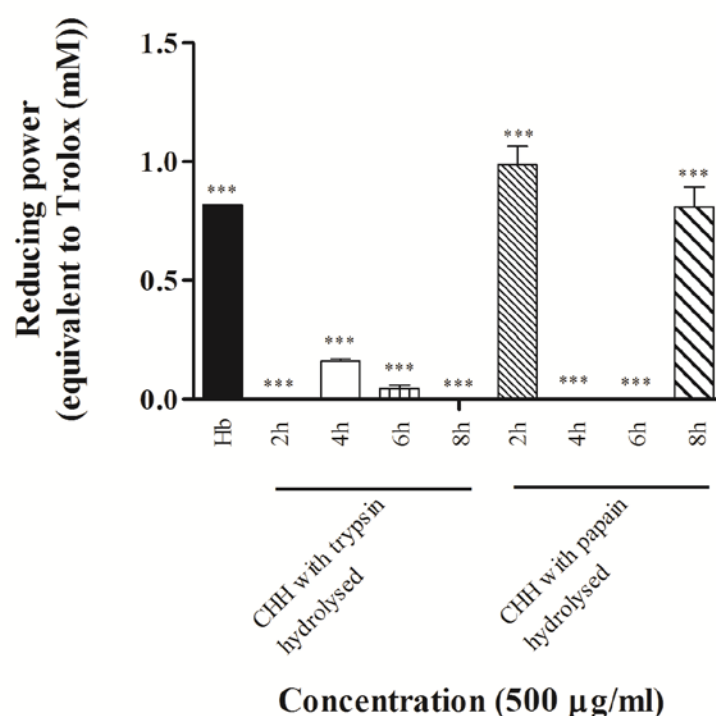
วิธี DPPH เป็นวิธีที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการตรวจหากิจกรรมยับยั้งอนุมูลอิสระจากความสามารถในการลดสารอนุมูลอิสระของสาร (Shukla and Mehta 2017) ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *Crocodylus siamensis* hemoglobin hydrolysates (CHHs) (15-62 $\mu\text{g/ml}$) แสดงถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่า CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปน (CHHp) แสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซิน (CHH_t) CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนที่เวลา 8 ชั่วโมง (8h-CHHp) ที่ความเข้มข้น 15, 31 (IC₅₀ value) และ 62 $\mu\text{g/ml}$ สามารถต้านอนุมูลอิสระคิดเป็น 42.03, 56.86 และ 61.28% ตามลำดับ ในขณะที่ CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซิน (4h-CHH_t) ที่ความเข้มข้น 15, 31 (IC₅₀ value) และ 62 $\mu\text{g/ml}$ สามารถต้านอนุมูลอิสระคิดเป็น 48.73, 51.68 and 54.66% ตามลำดับ (รูปที่ 4.35) CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนแสดงกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซิน แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มระดับการย่อยด้วยปาเปนสามารถเพิ่มการย่อยให้เกิด protonated peptides ที่สามารถทำให้การกำจัด DPPH ดีขึ้น การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารสามารถเปลี่ยนสีของอนุมูลอิสระจากสีม่วงเป็นสีเหลืองซึ่งสามารถตรวจวัดได้ที่ 490 nm (Yun-hui et. al., 2006) นอกจากนี้ CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนยังสามารถลดอนุมูลอิสระ DPPH ได้เหมือนกับโปรตีนจาก *Camellia oleifera* seed cake ที่ผ่านการย่อยด้วยปาเปน (Li et. al., 2015)



รูปที่ 4.35 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเลือดกระชั้ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และปาเปน ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

4.8.2.2 การทดสอบ Ferric Reducing Power

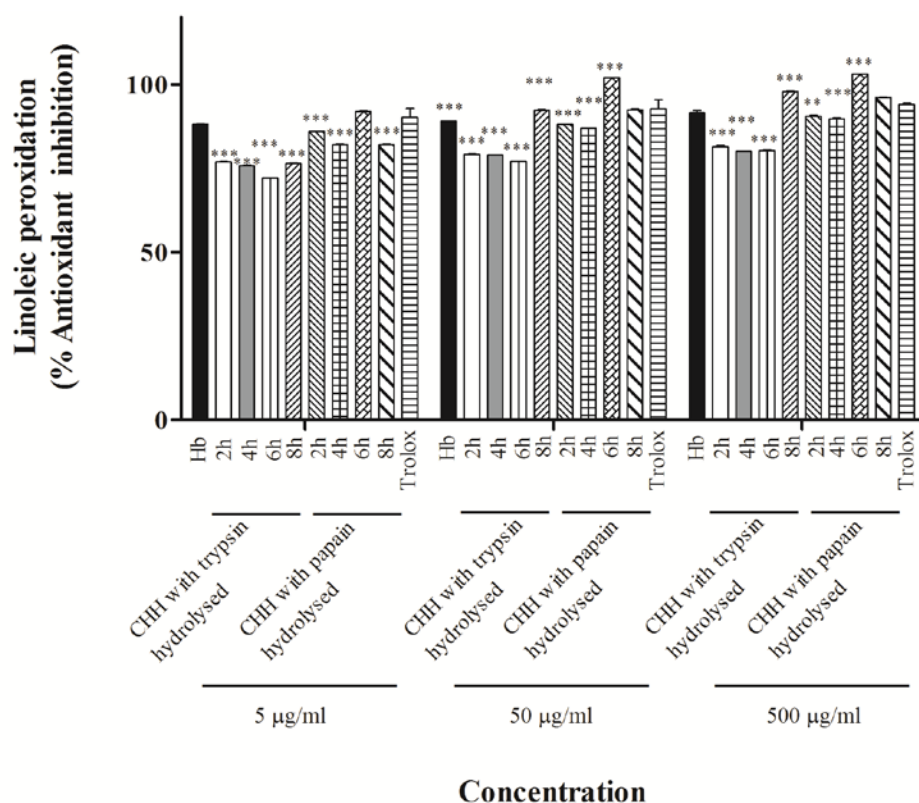
วิธี Ferric reducing power เป็นวิธีที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารให้อิเล็กตรอนในการให้อิเล็กตรอนกับ ferric cyanide complex $[Fe^{3+}(CN)_6]$ เพื่อทำให้เปลี่ยนเป็น cyanide complex $[Fe^{2+}(CN)_6]$ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซินที่เวลา 4 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง (4h-CHHt และ 6h-CHHt) และ CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซินที่เวลา 2 และ 8 ชั่วโมง (2h-CHHp และ 8h-CHHp) ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml แสดงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนอย่างมีนัยสำคัญ 2h-CHHp แสดงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนสูงที่สุดเทียบเท่า Trolox ประมาณ 0.99 mM ในขณะที่ intact Hb, 4h-CHHt, 6h-CHHt และ 8h-CHHp แสดงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเทียบเท่า Trolox ประมาณ 0.82, 0.16, 0.05 และ 0.81 mM ตามลำดับ (รูปที่ 4.36) ที่มากกว่านั้น 500 µg/ml glutathione (positive control) แสดงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเทียบเท่า Trolox ประมาณ 18.60 mM ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยา potassium ferricyanide to form potassium ferrocyanide ซึ่งเกิดปฏิกิริยากับ ferric trichloride ส่งผลให้เกิด ferric ferrocyanide ที่มีสีน้ำเงินที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ 700 nm มีรายงานพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ประกอบไปด้วย Ile, His, Tyr, Pro และ Lys มีความสามารถสูงในการให้อิเล็กตรอนและแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่ส่งผลให้เกิดการขัดขวางปฏิกิริยาถูกโคของอนุมูลอิสระ (Qian et. al., 2008; Han et. al., 2015)



รูปที่ 4.36 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Power ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือดจระเข้ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน

4.8.2.3 ผลการการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิด (Linoleic Peroxidation)

การเกิด Lipid peroxidation ถือว่าเป็นกระบวนการในการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในกระบวนการออกซิเดชันของลิพิดที่ไม่อิ่มตัว การเกิด Lipid peroxidation สามารถทำลาย double layer cell membranes ซึ่งส่งผลให้เกิดสารอันตรายหลายชนิดเช่น hydrocarbon compounds, ketone และ aldehyde (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง malondialdehyde, MDA) (Halliwell, 1987) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า CHHs (5-500 µg/ml) สามารถยับยั้งกระบวนการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิดได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ Trolox CHH ที่ได้จากการย่อยที่เวลา 8 ชั่วโมง (8h-CHHt) ที่ความเข้มข้น 5 (IC₅₀ value), 50 and 500 µg/ml แสดงการยับยั้งกระบวนการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิโนเลอิกคิดเป็น 76.34, 96.99 และ 97.85% ตามลำดับ ในขณะที่ CHH ที่ได้จากการย่อยที่เวลา 6 ชั่วโมง (6h-CHHt) ที่ความเข้มข้น 5 (IC₅₀ value), 50 and 500 µg/ml แสดงการยับยั้งกระบวนการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิโนเลอิกคิดเป็น 91.95, 100 และ 103% ตามลำดับ (รูปที่ 4.37) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ Trolox สามารถยับยั้งได้ 90.18, 92.73 และ 93.99% ตามลำดับ และฮีโมโกลบินที่ไม่ผ่านการย่อย (intact Hb) สามารถยับยั้งได้ 88.12, 88.99 and 91.55% ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น สามารถบ่งชี้ได้ว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิโนเลอิกได้ดีกว่าการย่อยด้วยทริปซิน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการย่อยเจลาตินของผิวปลาโฮกิ (Mendis et. al., 2005)

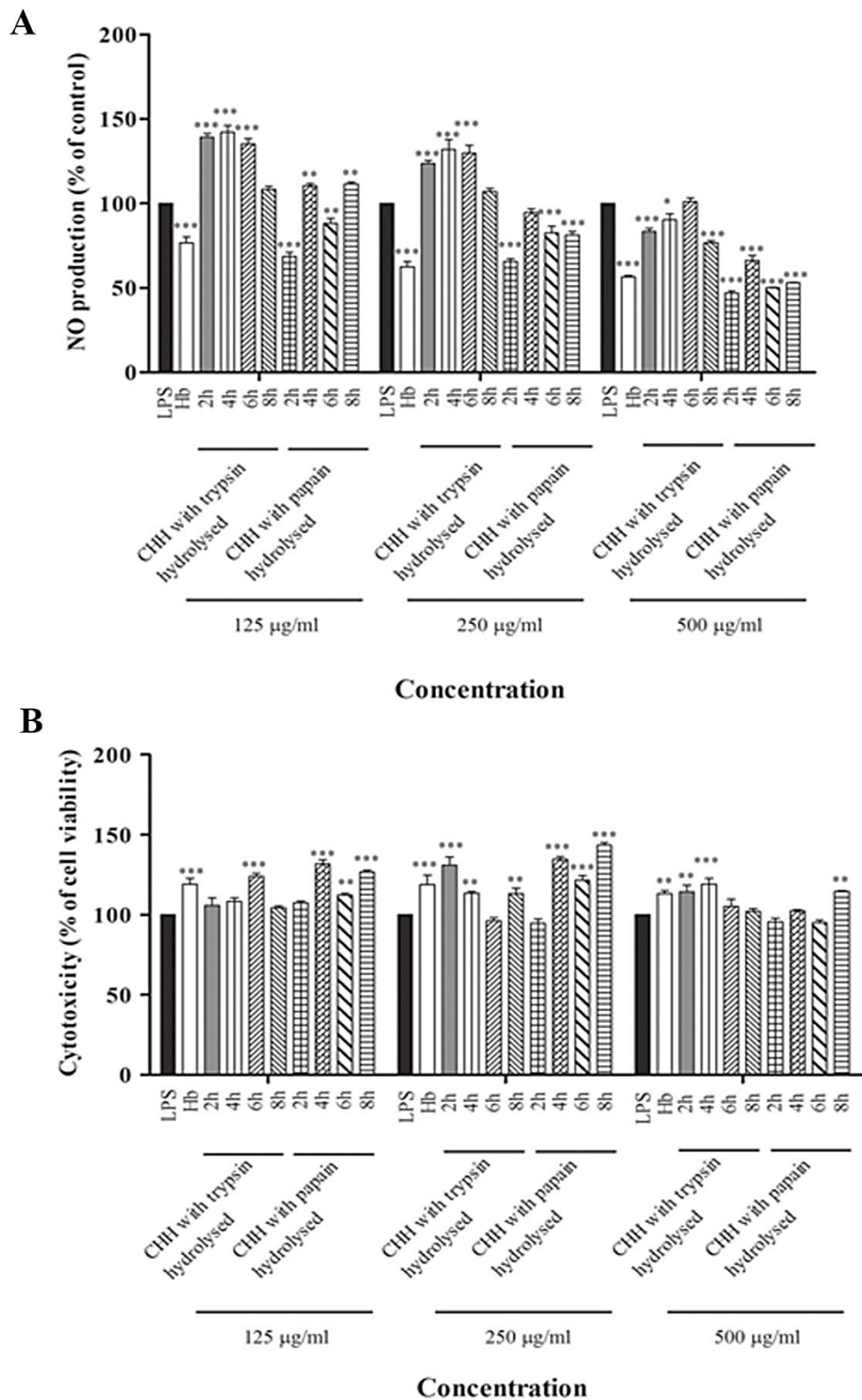


รูปที่ 4.37 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Linoleic peroxidation ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด กระทั่งย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน

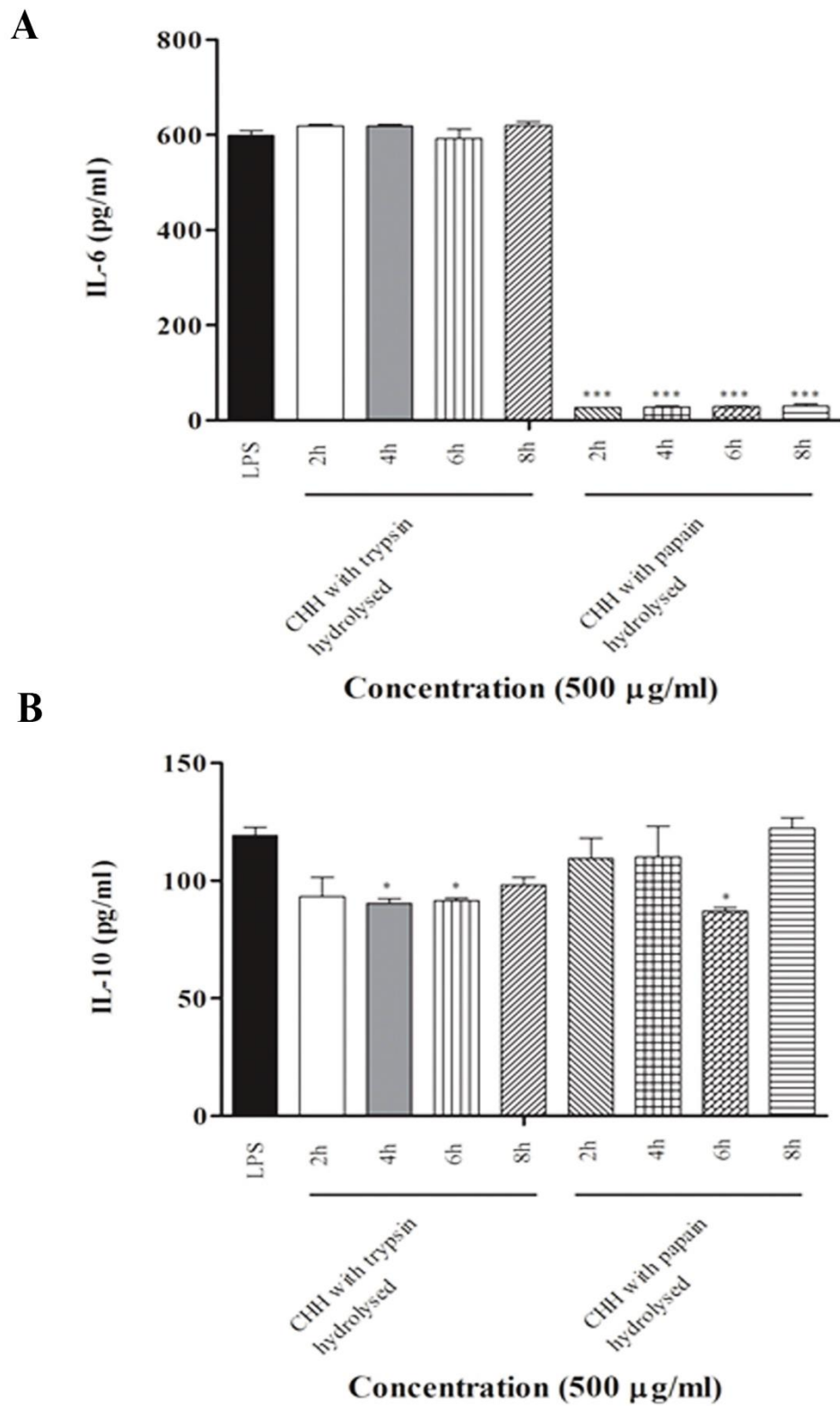
4.9 ผลการตรวจวัดไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) การอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) และไซโตไคน์ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokines, IL-10 and IL-6)

ทำการศึกษาความสามารถในการลดการอักเสบและประเมินความเป็นพิษของ intact Hb และ CHHs โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7 cells) เป็นโมเดล โดยจะทำการกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ให้เกิดการอักเสบด้วย Lipopolysaccharide (LPS) เมื่อเซลล์เกิดการอักเสบจะมีการผลิต nitric oxide (NO) ซึ่งเป็นสารสื่อการอักเสบเพิ่มสูงขึ้น จากนั้นทำการประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิต NO และ ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ถูกผลิตในเซลล์ RAW 264.7 cells ของ intact Hb และ CHHs ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการผลิต nitric oxide (NO) สามารถลดผลเสียที่เกิดจากกระบวนการอักเสบได้ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 cells ด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสถานะที่ไม่มีสารตัวอย่าง พบการสร้าง NO เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งปริมาณ NO ที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะถูกคิดเป็นปริมาณ 100% (รูปที่ 4.38A) แต่เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและเลี้ยงเซลล์นั้นร่วมกับ intact Hb และ CHHs (125-500 µg/ml) พบว่า NO มีการผลิตน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพิ่มขึ้น CHHs ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนได้แก่ 2h-CHHp, 4h-CHHp, 6h-CHHp และ 8h-CHHp ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml สามารถวัดปริมาณ NO คิดเป็น 46.86, 66.26, 52.27 และ 52.94% ตามลำดับ ในขณะที่ CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซินที่เวลา 8 ชั่วโมง (8h-CHHt) ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml สามารถวัดปริมาณ NO คิดเป็น 76.50% จากนั้นเพื่อประเมินความเป็นพิษของ CHHs ต่อ macrophage RAW 264.7 cells จึงได้ทำการทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ในสถานะที่มี CHHs (รูปที่ 4.38B) ผลการทดลองพบว่า CHHs ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนและทริปซินไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 cells เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบ

ความสามารถในการลดการสร้าง NO ระหว่าง CHHs พบว่า CHHs ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนมีประสิทธิภาพในการลดการสร้าง NO ดีกว่า CHHs ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซิน O'Sullivan et al, (2017) รายงานว่า bovine lung hydrolysates ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนแสดงความสามารถในการยับยั้งการอักเสบโดยการลดการสร้าง IL-6, IL-1 β , และ NO ในเซลล์ RAW264.7 และ IL-2 ในเซลล์ Jurkat T cells แต่อย่างไรก็ตามการลดลงของสารก่อการอักเสบดังกล่าวดูเหมือนจะเป็นผลมาจากพิษของเปปไทด์ ต่อเซลล์ Phosri et al, (2017) และ Jangpromma et al, (2017) รายงานว่า crocodile Hb สามารถยับยั้งการอักเสบได้ด้วยการกีดขวางการแสดงออกของ nitric oxide synthase (NOS) ส่งผลให้เกิดการลดการสร้าง NO และกีดขวางการแสดงออกของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) นอกจากนี้ Lueangsakulthai et al, (2018) ยังแสดงให้เห็นว่า hemoglobin hydrolysate ที่ได้จากการย่อยด้วยเปปซินสามารถยับยั้งการอักเสบโดยการลดการสร้าง pro-inflammatory cytokines และ cytokine mediator เช่น NO, IL-6, IL-1 β และ PGE₂ ซึ่งในทำนองเดียวกันงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า 2h-CHHp แสดงความสามารถที่ดีที่สุดในการยับยั้งการสร้าง IL-6 (25.73 pg/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับ LPS, 4h-CHHp, 6h-CHHp และ 8h-CHHp ซึ่งสามารถยับยั้งการสร้าง IL-6 ได้คิดเป็น 28.36, 26.60 and 29.84 pg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 4.39A) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า 4h-CHHt, 6h-CHHt และ 6h-CHHp สามารถลดการสร้าง IL-10 ประมาณ 90.41, 91.52 and 87.07 pg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับ LPS (รูปที่ 4.39B) ในขณะที่ 2h-CHHp สามารถวัดปริมาณ IL-10 (109.30 pg/ml) ได้ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ LPS จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนแสดงความสามารถที่ดีที่สุดในการลดการอักเสบ และ 2h-CHHp แสดงความสามารถในการลดการอักเสบโดยปราศจากความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 และมีความสามารถในการลดการสร้าง IL-6 ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง Inflammatory biomarkers ที่ส่งผลให้การอักเสบ ในขณะที่ IL-10 เป็น anti-inflammatory cytokine ที่ส่งเสริมให้เกิดการยับยั้งการอักเสบ นอกจากนี้ยังพบว่า IL-6 ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลยับยั้งการอักเสบ เช่น IL-1R antagonist, soluble TNF receptors, IL-10, glucocorticoids, protease inhibitors (เช่น tissue inhibitor ของ metalloproteinase-1), และการกีดขวางส่งสัญญาณของ cytokine (SOCS)₃ proteins (Ahmed et. al., 2000) เมื่อ IL-6 ลดลงจะส่งผลให้เกิดการลดการสร้าง IL-10 ดังนั้นหากสามารถลดการสร้าง IL-6 ก็จะส่งผลให้สามารถชะลอหรือบรรเทาการอักเสบได้ (Mao et. al., 2011) ผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการอักเสบของ CHH อาจจะเกี่ยวข้องกับ JAK/STAT pathway โดยพิจารณาจากความสามารถในการลด pro-inflammatory cytokine (Yoshimura et. al., 2005)



รูปที่ 4.38 แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบ ผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเลือดจระเข้ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน (A) และการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 (B)



รูปที่ 4.39 แสดงฤทธิ์การสร้างสารสื่อการอักเสบ IL-6 (A) และ IL-10 (B) ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือดจระเข้ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน

4.10 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนฮีโมโกลบินไฮโดรไลสจากจระเข้สยาม

องค์ประกอบของกรดอะมิโนเป็นลักษณะอย่างหนึ่งของโปรตีน CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซิน ที่ 4 ชั่วโมง (4h-CHHt) และ CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนที่ 2 ชั่วโมง (2h-CHHp) ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบได้ดีกว่าการย่อยด้วยเวลาอื่นๆ ได้นำมาศึกษาต่อเนื่อง ในแง่ขององค์ประกอบของกรดอะมิโน ผลการทดลองพบว่า 4h-CHHt ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 10 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย Thr, Gly, Cys, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, His และ Lys ซึ่งคิดเป็น 61.11, 179.96, 32.76, 67.21, 137.30 and 101.24 $\mu\text{mol/l}$ ตามลำดับ ในขณะที่ 2h-CHHp ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 15 ชนิดซึ่งประกอบไปด้วย Thr, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Orn และ Lys ซึ่งคิดเป็น 32.96, 66.94, 400.44, 276.62, 594.30, 24.93, 294.25, 28.36, 77.07, 563.54, 143.83, 246.75, 259.23, 38.97 and 103.06 $\mu\text{mol/l}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.33) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนใน 4h-CHHt และ 2h-CHHp แสดงให้เห็นว่าการย่อยด้วยปาเปนมีปริมาณและความหลากหลายของกรดอะมิโนที่มากกว่าการย่อยด้วยทริปซิน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนและทริปซินจะมี Pro, Ala, Leu, Tyr, Phe, Cys, Gly, His และ Val เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก (Jun et. al., 2004; Je et. al., 2007; Kim et. al., 2007; Ren et. al., 2008; Ao and Li et. al., 2012; Feng et. al., 2017) ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นกรดอะมิโนหลักที่พบใน CHH ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของโปรตีนที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนอาจเป็นผลมาจากกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และ thiol groups ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล จากผลการศึกษาโดย Qian et. al, (2008) ซึ่งรายงานไว้ว่า Ile, His, Tyr, Pro และ Lys เป็นกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนในโปรตีนไฮโดรไลเซต นอกจากนี้เปปไทด์ที่มี His และ Tyr เป็นองค์ประกอบยังถูกรายงานว่ามีความสามารถในการต้าน lipid peroxidation (Moure et. al., 2006) ที่มากกว่านั้นกรดอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำ เช่น Leu, Phe, Val และ Ile รวมไปถึงกรดอะมิโนที่มีประจุบวก เช่น Lys, Arg และ His สามารถแสดงบทบาทสำคัญในเปปไทด์เพื่อต้านการอักเสบได้อีกด้วย (Vogel et. al., 2012; Nan et. al., 2007; Kovacs-Nolan et. al., 2012; Chatterton et. al., 2013; Majumder et. al., 2013; Kwak et. al., 2016)

ตารางที่ 4.33 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดไลสจากฮีโมโกลบินกระช้ำสยาม

Amino acid ($\mu\text{mol/L}$)	Sample	
	4h-CHHt	2h-CHHp
L-Aspartic (Asp)	-	-
L-Threonine (Thr)	9.74	32.96
L-Serine (Ser)	-	-
L-Glutamic (Glu)	-	66.94
L-Proline (Pro)	-	400.44
L-Glycine (Gly)	48.91	276.62
L-Alanine (Ala)	-	594.30
L-Cystine (Cys)	15.14	24.93
L-Valine (Val)	174.45	294.25
L-Methionine (Met)	-	28.36
L-Isoleucine (Ile)	61.11	77.07
L-Leucine (Leu)	179.96	563.54
L-Tyrosine (Tyr)	32.76	143.83
L-Phenylalanine (Phe)	62.71	246.75
L-Histidine (His)	137.30	259.23
L-Ornithine (Orn)	-	38.97
L-Lysine (Lys)	101.24	103.06
L-Arginine (Arg)	-	-

บทที่ 5

ผลและอภิปรายผลการวิจัยของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์ข้อปล้อง

5.1 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีนของปอดกบนาด้วยเทคนิคทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomic)

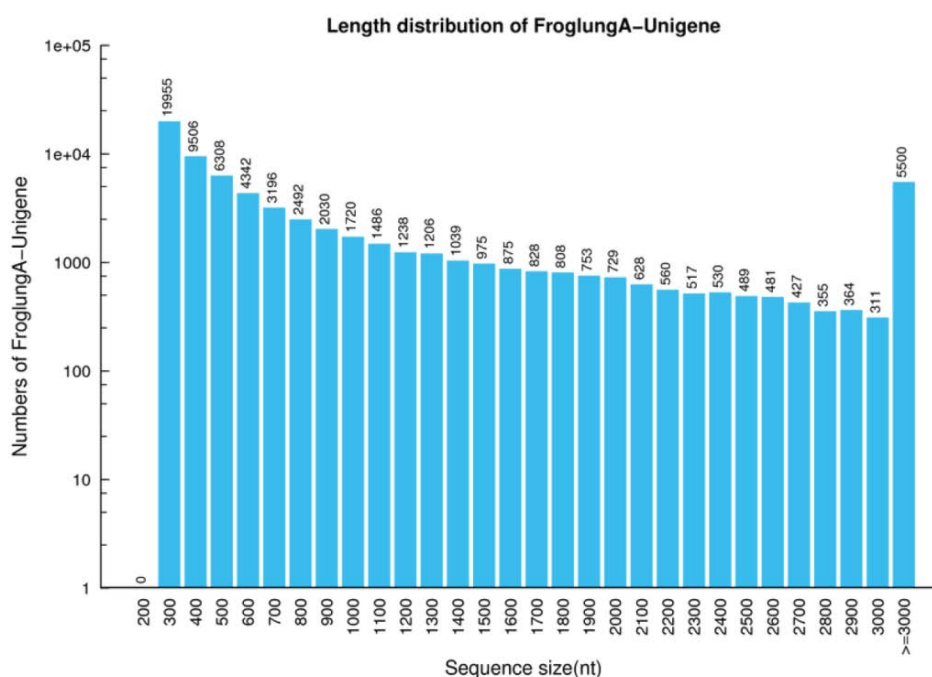
จากการศึกษาเนื้อเยื่อของปอดกบนาโดยการทำ RNA-sequencing สามารถวิเคราะห์จำนวน transcript ได้ทั้งหมด 105,228 และจำนวน unigene ได้ทั้งหมด 69,648 ดังตารางที่ 5.1 โดยมีความยาวรวมของ transcript และ unigene เท่ากับ 93,474,196 และ 73,220,678 เบส ตามลำดับ โดยมีความยาวเฉลี่ยของ transcript และ unigene เท่ากับ 888 และ 1,051 เบส ตามลำดับ แต่เมื่อจำแนกจำนวนของ unigene ในแต่ละความยาวของจำนวนนิวคลีโอไทด์ ระหว่างช่วง 200-3000 เบส และความยาวมากกว่า 3000 เบส พบว่า ในช่วง 300-399 เบสจะมีจำนวนมากที่สุด คือ 19955 unigene จากนั้นจำนวน unigene 400-3000 เบส มีแนวโน้มลดหลั่นกันมาเรื่อยๆ แต่ความยาวของ unigene ที่มากกว่า 3000 เบส มีจำนวนทั้งหมด 5500 unigene แสดงดังรูปที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงจำนวน Transcript และ Unigene จากเนื้อเยื่อปอดของกบนาจากการทำ RNA-sequencing

Total Number	total Length	Mean Length	N50	N70	N90	GC (%)
105,228 ^a	93,474,196	888	1,975	917	299	44.47
69,648 ^b	73,220,678	1,051	2,141	1,088	375	44.55

^aข้อมูลรายละเอียดของ transcript

^bข้อมูลรายละเอียดของ unigene



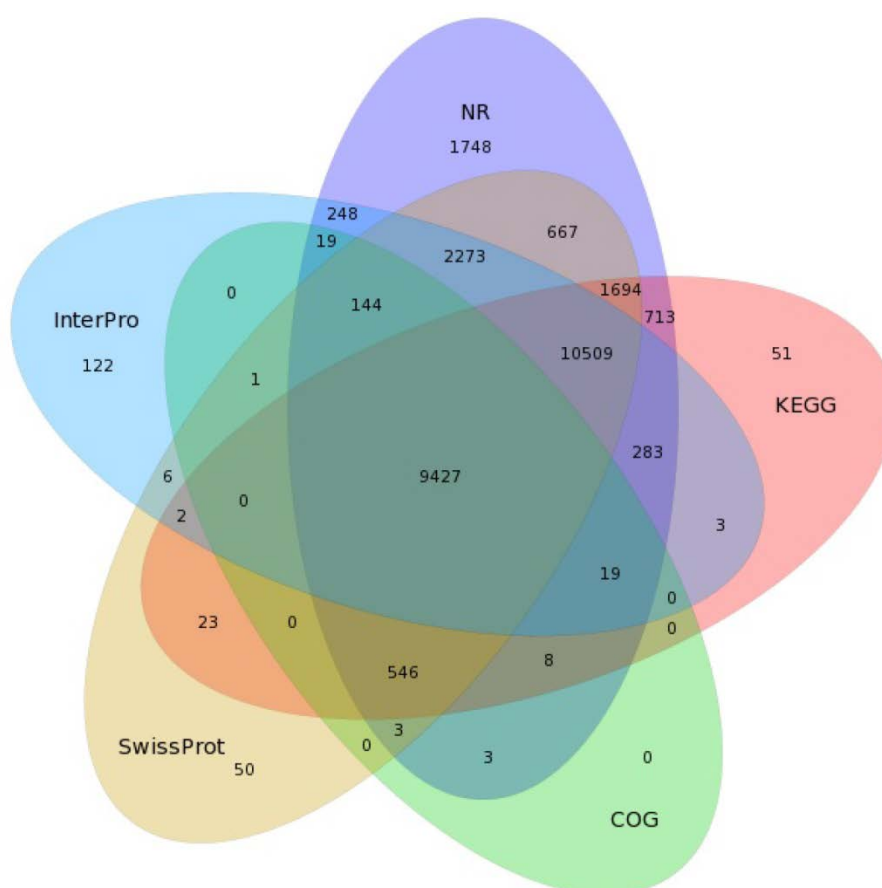
รูปที่ 5.1 แสดงจำนวน unigene ในแต่ละช่วงความยาว

เมื่อนำ unigene ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับ 7 ฐานข้อมูล เพื่อระบุชื่อและหน้าที่ในเซลล์ ประกอบด้วย Nt (NCBI nucleotide sequences), NR (NCBI non-redundant protein sequences), GO (Gene Ontology), COG (Clusters of Orthologous Groups), KEGG Orthology Swissprot และ InterPro จากผลดังตารางที่ 5.2 พบว่า จากทั้งหมด 69,648 unigene ที่วิเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล Nr-Annotated ระบุได้มากที่สุดคือ 28,304 unigene โดยคิดเป็น 40.64% และฐานข้อมูล COG Annotated ระบุได้น้อยที่สุดคือ 10,170 unigene โดยคิดเป็น 14.6% และ unigene ที่ระบุได้ร่วมกันในแต่ละฐานข้อมูล ได้แสดงในรูป Venn diagram ดังแสดงในรูปที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 แสดงจำนวน unigene หลังจากจัดจำแนกตามหน้าที่ในแต่ละฐานข้อมูลแล้ว

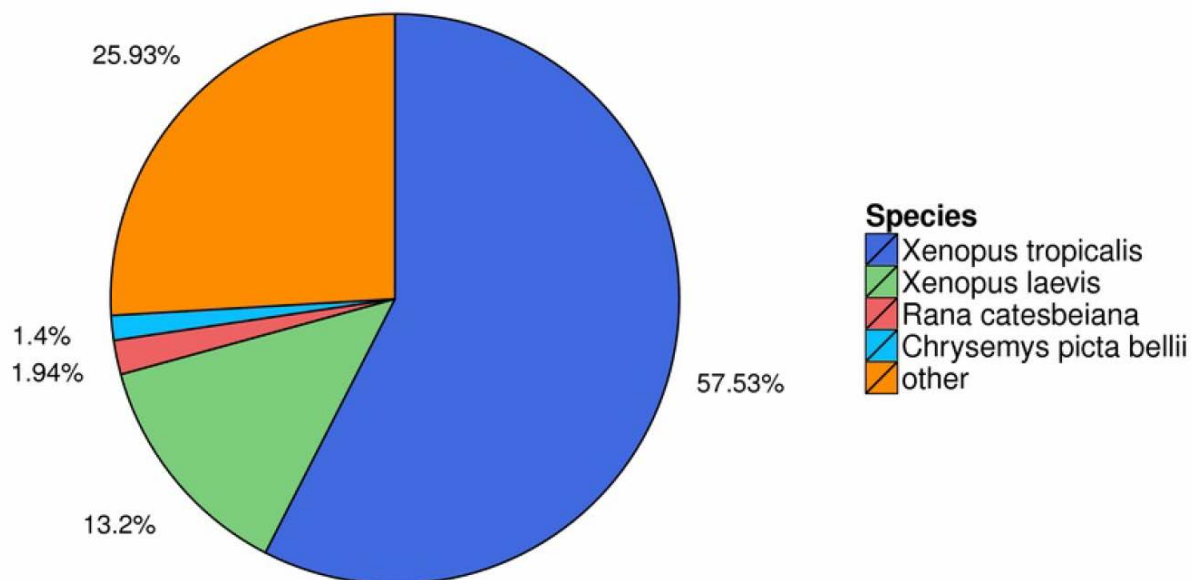
Values	Total	Nr- Annotated	Nt- Annotated	Swissprot- Annotated	KEGG- Annotated	COG- Annotated	Interpro- Annotated	GO- Annotated	Overall
Number	69,648	28,304	26,375	25,345	23,278	10,170	23,056	11,602	33,383
Percentage	100%	40.64%	37.87%	36.39%	33.42%	14.60%	33.10%	16.66%	47.93%

เมื่อใช้ฐานข้อมูล Nr-Annotated แสดงการกระจายตัวของจำนวน unigene ของกบนา พบว่า unigene ของกบนามีความคล้ายกับ *Xenopus tropicalis* มากที่สุด คือ 57.53% รองลงมาคือ *Xenopus laevis* 13.2% และ *Rana catesbeiana* 1.94% ตามลำดับ เหตุที่ *Xenopus tropicalis* สามารถระบุได้มากที่สุดเพราะมีฐานข้อมูลของยีนและการศึกษาใน *Xenopus tropicalis* มาก (รูปที่ 5.3) นอกจากนี้ยังใช้ฐานข้อมูลอื่น คือ COG Gene Ontology และ KEGG เพื่อระบุ unigene จากนั้นแจกแจงจำนวนของ unigene ในแต่ละหน้าที่ของการทำงานในเซลล์ตามหลักเกณฑ์การแบ่งของแต่ละฐานข้อมูล ซึ่งสามารถแบ่งหน้าที่ unigene โดยอาศัยฐานข้อมูล COG ได้ดังแสดงในรูปที่ 5.4 และแบ่งหน้าที่ unigene โดยอาศัยฐานข้อมูล Gene Ontology ได้ดังแสดงในรูปที่ 5.5 สำหรับการแบ่งหน้าที่ unigene โดยอาศัยฐานข้อมูล KEGG แสดงดังรูปที่ 5.6

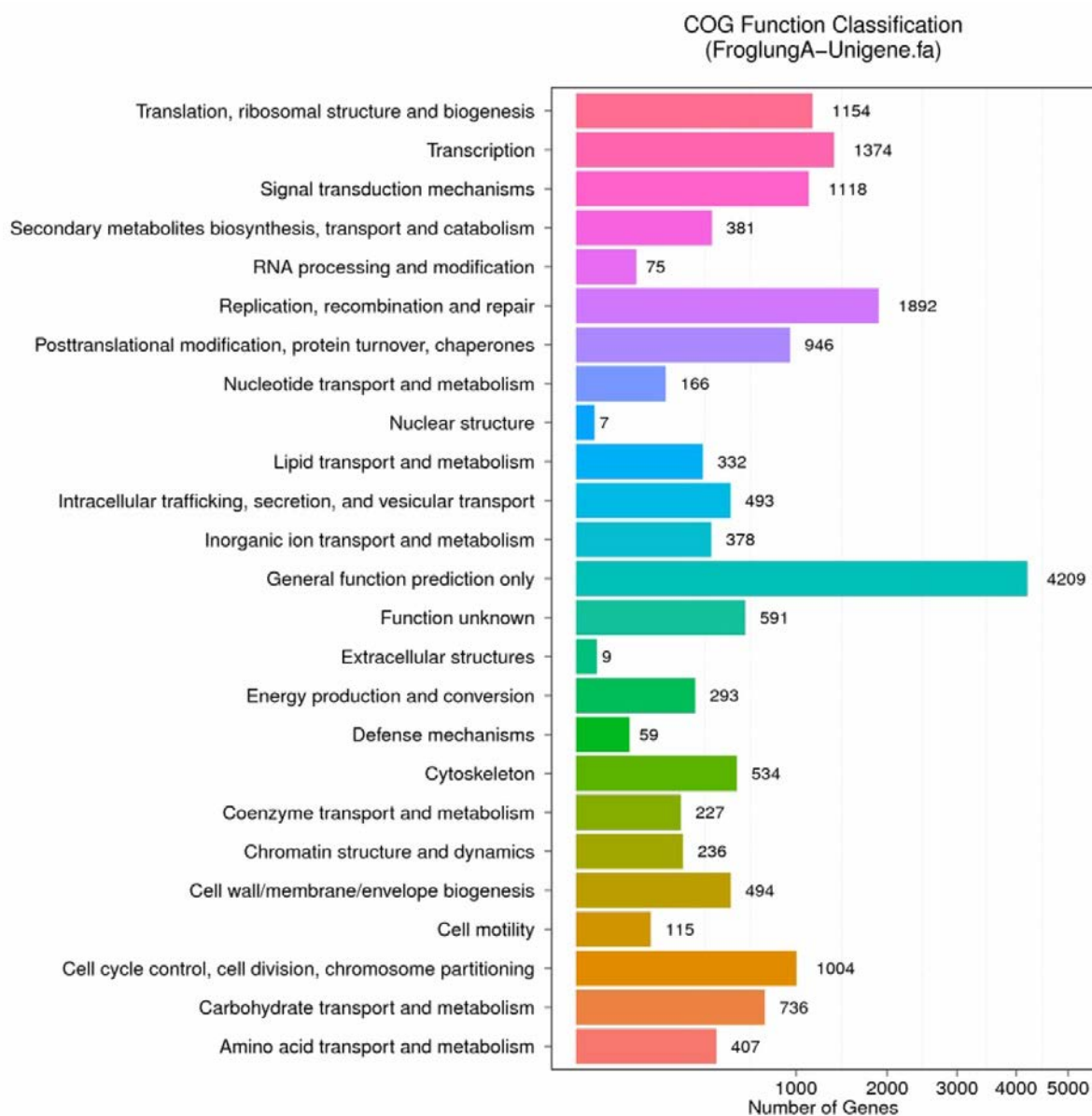


รูปที่ 5.2 Venn diagram แสดงจำนวน unigene ที่ระบุด้วยแต่ละฐานข้อมูล NR, COG, KEGG, Swissprot และ Interpro

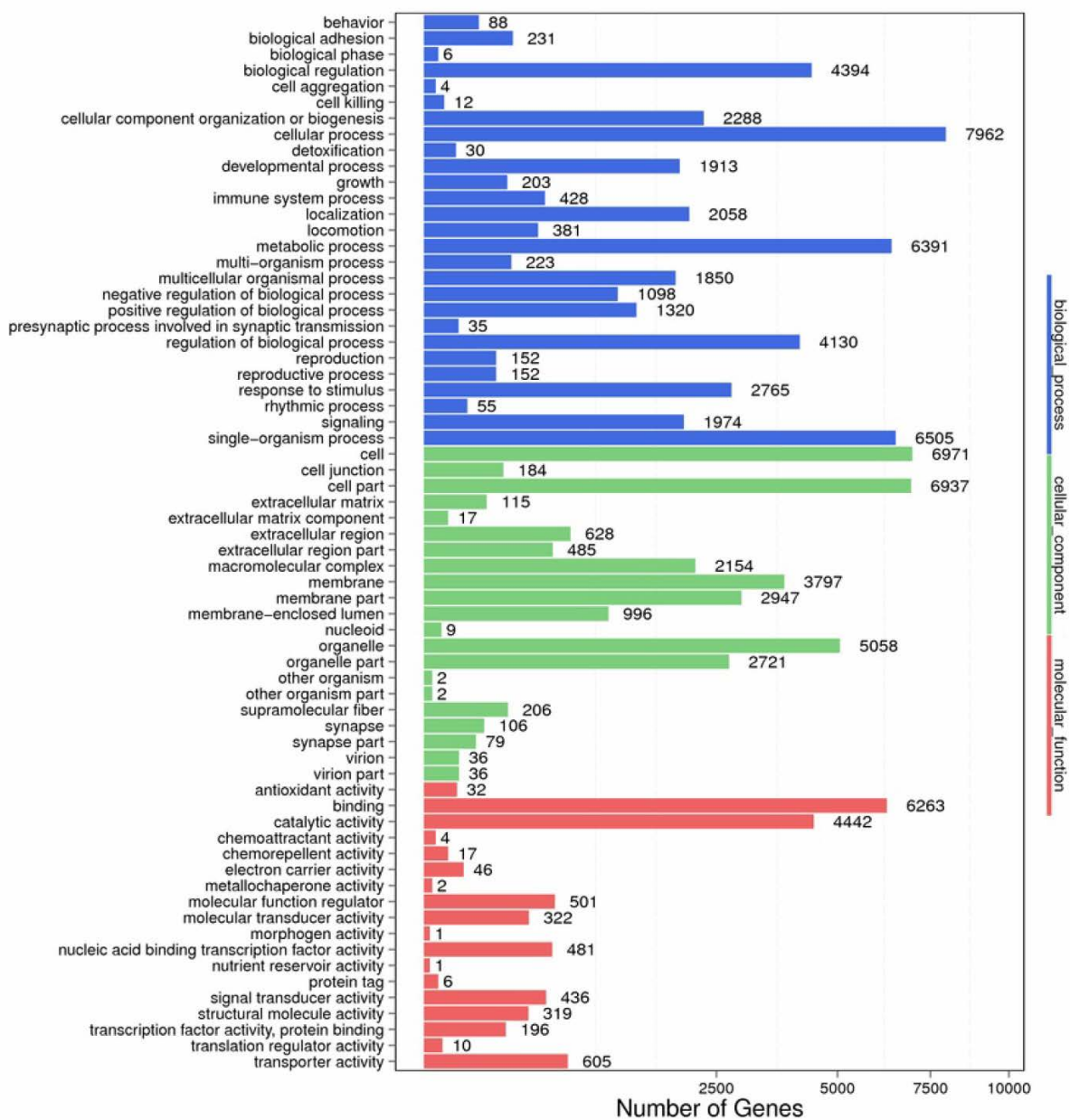
Species Distribution



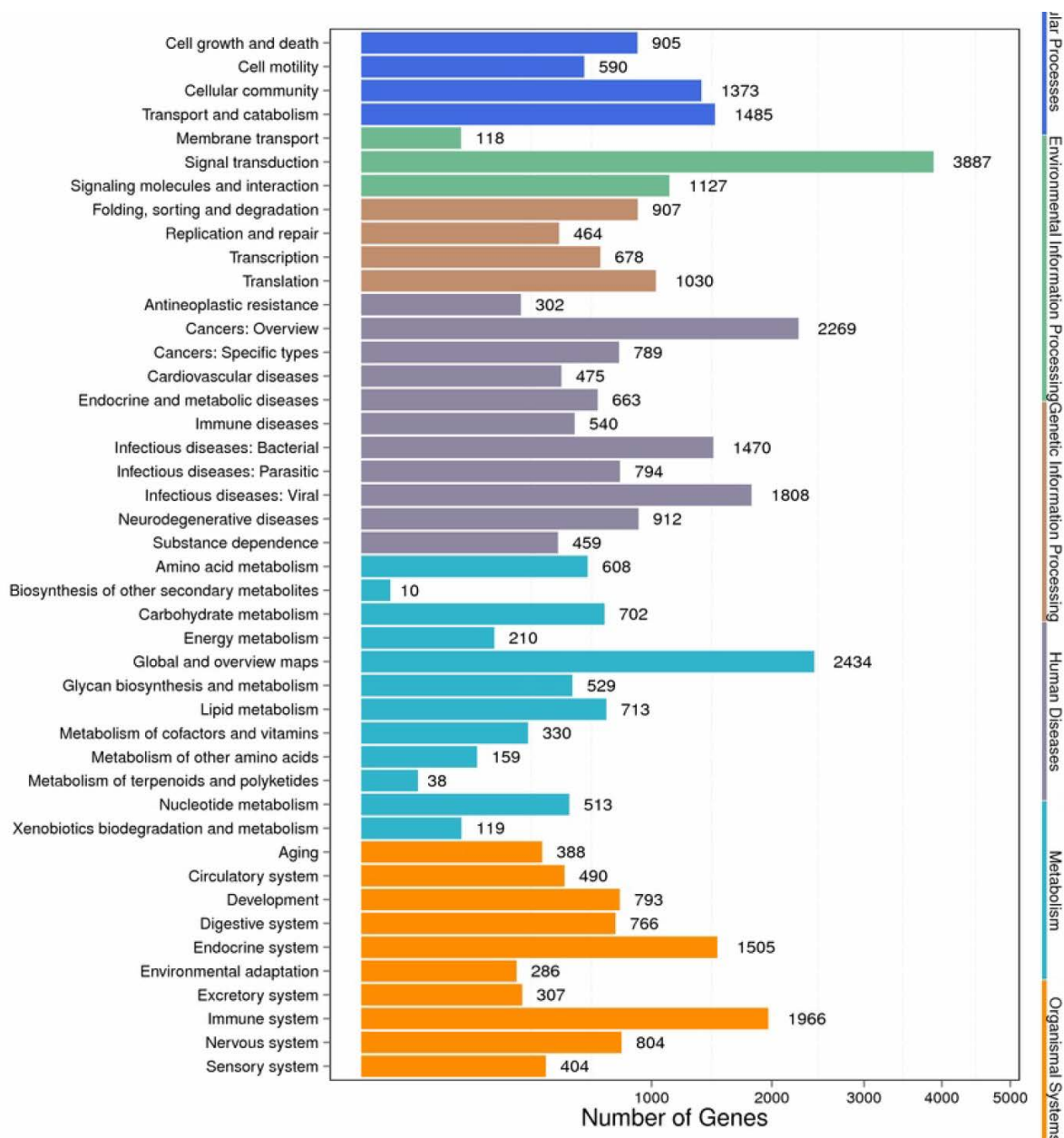
รูปที่ 5.3 แสดงร้อยละของฐานข้อมูลในแต่ละสิ่งมีชีวิตที่นำมาอ้างอิงในการระบุ Unigene



รูปที่ 5.4 การจำแนก unigene ที่ระบุได้ ตามหน้าที่โดยอาศัยฐานข้อมูล COG



รูปที่ 5.5 การจำแนก unigene ที่ระบุได้ด้วย ฐานข้อมูล Gene Ontology ตามหน้าที่



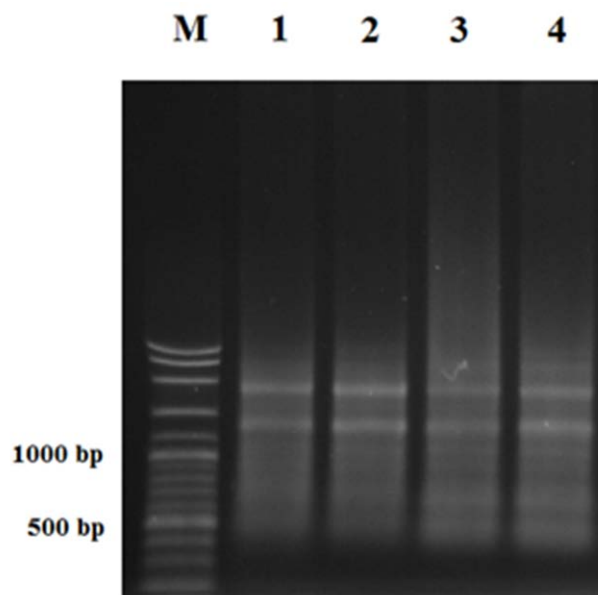
รูปที่ 5.6 การจำแนก unigene ที่ระบุได้ด้วย ฐานข้อมูล KEGG ตามหน้าที่

5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนคาเธิซินในกบนา

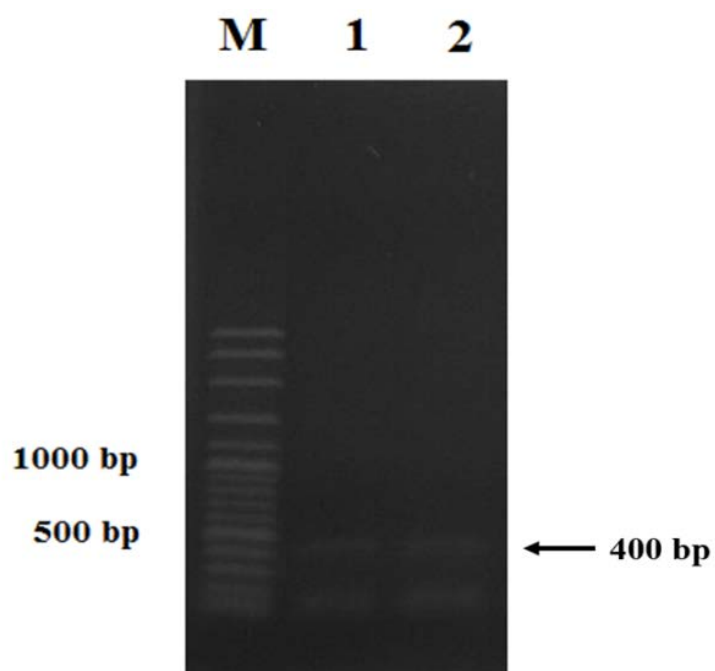
5.2.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเธิซินของกบนา

ทำการเก็บปอดและตับจากกบนาแล้วสกัด total RNA เมื่อตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่ได้จากการสกัดด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis พบว่า total RNA ที่ได้ทั้งจากปอดและตับของกบนามีคุณภาพอยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนถัดไปได้ (รูปที่ 5.7) จากนั้นนำ total RNA ของปอดและตับของกบนาไปใช้สำหรับการสังเคราะห์ cDNA เพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีนคาเธิซินด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ conserve ของยีนคาเธิซินของ *R. catesbiana* (rcCATH-f) ร่วมกับ Oligod(T) primer เมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis พบแถบ PCR product ขนาด 400 bp (รูปที่ 5.8) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับยีนคาเธิซิน

จากกบอื่นๆ จากผลการทดลองแสดงได้ชัดเจนว่ามีการแสดงออกของยีนคาเทลิซิตินทั้งในปอดและตับของกบนา

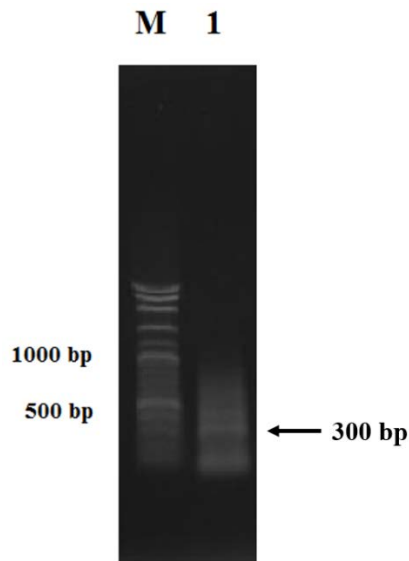


รูปที่ 5.7 ผลของการสกัด total RNA จากปอด (1 และ 2) และตับ (3 และ 4) ของกบนา

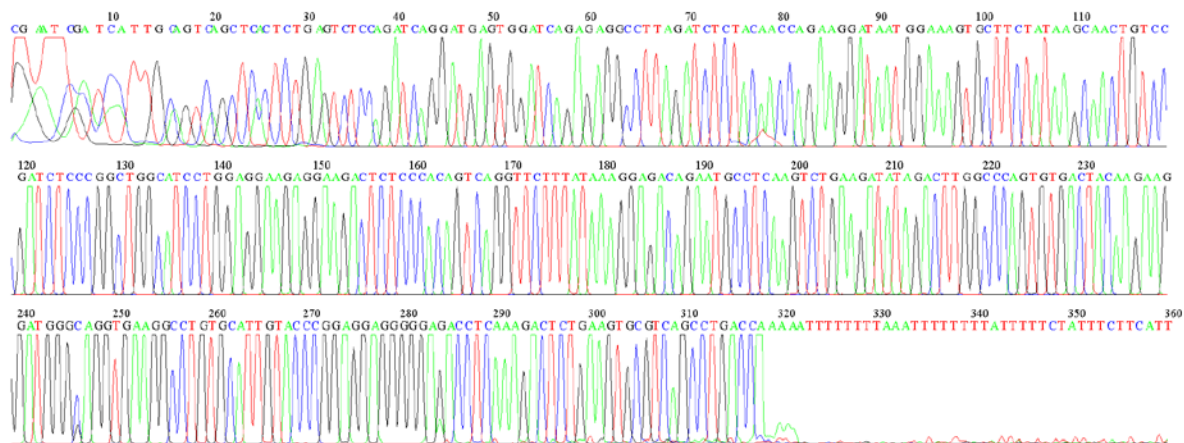


รูปที่ 5.8 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนคาเทลิซิตินในปอด (1) และตับ (2) ของกบนาด้วย rcCATH-f primer และ Oligod(T) primer

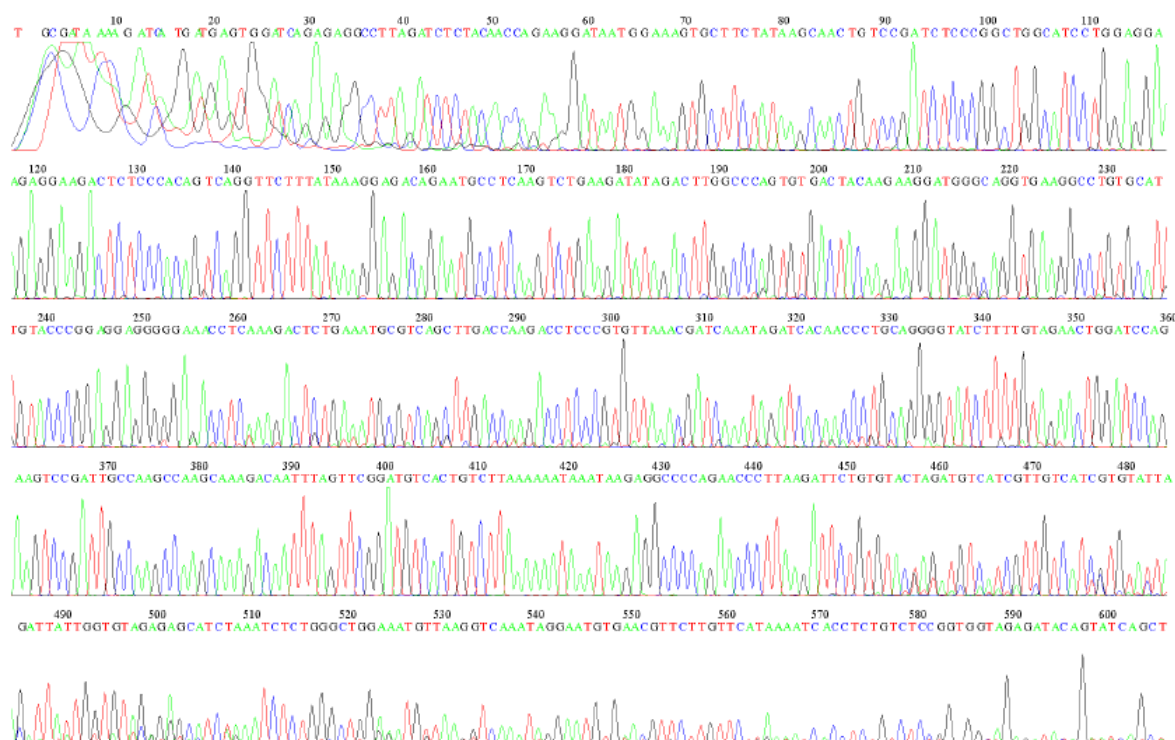
เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนของลำดับนิวคลีโอไทด์จึงทำการเลือกเฉพาะตัวอย่าง cDNA จากปอดของกบนาเท่านั้นมาใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเทลิซิน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ conserve ของยีนคาเทลิซินของ *R. catesbiena* rcCATH-f และ rcCATH-r primer โดยจากผล agarose gel electrophoresis พบแถบ PCR product ขนาด 300 bp ซึ่งตรงกับขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้จากการจับของไพรเมอร์ทั้งสอง จึงทำการตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 5.9) ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอดังกล่าวแสดงผลดังรูปที่ 5.10 และ 5.11 ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของคาเทลิซินที่มีรายงานในฐานข้อมูล



รูปที่ 5.9 ผลการทำ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ conserve domain ของยีนคาเทลิซินจาก *R. catesbiena* (rcCATH-f primer และ rcCATH-r primer)



รูปที่ 5.10 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp จากการทำ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ rcCATH-f primer



รูปที่ 5.13 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนคาเทลิซินของกบนาด้วยไพรเมอร์ frogCATH34-f primer

1 M K I W Q C V F I F A I T L Q S A H S
1 ATGAAGACTCTGGCAGTGTGTGTTCTGGATTTCGCAATCATTGCGAGTCAGCTCACTCT
21 E S P D Q D E W I R E A L D L Y N Q K D
61 GAGTCTCCAGATCAGGATGAGTGGATCAGAGAGGCCCTTAGATCTCTACAACCAGAAGGAT
41 N G K C F Y K Q L S D L P A G I L E E E
121 AATGGAAAGTGCTTCTATAAGCAACTGTCCGATCTCCCGGCTGGCATCTCTGGAGGAAGAG
61 E D S P T V R F F I K E T E C L K S E D
181 GAAGACTCTCCACAGTCAGGTTCTTTATAAAGGAGACAGAATGCCTCAAGTCTGAAGAT
81 I D L A Q C D Y K K D G Q V K A C A L Y
241 ATAGACTTGGCCCAGTGTGACTACAAGAAGGATGGGCAGGTGAAGGCCTGTGCATTGTAC
101 P E E G E T S K T L K C V S L T K T S R
301 CCGGAGGAGGGGGAGACCTCAAAGACTCTGAAATGCGTCAGCTTGACCAAGACCTCCCGT
121 V K R S N R S Q P C R G I F C R T G S R
361 GTTAAACGATCAAATAGATCACAACCCTGCAGGGGTATCTTTTGTAGAAGTGGATCCAGA
141 S P I A K P S K D N L V R M S L S *
421 AGTCCGATTGCCAAGCCAAGCAAAGACAATTTAGTTCGGATGTCACTGTCTTAAAAAATA
481 AATAAGAGGCCCCAGAACCCTTAAGATTCTGTGTACTAGATGTCATCGTTGTCATCGTGT
541 ATTAGATTATTGGTGTAGAGAGCATCTAAATCTCTGGGCTGGAAATGTTAAGGTCAAATA
601 GGAATGTGAACGTTCTTGTTTCATAAAATCACCTCTGTCTCCGGTGGTAGAGATACAGTA
661 CAGCTTGTACTTAATCTATATTTGTACCGAAATTAATATATACTATGGCTAAGAAATATG
721 TTAAATGAAATGATTATGGATAAAATTAATTAATAATATATTTCAATCTTTTTATATTT
781 TATTTA

รูปที่ 5.14 ผลการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนคาเธลิซินเป็นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์คาเธลิซินของกบนา (แถบสีเทา) signal peptide (ขีดเส้นใต้) และ stop codon (ตัวอักษรสีแดง)

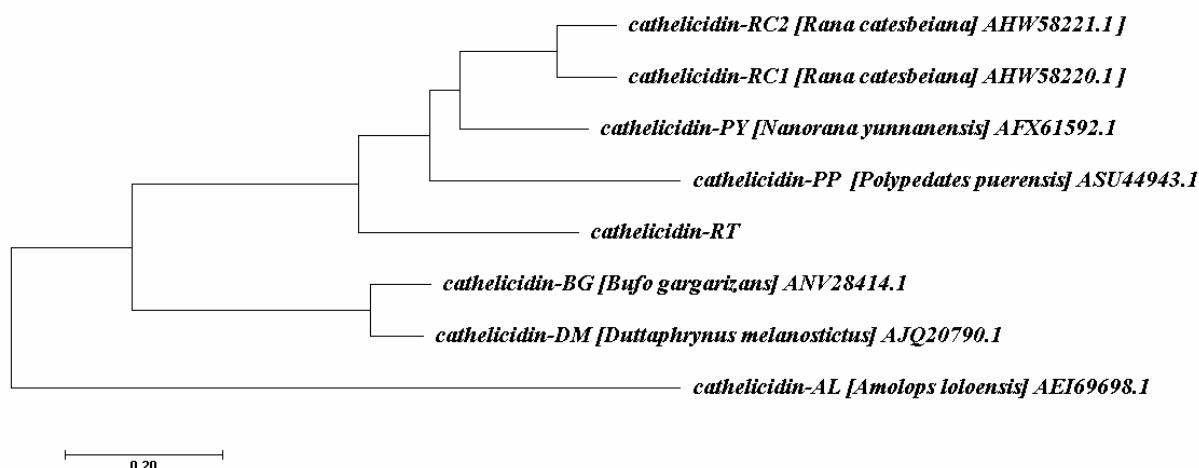
5.2.2 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์คาเทลิซินของกบนา

จากภาพการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาเทลิซินสามารถ encode ให้ลำดับกรดอะมิโน 157 หน่วย เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปวิเคราะห์ด้วย ExPASy คาเทลิซินของกบนามีขนาด 17.97 kDa และมีค่า pI เท่ากับ 6.59 ผลการวิเคราะห์ด้วย SignalP 4.0 Server แสดงส่วนของ signal peptide บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 1 ถึง 20 (รูปที่ 5.14) และส่วนของเปปไทด์คาเทลิซินทางด้าน C-terminal ความยาว 29 หน่วย (Theoretical pI/Mw: 10.86/3177.75 Da)

จากผลการทำ alignment พบว่าคาเทลิซินของกบนา (cathelcidin-RT) มีความเหมือนกับ cathelcidin-PY1 precursor (*Nanorana yunnanensis*) 62% มีความเหมือนกับ cathelcidin-RC2 preproprotein ของ *R. catesbeiana* 54% มีความเหมือนกับ cathelcidin-BG (*Bufo gargarizans*) และ cathelcidin-DM (*Duttaphrynus melanostictus*) 41% และ 39% ตามลำดับ (รูปที่ 5.15) จะเห็นได้ว่าทางด้าน N-terminal cathelin domain จะมีลักษณะ conserve อย่างมาก โดยเฉพาะลำดับกรดอะมิโนที่มาจากสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ด้าน C-terminal cathelcidin domain แสดงให้เห็นถึงความผันแปรของลำดับกรดอะมิโน จากผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของคาเทลิซินสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (รูปที่ 5.16) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 cluster โดย cluster I ประกอบด้วย cathelcidin-RC1 cathelcidin-RC2 cathelcidin-PY cathelcidin-PP (*Polypedates puerensis*) และ cathelcidin-RT cluster II ประกอบด้วย cathelcidin-BG และ cathelcidin-DM และ cluster III ซึ่งเป็นคาเทลิซินที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากคาเทลิซินอื่นๆ คือ cathelcidin-AL (*Amolops loloensis*)

cathelcidin-BG	MRSWWSLLLVSAVTLHGCLSDTAEPEVQDGRSIGDVLDLYNQREGVITYLYKSLDQLPPV
cathelcidin-DM	MRSWRLSLLLVSAVTLHGCLSDPAEPEVQDGRSIEDVIDLYNQREGVITYLYKSLDQLPPV
cathelcidin-RT	MKIWQC-VFWIFAITLQSAHSESPD----QDEWIREALDLYNQKDNKGCFYKQLSCLPAG
NP-CATH1	MKVWQC-ALWISALTQLQAARSQSPD----REEWIKREALDLYNQREDGEFFFKFLSCLPAA
cathelcidin-PY1	MKVWQC-VLWISALTQLQAARSQSPD----QDGWIREALDLYNQREDGEFFFKFLSCLPDV
NP-CATH2	MKVWQC-ALWISALTQLQAARSQSPD----REEWIREALDLYNQREDGEFFFKFLSCLPAA
NP-CATH3	MKVWQC-ALWISALTQLQAARSQSPD----REEWIKREALDLYNQREDGEFFFKFLSCLPAA
cathelcidin-RC2	MKIWQC-VVWLCAITLVAHSQSPD----REGWITEALDLYNQREDGEFFFKLLSELPPAP
cathelcidin-RC1	MKIWQC-VVWLCAITLVAHSQSPD----REGWIREALDLYNQREDGEFFFKLLSELPGP
	*: * . : * : * . . * : : * : : * * * * : . : * * : * *
cathelcidin-BG	PMEEDENPNRRGFIIKETVCLKSENPDLTQCDFKPDGDVVKICSLDLGDE-DPEDIMCTSL
cathelcidin-DM	PMEEDENPNRRGFIMKETVCLKSENPDLTQCDFKPDGDVVKICSLDLGDE-DPEDIMCFSL
cathelcidin-RT	ILEEEEDSPTVRFIIKETVCLKSEDIDLAQCDYKKGQVKAALYPEEGETSKTLKCVSL
NP-CATH1	PLEEE-NNPTIAFLIKETVCLKSEDINLEECDYKKGGEVVKVGLYPAGEETMKTLCVGL
cathelcidin-PY1	LLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKCDYRKDGGEVVKVCTLYREEE----DVKCVSL
NP-CATH2	PLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKRDYRKDGGEVVKVCTLYREEE----DVKCVSL
NP-CATH3	PLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKRDYRKDGGEVVKVCTLYREEE----DVKCVSL
cathelcidin-RC2	LLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEENDLEGCDYSKDGGEVVKVCTLYHREDE----DVKCVSL
cathelcidin-RC1	LLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEIDLERCDYSKDGGEVVKVCTLYHQEEQ----DVKCVSL
	: * : : : * : * * * * : * : * : * : * * * * : : * : *
cathelcidin-BG	NKEVRVKR SNRRRRCGRSCSPWL RGAYTL----IGRPAKNQNRPKYMWV----
cathelcidin-DM	NKEVRMKRSSRRKPCCKGWLCKLKLGGYTL----IGSA-TNLNRPTVYRA----
cathelcidin-RT	TKTSRVKRSNRQ PCRGIFC RTGS-----RSPIAKP----SKDNLVVRMSLS-
NP-CATH1	TKANGKAESAVKI-VK-NVCKKAQ---SDGKDQ--WKAILQWRNTPTVGMDDSSC
cathelcidin-PY1	SKNSRTRRAGTKRKN-FLCKLKEKLRTVITS-HIDK-VLRPQG-----
NP-CATH2	SKDSRTRRSRGTGRNCN-FLCKVKQRLRSASSTSHIGMAIPRPRG-----
NP-CATH3	SKDSRTRRSRGTGRNCN-FLCKVKQRLRSASSTSHIGMAIPRPRG-----
cathelcidin-RC2	TAENSRSKRSSNKKCG-FFCKLKNKLKSTGSRSNIAAG--THGGTFFV-----
cathelcidin-RC1	TENSRSKRSSKKKKCK-FFCKVKKKIKSIGFQIPIVSI--PFK-----
	. . *

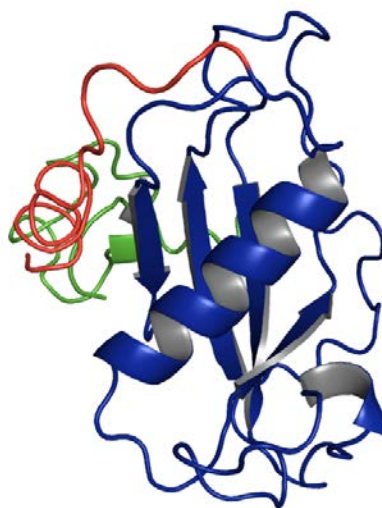
รูปที่ 5.15 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของคาเทลิซินของกบนา (cathelcidin-RT) กับคาเทลิซินของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่นๆ



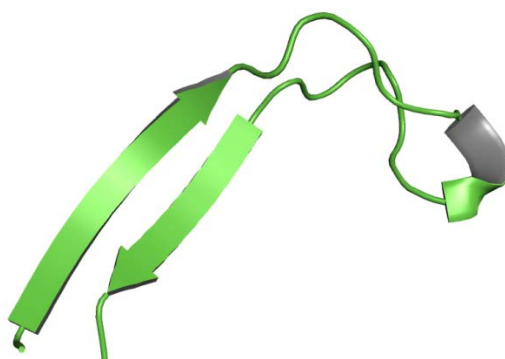
รูปที่ 5.16 ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซินของกบนา (cathelicidin-RT) กับคาเธลิซินของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่นๆ

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ cathelicidin-RT มาทำนายโครงสร้างตติยภูมิด้วยโปรแกรม I-TASSER server โครงสร้างสามมิติโดยทั่วไปมีลักษณะเหมือนกันคาเธลิซินอื่นๆ ที่มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติมาแล้ว โดยเฉพาะส่วน N-terminal cathelin domain ที่มีลักษณะ conserve แต่เนื่องจาก C-terminal cathelicidin domain ของแต่ละสปีชีส์นั้นมีความแตกต่างกัน ทำให้โครงสร้างของ cathelicidin-RT ประกอบ α -helix 1 สาย และ β -strand 4 สาย อีกทั้งพันธะไดซัลไฟด์ 2 พันธะ (รูปที่ 5.17)

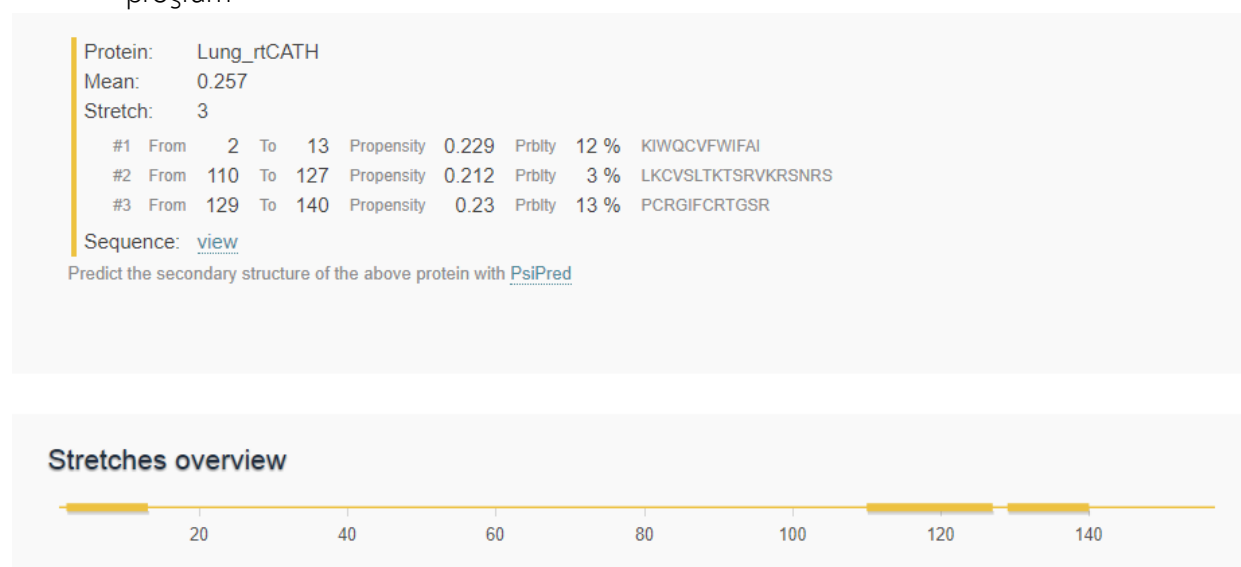
จากลำดับกรดอะมิโนของ cathelicidin-RT ซึ่งแสดงส่วนของเปปไทด์คาเธลิซิน 29 amino acid residue ทำให้ได้ mature peptide มีลำดับกรดอะมิโนคือ PCR29 ; NH₂-PCRGIFCARTGS RSPIAKPSKDNLVMSLS-COOH และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ PCR29 มาทำนายโครงสร้างตติยภูมิ ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD server (รูปที่ 5.18) จะเห็นได้ว่าเปปไทด์ PCR29 มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ β -loop- β motif อย่างไรก็ตามผลจากการนำลำดับกรดอะมิโนของ cathelicidin-RT มาวิเคราะห์บริเวณที่สามารถเป็น antimicrobial peptide ด้วย Antimicrobial Sequence Scanning System พบว่าลำดับกรดอะมิโนบริเวณ NH₂-PCRGIFCARTGSR-COOH (PCR12) และ NH₂-LTKTSRVKRSNR-COOH (LT12) มีลักษณะของ bactericidal stretches ด้วย 13% และ 3% probability ตามลำดับ (รูปที่ 5.19) โดยที่ PCR12 แสดงโครงสร้างแบบ random coil structure ในขณะที่ LT12 แสดงลักษณะโครงสร้างแบบ α -helix (รูปที่ 5.20) อย่างไรก็ตามเปปไทด์ที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ α -helix นั้นมีแนวโน้มในการเป็นโครงสร้างตติยภูมิของ antimicrobial peptide ดังนั้นจึงได้ทำการสังเคราะห์เปปไทด์ทั้งสามเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป



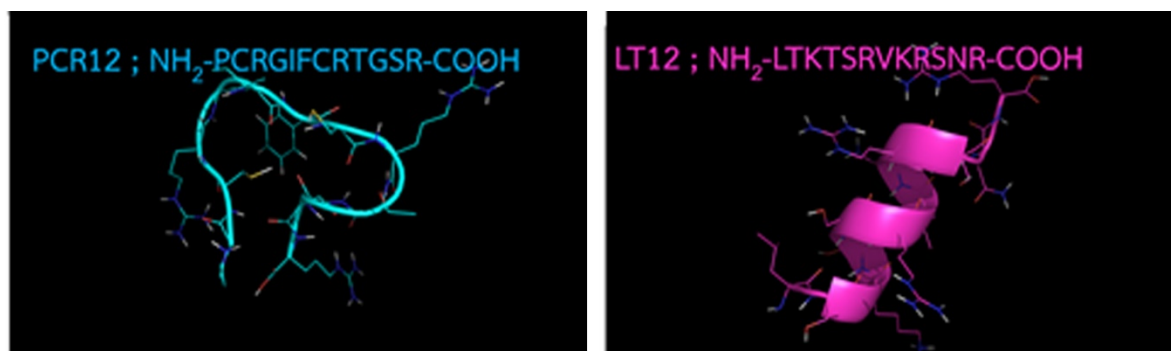
รูปที่ 5.17 ผลการทำนายโครงสร้างสามมิติคาเธลิซินของกบนา (cathelicidin-RT) ด้วย I-TASSER program
signal peptide (สีแดง) cathelin domain (สีน้ำเงิน) cathelicidin (สีเขียว)



รูปที่ 5.18 ผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์คาเธลิซินของกบนา (PCR29) ด้วย PEP-FOLD program



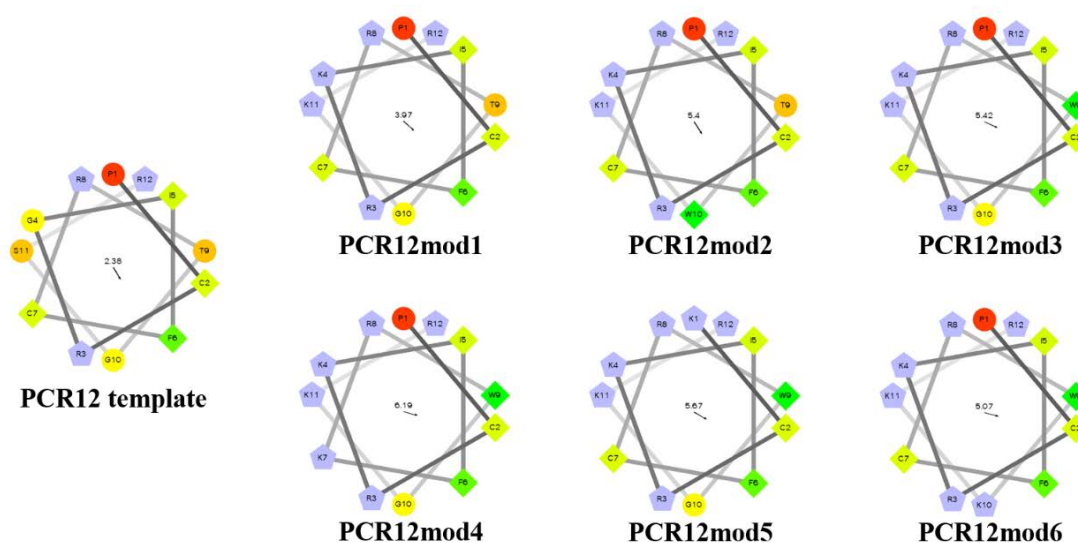
รูปที่ 5.19 ผลการวิเคราะห์บริเวณของลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซินของกบนา (cathelicidin-RT) ที่คาดว่าจะ
จะเป็น Antimicrobial peptide



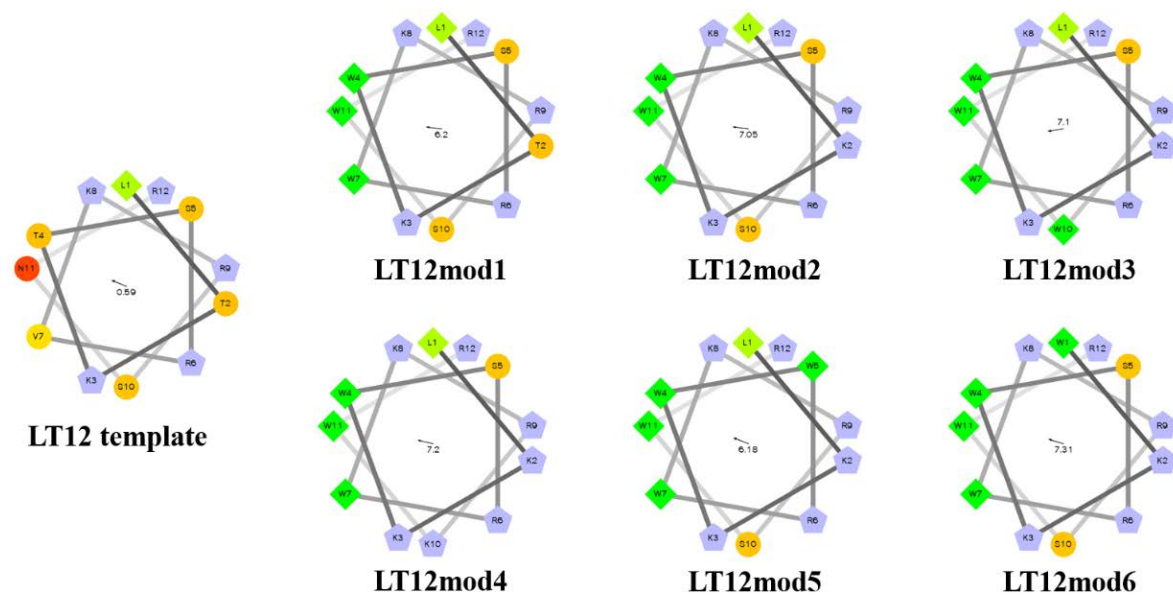
รูปที่ 5.20 ผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์คาเธลิซินของกบนา (PCR12 และ LT12) ด้วย PEP-FOLD program

5.2.3 การออกแบบเปปไทด์ให้มีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ที่ดีขึ้นโดยใช้เปปไทด์คาเธลิซินจากกบนาเป็นแม่แบบ

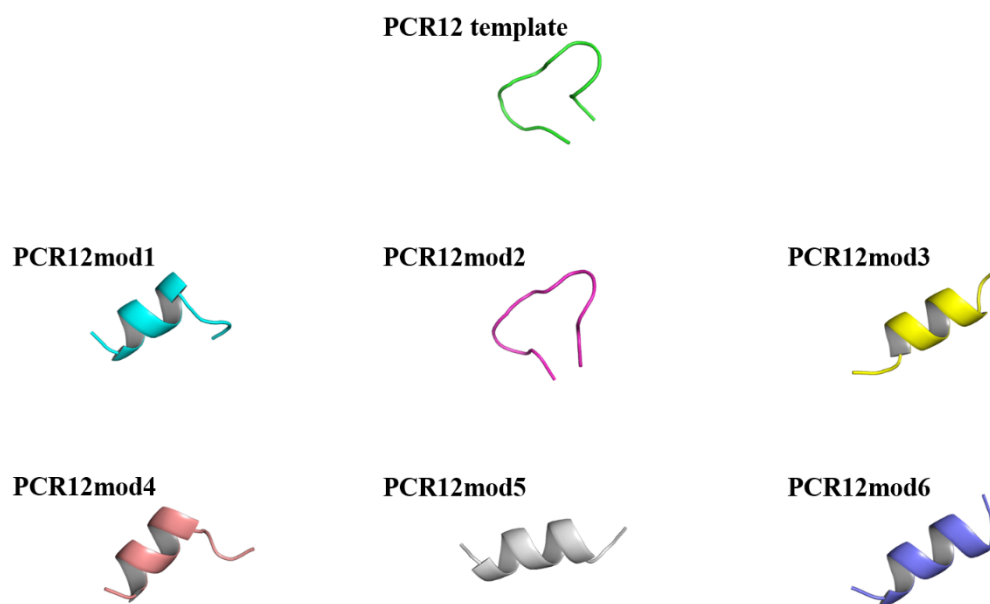
ลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์ PCR12 และ LT12 ถูกใช้เป็นเปปไทด์เส้นแม่แบบในการออกแบบเปปไทด์ให้มีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์สูงขึ้น การเปลี่ยนกรดอะมิโนบางชนิดในเส้นอาศัย Helical wheel diagram ของเปปไทด์ PCR12 (รูปที่ 5.21) และ LT12 (รูปที่ 5.22) เพื่อเลือกตำแหน่งที่น่าสนใจเพื่อทำการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากเปปไทด์ PCR12 มีประจุสุทธิที่ต่ำคือ 3 (ตารางที่ 5.3) จึงทำการออกแบบให้มีประจุสุทธิเพิ่มสูงขึ้น และเปปไทด์ LT12 มีเปอร์เซ็นต์ hydrophobicity ที่ต่ำ จึงทำการออกแบบให้มีเปอร์เซ็นต์ hydrophobicity เพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 5.3) อีกทั้งให้เปปไทด์มีโครงสร้างทุติยภูมิที่เหมาะสมยิ่งขึ้น (รูปที่ 5.23 และ 5.24) จากผลการออกแบบเปปไทด์ พบว่าการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียง 4 residue ของเปปไทด์ PCR12 สามารถทำให้ประจุสุทธิเพิ่มขึ้นเป็น 6 อีกทั้งมีโครงสร้างทุติยภูมิในรูปแบบของ α -helix structure ที่สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เลือกเปปไทด์ที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะมีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ที่ดีขึ้น โดยอาศัยค่า $\Delta G_{transfer}$ ที่ต่ำที่สุด และค่า SVMACP Prob ที่สูงที่สุดของเปปไทด์ที่ทำการออกแบบ ทำให้ได้เปปไทด์ PCR12mod6 และ LT12mod2 มาใช้ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับเปปไทด์ PCR12 และ LT12 เส้นแม่แบบ



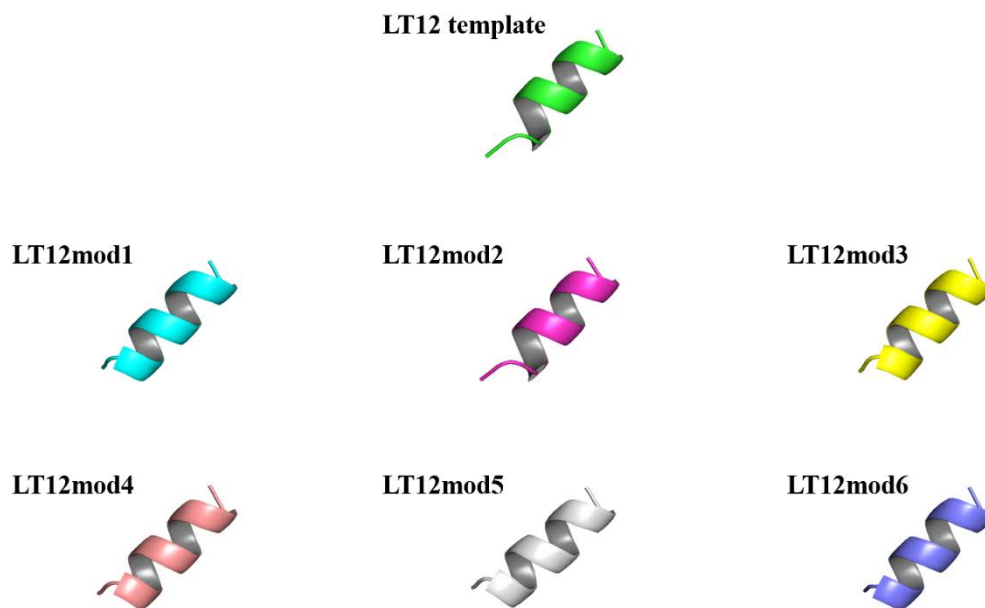
รูปที่ 5.21 Helical wheel diagram ของเปปไทด์ PCR12s



รูปที่ 5.22 Helical wheel diagram ของเปปไทด์ LT12s



รูปที่ 5.23 โครงสร้างทุติยภูมิ ของเปปไทด์ PCR12s



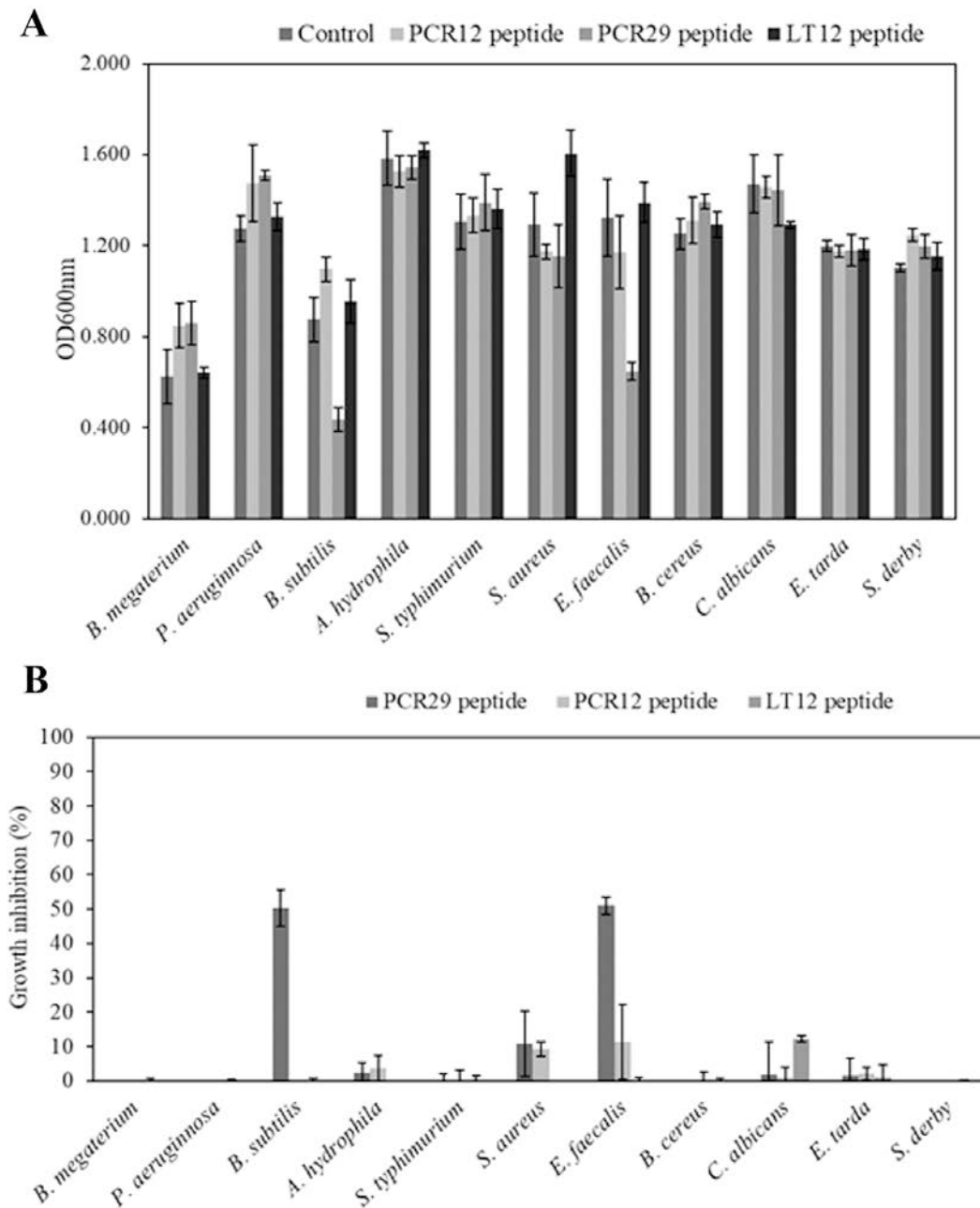
รูปที่ 5.24 โครงสร้างทุติยภูมิ ของเปปไทด์ LT12s

ตารางที่ 5.3 การออกแบบเปปไทด์ให้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีขึ้นโดยใช้เปปไทด์ PCR12 และ LT12 ของกบนาเป็นแม่แบบ

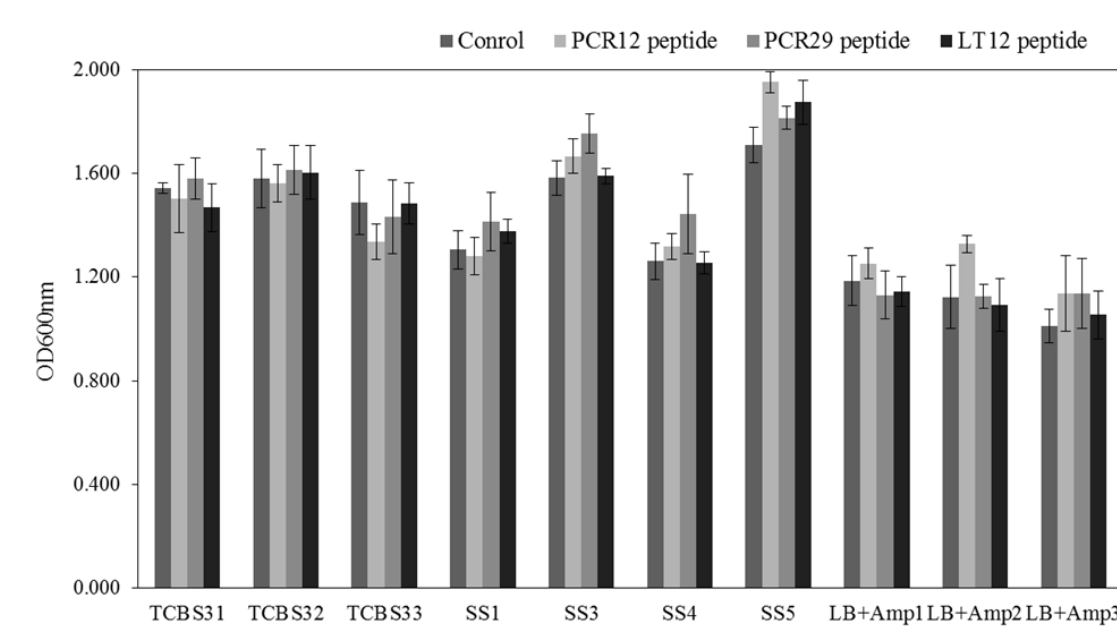
5.2.4 ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์คาเทลิซินของกบนา

Name	Peptide sequence	% hydrophobicity	Net charge	Depth (Å)	$\Delta G_{\text{transfer}}$ (kcal/mol)	SVMACP Prob
PCR12 template	PCRGIFCRTGSR	33%	+3	0.7 ± 1.5	-2.6	0.5394
PCR12mod1	PCRKIFCRTGKR	33%	+5	2.7 ± 0.5	-5.4	0.6528
PCR12mod2	PCRKIFCRTWKR	41%	+5	1.5 ± 0.4	-3.1	0.8172
PCR12mod3	PCRKIFCRWGKR	41%	+5	4.8 ± 1.2	-4.3	0.7860
PCR12mod4	PCRKIFKRWGKR	33%	+6	2.4 ± 0.4	-5.1	0.7857
PCR12mod5	KCRKIFCRWGKR	41%	+6	3.2 ± 1.3	-4.1	0.7231
PCR12mod6	PCRKIFCRWKKR	41%	+6	5.0 ± 0.2	-5.5	0.8489
LT12 template	LTKTSRVKRSNR	16%	+5	4.9 ± 2.0	-3.4	0.4003
LT12mod1	LTKWSRWKR SWR	33%	+5	3.1 ± 1.1	-4.4	0.8138
LT12mod2	LKKWSRWKR SWR	33%	+6	4.4 ± 0.3	-5.9	0.8198
LT12mod3	LKKWSRWKR WWR	41%	+6	2.0 ± 2.0	-2.6	0.7817
LT12mod4	LKKWSRWKR KWR	33%	+7	1.8 ± 1.6	-2.5	0.8007
LT12mod5	LKKWWRWKRSWR	41%	+6	3.3 ± 1.8	-3.4	0.7823
LT12mod6	WKKWSRWKR SWR	33%	+6	1.4 ± 2.0	-2.8	0.7546

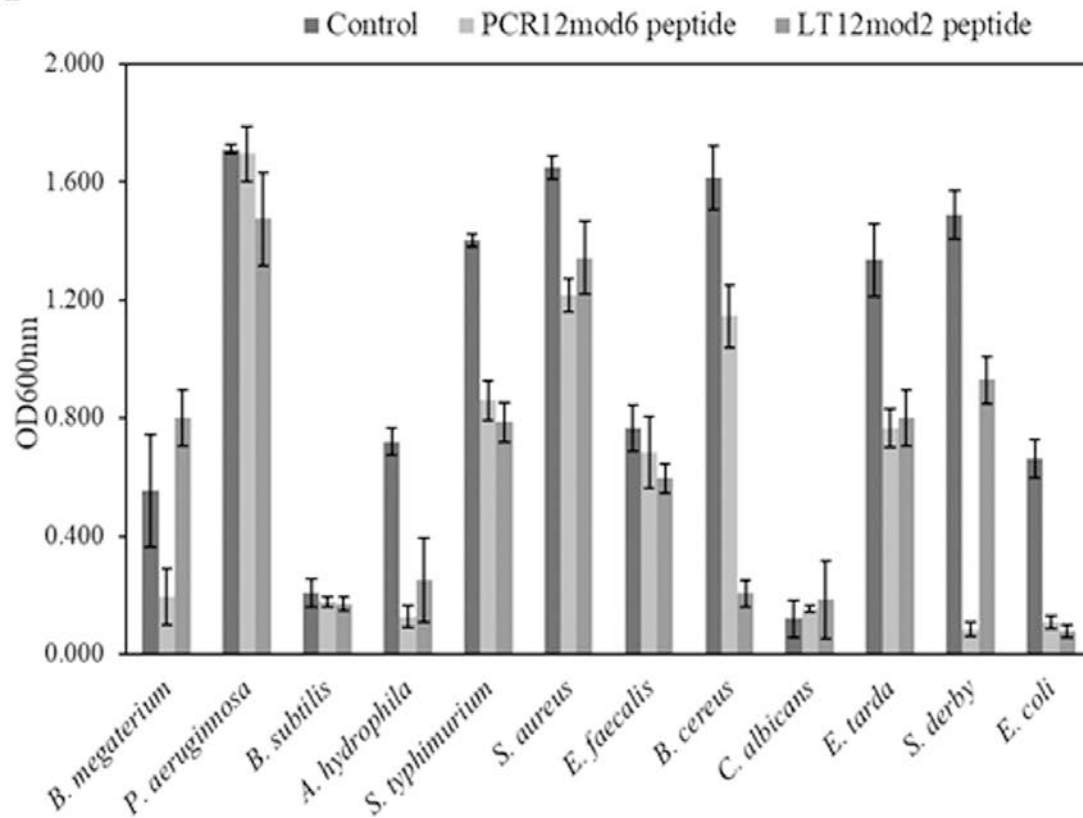
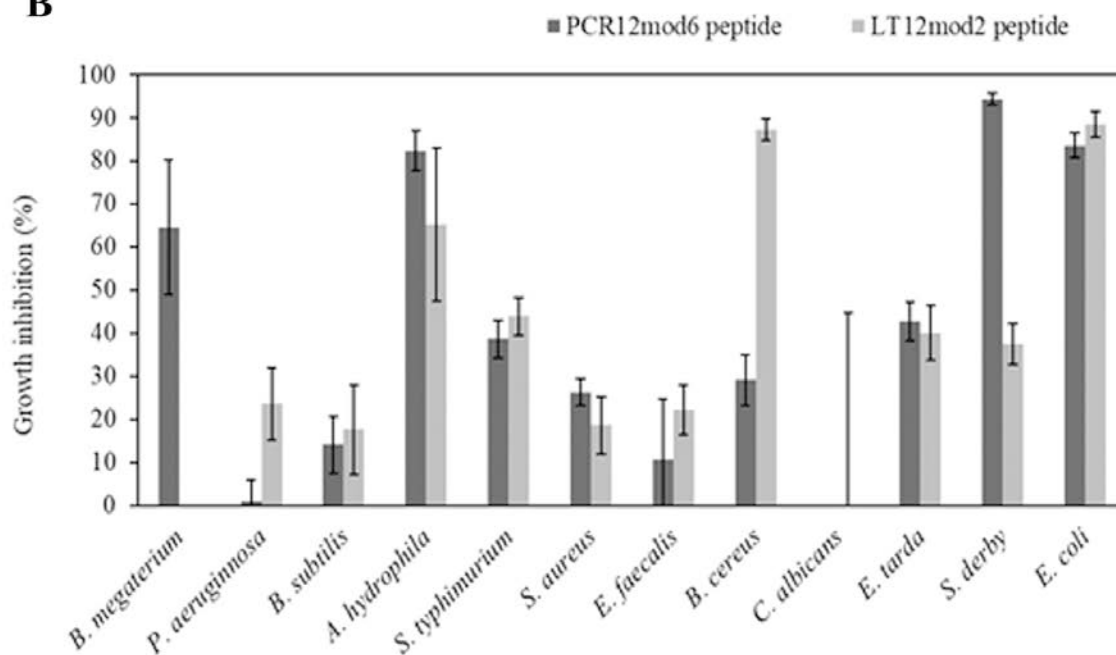
เปปไทด์ PCR29 PCR12 และ LT12 ที่ได้จากการสังเคราะห์ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธี broth dilution assay พบว่ามีเพียงเปปไทด์ PCR29 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR124 และ *E. faecalis* TISTR927 โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ถึง 50% เปปไทด์ PCR12 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR746 และ *E. faecalis* TISTR927 ได้เพียง 10% ในขณะที่เปปไทด์ LT12 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* TISTR5554 ได้เพียง 10% (รูปที่ 5.25) นอกจากนี้ เปปไทด์ PCR29 PCR12 และ LT12 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่แยกได้จากผิวกบนาได้ (รูปที่ 5.26) ส่วนเปปไทด์ที่ได้ทำการออกแบบ พบว่า PCR12mod6 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีต่อเชื้อ *B. megaterium* TISTR067 *E. coli* DH5 α และเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ เช่น *A. hydrophila* TISTR1321 และ *S. derby* DMST16881 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 60-90% (รูปที่ 5.27) ในขณะที่เปปไทด์ LT12mod2 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีต่อเชื้อ *B. cereus* TISTR1449 *E. coli* DH5 α และ *A. hydrophila* TISTR1321 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 60-90% (รูปที่ 5.27) อย่างไรก็ตามพบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการออกแบบมีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่าเปปไทด์เส้นแม่แบบ



รูปที่ 5.25 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์ PCR29 PCR12 และ LT12 แสดงผลการวัดค่า OD600nm (A) และค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (B)



รูปที่ 5.26 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวกบนของเปปไทด์ PCR29, PCR12 และ LT12

A**B**

รูปที่ 5.27 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์ PCR12mod6 และ LT12mod2 แสดงผลการวัดค่า OD600nm (A) และค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (B)

5.3 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีนของต่อมน้ำพิษต่อหัวเสือด้วยเทคนิคทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomic)

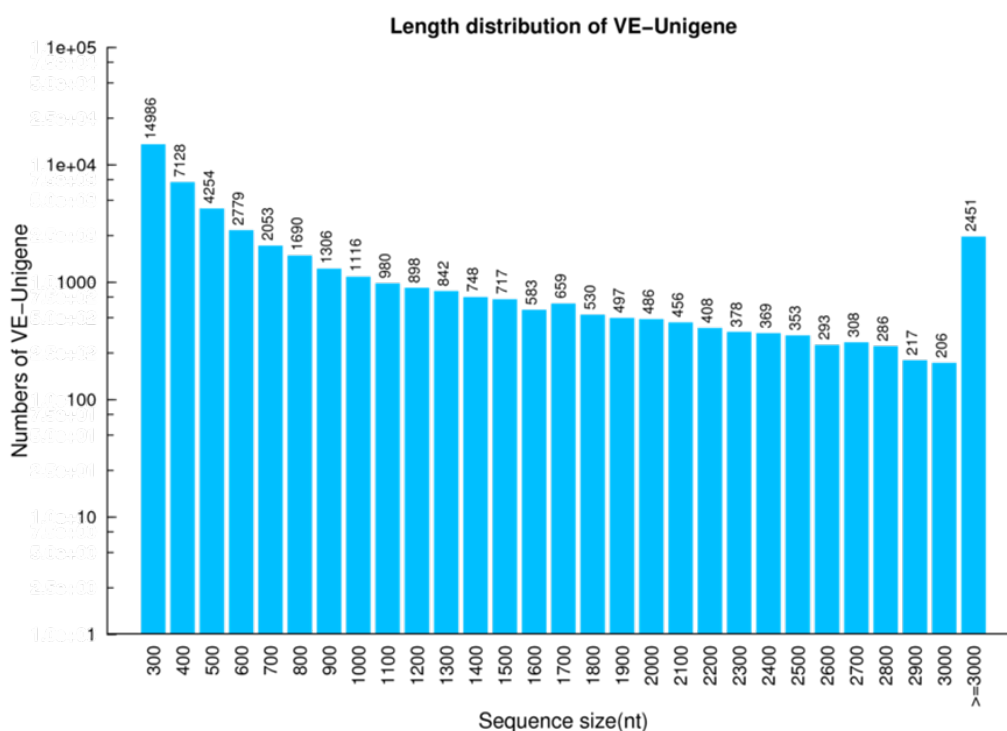
จากการศึกษาต่อมน้ำพิษต่อหัวเสือโดยการทำ RNA-sequencing สามารถวิเคราะห์จำนวน transcript ได้ทั้งหมด 70,690 และจำนวน unigene ได้ทั้งหมด 47,977 ดังตารางที่ 5.4 โดยมีความยาวรวมของ transcript และ unigene เท่ากับ 55,313,195 และ 42,874,455 เบส ตามลำดับ โดยมีความยาวเฉลี่ยของ transcript และ unigene เท่ากับ 782 และ 893 เบส ตามลำดับ แต่เมื่อจำแนกจำนวนของ unigene ในแต่ละความยาวของจำนวนนิวคลีโอไทด์ ระหว่างช่วง 300-3000 เบส และความยาวมากกว่า 3000 เบส พบว่า ในช่วง 300-399 เบสจะมีจำนวนมากที่สุด คือ 14,986 unigene จากนั้นจำนวน unigene 400-3000 เบส มีแนวโน้มลดหลั่นกันมาเรื่อยๆ แต่ความยาวของ unigene ที่มากกว่า 3000 เบส มีจำนวนทั้งหมด 2,451 unigene แสดงดังรูปที่ 5.28

ตารางที่ 5.4 แสดงจำนวน Transcript และ Unigene จากต่อมน้ำพิษต่อหัวเสือจากการทำ RNA-sequencing

Total Number	total Length	Mean Length	N50	N70	N90	GC (%)
70,690 ^a	55,313,195	782	1,525	732	282	35.9
47,977 ^b	42,874,455	893	1,703	870	323	36.22

^aข้อมูลรายละเอียดของ transcript

^bข้อมูลรายละเอียดของ unigene



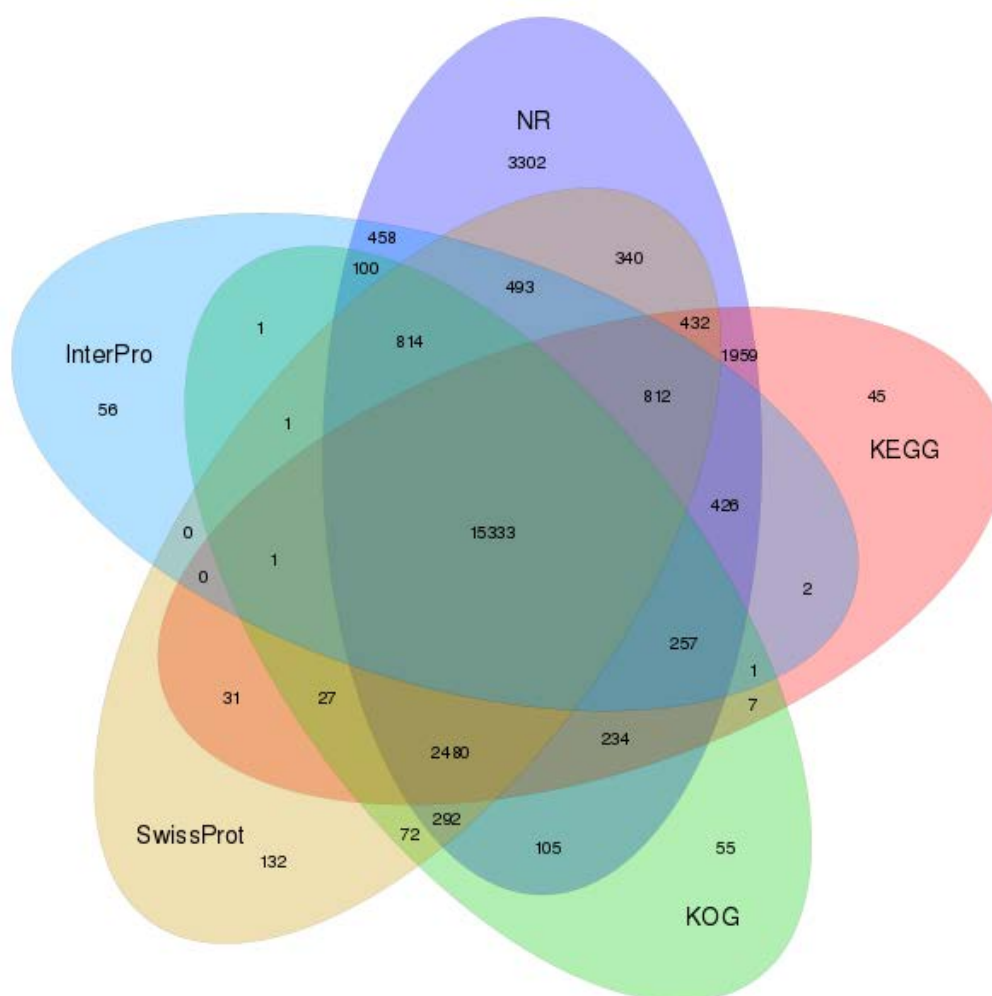
รูปที่ 5.28 แสดงจำนวน unigene ในแต่ละช่วงความยาว

เมื่อนำ unigene ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับ 7 ฐานข้อมูล เพื่อระบุชื่อและหน้าที่ในเซลล์ ประกอบด้วย Nt (NCBI nucleotide sequences), NR (NCBI non-redundant protein sequences), GO (Gene Ontology), COG (Clusters of Orthologous Groups), KEGG Orthology Swissprot และ InterPro จากผลดังตารางที่ 5.5 พบว่า จากทั้งหมด 47,977 unigene ที่วิเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล Nr-Annotated ระบุได้มากที่สุดคือ 27,837 unigene โดยคิดเป็น 58.02% และฐานข้อมูล GO Annotated ระบุได้น้อยที่สุดคือ 5,554 unigene โดยคิดเป็น 11.58% และ unigene ที่ระบุได้ร่วมกันในแต่ละฐานข้อมูล ได้แสดงในรูป Venn diagram ดังแสดงในรูปที่ 5.29

ตารางที่ 5.5 แสดงจำนวน unigene หลังจากจัดจำแนกตามหน้าที่ในแต่ละฐานข้อมูลแล้ว

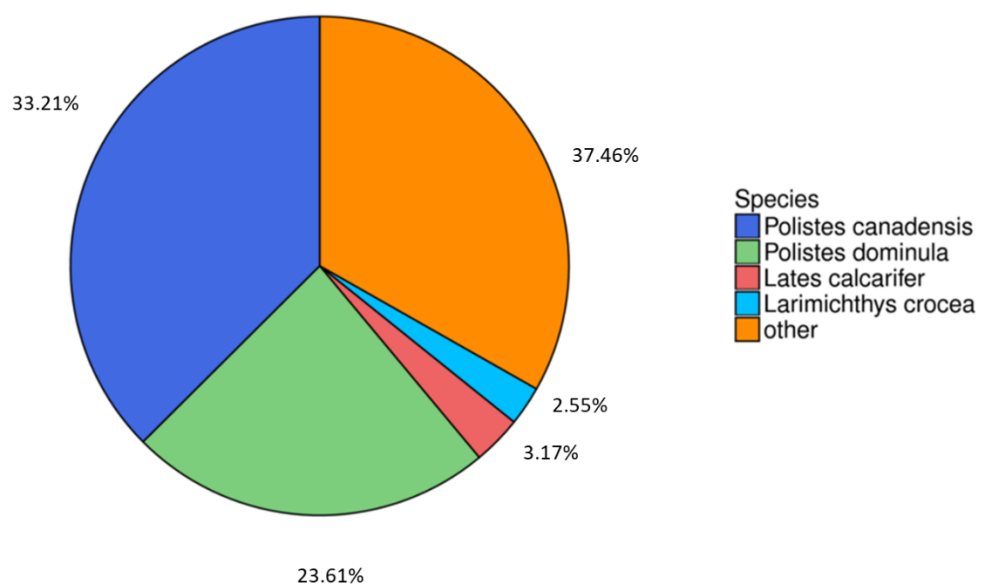
Values	Total	Nr- Annotated	Nt- Annotated	SwissProt- Annotated	KEGG- Annotated	COG- Annotated	InterPro- Annotated	GO- Annotated	Overall
Number	47,977	27,837	36,474	21,260	22,047	19,780	18,755	5,554	39,335
Percentage	100%	58.02%%	76.02%	44.31%	45.95%	41.23%	39.09%	11.58%	81.99%

เมื่อใช้ฐานข้อมูล Nr-Annotated แสดงการกระจายตัวของจำนวน unigene ของต่อหัวเสือ พบว่า unigene ของน้ำพิษต่อหัวเสือมีความคล้ายกับ *Polistes canadensis* มากที่สุด คือ 33.21% รองลงมาคือ *Polistes dominula* 23.61% และ *Lates calcarifer* 3.17% ตามลำดับ เหตุที่ *Polistes dominula* สามารถระบุได้มากที่สุดเพราะมีฐานข้อมูลของยีนและการศึกษายีน *Polistes dominula* มาก (รูปที่ 5.30) นอกจากนี้ยังใช้ ฐานข้อมูลอื่น คือ COG Gene Ontology และ KEGG เพื่อระบุ unigene จากนั้นแจกแจงจำนวนของ unigene ในแต่ละหน้าที่ของการทำงานในเซลล์ตามหลักเกณฑ์การแบ่งของแต่ละฐานข้อมูล ซึ่งสามารถแบ่งหน้าที่ unigene โดยอาศัยฐานข้อมูล COG ได้ดังแสดงในรูปที่ 5.31 และแบ่งหน้าที่ unigene โดยอาศัยฐานข้อมูล Gene Ontology ได้ดังแสดงในรูปที่ 5.32 สำหรับการแบ่งหน้าที่ unigene โดยอาศัยฐานข้อมูล KEGG แสดงดังรูปที่ 5.33

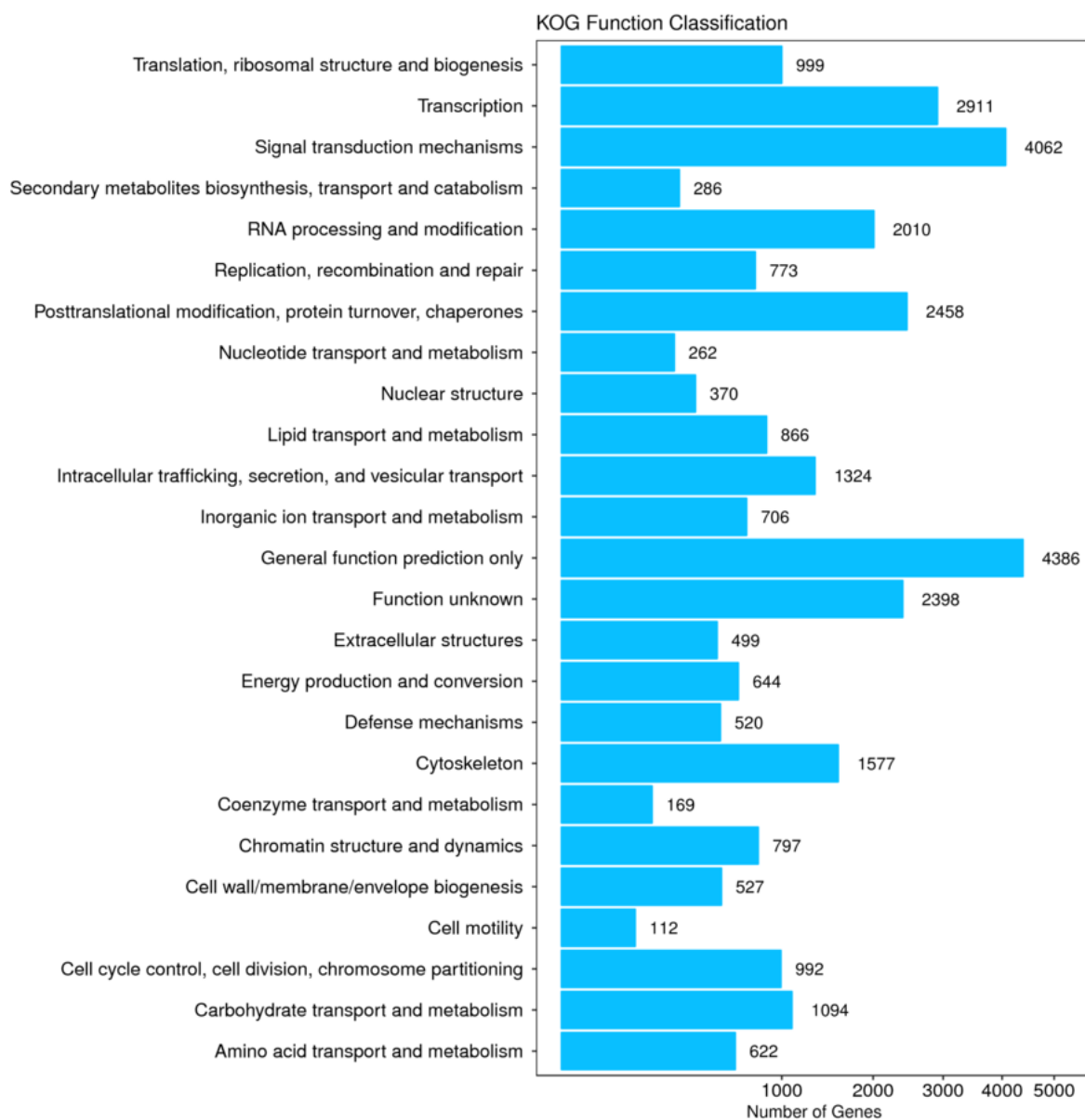


รูปที่ 5.29 Venn diagram แสดงจำนวน unigene ที่ระบุด้วยแต่ละฐานข้อมูล NR, COG, KEGG, Swissprot และ Interpro

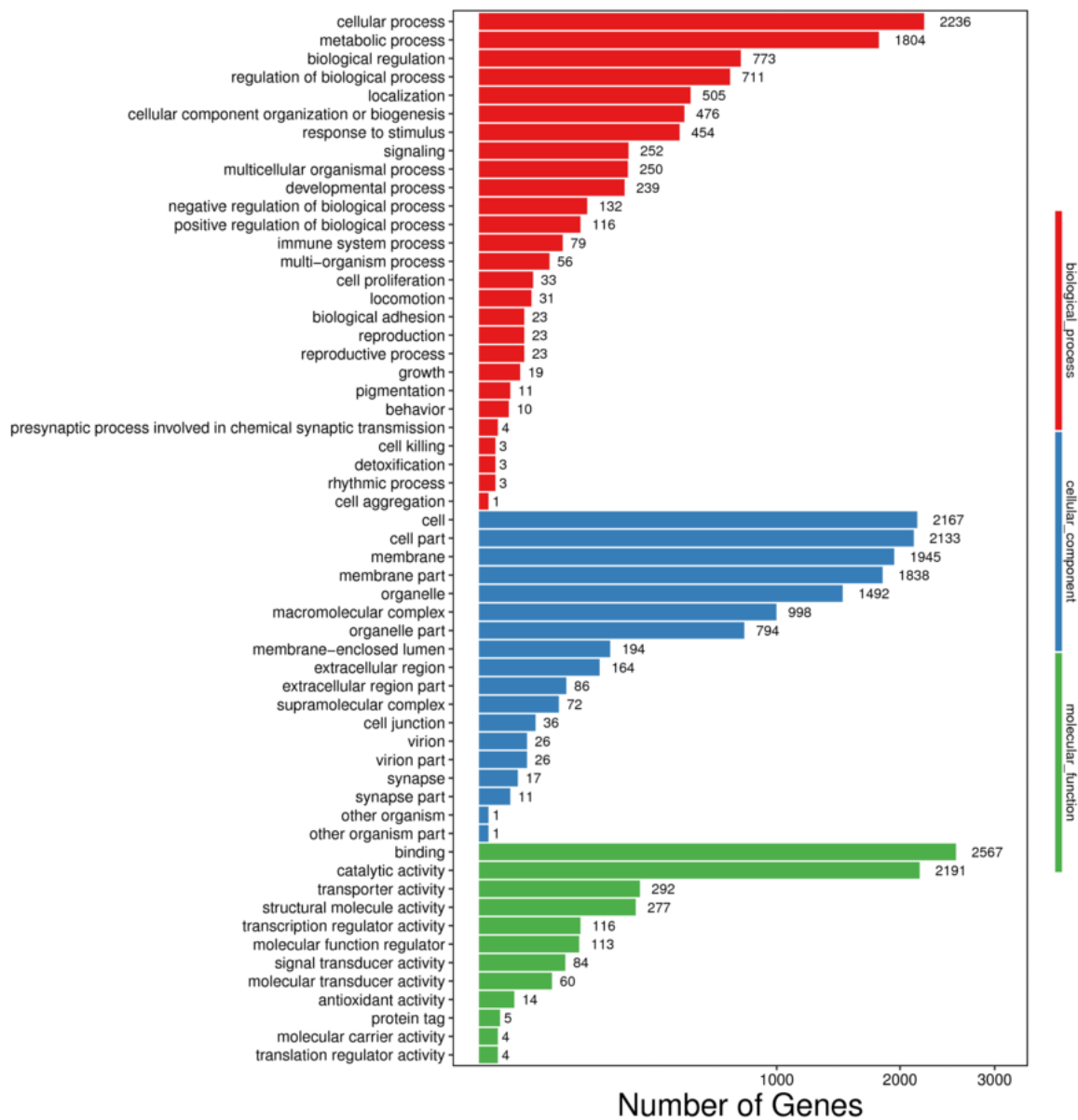
Species Distribution



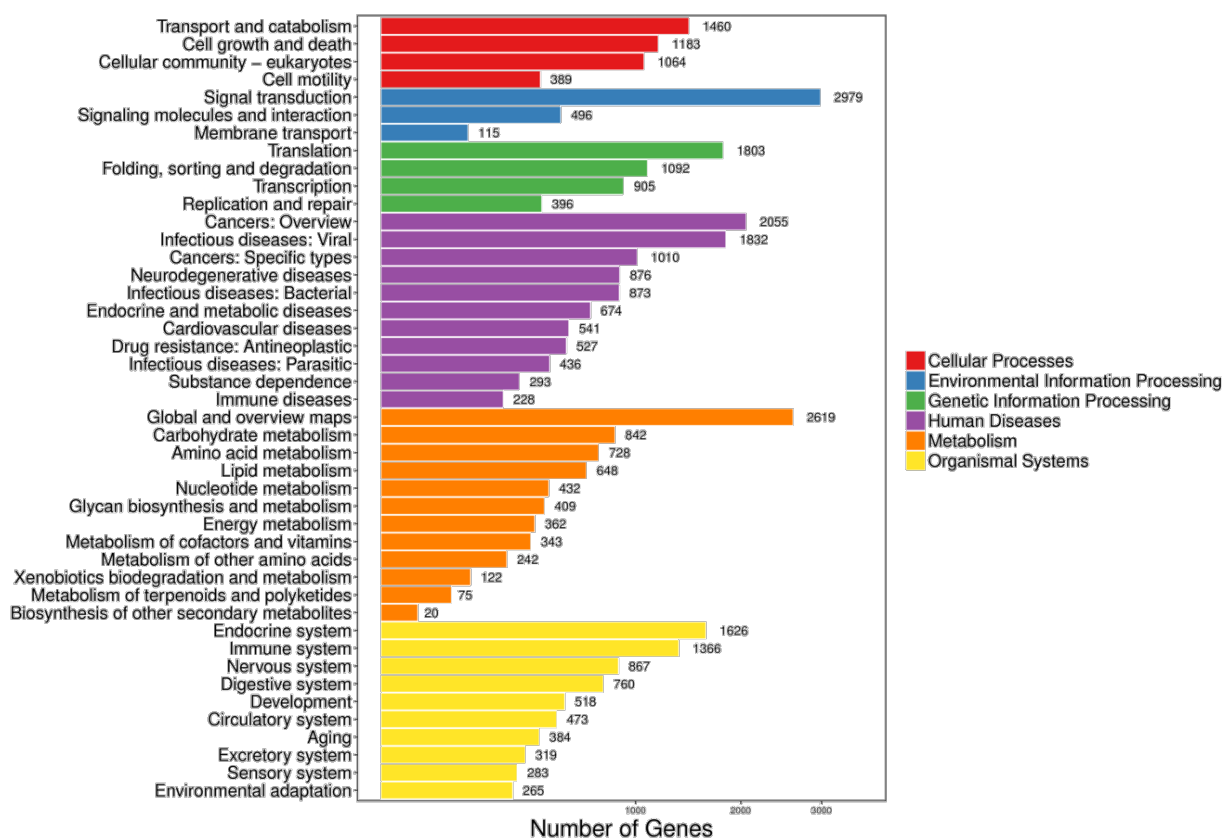
รูปที่ 5.30 แสดงร้อยละของฐานข้อมูลในแต่ละสิ่งมีชีวิตที่นำมาอ้างอิงในการระบุ Unigene



รูปที่ 5.31 การจำแนก unigene ที่ระบุได้ ตามหน้าที่โดยอาศัยฐานข้อมูล COG



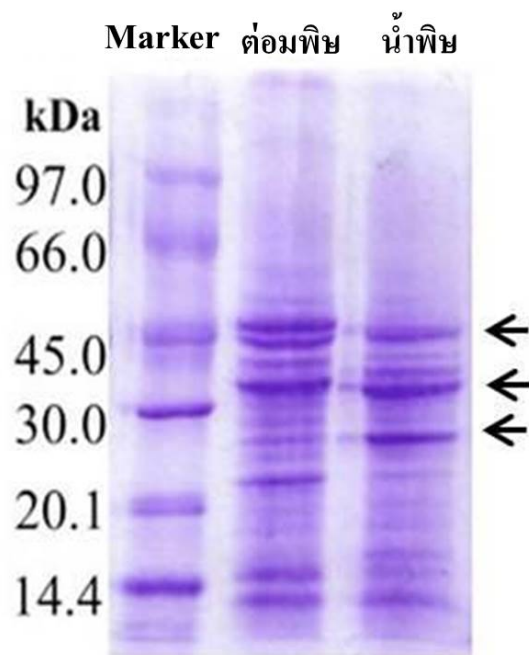
รูปที่ 5.32 การจำแนก unigene ที่ระบุได้ด้วย ฐานข้อมูล Gene Ontology ตามหน้าที่



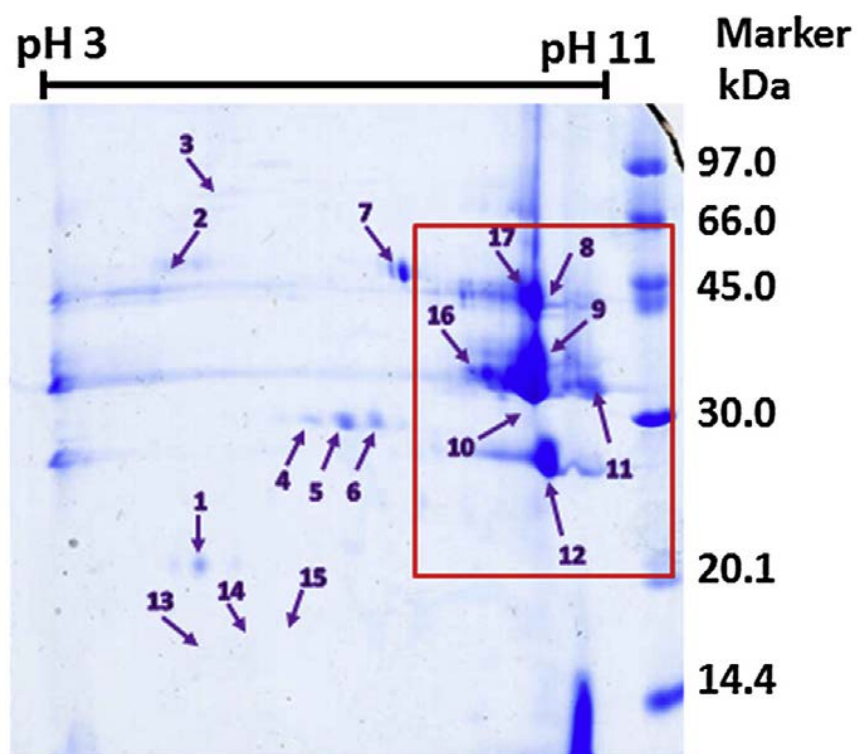
รูปที่ 5.33 การจำแนก unigene ที่ระบุได้ด้วย ฐานข้อมูล KEGG ตามหน้าที่

5.4 การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (Proteomics)

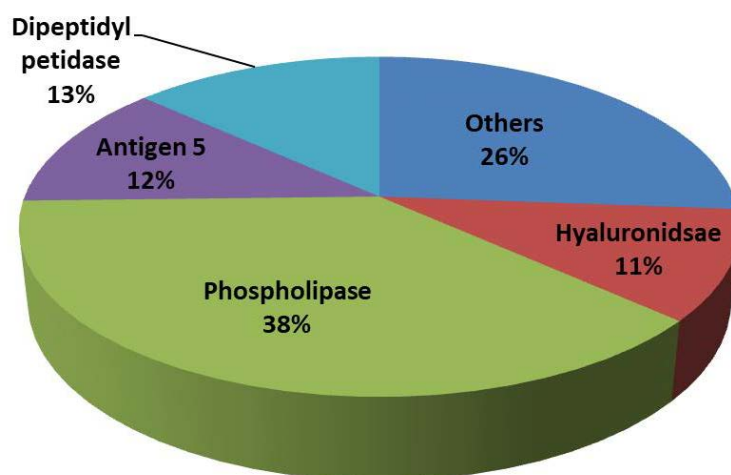
สำหรับการศึกษาแบบแผนโปรตีนในน้ำพิษของต่อหัวเสือ (*Vespa affinis*) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค 2D-PAGE พบว่ากลุ่มโปรตีนหลักมีขนาดประมาณ 45 32 26 kDa (รูปที่ 5.34) ส่วนการวิเคราะห์น้ำพิษด้วยเทคนิค 2D-PAGE พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะเป็น basic proteins โดยมี pI อยู่ระหว่าง 5 ถึง 10 และมีขนาดน้ำหนักอยู่ระหว่าง 27-50 kDa ดังรูป 5.35



รูปที่ 5.34 แสดงแบบแผนโปรตีนของพิษต่อหัวเสือ (*V. affinis*) โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE



รูปที่ 5.35 แสดงแบบแผนโปรตีนของพิษต่อหัวเสือ (*V. affinis*) โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-PAGE



รูปที่ 5.36 แสดงชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำพิษของต่อหัวเสือ (*V. affinis*)

จากผลการวิเคราะห์ spot โปรตีนด้วยเทคนิค LC/MS-MS สามารถระบุชนิดของโปรตีนในน้ำพิษของต่อหัวเสือ ได้ดังตารางที่ 5.6 พบชนิดของโปรตีนกลุ่มสำคัญ ได้แก่ phospholipase (PLA) ในปริมาณสูงที่สุดถึงร้อยละ 38 รองลงมาคือโปรตีน dipeptidyl peptidase ร้อยละ 13 โปรตีนแอนติเจน 5 (Ag 5) และ hyaluronidase (Hya) ร้อยละ 12 นอกจากนี้ยังพบโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ร้อยละ 26 (รูปที่ 5.36) โดยพบว่าโปรตีน phospholipase เป็นโปรตีนสำคัญที่พบได้ทั่วไปในพิษของตัวต่อ ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับ ผลการศึกษาการแยกน้ำพิษของต่อ *Vespa basalis* และ *V. vulgaris* (Ho et al.,1998) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลุ่มนี้เป็นโปรตีนหลักที่ส่งผลต่อความเป็นพิษของน้ำพิษที่สามารถทำให้เหยื่อตายได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า โปรตีน phospholipase A เป็นโปรตีนที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรต (non-glycosylated protein) และเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการก่อภูมิแพ้และทำหน้าที่เป็นสารพิษหลักของพิษ เมื่อน้ำพิษเข้าสู่ร่างกายเหยื่อ โปรตีน phospholipase A จะมีการย้ายหมู่ acyl group ออกจากหมู่ phospholipid ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วนำไปสู่ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกอย่างรุนแรง และทำให้ระบบการทำงานของหัวใจของเหยื่อเกิดความล้มเหลว นอกจากนี้โปรตีนชนิดนี้ยังก่อให้เกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือด ส่งผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบและการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์อีกด้วย

ตารางที่ 5.6 การระบุชนิดของโปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือด้วยวิธี 2D-PAGE/LC-MS/MS

Spots	Match to	Predicted high homologous molecules	Score ^a	Theoretical MW ^b	Experimental MW/pI ^c	Partial sequence obtained ^d
2, 7	gi 110277461	Dipeptidylpeptidase IV of <i>Vespa basalis</i>	108.28	88.49/5.69	47/8.13	R.FSNNGFNDVQR.V R.VIDKDNLDGILETQDGQNLSK.E R.YVIYDIELGGYDK.I R.NVQEILYLHYGEPGNLVDQYPTVEK .I R.LTVIVDSSVMDDYIVSHYMLSPK.G K.TEIVWYNK.Y K.NLFFYK.Q R.FLLIGYDFQK.G K.WAPLTDDLIIYILDNDIYYMR.F
8	gi 74772895	Hyaluronoglucosaminidase A or B (HyaluronidaseA or B) (Allergen Ves v2a or Ves v 2b)	10.23	40.07/9.31	43/9.86	K.INKDISIDLVR.K
9, 10, 16, 17	gi 548449	Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02) (Dol m 1)	24.20	33.781/8.92	34/9.58	R.NECVCVGLNAK.E R.LIGHSLGAQIAGFAGK.E K.LVP EEISFVLSTR.E R.LIGHSLGAHVSGFAGKK.V R.LIGHSLGAHVSGFAGK.R K.QECVCVGLNAK.K
12	gi 549193	Antigen 5	30.20	23.11/8.91	27/10.18	K.TKEIGCGSIK.Y K.YIENGWHR.H

Spots	Match to	Predicted high homologous molecules	Score ^a	Theoretical MW ^b	Experimental MW/pI ^c	Partial sequence obtained ^d
						K.VGHYTMVWAK.T K.FGISTKPNCCK.N

^aScore obtained after LC-MS/MS analysis.

^bTheoretical molecular weight (MW) obtained after LC-MS/MS analysis.

^cThe experimental MW and pI of the protein spots were determined by the 2D platinum software (GE Healthcare).

^dDeduce peptide sequence obtained after LC-MS/MS with ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

เอกสารอ้างอิง

- กาญจน์ คุ่มทรัพย์ และอาตุล จงรักษ์. 2016. ความหลากหลายของสัตว์เลื้อยคลานบริเวณสังคมพืชรอบอ่างเก็บน้ำคลองลำกง อำเภอนองไผ่ จังหวัดเพชรบูรณ์. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 ประจำเดือน พฤษภาคม-สิงหาคม 2559. น 82-91.
- ซัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์. [ม.ป.ป.]. ทรานสคริปโตมของมนุษย์, ทรานสคริปโตมิกส์และการประยุกต์ (Human Transcriptome, Transcriptomics, and Applications). ค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2562, จาก <http://www.si.mahidol.ac.th/departement/Biochemistry/home/articles/transcriptomics%20synopsis.htm>
- สมปอง คล้ายหนองสรวง (2558) เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน กรุงเทพฯ : อมรินทร์, 2558.209 หน้า.ISBN 978-616-394-381-1.
- Abbassi F, Lequin O, Piesse C, Goasdoué N, Foulon T, Nicolas P. Temporin-SHf, a new type of Pherich and hydrophobic ultrashort antimicrobial peptide. J Biol Chem 2010; 285: 16880-92.
- Adler-Nissen J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 27(6): 1256–1262.
- Ahmed S.T. and Ivashkiv L.B. (2000). Inhibition of IL-6 and IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways. J Immunol, 165: 5227-5237. DOI 10.4049/jimmunol.165.9.5227.
- Afify AEMMR, El Baroty GS, El Baz FK, El Baky HH and Murad AS. (2018). Scenedesmus obliquus: antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology: Epub ahead of print 1 February 2018.
- Alcaide M, Lemus JA, Blanco G, Tella JL, Serrano D, Negro JJ, Rodriguez A, Garcia-Montijano M. MHC diversity and differential exposure to pathogens in kestrels. Mol Ecol. 2010; 19: 691-705.
- Anita Annese, Caterina Manzari, Claudia Lionetti, Ernesto Picardi, David S. Horner, Matteo Chiara, Mariano Francesco Caratozzolo, Apollonia Tullo, Bruno Fosso, Graziano Pesole, Anna Maria D’Erchia (2018). Whole transcriptome profiling of Late-Onset Alzheimer’s Disease patients provides insights into the molecular changes involved in the disease. Scientific reports 8:4282. DOI:10.1038/s41598-018-22701-2.
- Arikan and Cicek (2014). Haematology of amphibians and reptiles: a review. North-western journal of zoolog. 10(1): 190-209.
- Ao J and Li B. (2012). Amino acid composition and antioxidant activities of hydrolysates and peptide fractions from porcine collagen. Food Science and Technology International 18(5): 425–434.

- Baimai V. (2010). Biodiversity in Thailand. The Journal of the Royal Institute of Thailand 2:107.
- Barksdale, S.M., Hrifko, E.J. and van Hoek, M.L. (2017) Cathelicidin antimicrobial peptide from *Alligator mississippiensis* has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. Dev. Comp. Immunol. 70, 135–144.
- Bishop BM, Juba M, Russo PS, Devine M, Barksdale SM, Scott S, Settlege R, Michalak P, Gupta K, Vliet K, Schnur JM, van Hoek MLJ (2017) Discovery of Novel Antimicrobial Peptides from *Varanus komodoensis* (Komodo Dragon) by Large-Scale Analyses and De-Novo-Assisted Sequencing Using Electron-Transfer Dissociation Mass Spectrometry. Proteome Res 16, 1470–1482.
- Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility molecules. Ann Rev Biochem. 1990; 59: 253-288.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Benjakul S, Morrissey M. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. J Agric Food Chem 1997; 45: 3423-3430.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. Nat Rev Microbiol. 2005; 3: 238-250.
- Brown DR. Mycoplasmosis and immunity of fish and reptiles. (2002). Front Biosci. 7: 1338-1346.
- Bond PJ, Parton DL, Clark JF, Sansom MS. Coarse-grained simulations of the membrane-active antimicrobial peptide maculatin 1.1. Biophys J. 2008; 95: 3802-3815.
- Bulet P, and Stöcklin R. Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. Protein and Peptide Letters. 2005; 12: 3-11.
- Burke RL, Hussain AA, Storey KB (2002). Freeze tolerance and supercooling ability in the Italian Wall lizard, *Podarcis sicula*, Introduced to Long Island, New York. Copeia 2002:836-842.
- Burnham DK, Keall SN, Nelson NJ, Daugherty CH. T cell function in tuatara (*Sphenodon punctatus*). Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2005; 28: 213-222.
- Chatterton DE, Nguyen DN, Bering SB and Sangild PT. (2013). Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 45(8): 1730–1747.
- Castillo J.C, Stuart E. Reynolds S.E., Eleftherianos I (2011). Insect immune responses to nematode parasites. Trends in Parasitology. 27(12). 537-547.

- Chattopadhyay S, Sinha NK, Banerjee S, Roy D, Chattopadhyay D, Roy S. Small cationic protein from a marine turtle has beta-defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity. *Proteins* 2006; 64: 524-531.
- Chen Y, Cai S, Qiao X, Wu M, Guo Z, Wang R, Kuang YQ, Yu H, Wang Y. As-CATH1-6, novel cathelicidins with potent antimicrobial and immunomodulatory properties from *Alligator sinensis*, play pivotal roles in host antimicrobial immune responses. (2017) *Biochem J.* 10;474 (16):2861-2885.
- Chen, Y., Costa, R.M., Love, N.R., Soto, X., Roth, M., Paredes, R., Amaya, E., 2009. C/EBP α initiates primitive myelopoiesis in pluripotent embryonic cells. *Blood* 114, 40–48.
- Chico V, Nombela I, María SP, Ortega-Villaizán MM. (2018). Nucleated Red Blood Cells Contribute to the Host Immune Response Against Pathogens. *Immune Response Activation*. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80545>.
- Chojnowski, J.L., Franklin, J., Katsu, Y., Iguchi, T., Guillet, L.J., Kimball, R.T., Braun, E.L., (2007) Patterns of vertebrate isochore evolution revealed by comparison of expressed mammalian, avian, and crocodilian genes. *J Mol Evol.* 65, 259–266.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001; 71: 1-20.
- Coronado MA, Georgieva D, Buck F, Gabdoulkhakov AH, Ullah A, Spencer PJ, Arni RK, Betzel C. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crotamine, a myotoxic polypeptide from the Brazilian snake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2012; 68: 1052-1054.
- Dalla Valle L, Benato F, Maistro S, Quinzani S, Alibardi L. Bioinformatic and molecular characterization of beta-defensins-like peptides isolated from the green lizard *Anolis carolinensis*. *Dev Comp Immunol.* 2012; 36: 222-229.
- Darville LNF, Merchant ME, Hasan A, Murray K (2010) Proteome analysis of the leukocytes from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol Part D.* 5, 308-316.
- Das S, Nikolaidis N, Klein J, Nei M. Evolutionary redefinition of immunoglobulin light chain isotypes in tetrapods using molecular markers. *PNAS.* 2008; 105: 16647-16652.
- Dean RE, O'Brien LM, Thwaite JE, Fox MA, Atkins H, Ulaeto DO. A carpet-based mechanism for direct antimicrobial peptide activity against vaccinia virus membranes. *Peptides.* 2010; 31: 1966-1972.
- DeLucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE, Walsh TJ. Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 481-483.
- Deretic V, Saitoh T, and Akira S. (2013). Autophagy in infection, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol.* 13(10):722–737. doi:10.1038/nri3532.
- Du Pasquier, L., Robert, J., Courtet, M., Musmann, R., 2000. B-cell development in the amphibian *Xenopus*. *Immunol. Rev.* 175, 201–213.

- E-Kobin T, Thongarm P, Roytrakul S, Meesuk L, Chumnannpuen P (2016) Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Comput Struct Biotechnol J*;14:49–57.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 35(4):495–516.
- Eskew EA, Shock BC, LaDouceur EEB, Keel K, Miller MR, Foley JE, Todd BD. (2018). Gene expression differs in susceptible and resistant amphibians exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis*. *R Soc Open Sci*. 5(2): 170910. doi: 10.1098/rsos.170910
- Fan W, Jiang Y, Zhang M, Yang D, Chen Z, Sun H, Lan X, Yan F, Xu J, Yuan W. (2017). Comparative transcriptome analyses reveal the genetic basis underlying the immune function of three amphibians' skin. *PLoS One*. ;12(12):e0190023. doi: 10.1371/journal.pone.0190023.
- Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: 1333-1341.
- Farag MA, El Ridi R. Mixed leucocyte reaction (MLR) in the snake *Psammophis sibilans*. *Immunology*. 1985; 55: 173-181.
- Feng P, Ding H, Lin H and Chen W. (2017). AOD: the antioxidant protein database. *Scientific Reports* 7:7449.
- Fernaund S, Evans RW. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40:395–405.
- Feser, J., Truong, D., Das, C., Carson, J.J., Kieft, J., Harkness, T., Tyler, J.K., (2010) Elevated histone expression promotes lifespan extension. *Molecular Cell*. 39, 724-735.
- Florensa L, Liu X, Wang Y, Yang S, Schwartz O, Peglar M, Caruccie D.J, Yates J.R, and Wu Y (2004). Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*. 135: 1-11.
- Girgih AT, Udenigwe CC, Aluko RE. In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *J Am Oil Chem Soc* 2011; 88: 381-389.
- Gump J.M and Thorburn A. (2011). Autophagy and apoptosis- what's the connection?. *Trends in Cell Biology*. 21(7):387–392.doi:10.1016/j.tcb.2011.03.007.
- Fogaca AC, Silva PJ, Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J biol chem*. 1999; 274: 25330-25334.
- Fry BG, Roelants K, Winter K, Hodgson WC, Griesman L, Kwok HF, Scanlon D, Karas J, Shaw C, Wong L, Norman JA (2010). Novel Venom Proteins Produced by Differential Domain-Expression Strategies in Beaded Lizards and Gila Monsters (genus *Heloderma*). *Molecular Biology and Evolution* . 27(2):395-407.

- Fujita, T., Endo, Y., Nonaka, M., 2004. Primitive complement system–recognition and activation. *Mol. Immunol.* 41, 103–111.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins: Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 1427-1435.
- Gao W, Xing L, Qu P, Tan T, Yang N, Li D, Chen H, Feng X (2015) Identification of a novel cathelicidin antimicrobial peptide from ducks and determination of its functional activity and antibacterial mechanism. *Sci Rep.* 5: 17260. doi: 10.1038/srep17260.
- Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol.* 2004; 41: 1089-1098.
- Gaspar D, Veiga AS, Sinthuvanich C, Schneider JP, Castanho M. Anticancer Peptide SVS-1: Efficacy Precedes Membrane Neutralization. *Biochemistry.* 2012; 51: 6263-6265.
- Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2000; 55: 31-49.
- Geng X, Wei H, Shang H, Zhou M, Chen B, Zhang F, Zang X, Li P, Sun J, Che J, Zhang Y, Xu C (2015) Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *J Proteomics* 119, 196-208.
- Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Fortuna M, Sealise G. In vitro activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 44: 641-645.
- Gosling, P.J. (1996) *Aeromonas* species in disease of animals. In :The Genus *Aeromonas*. ed. Austin, B., Altwegg, M., Gosling, P. J. and Joseph, S. pp. 174-195. John Wiley and Sons, Chichester.
- Godwin, J.W., Pinto, A.R., Rosenthal, N.A., 2013. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9415–9420.
- Green RE, Braun EL, Armstrong J, Earl D, Nguyen N, Hickey G, et al (2015). Three crocodilian genomes reveal ancestral patterns of evolution among archosaurs. *Science* 346(6215): 1254449.
- Halliwell B. (1987). Free radicals and metal ions in health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 46(1): 13–26.
- Hao J, Li YW, Xie MQ, Li AX. Molecular cloning, recombinant expression and antibacterial activity analysis of hepcidin from Siamensis crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Comp Biochem Phys Part B.* 2012; 163: 309-315.
- Han Y, Byun SH, Park JH and Kim SB. (2015). Bioactive properties of enzymatic hydrolysates from abdominal skin gelatin of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *International Journal of Food Science and Technology* 50(9): 1996–2003.
- Henriques ST, Tan CC, Craik DJ, Clark RJ. Structural and functional analysis of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Chembiochem.* 2010; 11: 2148-2157.

- Hiemstra PS, Zatt SAJ. *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*. New York: Springer Basel 2013.
- Hilchie AL, Doucette CD, Pinto DM, Patrzykat A, Douglas S, Hoskin DW. Pleurocidin family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts. *Breast Cancer Res.* 2011; 13: 1-16.
- Hoffman B, Key B, Ofer B, Kiryat T (2002). Reptilian-derived peptides for the treatment of microbial infections. In: United States Patent (USA). 6,340,667.
- Hoffmann J.A. and Reichhart, J.M. (2002). *Drosophila* innateimmunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* 3:121–126
- Honda, T., Uehara, T., Matsumoto, G., Arai, G. & Sugano, M. (2016) Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin. Chim. Acta* 457, 46–53.
- Ho, C.L., Chen, W.C., Lin, Y.L., 1998. Structures and biological activities of new wasp venom peptides isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. *Toxicon* 36, 609-617.
- Hocquellet A, Odaert B, Cabanne C, Noubhani A, Dieryck W, Joucla G, le Senechal C, Milenkov M, Chaignepain S, Schmitter JM. Structure-activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides.* 2010; 31: 58-66.
- Huang L, Li J, Anboukaria H, Luo Z, Zhao M, Wu H. (2016). Comparative transcriptome analyses of seven anurans reveal functions and adaptations of amphibian skin. *Sci. Rep.* 6: 24069. doi: 10.1038/srep24069.
- Ivanov VT, Karelin AA, Philippova MM, Nazimov IV, Pletnev VZ. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool. *Biopolymers.* 1997; 43: 171-188.
- Jacques Robert (2016). *The Immune System of Amphibians*. University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA.
- Jaratlerdsiri W, Isberg SR, Higgins DP, Ho SYW, Salomonsen J, Skjodt K, Miles LG, Gongora G. Evolution of MHC class I in the Order Crocodylia. *Immunogenetics.* 2014; 66: 53-65.
- Jäkel S, Mingot JM, Schwarzmaier P, Hartmann E, Görlich D (2002) Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J* 21(3):377–386.
- Je JY, Qian Z, Byun H and Kim S. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry* 42(5): 840–846.
- Jianxu Li, Xueqing Xu, Chunhua Xu, Weiping Zhou, Keyun Zhang, Haining Yu, Yaping Zhang, Yongtang Zheng, Huw H. Rees, Ren Lai, Dongming Yang, and Jing Wua. Anti-infection Peptidomics of Amphibian Skin. 2007. *Molecular & Cellular Proteomics* 6.5.

- Jun S, Park P, Jung W and Kim S. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology* 219(1): 20–26.
- Kappes D, Strominger JL. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Ann Rev Biochem.* 1988; 57: 991-1028.
- Kakhniashvili DG, Griko NB, Bulla LA, and Goodman SR (2005). The proteomics of sickle cell disease: profiling of erythrocyte membrane proteins by 2D-DIGE and tandem mass spectrometry. *Exp Biol Med.* 230: 787-92.
- Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics.* 2005; 56: 683-695.
- Kim SY, Je JY and Kim SK. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18(1): 31–38.
- Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. Wiley, New York. 1986.
- Kozlowski, H.N., Lai, E.T., Havugimana, P.C., White, C., Emili, A., Sakac, D., Binnington, B., Neschadim A, McCarthy SD, Branch DR. (2016) Extracellular histones identified in crocodile blood inhibit in-vitro HIV-1 infection. *AIDS* 30, 2043-52.
- Krause A, Sillard R, Kleemeier B, Kluver E, Maronde E, Conejo-Garcia JR, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Nehls MC, Wattler F. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein Sci.* 2003; 12: 143-152.
- Kerkis I, Silva Fde S, Pereira A, Kerkis A. Radis-Baptista, G. Biological versatility of crotamine-A cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010; 19: 1515-1525.
- Kovacs-Nolan J, Zhang H, Ibuki M, Nakamori T, Yoshiura K and Turner PV. (2012). The PepT1-transportable soy tripeptide VPY reduces intestinal inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820(11): 1753–1763.
- Kwak SJ, Kim CS, Choi MS, Park T, Sung MK, Yun JW, Yoo H, Mine Y and Yu R. (2016). The soy peptide Phe-Leu-Val reduces TNF α -induced inflammatory response and insulin resistance in adipocytes. *Journal of Medicinal Food* 19(7): 678–685.
- Lax R. The future of peptide development in the pharmaceutical industry. *Int Peptide Rev.* 2013: 10-15.
- Lehrer RI, Lu W. alpha-Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev.* 2012; 245: 84-112.
- Ledesma BH, Hsieh CC, Delumen BO. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 803-808.
- Leslie GA, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med.* 1969; 130: 1337-1352.

- Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors-taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 165-178.
- Li D, Zhang L, Yin H, Xu H, Trask J.S, Smith D.G, Li Y, Yang M, Zhu Q (2014). Evolution of primate β and θ -defensins revealed by analysis of genomes. *Mol Biol Rep*. 41: 3859–3866.
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., Lapatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O., 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat. Immunol.* 7, 1116–1124.
- Li H, Aneja R, Chaiken I. Click chemistry in peptide-based drug design. *Molecules*. 2013; 18: 9797-9817.
- Ling G, Gao J, Zhang S, Xie Z, Wei L, Yu H, Wang Y. (2014). Cathelicidins from the bullfrog *Rana catesbeiana* provides novel template for peptide antibiotic design. *PLoS One*. 9: e93216.
- Liu S, Yang H, Wan L, Cheng J, Lu X. Penetratin-mediated delivery enhances the antitumor activity of the cationic antimicrobial peptide magainin II. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013; 28: 289-297.
- Liumbruno G.M (2008). Proteomics: applications in transfusion medicine. *Blood Transfus*. 6:70-85, DOI 10.2450/2008.0038-07.
- Li X, Deng J, Shen S, Li T, Yuan M, Yang R and Ding C. (2015). Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. *Journal of Food Science and Technology* 52(9): 5681–5690.
- Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T (2017) Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* 13(5): e1005457.
- Lozito TP1 and Tuan RS (2017). Lizard tail regeneration as an instructive model of enhanced healing capabilities in an adult amniote. *Connect Tissue Res*. 58(2):145-154.
- Lueangsakulthai, J., Jangpromma, N., Tamsiripong, T., McKendrick, J.E., Khunkitti, W., Maddocks, S.E., Klaynongsruang, S., (2017) A novel antibacterial peptide derived from *Crocodylus siamensis* haemoglobin hydrolysate induces membrane permeabilization causing iron dysregulation, oxidative stress and bacterial death. *J Appl Microbiol*. 123, 819-831.
- Lu J, Chen ZW. Isolation, characterization and anti-cancer activity of SK84, a novel glycine-rich antimicrobial peptide from *Drosophila virilis*. *Peptides*. 2010; 31: 44-50.
- Major A, Mathez-Loic F, Rohling R, Gautschi K, Brugnara C. (1997) The effect of intravenous iron on the reticulocyte response to recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* 98: 292–294.
- Maijaroen S, Jangpromma N, Daduang J, Klaynongsruang S. (2018) KT2 and RT2 modified antimicrobial peptides derived from *Crocodylus siamensis* Leucrocin I show activity

- against human colon cancer HCT-116 cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. Sep;62:164-176.
- Majumder K, Chakrabarti S, Davidge ST and Wu JJ. (2013). Structure and activity study of egg protein ovotransferrin derived peptides (IRW and IQW) on endothelial inflammatory response and oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(9): 2120–2129.
- Mao XY, Cheng X, Wang X and Wu SJ. (2011). Free radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry* 126(2): 484–490.
- Mateo MR, Roberts ED, Enright FM. Morphological, cytochemical and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Am J Vet Res*. 1984; 45: 1046-1053.
- Matsumiya T, Xing F, Ebina M, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Hideaki Kikuchi, Matthew K Topham, Kei Satoh, Stafforini DM (2013) Novel role for molecular transporter importin 9 in post-transcriptional regulation of interferon- β expression. *J Immunol*. 2013 Aug 15; 191(4): 1907–1915.
- Margetic S. (2012). Inflammation and haemostasis. *Biochem Med*. 22(1):49-62.
- M. Reyes-Becerril, F. Ascencio-Valle, M.E. Macias, M. Maldonado, M. Rojas, M.A. Esteban (2012) Effects of marine silages enriched with *Lactobacillus sakei* 5-4 on haemato-immunological and growth response in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Aeromonas veronii* *Fish Shellfish Immunol*, 33, pp. 984-992.
- McInturff JE, Wang SJ, Machleidt T, Lin TR, Oren A, Hertz CJ, Krutzik SR, Hart S, Zeh K, Anderson DH. Granulysin-derived peptides demonstrate antimicrobial and anti-inflammatory effects against *propionibacterium acnes*. *J Invest Dermatol*. 2005; 125: 256-263.
- Mendis E, Rajapakse N and Kim SK. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(3): 581–587.
- Merchant ME, Roche C, Elsey RM, Prudhomme J. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp biochem Physiol Part B*. 2003; 136: 505-513.
- Merchant ME, Roche CM, Thibodeaux D, Elsey RM. Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2005; 141: 281-288.
- Merchant ME, Leger N, Jerkins E, Mills K, Pallansch MB, Paulman RL, Ptak RG. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet Immunol Immunopathol*. 2006; 110: 221-228.

- Merchant ME, Mills K, Leger N, Jerkins E, Vliet KA, McDaniel N. Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. *Com Biochem Physiol Part B*. 2006; 143: 133-137.
- Michael J.C and Sonnevend A. Clinical Applications of Amphibian Antimicrobial Peptides. *Journal of Medical Sciences* (2011); 4(2): 62-72.
- Minasyan H (2014) Erythrocyte and blood antibacterial defense *Eur J Microbiol Immunol* 4 2, 138–14.
- Mynasyan H. (2018) Phagocytosis and oxycytosis: two arms of human innate immunity. *Immunol Res*.66: 271–280.
- Montali RJ. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *J Comp Pathol*. 1988; 99: 1-26.
- Moure A, Dominguez H and Parajo JC. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry* 41(2): 447–456.
- Munoz M, Vandenbulcke F, Gueguen Y, Bachere E. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol*. 2003; 27: 283-289.
- Nan YH, Park KH, Jeon YJ, Park YK, Park IS, Hahm KS and Shin SY. (2007). Antimicrobial and anti-inflammatory activities of a Leu/Lys-Rich antimicrobial peptide with Phe-Peptoid residues. *Protein and Peptide Letters* 14(10): 1003–1007.
- Natarajan K, Muthukkaruppan VR. Distribution and ontogeny of B cells in the garden lizard (*Calotes versicolor*). *Dev Comp Immunol*. 1985; 9: 301-310.
- OEPP. (1992). Thailand Country Study on Biodiversity. Ministry of Science. Technology and Environment Bangkok, Thailand.
- O' Sullivan SM, Lafarga T, Hayes M and O' Brien NM. (2017). Bioactivity of bovine lung hydrolysates prepared using papain, pepsin, and alcalase. *Journal of Food Biochemistry* 41(6): e12406.
- Otvos L Jr. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59: 1138-1150.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7806-7810.
- Pata S, Yaraksa N, Daduang S, Temsiripong Y, Svasti J, Araki T, Thammasirirak S. Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrocin from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *Dev Comp Immunol*. 2011; 35: 545-553.
- Pasqualato, S., L. Renault, and J. Cherfils. (2002) Arf, Arl, Arp, and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep*. 3:1035–1041.

- Piertney SB, Oliver MK. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*. 2006; 96: 7-21.
- Pitchappan RM, Muthukkaruppan VR. Role of the thymus in the immune response to sheep erythrocytes in the lizard *Calotes versicolor*. *Proc Ind Acad Sci*. 1977; 85: 25-33.
- Ponkham P, Daduang S, Kitimasak W, Krittanai C, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, Svasti J, Kawamura S, Araki T, Thammasirirak S. Complete amino acid sequence of three reptile lysozymes. *Comp Biochem Phys Toxicol Pharmacol*. 2010; 151: 75-83.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B., 2002. Origin and Radiation of Tetrapods and Modifications for Life on Land. *Vertebrate Life*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.
- Qi, Z, Zhang Q, Wang Z, Ma T, Zhou J, Holland JW, Gao Q. (2015). Transcriptome analysis of the endangered Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*): immune modulation in response to *Aeromonas hydrophila* infection, *Veterinary Immunology and Immunopathology*.doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.004.
- Qian Z, Jung W, Byun H and Kim S. (2008). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology* 99(9): 3365–3371.
- Ren J, Zhao M, Shi J, Wang J, Jiang Y, Cui C, Kakuda Y and Xue SJ. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry* 108(2): 727–736.
- Richardson MF, Sequeira F, Selechnik D, Carneiro M, Vallinoto M, Reid JG, West AJ, Crossland MR, Shine R, Rollins LA. (2018). Improving amphibian genomic resources: a multitissue reference transcriptome of an iconic invader. *Gigascience*. 7(1):1-7.
- Rollins-Smith, L.A., Ramsey, J.P., Pask, J.D., Reinert, L.K., Woodhams, D.C., 2011. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integr. Comp. Biol.* 51, 552–562.
- Root D.D., Wang, K., (1994) Calmodulin-sensitive interaction of human nebulin Stegemann, C., Kolobov, A.J., Leonova, Y.F., Knappe, D., Shamova, O., Ovchinnikova, T.V., Kokryakov, V.N., Hoffmann, R., 2009. Isolation, purification and de novo sequencing of TBD-1, the first β -defensin from leukocytes of reptiles. *Proteomics*. 9, 1364–73.
- Ruifang Li, Sara A. Grimm, Deepak Mav, Haiwei Gu, Danijel Djukovic, Ruchir Shah, B. Alex Merrick, Daniel Raftery, Paul A. Wade (2018). Transcriptome and DNA Methylation Analysis in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity Predicts Increased Risk of Colorectal Cancer. *Cell Reports* 22:624–637.
- Sang Y, Ramanathan B, Minton JE, Ross CR, Blecha F. Porcine liver-expressed antimicrobial peptides, hepcidin and LEAP-2: cloning and induction by bacterial infection. *Dev Comp Immunol*. 2006; 30: 357-366.

- Schieven GL. (2005). The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem.* 5(10):921-8.
- Sharma H, Nagaraj R. Human β -defensin 4 with non-native disulfide bridges exhibit antimicrobial activity. *PLoS ONE.* 2015; 10: doi:10.1371/journal.pone.0119525.
- Shu G, Zhang Q, Chen H, Wan H and Li H. (2015). Effect of five proteases including alcalase, flavourzyme, papain, proteinase K And trypsin on antioxidative activities of casein hydrolysate from goat milk. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology* 19(2): 65–74.
- Shukla S and Mehta A. (2017). Antioxidant, total phenolics and total flavonoid content of the aqueous extract of *Caesalpinia bonducella* Seeds. *Chiang Mai Journal of Science* 44(3): 929–938.
- Smith RW, Cash P, Hogg DW, Buck LT (2015). Proteomic changes in the brain of the western painted turtle (*Chrysemys picta bellii*) during exposure to anoxia. *Proteomics.* 15(9):1587-97.
- Srihongthong S, Pakdeesuwan A, Daduang S, Araki T, Dhiravisit A, Thammasirirak S. Complete amino acid sequence of globin chains and biological activity of fragmented crocodile hemoglobin (*Crocodylus siamensis*). *Protein J.* 2012; 31: 466-476.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H. and Boman, H.G. (1981) *Nature*, 292, 246-248.
- Sunyer JO, Lambris JD. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunol Rev.* 1998 166: 39-57.
- Takatsu, H. et al. (2011) ATP9B, a P4-ATPase (a Putative Aminophospholipid Translocase), localizes to the trans-golgi network in a CDC50 protein-independent manner. *J. Biol. Chem.* 286, 38159–38167
- Tankrathok A Punpad A, Kongchaiyapoom M, Sosiangdi S, Jangpromma N, Daduang S, Klaynongsruang S. (2018) Identification of the first *Crocodylus siamensis* cathelicidin gene and RN15 peptide derived from cathelin domain exhibiting antibacterial activity. *Biotechnol Appl Biochem.* doi: 10.1002/bab.1709.
- Tasoulis T and Isbister GK (2017). A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins (Basel).* 9(9):290.
- Tavano OL. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* 90: 1–11.
- Thekkiniath J, Zabet-Moghaddam M, Kottapalli KR, Pasham MR, San Francisco S, San Francisco M. (2015). Quantitative Proteomics of an Amphibian Pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, following Exposure to Thyroid Hormone. *PLoS ONE* 10(6): e0123637. doi:10.1371/journal.pone.0123637.

- Theerakupt, K. and Panha, S. (2002) Animal Diversity in Thailand Biodiversity. National Science and Technology Development Agency, Ministry of Science, Technology and Environment.
- Thorburn A. (2008). Apoptosis and Autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*. 13(1): 1–9. doi:10.1007/s10495-007-0154-9.
- Trapanese M, Buglione M, Maselli V, Petrelli S, Aceto S, Fulgione D (2017). The first transcriptome of Italian wall lizard, a new tool to infer about the Island Syndrome. *PLoS ONE* 12(9):30185227.
- Tomasinsig L, Zanetti M. (2005). The cathelicidins--structure, function and evolution. *Current Protein & Peptide Science*, 6(1):23-34.
- Tongaonkar P, Golji AE, Tran P, Ouellette AJ, Selsted ME. High fidelity processing and activation of the human alpha-defensin HNP1 precursor by neutrophil elastase and proteinase 3. *PloS One*. 2012; 7: e32469.
- Tosches MA, Yamawaki TM, Naumann RK, Jacobi AA, Tushev G, Laurent G (2018). Evolution of pallium, hippocampus, and cortical cell types revealed by single-cell transcriptomics in reptiles. *Science* 360(6391):881-888.
- Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2000; 55: 4-30.
- Ullal AJ, Wayne Litaker R, Noga EJ. Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) *Developmental and Comparative Immunology*. 2008; 32:1301–1312.
- van Hoek, M.L., (2014) Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals* (Basel). 7, 723-53.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10, 57–63.
- van Dijk A, Veldhuizen EJ, van Asten AJ, Haagsman HP. CMAP27, a novel chicken cathelicidin-like antimicrobial protein. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005; 106: 321-327.
- Valdor R and Macian F. (2012). Autophagy and the regulation of the immune response. *Pharmacological Research*. 66: 475-483.
- Vena GA, Chieco P, Posa F, Garofalo A, Bosco A, Cassano N. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiol*. 2012; 35: 207-213.
- Vogel HJ, Schibli DJ, Jing W, Lohmeier-vogel EK, Epand RF and Epand RM. (2002). Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan and arginine-containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology* 80(1): 49–63.
- Wang G, Li X, Wang Z. APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: 933-937.
- Wessel, Olsen CM, Rimstad E, Dahle MK. (2015) Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes ex vivo. *Veterinary Research*. 6: 46:26.

- Yang W, Qi Y, Fu J. (2016). Genetic signals of high-altitude adaptation in amphibians: a comparative transcriptome analysis. *Genetic signals of high-altitude adaptation in amphibians: a comparative transcriptome analysis. BMC genetic.* (2016) 17:134
- Yang P, Ramamoorthy A, Chen Z. Membrane orientation of MSI-78 measured by sum frequency generation vibrational spectroscopy. *Langmuir.* 2011; 27: 7760-7767.
- Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Parrott, B.B., Yamaguchi, K., Ogino, Y., Miyakawa, H., Lowers, R.H., Shigenobu, S., Guillette, L.J. et al. (2016) RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during Alligator Mississippiensis temperature-dependent sex determination and differentiation. *BMC Genom* 17, 77.
- Yoshimura A., Nishinakamura H., Matsumura Y. and Hanada T. (2005). Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Res Ther*, 7: 100-110. DOI 10.1186/ar1741.
- Yu Y, Hu J, Miyaguchi Y, Bai X, Du Y, Lin B. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. *Peptides* 2006; 27: 2950-2956.
- Yun-hui C, Zhang W and Shi-ying X. (2006). Antioxidant properties of wheat germ protein hydrolysates evaluated in vitro. *Journal of Central South University of Technology* 13(2): 160–165.
- Zimmerman LM, Vogel LA, Bowden RM. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J Exp Biol.* 2009; 213: 661-671.
- Zoggel HV, Carpentier G, Santos CD, Hamma-Kourbali Y, Courty J, Amiche M, Delbe J. Antitumor and Angiostatic Activities of the Antimicrobial Peptide Dermaseptin B2. *PLOS ONE* 2012; 7: 1-13.

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์	จำนวน 5 เรื่อง
การเข้าร่วมประชุมวิชาการระดับนานาชาติ	จำนวน 16 เรื่อง
การบริการวิชาการแก่สังคมและการถ่ายทอดเทคโนโลยี	จำนวน 3 โครงการ
การสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับนักวิจัยต่างชาติ	จำนวน 1 มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 1

ผลงานวิจัยตีพิมพ์
(Publications)

VOL 66 NO 2 | MARCH/APRIL 2019

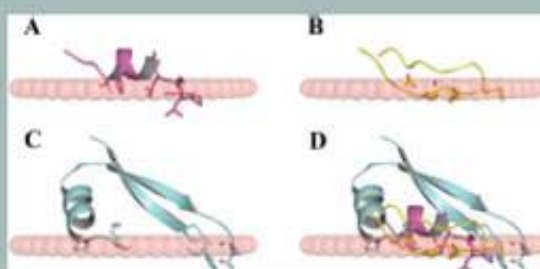
Biotechnology and Applied Biochemistry

IN THIS ISSUE:

Novel cathelicidin and antimicrobial cathelin peptide
from the Siamese crocodile

Opportunities and challenges in the bioconversion
of lignin

Modulation of oxidative damage by albumin



Published for the
International Union of
Biochemistry and
Molecular Biology

WILEY

Discover this journal online at
Wiley Online Library
at wileyonlinelibrary.com/journal/abm

Identification of the first *Crocodylus siamensis* cathelicidin gene and RN15 peptide derived from cathelin domain exhibiting antibacterial activity

Anupong Tankrathok^{1,2*}
 Arpaporn Punpad¹
 Monrudee Kongchaiyapoom³
 Sirinthip Sosiangdi^{2,3}
 Nisachon Jangpromma^{2,4}
 Sakda Daduang^{2,5}
 Sompong Klaynongsruang^{2,3}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, Kalasin University, Kalasin, Thailand

²Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

⁴Department of Integrated Science, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

⁵Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Abstract

Cathelicidins are effector molecules of vertebrate immunity that play vital roles against microbial invasion. They are widely identified in mammals, but few have been reported in Crocodilians, which are considered to be species with a powerful immune system. In the present study, we identified and characterized a novel cathelicidin from the blood of the Siamese crocodile, *Crocodylus siamensis*. A cDNA sequence (501 base pair) encoded a predicted 166-residue prepropeptide of *C. siamensis* cathelicidin (Cs-CATH), which comprised a 21-residue signal peptide, a 109-residue cathelin domain, and a 36-residue mature cathelicidin peptide. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis demonstrated that Cs-CATH shared a high degree of similarity with other crocodilian cathelicidins. Joint consideration of elastase

cleavage site, physicochemical properties, and predicted secondary structure demonstrated that RN15 peptide is a candidate antimicrobial peptide derived from Cs-CATH. The synthetic RN15 peptide demonstrates antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Scanning electron microscopy illustrated RN15-peptide-induced bacteria cells exhibited morphological change. Besides, RN15 peptide demonstrates low hemolytic activity against human erythrocytes and low cytotoxic activity against normal human dermal fibroblasts. This is the first cathelicidin identified from *C. siamensis*, and it is highlighted that its derived peptide from cathelin domain promises potent novel peptide antibiotics templates. © 2018 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 00, Number 0, Pages 1–11, 2018

Keywords: antimicrobial peptide, cathelicidin, reptile immunity, Siamese crocodile

Abbreviations: AMPA, Antimicrobial Sequence Scanning System; AMPs, Antimicrobial peptides; APD, Antimicrobial peptide database; Cs-CATH, *C. siamensis* cathelicidin; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; hRBCs, Human red blood cells; MHB, Mueller-Hinton broth; MIC, Minimum inhibition concentration; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; NB, Nutrient broth; NHDF, Normal human dermal fibroblasts; PBS, Phosphate-buffered saline; RP-HPLC, Reverse-phase high-performance liquid chromatography; RT-PCR, Reverse transcriptase polymerase chain reaction; SEM, Scanning electron microscopy.

*Address for correspondence: Anupong Tankrathok, PhD, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, Kalasin University, 62/1 Kasat Somboon Road, Kalasin, Muang, Kalasin 46000, Thailand. Tel: +66 43 811128; Fax: +66 43 812583; e-mail: anupong2.ta@ksu.ac.th. Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Received 28 June 2018; accepted 6 November 2018

DOI: 10.1002/bab.1709

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)



1. Introduction

Over the past decades, the effect of drug-resistant bacteria has become a crucial issue in global public health [1]; therefore, it is essential to discover a novel drug to inhibit the growth of pathogens. However, analog conventional antibiotics have been following a similar drug-resistant pattern and might become useless in the future [2]. Therefore, it is necessary to find a new substance from nature with the same potential as antibiotics that does not result in resistance. Antimicrobial peptides (AMPs) have been established as capability-therapeutic drugs owing to the broad range of killing activity and decreasing of bacterial resistance [3].

Cathelicidin is a group of peptides that have a variety of structures and can inhibit the growth of microorganisms that are found in almost all vertebrates [4]. These peptides are produced as prepropeptides that comprise the conserved amino-terminal domain named "cathelin"; and the variable carboxyterminal mature peptide sequences possess antimicrobial properties [5]. It has also been found that cathelicidin is involved in many biological functions, including angiogenesis, cytotoxic induction, and chemotaxis for immune system cells [6].

In reptiles, five cathelicidins from elapid snakes have been identified and characterized, such as BF-CATH from *Bungarus fasciatus* [7], OH-CATH from *Ophiophagus hannah*, NA-CATH from *Naja atra* [8], and PLCRAMP1-2 from *Pseudonaja textilis* [9]. Moreover, four viperidins, cathelicidins from venoms of South American pit vipers, named batroxidin, lutzidin, crotalidin, and lachesidin were discovered in *Bothrops atrox*, *Bothrops lutzi*, *Crotalus durissus terrificus*, and *Lachesis muta rhombata*, respectively [9]. In addition, Kim et al. [10] reported and characterized five cathelicidins from *Python bivittatus* Pb-CATH1-5 using bioinformatic analysis of python genome information. From annotated crocodilian genome data, several cathelicidin genes have been identified from *Alligator mississippiensis*, *Alligator sinensis*, and *Crocodylus porosus* but only *A. mississippiensis* cathelicidin (Am-CATH) and *A. sinensis* cathelicidin (As-CATH) peptides have recently been reported to have antimicrobial function [11–13].

The Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) is an enormous reptile or a tropical animal that is not resistant to cold weather, similar to other crocodiles. Their environmental habitats contain a broad range of pathogenic bacteria. It is possible that crocodiles can produce compounds that are destroyable to pathogens or a familiar high-performance immune system. It is well-known that crocodile blood is used in Chinese medicine. Moreover, it has been elucidated that Siamese crocodile blood is rich in powerful antibiotic substances. *C. siamensis* serum can inhibit the growth of a wide range of bacteria such as *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* [14]. Leukocyte extract peptides Leucocin I and Leucocin II show effective antimicrobial activity against both Gram-positive and

Gram-negative bacteria by disrupting bacterial membrane with concentration dependence [15]. For plasma, a fraction of *C. siamensis* plasma from cation exchange chromatography has exhibited antimicrobial activity against both *S. typhi* and *V. cholera* growth [16]. In addition, the intact and fragmented *C. siamensis* hemoglobin exhibited antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* [17]. Lately, peptides from pepsin-digested hemoglobin demonstrated antioxidant and anti-inflammatory activity [18]; however, cathelicidin activity has never been seen in genus *Crocodylus*. Here, we report the first cathelicidin from *C. siamensis* and investigate the antimicrobial activities of a *C. siamensis* cathelicidin (Cs-CATH)-derived peptide.

2. Materials and Methods

2.1. RACE amplification and gene expression

A healthy captive adult crocodile was treated with Gram-negative aquatic pathogen, *Edwardsiella tarda* at 10^6 CFU/ml by intravenous infection. Total RNA was extracted from crocodile red blood cell and whole blood 24 and 72 h after infection by using GF-1 Total RNA extraction Kit (Vivantis, Selangor DE, Malaysia), following the manufacturer's instructions, and then quantitated by spectrophotometer. The experimental protocol was approved by the animal ethics committee of Khon Kaen University (ethical approval number 0514.175/66). The first strand cDNA was synthesized using Viva 2-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with M-MuLV RT by oligonucleotide d(T) (Vivantis). The cDNA was amplified with forward primer CS-F (5'-GCTGTCAACTTCTACAACC-3') and reverse primer CS-R (5'-CGTTGTCTGGAAGTCGC-3'), based on the design of the conserved domain of saltwater crocodile *C. porosus* cathelicidin (Cp-CATH) genes; 3'-RACE was amplified using 5'-specific forward primer SF-F (5'-GCTGTCAACTTCTACAACCAACA-3') and 3'UTR reverse primer (5'-TGCTTTCTGGTCACTGGTGG-3'), based on the designed downstream untranslated region of *C. porosus* cathelicidin (Cp-CATH2; CP0002468) gene. On the other hand, 5'-RACE was amplified using 5'UTR forward primer (5'-GCAGCAGACGCTCAGGG-3'), based on Cp-CATH2 at the 5'-untranslated region, combined with 3'-specific reverse primer SF-R (5'-CCCCACGGGTTTTTTTGTATGG-3'), designed from the 3'-end specific site of Cs-CATH gene. PCR reaction was carried out on T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The PCR products were purified by gel electrophoresis with GF-1 Ambiclean kit (Vivantis). The cDNA sequence was analyzed by standard nucleotide sequencing (Macrogen, Seoul, South Korea). The level of Cs-CATH gene expression was examined by LightCycler® 480 real-time PCR systems (Roche, Rotkreuz, Switzerland). The cDNA of infected crocodile red blood cell and whole blood at 24 and 72 h was amplified with Cs-CATH-F primer (5'-CATGCCAAGCCAAACCGAA-3') and Cs-CATH-R primer (5'-TGGGGAATGAAAACGGGGTT-3'). The reaction mixtures were conducted in triplicate and each 10 µl

total reaction volume contained 5 μ l mixture of SYBR® Green PCR master mix (Roche), 0.5 μ l of forward and reverse primer, 1 μ l of cDNA, and 3 μ l of Diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. The PCR conditions consisted of a denaturation step at 95 °C for 3 Min followed by 50 cycles of 95 °C for 20 Sec, 58 °C for 20 Sec, and 72 °C for 30 Sec. A dissociation melting curve was constructed in the range of 65–95 °C. The β -actin gene was used as the housekeeping reference with Cs-beta-Actin-F primer (5'-CTGTGGCATTACAGAGACCA-3') and Cs-beta-Actin-R primer (5'-ACCACGGACAATACTGTGT-3'). The relative expression level of Cs-CATH gene was normalized by the expression of beta-actin, and data were exhibited using the comparative $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

2.2. Bioinformatic analysis

The crocodilian cathelicidin amino acid sequences were obtained from CrocBase (<http://crocgenome.hpc.msstate.edu/crocbase/>) and NCBI BLAST search. Then, the amino acid sequence alignments were built using ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Based on the proregion and mature domain, phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method (Mega, version 4.0; www.megasoftware.net) by calculating the proportion of amino acid differences among all sequences. The tertiary and secondary structures were analyzed by I-TASSER [19] and PEP-FOLD servers [20], respectively. The structure graphics were generated in PyMol (Schrödinger LLC, Cambridge, MA, USA). The antimicrobial domain of the protein was predicted by Antimicrobial Sequence Scanning System (AMPA) server (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/>) [21]. The physicochemical properties of peptides were analyzed through the antimicrobial peptide database (APD) (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) [22]. The predicted peptide structure protein data bank (PDB) file format was used for calculating peptide positioning in membranes by PPM web server (<http://opm.phar.umich.edu/server.php>) [23].

2.3. Peptide synthesis

RN15 peptide (NH₂-RNCTWLFSTKLKLP-COOH) with a molecular weight of 1778.14 dalton was synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA). Purity was analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), and peptide sequence was confirmed by electrospray ionization mass spectrometry.

2.4. Antimicrobial activity assay

Antimicrobial activity was assayed by modifying the resazurin-based 96-well plate microdilution method [24]. The bacterial cells were cultured in Mueller-Hinton broth (MHB) at 37 °C until the middle log phase. Then, cells were diluted with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, for 10⁴ CFU/ml. Then, 25 μ l of diluted bacterial solutions were added onto 96-well microtiter cell-culture plates and followed by adding 25 μ l of twofold serial dilution peptide (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125,

and 1.5625 μ g/ml) and using ampicillin as positive control, and then incubated at 37 °C for 3 H. The peptide reaction mixtures were added with 50 μ l MHB and cultured at 37 °C for 18 H. The residual living bacteria cells were monitored by assaying coloring against 30 μ l of 0.015% w/v resazurin solution at 37 °C for 2 H. Minimum inhibition concentration (MIC) was indicated by a clear blue color at the lowest peptide concentration.

2.5. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used for examination, as previously described [15]. Briefly, *Bacillus megaterium* TISTR067 and *E. coli* DH5 α were grown in nutrient broth (NB) at 37 °C until the logarithmic phase. The cultured cells were then diluted with NB for 10⁴ CFU/ml and were individually incubated with peptides at MIC or without peptide (untreated control) at 37 °C for 15 Min. Afterward, cells were fixed with 2.5% (w/v) of glutaraldehyde (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 1 H and then applied to a 0.2 μ m cellulose acetate membrane filter (Sartorius AG, Göttingen, Germany). After being washed twice with PBS, the fixed cells were dehydrated with ethanol solution series (30%, 50%, 70%, 90%, and 100%) for 15 Min each. The bacterial specimens were then dried in a critical point dryer (CPD7510; Thermo VG Scientific, East Grinstead, England). The dried samples were coated using a sputter coater (SC7620, Polaron, Watford, England) with gold palladium and visualized under a scanning electron microscope (LEO1450VP, LEO Electron Microscopy, Cambridge, England).

2.6. Hemolytic activity assays

The hemolytic activity of the RN15 peptide was determined as previously described [15]. Briefly, human red blood cells (hRBCs) were washed three times with PBS, pH 7.4, and then diluted to 2% (v/v) in PBS. The hRBC solution (100 μ l) was aliquoted into microcentrifuge tubes, followed by addition of 10 μ l of twofold serial dilution peptide. The reactions were centrifuged at 1,000 g for 5 Min after incubation at 37 °C for 1 H. Then, 100 μ l of supernatants were transferred into a 96-well plate for measuring at 415 nm. The hRBCs in 1% (v/v) Triton X-100 and PBS were used as positive and negative controls, respectively. Percent hemolysis was calculated as $[(A_{415 \text{ nm, peptide}}/A_{415 \text{ nm, 1\% [v/v] Triton X-100}}) \times 100]$.

2.7. Cytotoxicity assays

Normal human dermal fibroblast (NHDF) cells were cultured in 96-well plates with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) at 37 °C under a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ for 12–16 H. The cultured medium was then removed and then placed with DMEM diluted peptide and incubated at 37 °C for 24 H. The 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution was used for colorimetric assay by adding 100 μ l of 0.5 mg/ml MTT at 37 °C for 60 Min. The formazan crystal was dissolved with 100 μ l of dimethyl sulfoxide, and then optical density was measured at 570 nm using a microplate reader. Percent cell

TABLE 1 Physicochemical properties of peptides

Peptide	Sequence	Length	Net charge	Theoretical pI	Mw	Hydrophobic ratio (%)
RN15	RNCTWLFSTKLKLP	15	+3	10.06	1778.15	46
SI16	SIITCDTMTPGKDIHA	16	-1	5.19	1702.96	37
KP36	KPKPKPGKDERGRPGSGS WIGKGTFFSFPITKKPVG	36	+7	10.73	3820.46	16

cathelicidin (ASN73763.1) (As-CATH3) and *A. mississippiensis* cathelicidin (KYO44087.1) (Am-CATH4), respectively (Fig. 3). The N-terminal cathelin domain showed a highly conserved sequence among *Crocodylus* sp. and *Alligator* sp. species. On the other hand, the C-terminal cathelicidin domain showed a variety of amino acid sequences. From phylogenetic tree analysis (Fig. 4), crocodilian cathelicidins were classified into four clusters. Cluster I was the group with the largest number of cathelicidins, consisting of Cs-CATH, Cp-CATH1-2, As-CATH1-3, and Am-CATH3-4. Cluster II comprised Cp-CATH3, As-CATH5, Am-CATH2, and Am-CATH5. Clusters III and IV have two cathelicidin members each: cluster III included As-CATH4 and Cp-CATH4, whereas cluster IV had two cathelicidins from only alligators, Am-CATH1 and As-CATH6. The predicted three-dimensional structures of Cs-CATH amino acid sequence displayed the structure similar to other known cathelicidin structures with highly conserved sequence cathelin domain. The Cs-CATH structure contained one α -helical, four β -strand, and the C-terminal end random coiled. Besides, this structure presented two disulfide bridges located on the cathelin domain (Supplement Fig. 2).

3.3. Analysis of candidate Cs-CATH derived peptide

It was well known that elastase activity performed catalytic cleavage position at Val or Ala. Hereby, we assumed that three types of peptides were released from the Cs-CATH molecule. The candidate three peptides are denoted as RN15: NH₂-RNCTWLFSTKLKLP-COOH and SI16: NH₂-SIITCDTMTPGKDIHA-COOH from the cathelin domain, and KP36: NH₂-KPKPKPGKDERGRPGSGSWIGKGTFFSFPITKKPVG-COOH mature cathelicidin peptide. The physicochemical properties and predicted secondary structure of these peptides are presented in Table 1 and Fig. 5, respectively. The three candidate Cs-CATH peptides, RN15, SI16, and KP36, were composed of 15, 16, and 36 amino acid residues, respectively. For total net charge, the RN15 and KP36 peptides demonstrated cationic peptide property with +3 and +7 net charge, respectively, whereas the SI16 peptide presented anionic peptide with -1 total net charge. Although both RN15 and KP36 peptides expressed positive total net charge, only RN15 peptide presented a hydrophobic ratio percent at the level of a major group of AMPs. The hydrophobic ratios were 46%, 37%, and

16% for RN15, SI16, and KP36 peptides, respectively. The three peptides showed distinct characteristics of the predicted secondary structure. The RN15 peptide presented the α -helical structure whereas the SI16 peptide showed a random coil loop. Moreover, the KP36 peptide comprised both α -helix and β -strand models in their predicted secondary structure. However, the predicted α -helix structure and cationic properties made the RN15 peptide resemble common AMPs. In addition, AMPA server analysis indicated that twelve amino acid residues (NH₂-RNCTWLFSTKLK-COOH) located on the RN15 peptide denoted a bactericidal stretch with 14% probability (data not shown). Furthermore, the peptide positioning in membranes was calculated for three candidate peptides (Table 2). The results showed that the RN15 peptide penetrated into the membrane the same that KP36 peptide did with 4.6-4.5 Å depth, whereas SI16 peptide stabbed into the membrane with 2.5 Å depth. Although all three peptides resorted to using 6-7 amino acid residues for membrane embedding, five residues located on C-terminal end of the RN15 peptide caused the embedded region to attack the membrane (Fig. 6A). In case of the SI16 peptide, the membrane interaction employed only a single site of peptide region for insertion. However, this peptide showed forceless penetration (Fig. 6B). On the other hand, the longest stretch of KP36 peptide was found handling both β -turn structure and C-terminal site for binding (Fig. 6C). Moreover, preliminary results showed that at high concentrations, KP36 peptide (4 mg/ml) could not show antimicrobial activity (data not shown).

3.4. Antimicrobial activity of RN15 derived peptide

The RN15 peptide was chemically synthesized by solid phase peptide synthesis. From mass spectrum and RP-HPLC analyses, RN15 peptide with 1778.55 observed molecular weight had a purity of about 99.06% (Supplement Fig. 3). The antimicrobial activity of RN15 peptide was examined by the MIC assay (Table 3). The results obviously showed that synthetic RN15 peptide inhibited the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, wherewith the RN15 peptide exhibited low MIC against Gram-positive bacteria such as *B. megaterium* TISTR067 and *B. subtilis* TISTR1248, with MICs ranging from 12.5 to 25 µg/ml. These results indicated that RN15 showed a novel potent AMP. The effect of RN15 peptide on the membrane of *B. megaterium* TISTR067 and *E. coli* DH5a

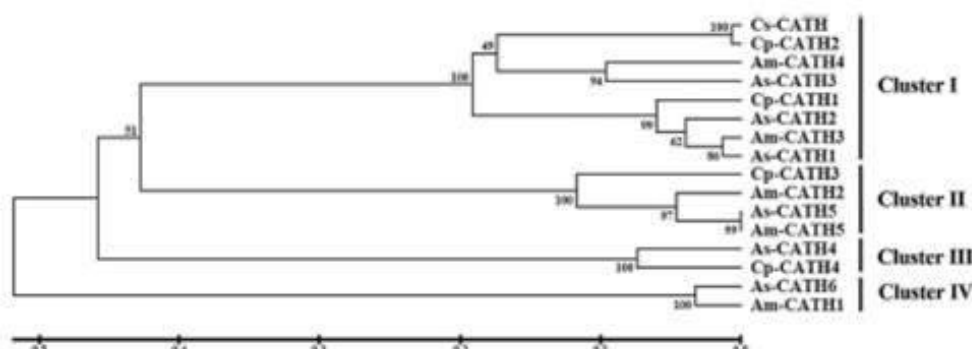


FIG. 4

The phylogenetic analysis of Cs-CATH complete peptide with other crocodilian cathelicidins—*A. mississippiensis* cathelicidin (Am-CATH1<KYO43834.1>, Am-CATH2<KYO43835.1>, Am-CATH3<KYO44086.1>, Am-CATH4<KYO44087.1>, and Am-CATH5<XP014466014.1>), *A. sinensis* cathelicidin (As-CATH1<ASN73761.1>, As-CATH2<ASN73762.1>, As-CATH3<ASN73763.1>, As-CATH4<ASN73764.1>, As-CATH5<ASN73765.1>, and As-CATH6<ASN73766.1>), *C. porosus* cathelicidin (Cp-CATH1<CPORG000270>, Cp-CATH2<CPORG002468>, Cp-CATH3<CPORG005374>, and Cp-CATH4<CPORG009296>), and *C. siamensis* cathelicidin (Cs-CATH<MH425517>).

3.5. Hemolytic activity and cytotoxicity of RN15-derived peptide

The hemolysis of RN15 peptide on human erythrocyte showed that RN15 peptide displayed insignificant hemolytic activity—less than 10%—even at a concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 8A). Moreover, the determination of peptide cytotoxicity against NHDF cells demonstrated that RN15 ranging from 3.13 to 50 $\mu\text{g/ml}$ slightly affected the viability of the cell after 24 h of exposure, as it could be seen that cell survival level decreased by approximately 20%, compared with untreated cells (Fig. 8B). However, the high concentrations of peptides (100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) showed the ability to recover cell viability, which was not significantly different from the untreated NHDF cells (Fig. 8B).

4. Discussion

Cathelicidins play an important role in the innate immune system of animals, and can serve as the first defensive molecule to kill a variety of microbes. Mammalian cathelicidin was first discovered from the neutrophil of cattle [25]. After that, a large number of cathelicidins have been identified from many mammalian species such as humans, monkeys, mice, rats, rabbits, guinea pigs, pigs, cattle, sheep, goats, and horses [26].

In reptiles, there are many types of cathelicidins, which might be employed in different biological functions [27]. For instance, crotalicidin from rattlesnake venom exhibited antitumor [28] and antifungal activity [29]. In addition, snake cathelicidins and their derivative have been reported to show potent antimicrobial activity against drug-resistant bacteria [8, 30]. For crocodilians, several cathelicidin genes were reported in the database. Recently, the role of cathelicidins from alligator groups has been reported in AMPs; for example, a cathelicidin from *A. mississippiensis* exhibited antimicrobial activity against drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* [11]. Moreover, cathelicidins from *A. sinensis* exhibited potent antimicrobial activity and showed their ability as immunomodulators [12] and also peptide immunostimulants in crabs [13]. Both *A. mississippiensis* and *A. sinensis* have various cathelicidin sequences, which are expressed to perform different functions. Thus, cathelicidins from crocodiles are diverse and might play many important

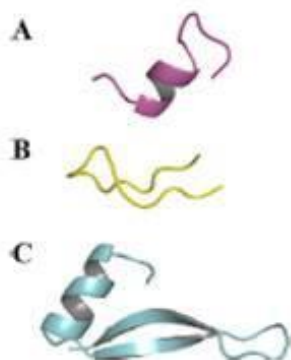


FIG. 5

Predicted peptide secondary structure of RN15 (A), SI16 (B), and KP36 (C), using PEP-FOLD server.

was observed under SEM. From the results, the control cells displayed a normal shape and smooth surface (Figs. 7A and 7D), whereas the bacterial cell showed morphological changes after peptide treatment for 15 min. The membrane surface of peptide-treated *B. megaterium* TISTR067 cells became swollen and rough (Figs. 7B and 7C). While the surface of *E. coli* DH5 α treated with peptide was severely damaged with cell shrinking and membrane blebs (Figs. 7E and 7F).

TABLE 2

The parameter of peptide positioning in the membrane

Peptide	Depth (Å)	$\Delta G_{transfer}$ (kcal/mol)	Tilt angle (°)	Embedded residues (bold)
RN15	4.6 ± 1.0	-5.2	71 ± 6	RNCTWLFSTKLK LPA
SI16	2.5 ± 2.1	-3.4	75 ± 10	SIITCDTMT PGKDIHA
KP36	4.5 ± 0.2	-7.2	71 ± 4	KPKPKPGKDERGRPGSGS WIGKGT PFSPITKKPVG

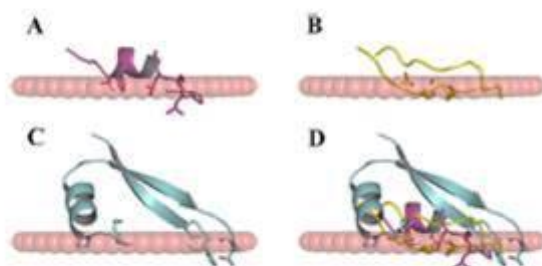


FIG. 6

Membrane positioning modeling of peptides using PPM online server. RN15 (A), SI16 (B), and KP36 (C) peptide structures are displayed in magenta, yellow, and cyan, respectively. The superimposition of peptides on the membrane are displayed in (D). The membrane-embedded residues are shown in stick.

roles. However, the proteins and peptides from the Siamese crocodile are important components that are still waiting to be discovered. This will lead to a better understanding of the functional role of these molecules within cells. This research clearly shows that cathelicidin was expressed in Siamese crocodile blood 24 h after bacterial infection, and disappeared at 72 h, which implies that this peptide might be involved in the innate immune system by direct killing bacteria upon invasion. The complete sequence of the crocodile cathelicidin gene was 501 bp encoding 166 amino acid sequences, 18.24 kDa, with 9.54 pI. The alignment result of Cs-CATH was 99% identical to that of Cp-CATH2 from *C. porosus*, differing only by one position of amino acid residue. This result indicated that these cathelicidins are conserved among *Crocodylus* genus, and might be important for biological function. In addition, Alligator genus was also found to have conserved cathelicidin with 100% identity between Am-CATH5 and As-CATH5. These cathelicidin types exhibited a powerful peptide with potent antimicrobial, antibiofilm, and anti-inflammatory activity [12].

It is well known that it is necessary for cathelicidins to be enzymatically cleaved for maturation. This proteolytic cleavage is processed by elastase in most of the cathelicidins but not in human LL-37, which is mediated by proteinase 3 [31]. In general, elastase is preferred as it is sensitive to a valine or

TABLE 3

Minimum inhibition concentration of RN15 peptide

Microorganism	Minimum inhibition concentration (μg/ml)	
	RN15	Ampicillin
Gram-positive bacteria		
<i>Bacillus megaterium</i> TISTR067	12.5	1.56
<i>Bacillus subtilis</i> TISTR1248	25	1.56
<i>Bacillus cereus</i> TISTR1449	400	50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	400	1.56
<i>S. aureus</i> TISTR746	400	1.56
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR927	100	12.5
Gram-negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	200	12.5
<i>E. coli</i> DH5α	200	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TISTR1287	>400	>50
<i>Salmonella thyphimurium</i> TISTR1472	>400	>50
Fungi		
<i>Candida albicans</i> TISTR5554	>400	>50
Aquatic pathogenic bacteria		
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR1321	>400	1.56
<i>Salmonella derby</i> DMST16881	>400	1.56
<i>Edwardsiella tarda</i> DMST38217	>400	1.56

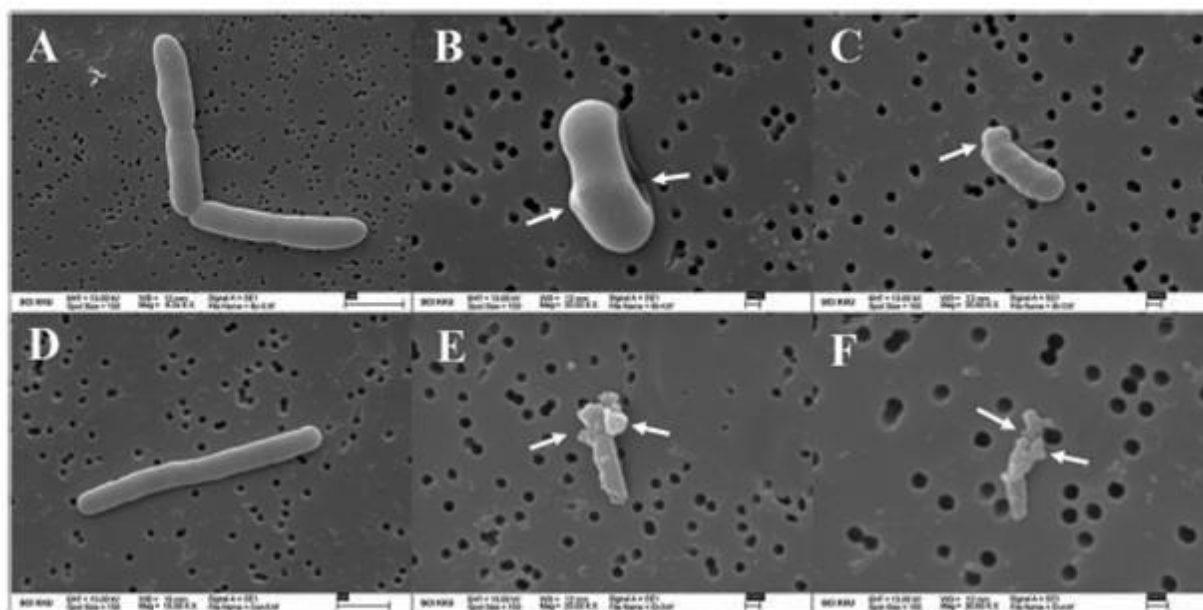


FIG. 7 Scanning electron micrographs of *B. megaterium* TISTR067 (upper panel) and *E. coli* DH5 α (lower panel) treated with RN15 peptide. (A) and (D) represent untreated control *B. megaterium* and *E. coli*, respectively. (B) and (C) represent *B. megaterium*, and (E) and (F) represent *E. coli* treated with RN15 peptide at minimum inhibition concentration for 15 Min. The arrows indicates cell morphological change.

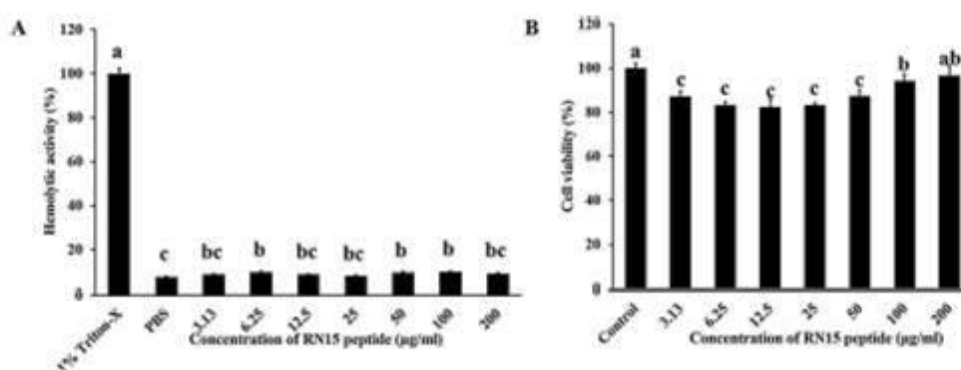


FIG. 8 Hemolytic activity against human erythrocyte (A) and cytotoxicity on normal human dermal fibroblasts (B) of RN15 peptide.

alanine residue. We assumed that elastase cleaved *Crocodylus* cathelicidin at alanine position, though proteolytic processing for cathelicidin remains unclear. Thus, Ala130 in the C-terminal domain of the propeptide Cs-CATH can generate Cs-CATH peptide with 36 residues. Although mature cathelicidin peptides

have a variety of secondary structures, a major group of AMPs display an alpha-helical conformation. The predicted Cs-CATH mature (KP36) peptide presented both α -helix and β -strand structure, which is not commonly found in the structure of AMPs (APD). Therefore, we reconsidered the valine and alanine located on cathelin domain as elastase-sensitive residue; thus, three candidate peptides could be released in three positions (Val99, Ala114, and Ala130) by elastase, which are RN15 (RNCTWLFSTKLKLP), SH16 (SIITCDTMTPGKDIHA), and KP36

peptide (KPKPKPGKDERGRPGSGSWIGKGTFFSFITKKPVG). Although both RN15 and KP36 peptides expressed positive total net charge, only RN15 peptide presented a hydrophobic ratio percentage at the level of a major group of AMPs, which is mostly in the range of 40–50% hydrophobic residues (APD). The optimum hydrophobicity of peptides may enhance bacterial membrane penetration and disruption [32]. According to the PEP-FOLD server program, the predicted secondary structures of these peptides presented as something completely different. Only predicted RN15 peptide structure displayed an α -helix, one of the most widely distributed AMP structures, which provided broad-spectrum and rapid killing activity [33]. Moreover, the results from both bioinformatics tools, that is antimicrobial region prediction by AMPA server and peptide positioning in membranes by PPM server, also confirmed that RN15 peptide is a potent candidate AMP. However, both RN15 peptide and KP36 mature cathelicidin peptide were chemically synthesized, and then their antimicrobial function was proved.

The evaluation of the antimicrobial function of synthetic RN15 peptide also confirmed the computer prediction that this peptide shows potent antimicrobial property. On the other hand, KP36 mature peptide could not exhibit antimicrobial activity, similar to As-CATH1-3 [12]. RN15 peptide inhibited the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria; however, this peptide exhibits poor antimicrobial activity on Gram-negative bacteria. Nevertheless, our results cleared that this peptide is a proficient AMP against Gram-positive bacteria. It is implied that this synthetic RN15 peptide is an AMP specific to Gram-positive bacteria. Although a major group of AMPs exhibited broad-spectrum antimicrobial activity, a small number of AMPs expressed Gram-specific antibacterial activity [34]. However, the results of SEM exhibited that RN15 peptide could disrupt both Gram-positive and Gram-negative bacteria membrane, which is similar to many reported cathelicidins [5, 35]. From the antibacterial activity of RN15 peptide, it might be inferred that the crocodilian long chain mature cathelicidin probably was cleaved into small peptide fragments prior to it playing a role in biological activity. Furthermore, the low hemolytic activities and cytotoxicity are promising for the use of RN15 peptide as a template for the design of novel peptide-based antibiotics.

5. Conclusions

In conclusion, a novel cathelicidin peptide was identified from the Siamese crocodile, *C. siamensis*, which offered new insights into the role of cathelicidins in the reptilian innate immune system. Sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that Cs-CATH shares a conserved sequence among crocodylian cathelicidins. The RN15 peptide was expected to be an AMP that is released from cathelin domain and exhibits antimicrobial activity with no hemolytic activity and low cytotoxicity. Our results provide evidence for the function of the cathelin-domain

fragmented peptide as a contributor to the defence system against bacterial pathogens in crocodiles.

6. Acknowledgements

This work was supported by Thailand Research Fund grants TRG5880148 and DBG6080016, Rajamangala University of Technology Isan, Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Khon Kaen University, and Kalasin University.

7. References

- [1] Pontes, D. S., de Araujo, R. S. A., Dantas, N., Scotti, L., Scotti, M. T., de Moura, R. O., and Mendonça-Junior, F. J. B. (2018) *Curr. Top. Med. Chem.* <https://doi.org/10.2174/156802661868618020095224>.
- [2] Blair, J. M., Wobber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Fiddock, L. J. (2015) *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 42–51.
- [3] Teixeira, V., Feio, M. J., and Bastos, M. (2012) *Prog. Lipid Res.* 51, 149–177.
- [4] Avila, E. E. (2017) *Curr. Protein Pept. Sci.* 18, 1098–1119.
- [5] Zaiou, M., and Gallo, R. L. (2002) *J. Mol. Med.* 80, 549–561.
- [6] Ramaniathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R., and Bledha, F. (2002) *Microbes Infect.* 4, 361–372.
- [7] Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Wang, A., Lin, D., and Lai, R. (2008) *PLoS One* 3, e2217.
- [8] Zhao, F., Lan, X. Q., Du, Y., Chen, P. Y., Zhao, J., Zhao, F., Lee, W. H., and Zhang, Y. (2018) *Zool Res.* 39, 87–95.
- [9] Falcao, C. B., de La Torre, B. G., Pérez-Peñalado, C., Barron, A. E., Andreu, D., and Rádis-Baptista, G. (2014) *Amino Acids* 46, 2561–2571.
- [10] Kim, D., Soundarajan, N., Lee, J., Cho, H. S., Choi, M., Cha, S. Y., Ahn, B., Jeon, H., Lee, M. T., Song, H., Kim, J. H., and Park, C. (2017) *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00530–17.
- [11] Barksdale, S. M., Hrifko, E. J., and van Hoek, M. L. (2017) *Dev. Comp. Immunol.* 70, 135–144.
- [12] Chen, Y., Cai, S., Qiao, X., Wu, M., Guo, Z., Wang, R., Kuang, Y., Yu, H., and Wang, Y. (2017) *Biochem. J.* 474, 2861–2885.
- [13] Guo, Z., Qiao, X., Cheng, R., Shi, N., Wang, A., Feng, T., Chen, Y., Zhang, F., Yu, H., and Wang, Y. (2017) *Fish Shellfish Immunol.* 71, 202–209.
- [14] Preecharom, S., Daduang, S., Bunyatratchata, W., Araki, T., and Thammasirirak, S. (2008) *Afr. J. Biotechnol.* 7, 3121–3128.
- [15] Pata, S., Yaraksa, N., Daduang, S., Temsirirong, Y., Svesti, J., Araki, T., and Thammasirirak, S. (2011) *Dev. Comp. Immunol.* 35, 545–553.
- [16] Kommanee, J., Preecharom, S., Daduang, S., Temsirirong, Y., Dhiravisit, A., Yamada, Y., and Thammasirirak, S. (2012) *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 11, 22.
- [17] Srihongthong, S., Pakdeesuwan, A., Daduang, S., Araki, T., Dhiravisit, A., and Thammasirirak, S. (2012) *Protein J.* 31, 466–476.
- [18] Luangsakulthai, J., Phosri, S., Theansungnoon, T., Jengpromma, N., Temsirirong, T., McKendrick, J. E., Khunkitti, W., and Klaynongsarung, S. (2017) *Biotechnol. Appl. Biochem.* <https://doi.org/10.1002/bab.1628>.
- [19] Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015) *Nat. Methods* 12, 7–8.
- [20] Thévenot, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P., and Tufféry, P. (2012) *Nucleic Acids Res.* 40, W298–W293.
- [21] Torrent, M., Di Tommaso, P., Pulido, D., Nogués, M. V., Notredame, C., Boix, E., and Andreu, D. (2012) *Bioinformatics* 28, 130–131.
- [22] Wang, G., Li, X., and Wang, Z. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37, 933–937.
- [23] Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., and Lomize, A. L. (2012) *Nucleic Acids Res.* 40, D370–D376.
- [24] Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., and Banat, I. M. (2018) *Biotechnol. Lett.* 38, 1015–1019.



Chiang Mai J. Sci. 2019; xx(x) :
<http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/>
 Contributed Paper

Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of the Siamese Crocodile (*Crocodylus Siamensis*) Hemoglobin Hydrolysate Derived from Trypsin and Papain Hydrolysis

Jiraporn Lueangsakulthai[a,b], Nicholas Michael [c], Theeranan Temsiripong [d], Watcharee Khunkitti [e], Sompong Klaynongsruang [b,f], Nisachon Jangpromma* [b,g]

[a] College of Public Health and Human Sciences, School of Biological and Population Health Sciences, Oregon State University, Oregon, 97331, United States.

[b] Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Thailand.

[c] Department of Chemistry, The University of Reading, Reading, RG6 6UR, United Kingdom.

[d] Srirachamoda Co., Ltd. 383 Moo 4, Nongkham, Sriracha, Chonburi 20230, Thailand.

[e] Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[f] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[g] Department of Integrated Science, Forensic Science Program, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

*Author for correspondence; e-mail: nisaja@kku.ac.th

Received: 28 November 2018

Revised: 6 February 2019

Accepted: 12 February 2019

ABSTRACT

Crocodylus siamensis hemoglobin hydrolysates (CHHs) were obtained by trypsin and papain digestion at different incubation times (2, 4, 6 and 8 h) at 37 °C and subjected to antioxidant and anti-inflammatory activity assessment. DPPH scavenging activity of CHH derived from trypsin was similar to intact Hb. CHH derived from papain hydrolysis by 8-h hydrolysis (8h-CHHp) showed the highest DPPH scavenging activity at 56.86% antioxidant inhibition with IC_{50} value of 31 μ g/ml. CHH derived from papain hydrolysis by 2-h hydrolysis (2h-CHHp) showed the highest reducing power activity at 0.99 mM Trolox equivalent and 4h-CHHt showed reducing activity at 0.16 mM Trolox equivalent (at concentration of 500 μ g/ml). The linoleic peroxidation activity of CHH derived from papain hydrolysis by 6-h hydrolysis (6h-CHHp) and CHH derived from trypsin hydrolysis by 8-h hydrolysis (8h-CHHt) was increased in a dose-dependent manner with IC_{50} value of 5 μ g/ml. The strongest anti-inflammatory activity was found for 2h-CHHp, which displayed a high efficacy in decreasing NO production of macrophage RAW 264.7 cells (46.86%) with no toxicity and significantly reduced pro-inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) production to about 25.73 pg/ml. Taken collectively, the results of this work demonstrate that CHHs derived from papain hydrolysis possesses antioxidant and anti-inflammatory activities, which provides support for the application against inflammation and oxidative stress-related disorders.

Keywords: hemoglobin hydrolysate, papain hydrolysis, trypsin hydrolysis, anti-inflammatory, antioxidant

1. INTRODUCTION

Free radicals are created as a consequence of adenosine triphosphate (ATP) production by the mitochondria. These by-products are generally reactive oxygen species (ROS) as well as reactive nitrogen species (RNS). At low or moderate levels, ROS and RNS exert beneficial effects on cellular responses and immune function. At high concentrations, they generate

oxidative stress, a deleterious process that can damage all cell structures such as proteins, lipids, lipoproteins, and deoxyribonucleic acid (DNA) [1-2]. Oxidative stress plays a major part in the development of chronic diseases in humans such as cancer, arthritis, aging, autoimmune disorders, diabetes, infection, cardiovascular, inflammation and neurodegenerative diseases [3]. Within the human body has various mechanisms to counteract oxidative

stress by producing antioxidants, which are either naturally produced, or externally supplied through foods and/or supplements. Endogenous and exogenous antioxidants act as "free radical scavengers" by preventing and repairing damages that caused by ROS and RNS [4]. Inflammation is the immune system's physiological response to injury or infection [5]. Acute inflammation is a part of the body defense response, chronic inflammation is thought to be lead to numerous diseases for example cancer, diabetes, cardiovascular, pulmonary, and neurological diseases [5-6]. However, high expression of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 have been exhibited to have a role in oxidative stress-induced inflammation [7-8]. The imbalance between reactive oxygen species and endogenous antioxidant defense mechanisms leads to an unhealthy circle which may affect cellular components and trigger various diseases including inflammation [9].

Protein hydrolysate have begun to attract a lot of attention because of the growing belief that protein hydrolysate should possess health-promoting qualities. Recent biochemical research has shown that the protein hydrolysate not only furnishes amino acids but also provides bioactive peptides after digestion [10-11]. Consequently, bioactive peptides produced from both animal and plant sources are now being intensively investigated and have been reported to have antioxidant [12-13] and anti-inflammatory activity [14-16].

Crocodilus siamensis, commonly called Siamese crocodile, is a small freshwater crocodilian populating parts of Southeast Asia. Recently, several components of *C. siamensis* blood, i.e. plasma, serum, white blood cells and hemoglobin have been reported to possess a broad spectrum of biological properties, mainly attributed to the abundance of a number of biologically active peptides and proteins. Among these, hemoglobin constitutes the most abundant component and has been shown to exhibit antioxidant [17-22], antimicrobial [17-18, 22] and anti-inflammatory activity [19, 23-25].

Therefore, this study is aimed at investigating the antioxidant and anti-inflammatory of *C. siamensis* hemoglobin hydrolysates (CHHs) derived from trypsin and papain digestion. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), linoleic peroxidation and ferric reducing power assays were conducted to determine the antioxidant activity whereas 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), nitric oxide (NO) (of macrophage RAW 264.7 cells), IL-10 and IL-6 assays were used to investigate the anti-inflammatory activity. The amino acid composition was analyzed to determine the amino acid composition of protein hydrolysate.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Crocodile Hemoglobin Preparation

Crocodile (*C. siamensis*) blood was purchased from

Sriracha Moda Farm., Ltd., Chon Buri, Thailand. The animal ethic approval record number is ACUC-KKU-52/60 (reviewed and approved by the animal ethics committee of Khon Kaen University). Crocodile blood samples were withdrawn from the supravertibral branch of the internal jugular vein of crocodiles aged between 1-3 years. Blood was collected and transferred to 15-ml sterile tubes containing 0.08 g of EDTA. Blood samples were stored at 4 °C overnight to allow blood cells to settle. Red blood cells (bottom layer) were collected in sterile tubes. Isolated red blood cells were washed three times with phosphate buffer saline (PBS), pH 7.0, and centrifuged at $3,000 \times g$ for 5 min at 4 °C. Ice-cold distilled water of five-fold volume was added to the RBC pellet, followed by vigorous mixing and allowing the mixture to settle for 10 min. After centrifugation at $10,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, the supernatant was collected for lyophilization and then stored at -70 °C.

2.2 Trypsin and Papain Hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was performed according to the method of Yu *et al.* [26]. Shortly, the hemoglobin solution was digested by trypsin / papain with a ratio of enzyme to substrate of 1:100 (w/w) at 37 °C for 2, 4, 6 and 8 h and boiled at 95 °C for 10 min to quench the reaction by inactivating the enzyme. The hydrolysis condition was performed at pH 7.5 (adjusted with 1 M HCl), followed by removal of insoluble components by centrifugation at $7,168 \times g$ for 20 min. The supernatant was collected and adjusted to pH 7.0 by addition of 1 M HCl or 1 M NaOH. Finally, the supernatants were lyophilized and stored at -20 °C.

2.3 Degree of Hydrolysis

The degree of hydrolysis was determined by following the method of Benjakul *et al.* [27]. Briefly, 125 μ l of CHHs (1 mg/ml) were added to 2.0 ml of 0.21 M sodium phosphate buffer, pH 8.2, followed by addition of 1 ml of 0.01% TNBS solution. The mixture was incubated in a water bath at 50 °C for 30 min in the dark, then 2 ml of 0.1 M sodium sulfite was added to stop the reaction. The mixture was then allowed to cool for 15 min. The absorbance was measured at 420 nm and the α -amino acid content expressed in terms of L-leucine. The percentage of the degree hydrolysis was calculated using the formula: $DH = [(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$ where L_0 determines the amount of α -amino acid expressed in the sample, L_t corresponds to the amount of α -amino acid released at time t and L_{max} determines the maximum amount of α -amino acid after hydrolysis by 5 M HCl at 100 °C for 24 h.

2.4 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay

Double distilled water (50 μ l) was added to a 96-well plate. Next, CHHs (50 μ l) and 0.0004 M DPPH (50

μl) were added and mixed for 5 min. The reaction was kept in dark for 25 min and absorbance was measured at 490 nm using DPPH with double distilled water as a blank. All samples were analyzed in triplicate. Radical scavenging activity was determined as the percentage antioxidant inhibition (%AI) value that was calculated based on the following formula; % Antioxidant inhibition = $[(\text{Abs}_{\text{ctrl}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / \text{Abs}_{\text{ctrl}}] \times 100$

2.5 Ferric Reducing Power Assay

Ferric reducing power assay was modified from the method of Gargh *et al.* [28]. CHHs (100 μl) and positive control (glutathione) (100 μl) were added. Then 250 μl of 0.2 M phosphate buffer pH 6.6 and 150 μl of double distilled water were added. Potassium hexacyanoferrate 1% (w/v) 250 μl was added, vortexed and incubated at 50 °C, for 20 min. The reaction was stopped by adding 250 μl of 10% TCA and incubated for 10 min before centrifugation at $800 \times g$ for 10 min. Reactions were then performed in a 96-well plate. The reaction contains sample (30 μl), double distilled water (160 μl) and 0.1% (w/v) ferric chloride (10 μl). The reaction was mixed and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 700 nm and all samples were analyzed in triplicate. The activities were measured as the equivalent to trolox value and were calculated based on the equation of the standard curve of the positive control.

2.6 Linoleic Peroxidation Assay

This assay was performed following the method of Ledezma *et al.* [29] with modifications. CHHs (5-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (50 μl) were mixed with 50 μl of linoleic acid and 0.07 M ABAP (10 μl). The solution was mixed for 10 min. Acetic acid 20% (v/v) 150 μl was added and incubated at 70 °C, for 1h and reactions were performed in a 96-well plate. The reaction contains sample (20 μl), 75% ethanol (160 μl), 15% Ammonium thiocyanate (10 μl) and 10 mM ferrous chloride (10 μl). The reaction was mixed and incubated at room temperature for 3 min. The absorbance was measured at 500 nm. All samples were analyzed in triplicate. The activity was determined as the percentage antioxidant inhibition (%AI) value that was calculated using the following formula; % AI (antioxidant inhibition) = $[\text{Abs}_{\text{ctrl}} - \text{Abs}_{\text{test}}] / \text{Abs}_{\text{ctrl}} \times 100$

2.7 Measurement of Nitric Oxide and Cell Viability

This assay was conducted according to the method of Lucangrakulthai *et al.* [25]. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/ml) were cultured on a 96-well plate overnight. CHHs (125-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were co-incubated with LPS (100 ng/ml) and the resulting solution incubated with RAW 264.7 cells. Another incubation was set up between LPS and RAW 264.7 cells at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere for 24 h. After incubation for 24 h (NO assay),

100 μl of culture medium from each CHHs were mixed with 100 μl of Griess reagent and incubated at 25 °C for 10 min. The absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (BioRad, Model 680, USA). Nitric oxide (NO) production was calculated as percentage of control. After incubation for 24 h (Cell viability assay), the medium was discarded. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (0.5 mg/ml) was added to RAW 264.7 cells and incubated at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere for 30 min before the medium was discarded. DMSO was added and the reaction mixture incubated at 25 °C for 30 min. The absorbance was measured at 570 nm and the cell viability evaluated by comparing the absorbance with that of the control for each sample. All samples were analyzed in quadruplicate.

2.8 Measurement of IL-10 and IL-6

Aliquots of culture medium employed in the NO assay were further used for determination of IL-10 and IL-6 expression using the ELISA kit and following the instructions in the manufacturer's manual (R&D, Minneapolis, MN, USA).

2.9 Amino Acid Composition Analysis

Amino acids were determined by using ion-exchange chromatography. Their contents were identified using the amino acid analyzer (Biochrom 30+, Cambridge, UK) with post-column ninhydrin derivation and spectrophotometric detection. One hundred microliters of the prepared mixture was automatically injected into an amino acid analyzer.

2.10 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using ANOVA and followed by Dunnett's test (Prism 5.0, GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Data are presented as mean $\pm$ SEM. A value of $P < 0.05$ was accepted to be significant (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Degree of Hydrolysis (DH)

To obtain active protein fragments, crocodile hemoglobin was hydrolyzed by trypsin and papain digestion at different reaction times 2, 4, 6 and 8 h. Trypsin prefers to hydrolyze at Arg and Lys N-terminal position, while papain prefers to hydrolyze at hydrophobic side chain amino acid residues [30]. Trypsin is produced in the intestine and is one of the main digestive enzymes in the digestive system of humans and many other animals. Trypsin was used in order to mimic the intestinal digestion. Papain is one of the enzymes that used in commercial to produce active peptides. Degree of hydrolysis (DH) is defined as the proportion of cleaved peptide bonds in a protein hydrolysate. The TNBS method is based on the reaction of primary amino groups with trinitro-benzene-sulfonic acid (TNBS) reagent [31]. The extent of hemoglobin

hydrolysate using trypsin digestion was evaluated by degree of hydrolysis (DH) which was 3.64%, 4.31%, 6.65% and 9.61% for 2 h, 4 h, 6 h and 8 h of incubation, respectively. The extent of hemoglobin hydrolysate using papain digestion was 5.75%, 8.05%, 11.27% and 18.94% for 2 h, 4 h, 6 h and 8 h of incubation, respectively (Figure 1). Results indicated that cleavage of peptide bonds, free amino acid and small peptides were higher content in longer enzymatic hydrolysis. Degree of hydrolysis was

increased when incubation time rose. Trypsin has specific hydrolyzed position resulting in a slight increase of DH when compared with papain hydrolysis. Several protein hydrolysates that were hydrolyzed by trypsin and papain exhibited antioxidant [32-34] and anti-inflammatory activity [35]. Moreover, the radical scavenging activities of the hydrolysates were positively correlated with the DH (%) [36].

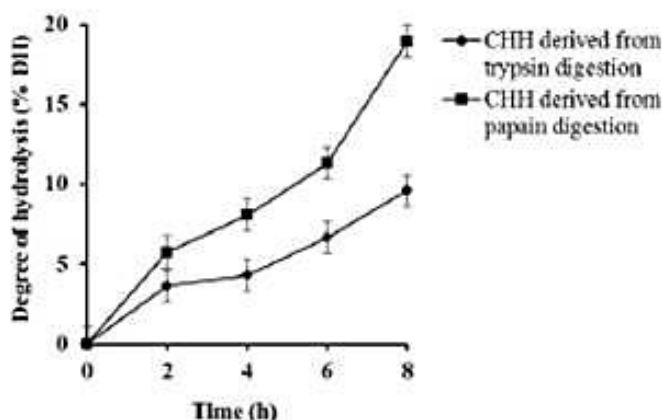


Figure 1. Degree of hydrolysis (%DH) of CHH after trypsin and papain digestion for 2, 4, 6 and 8 h. Hemoglobin hydrolyzed enzymatically displayed a direct correlation between the rate of hydrolysis (DH) and the time of incubation (h).

3.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activity

DPPH method is widely used for antioxidants screening because of its ability to scavenge oxidants compound [37]. In this assay, the different concentrations of CHHs (15-62 µg/ml) showed antioxidant activity. CHH derived from papain hydrolysis has higher antioxidant activity than CHH derived from trypsin hydrolysis. CHH derived from papain hydrolysis by 8-h hydrolysis (8h-CHHp) at the concentration of 15, 31 (IC₅₀ value) and 62 µg/ml showed 42.03, 56.86 and 61.28% antioxidant inhibition (AI), respectively. CHH derived from trypsin hydrolysis by 4-h hydrolysis (4h-CHHt) at the concentration of 15, 31 (IC₅₀ value) and 62 µg/ml showed 48.73, 51.68 and 54.66% antioxidant inhibition (AI), respectively (Figure 2). CHH derived from papain hydrolysis had better scavenging effect when compared with that of CHH derived from trypsin hydrolysis. This result suggests that the increased degree of hydrolysis of CHH derived from papain hydrolysis could enhance the hydrolyzation in small protonated peptides resulting in an increase in DPPH scavenging activity. Scavenging of DPPH radical by a proton donating substance changes color from violet to yellow, which is detectable at absorbance of 490 nm [38]. Moreover, CHH derived from papain hydrolysis

showed the ability to quench the DPPH radicals similar to the papain hydrolyzed from *Camellia oleifera* seed cake protein hydrolysate [32].

3.3 Ferric Reducing Power Assay

Ferric reducing power assay is the method that exhibited an ability to reduce ferric cyanide complex [Fe³⁺(CN)₆]⁴⁻ into ferrous cyanide complex [Fe²⁺(CN)₆]⁴⁻ by donating electrons. The results show that CHH derived from trypsin hydrolysis by 4-h hydrolysis (4h-CHHt), CHH derived from trypsin hydrolysis by 6-h hydrolysis (6h-CHHt), CHH derived from papain hydrolysis by 2-h hydrolysis (2h-CHHp) and CHH derived from papain hydrolysis by 8-h hydrolysis (8h-CHHp) at the concentration (500 µg/ml) displayed significant ferric ion reducing power. 2h-CHHp displayed the highest reduction activity equivalent to Trolox of about 0.99 mM, while intact Hb, 4h-CHHt, 6h-CHHt and 8h-CHHp displayed reduction equivalents of 0.82, 0.16, 0.05 and 0.81 mM Trolox, respectively (Figure 3). Moreover, 500 µg/ml glutathione (positive control) effected significant ferric ion reduction equivalent to Trolox at 18.60 mM (data not shown). An absorbance increase can be correlated to the reducing ability of antioxidant. The compound with antioxidant reacts with potassium ferricyanide to

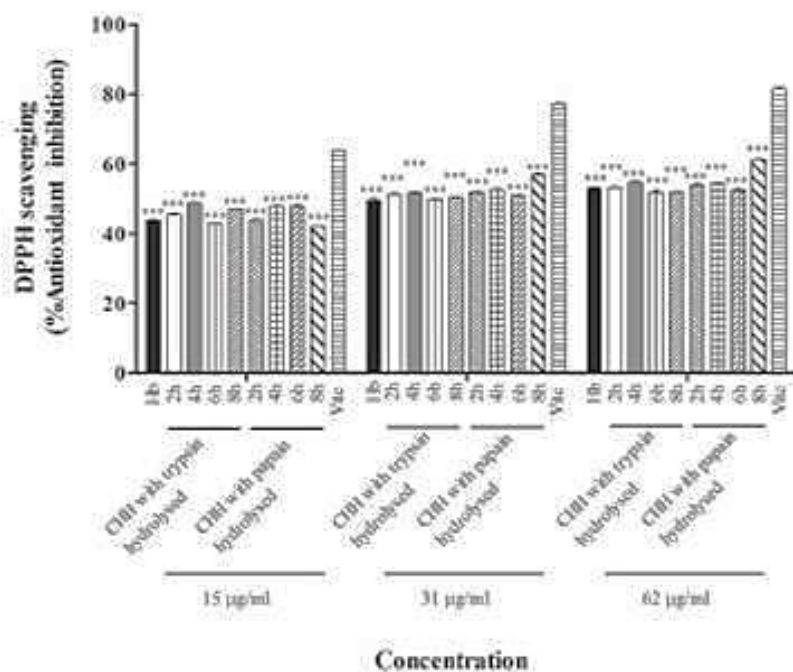


Figure 2. Antioxidant effect of CHHs derived from trypsin and papain digestion in DPPH radical scavenging assay. Each bar displays the mean $\pm$ SEM of three demonstrations. (***) $P < 0.001$ probability levels compared with vit C.

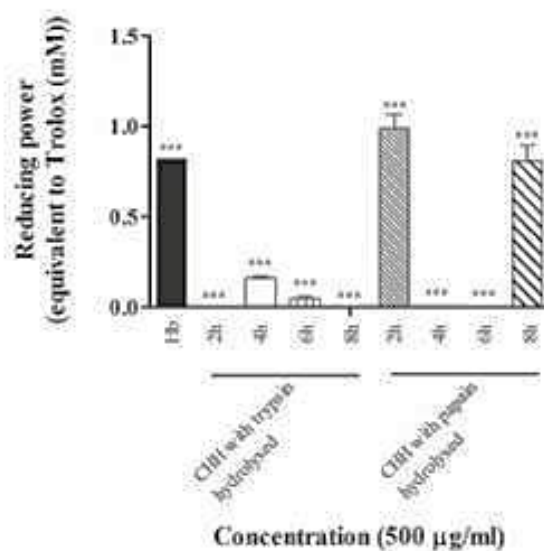


Figure 3. Reducing power of CHHs derived from trypsin and papain digestion at a concentration of 500 µg/ml expressed in Trolox equivalents. Each bar displays the mean $\pm$ SEM of three demonstrations. (***) $P < 0.001$ probability levels compared with glutathione.

form potassium ferrocyanide and this reacts with ferric trichloride, yielding ferric ferrocyanide, a blue coloured complex, with a maximum absorbance at 700 nm. It has been reported that protein hydrolysates containing Ile, His, Tyr, Pro and Lys residues with high reducing power show antioxidant activity as well as a great ability to donate electrons to form stable compounds and thereby interrupt the free radical chain reactions [39-40].

3.4 Linoleic Peroxidation Assay

Lipid peroxidation is considered to be a free radical process which occurs from unsaturated lipid oxidation process. Lipid peroxidation can damage double layer cell membranes leading to numerous products such as hydrocarbon compounds, ketone and aldehyde (especially malondialdehyde, MDA) [41]. The results of the linoleic peroxidation assay reveal that the different concentrations of CHHs (5-500 $\mu\text{g/ml}$) effected significant inhibition of linoleic peroxidation in a dose-dependent manner when compared with Trolox. CHH derived from trypsin hydrolysis by 8-h hydrolysis (8h-CHHr) at the concentration of 5 (IC_{50} value), 50 and 500 $\mu\text{g/ml}$ showed 76.34, 96.99 and 97.85% linoleic peroxidation inhibition, respectively. Meanwhile CHH derived from papain hydrolysis by 6-h

hydrolysis (6h-CHHp) at the concentration of 5 (IC_{50} value), 50 and 500 $\mu\text{g/ml}$ showed 91.95, 100 and 103% linoleic peroxidation inhibition, respectively (Figure 4). Moreover, Trolox (5, 50 and 500 $\mu\text{g/ml}$) showed 90.18, 92.73 and 93.99% of linoleic peroxidation inhibition and intact Hb (5, 50 and 500 $\mu\text{g/ml}$) showed 88.12, 88.99 and 91.55% inhibition. The results indicated that CHH derived from papain hydrolysis had significantly better linoleic peroxidation inhibition when compared with that of CHH derived from trypsin hydrolysis. The inhibitory effect of CHHp was similar to the hydrolysate of hoki skin gelatin where amino acid composition is rich in Gly, Pro, Glu, and Ala residues [42].

3.5 Measurement of Nitric Oxide, Cell Viability and Inflammatory Cytokines (IL-10 and IL-6) Production

The anti-inflammatory activity of intact Hb and CHHs were evaluated on the NO production, cell viability and inflammatory cytokines production against macrophage RAW 264.7 cells. The capability of inhibiting either the activity or production of nitric oxide (NO) can reduce the detrimental effects of inflammation. After induction of inflammation in macrophage RAW 264.7 cells by LPS addition for 24 h, the percentage of

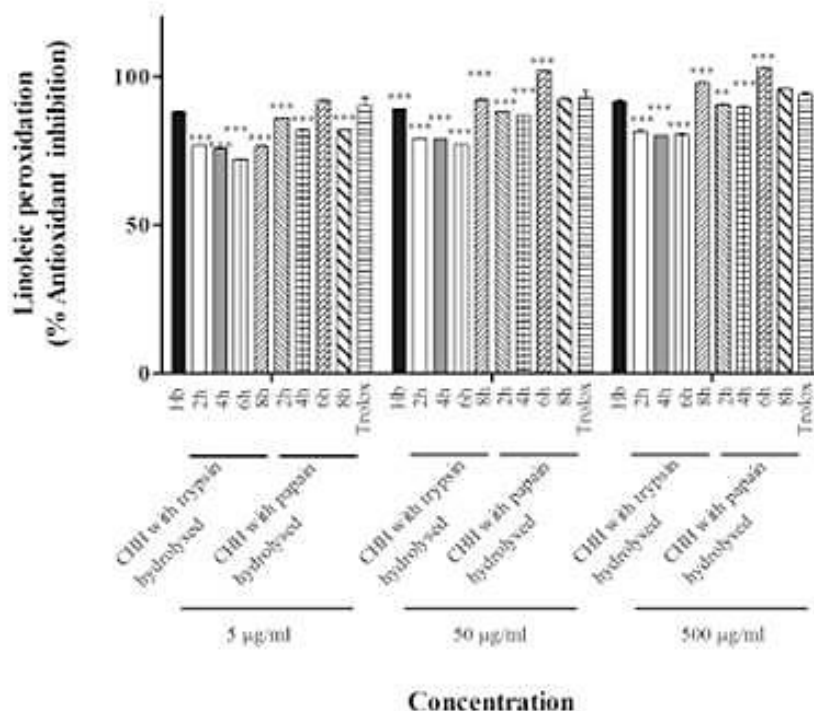


Figure 4. Linoleic peroxidation activity of CHHs derived from trypsin and papain digestion at a concentration of 5-500 $\mu\text{g/ml}$. Each bar displays the mean $\pm$ SEM of three demonstrations. (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$) probability levels compared with Trolox.

nitric oxide production was defined as 100%. Figure 5a, intact Hb and CHHs at concentrations of 125-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ show a decrease in nitric oxide production in a dose-dependent manner. CHH derived from papain hydrolysis by 2-h hydrolysis (2h-CHHp), 4h-CHHp, 6h-CHHp and 8h-CHHp at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ show nitric oxide production at 46.86, 66.26, 52.27 and 52.94%, respectively. CHH derived from trypsin hydrolysis by 8-h hydrolysis (8h-CHHt) at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ show nitric oxide production at 76.50%. In order to evaluate cytotoxic effects of CHHs against macrophage

RAW 264.7 cells, the viability of RAW 264.7 cells treated with defined concentrations of CHHs were examined (Figure 5b). The results indicate that all CHHs derived from trypsin hydrolysis and papain hydrolysis had no observable effect on cell viability. This result shows that CHHs derived from papain hydrolysis had high efficacy to reduce nitric oxide production than CHHs derived from trypsin hydrolysis. The report of O'Sullivan *et al.* [35] showed that bovine lung hydrolysates prepared using papain exhibited anti-inflammatory activity by decreasing IL-6, IL-1 β , and NO production in RAW264.7 cells and

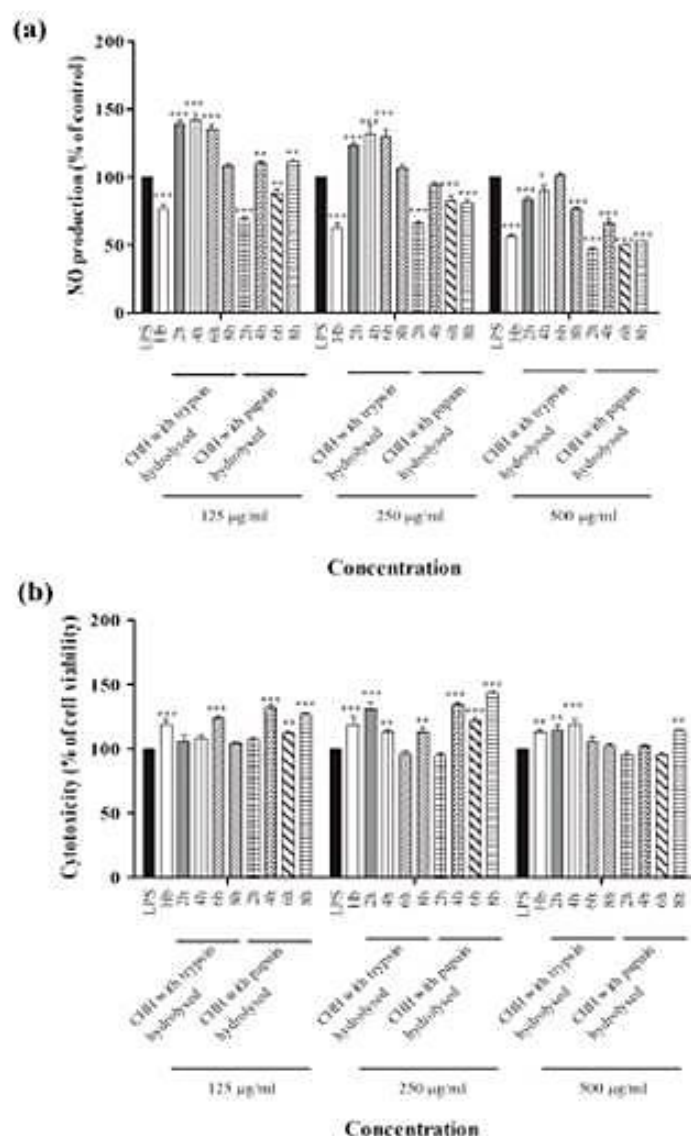


Figure 5. (a) The effect of CHHs derived from trypsin and papain digestion on NO production in LPS-activated macrophage RAW 264.7 cells and (b) the cytotoxicity (cell viability) of CHHs derived from trypsin and papain digestion on macrophage RAW 264.7 cells determined by the MTT assay. Each bar displays the mean $\pm$ SEM of four demonstrations. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$) probability levels compared with LPS treatment alone.

IL-2 production in Jurkat T cells. However, the decrease was likely due to cytotoxicity of this hydrolysate toward these cell lines. With excellent agreement with Phosri *et al.* [24], Jangpromma *et al.* [23] reported that crocodile Hb provides anti-inflammatory activity via the suppression of nitric oxide synthase (NOS), which inhibits the NO production and decreases inducible nitric oxide synthase (iNOS). The reports of Lueangakulthai *et al.* [25] revealed that hemoglobin hydrolysate with pepsin digestion showed anti-inflammatory activity with decreasing pro-inflammatory cytokines and cytokine mediator production

such as NO, IL-6, IL-1 β and PGE $_2$. Similarly, the current results indicated that 2h-CHMp showed the highest activity to inhibit IL-6 production (25.73 pg/ml) compared to LPS. 4h-CHMp, 6h-CHMp and 8h-CHMp showed the activity to inhibit IL-6 production about 28.36, 26.60 and 29.84 pg/ml, respectively (Figure 6a). Notably, 4h-CHHt, 6h-CHHt and 6h-CHMp showed significantly ability to reduce IL-10 production to about 90.41, 91.52 and 87.07 pg/ml compared to LPS (Figure 6b). 2h-CHHt showed non-significantly ability to reduce anti-inflammatory cytokines IL-10 (109.30 pg/ml). The results conclude

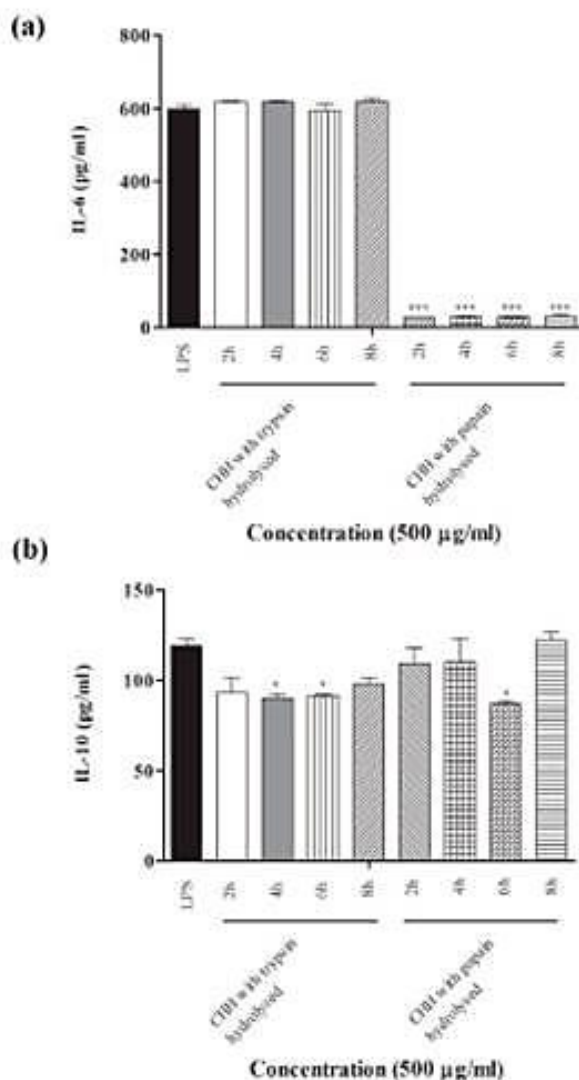


Figure 6. The effect of CHHs derived from trypsin and pepsin digestion at a concentration of 500 μ g/ml on LPS-stimulated (a) IL-6 and (b) IL-10 productions. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of three demonstrations. (* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$) probability levels compared with LPS treatment alone.

that CHH derived from papain hydrolysis has better efficacy than trypsin hydrolysis, CHH derived from papain hydrolysis by 2-h hydrolysis (2h-CHHp) was found to exhibit anti-inflammatory effects without toxic towards macrophage RAW 264.7 cells and possessed ability to decrease pro-inflammatory cytokine IL-6 production. The IL-6 is mediator for the production of inflammatory biomarkers, which consequently facilitates the progression of inflammation. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine, which facilitates the progression of anti-inflammation. IL-6 also induces the expression of multiple factors with anti-inflammatory properties, including IL-1R antagonist, soluble TNF receptors, IL-10, acute phase reactants, glucocorticoids, protease inhibitors (such as tissue inhibitor of metalloproteinase-1), and suppressors of cytokine signaling (SOCS)³ proteins [43]. IL-6 was decreased resulting in the decreasing of IL-10 production. Thus, the decreasing of IL-6 cytokines could retard or alleviate inflammation [44]. The collected results in this work indicate that the anti-inflammatory activity of CHH might be related to an interaction with the JAK/STAT pathway by their ability to decrease pro-inflammatory cytokine [45].

3.6 Amino Acid Composition Analysis

The amino acid composition is a characteristic feature of this protein. CHH derived from trypsin hydrolysis by 4-h hydrolysis (4h-CHHt) and CHH derived from papain hydrolysis by 2-h hydrolysis (2h-CHHp) both exhibited higher activity than other hydrolysates and the latter showed better antioxidant and anti-inflammatory activity. Both 4h-CHHt and 2h-CHHp were evaluated for their amino acid composition. 4h-CHHt contains 10 amino acids, including Thr, Gly, Cys, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, His and Lys at 9.74, 48.91, 15.14, 174.45, 61.11, 179.96, 32.76, 67.21, 137.30 and 101.24 $\mu\text{mol/l}$, respectively. 2h-CHHp contains 15 amino acids, including Thr, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Orn and Lys at 32.96, 66.94, 400.44, 276.62, 594.30, 24.93, 294.25, 28.36, 77.07, 563.54, 143.83, 246.75, 259.23, 38.97 and 103.06 $\mu\text{mol/l}$, respectively (Table 1). The papain hydrolysis showed higher antioxidant and anti-inflammatory activity than trypsin hydrolysis, the amino acid composition results revealed that papain hydrolysis has more amino acid residues that contain a higher quantity and variety of amino acids than trypsin hydrolysis. Several studies showed that antioxidant protein

Table 1. Amino acid composition of CHH derived from trypsin hydrolysis by 4-h hydrolysis (4h-CHHt) and CHH derived from papain hydrolysis by 2-h hydrolysis (2h-CHHp).

Amino acid ($\mu\text{mol/l}$)	Sample	
	4h-CHHt	2h-CHHp
L-Aspartic (Asp)	-	-
L-Threonine (Thr)	9.74	32.96
L-Serine (Ser)	-	-
L-Glutamic (Glu)	-	66.94
L-Proline (Pro)	-	400.44
L-Glycine (Gly)	48.91	276.62
L-Alanine (Ala)	-	594.30
L-Cysteine (Cys)	15.14	24.93
L-Valine (Val)	174.45	294.25
L-Methionine (Met)	-	28.36
L-Isoleucine (Ile)	61.11	77.07
L-Leucine (Leu)	179.96	563.54
L-Tyrosine (Tyr)	32.76	143.83
L-Phenylalanine (Phe)	67.21	246.75
L-Histidine (His)	137.30	259.23
L-Ornithine (Orn)	-	38.97
L-Lysine (Lys)	101.24	103.06
L-Arginine (Arg)	-	-

- Defines non-detection

hydrolysates hydrolyzed by trypsin and papain are enriched in Pro, Ala, Leu, Tyr, Phe, Cys, Gly, His and Val residues [46-51] which are major constituent amino acids in CHH papain hydrolysis. The antioxidant and anti-inflammatory activity of protein derived from papain hydrolysis results from elements of antioxidant amino acid residues and thiol groups that are presented in their molecule. In a previous study, Qian *et al.* [39] reported that Ile, His, Tyr, Pro and Lys are assumed to contribute to the reducing power of protein hydrolysates. In addition, peptides containing His and Tyr residues have been documented to exhibit protective effects against lipid peroxidation [52]. Hydrophobic amino acid side chains (e.g. Leu, Phe, Val and Ile) as well as positively charged amino acids (Lys, Arg and His) were documented to have a major influence on the anti-inflammatory activity of peptides [53-56].

4. CONCLUSION

Hemoglobin hydrolysate was derived from trypsin and papain hydrolysis of *C. siamensis* hemoglobin. CHH derived from papain hydrolysis is not only able to attenuate radical secretions of DPPH, ferric reducing and linoleic peroxide, but is also able to suppress LPS-induced nitric oxide production and pro-inflammatory cytokine IL-6 secretions in murine macrophages. These findings clearly indicate that CHH derived from papain hydrolysis possesses antioxidant and anti-inflammatory activities, which provide support for the application of hemoglobin hydrolysate against inflammation and oxidative stress-related disorders, however, further studies are required to identify active peptide sequences.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by the Royal Golden Jubilee Ph.D. program (RGJ-PHD program) (Grant No. PhD 0258/2552), the Corporation of Thailand Research Fund (TRF) and Chinese Academic of Sciences (CAS) Joint Research Fund (Grant No. DBG6080016) and the Thailand Research fund (TRF) (Grant No. MRG6180159). The Authors thank Grant Medlyn for improving and editing language in this manuscript.

REFERENCES

- [1] Young I.S. and Woodside J.V., *Clin Pathol*, 2001; 54: 176-186. DOI 10.1136/jcp.54.3.176.
- [2] Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn., Clarendon, Oxford, 2007.
- [3] Pham-huy L.A., He H. and Pham-huy C., *Int. J. Biomed. Sci.*, 2008; 4: 89-96.
- [4] Valko M., Rhodes C.J., Moneol J., Izakovic M. and Mazur M., *Chemico-Biol Inter.*, 2006; 160: 1-40. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [5] Aggarwal B.B., Shishodia S., Sandur S.K., Pandey M.K. and Sethi G., *Biochem Pharmacol.*, 2006; 72: 1605-1621. DOI 10.1016/j.bep.2006.06.029.
- [6] Khansari N., Shakiba Y. and Mahmoudi M., *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.*, 2009; 3: 73-80. DOI 10.2174/187221309787158371.
- [7] Federico A., Morgillo F., Tuccillo C., Ciardiello F. and Loguercio C., *Int J Cancer*, 2007; 121: 2381-2386. DOI 10.1002/ijc.23192.
- [8] Hussain S.P. and Harris C.C., *Int J Cancer*, 2007; 121: 2373-2380. DOI 10.1002/ijc.23173.
- [9] Ravipati A.S., Zhang L., Koryalamudi S.R., Jeong S.C., Reddy N., Bardett J., Smith P.T., Shanmugam K., Münch G., Wu M.J., Satyanarayanan M. and Vysetti B., *BMC Complement Altern Med.*, 2012; 12. DOI 10.1186/1472-6882-12-173.
- [10] Clare D.A. and Swaisgood H.E., *J Dairy Sci.*, 2000; 83: 1187-1195. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(00)74983-6.
- [11] Ofori J.A. and Hsieh Y.H.P., *In food additive Prof. Yehia El-Samragy* (ed). The use of blood and derived products as food additives, InTech, 2012. p. 229-256.
- [12] Fukada Y., Mizutani S., Nomura S., Hara W., Matsui R., Nagai K., Murakami Y., Washio N., Ikemoto N. and Terashima M., *J Food Sci Technol.*, 2016; 53: 2476-2481. DOI 10.1007/s13197-016-2233-9.
- [13] Shazly A.B., He Z., El-Aziz M.A., Zeng M., Zhang S., Qin F. and Chen J., *Food Chem.*, 2017; 232: 753-762. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.04.071.
- [14] Mukhopadhyay A., Noronha N., Bahar B., Ryan M.T., Murray B.A., Kelly P.M., O'Loughlin I.B., O'Doherty J.V. and Sweeney T., *Food. Sci. Nutr.*, 2014; 2: 712-723. DOI 10.1002/fsn3.153.
- [15] Ahn C.B., Cho Y.S. and Je J.Y., *Food Chem.*, 2015; 168: 151-156. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.05.112.
- [16] Joshi I., Sudhakar S. and Nazare R.A., *Appl Biochem Biotechnol.*, 2016; 180: 1128-1140. DOI 10.1007/s12010-016-2155-y.
- [17] Jandarnang J., Sritapetavee J., Thumman K., Songkietthigul C., Kottanai C., Daduang S., Dhixvinit A. and Thummanisirik S., *Protein J.*, 2012; 31: 43-50. DOI 10.1007/s10930-011-9372-7.
- [18] Srisongthong S., Pakdeesuwan A., Daduang S., Araki T., Dhixvinit A. and Thummanisirik S., *Protein J.*, 2012; 31: 466-476. DOI 10.1007/s10930-012-9424-7.
- [19] Phosri S., Mahakunakorn P., Lueangakulthai J., Jangpromma N., Swatsitang P., Daduang S., Dhixvinit A. and Thummanisirik S., *Protein J.*, 2014; 33: 484-492. DOI 10.1007/s10930-014-9581-y.
- [20] Maipiroen S., Anurud P., Klaynongkietuang S., Daduang S. and Boonmee A., *Protein Expr. Purif.*, 2016; 118: 55-63. DOI 10.1016/j.pep.2015.09.028.
- [21] Pakdeesuwan A., Araki T., Daduang S., Payongkietkuan

- W., Jangpromma N. and Klaynongruang S., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2017; 27: 26-35. DOI 10.4014/jmb.1603.03046.
- [22] Lueangrakulchai J., Jangpromma N., Temtisipong T., McKendrick J.E., Khunkitti W., Maddocks S.E. and Klaynongruang S., *J. Appl. Microbiol.*, 2017; 123: 819-831. DOI 10.1111/jam.13539.
- [23] Jangpromma N., Poolperat N., Pornti K., Anurud P., Kabbua T., Phosri S., Daduang S. and Klaynongruang S., *Chiang Mai J. Sci.*, 2017; 44: 800-815.
- [24] Phosri S., Jangpromma N., Patramanon R., Kongyingroet B., Mahakunakorn P. and Klaynongruang S., *Information*, 2017; 40: 205-220. DOI 10.1007/s10753-016-0471-7.
- [25] Lueangrakulchai J., Phosri S., Theansungroet T., Jangpromma N., Temtisipong T., McKendrick J.E., Khunkitti W. and Klaynongruang S., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2018; 65: 455-466. DOI 10.1002/bab.1628.
- [26] Yu Y., Hu J., Miyaguchi Y., Bai X., Du Y. and Lin B., *Peptides*, 2006; 27: 2950-2956. DOI 10.1016/j.peptides.2006.05.025.
- [27] Benjakul S. and Mccoskey M., *J. Agric. Food Chem.*, 1997; 45: 3423-3430. DOI 10.1021/jf970294g.
- [28] Girgh A.T., Udenigwe C.C. and Akoko R.E., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011; 88: 381-389. DOI 10.1007/s11746-010-1686-7.
- [29] Ledesma B.H., Hsieh C.C. and Delmon B.O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 390: 803-806. DOI 10.1016/j.bbrc.2009.10.053.
- [30] Tarano O.L., *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2013; 99: 1-11. DOI 10.1016/j.molcatb.2013.01.011.
- [31] Adler-Nissen J., *J. Agric. Food Chem.*, 1979; 6: 1256-1262. DOI 10.1021/jf60226a042.
- [32] Li X., Deng J., Shen S., Li T., Yuan M., Yang R. and Ding C., *J. Food Sci. Technol.*, 2015; 52: 5681-5690. DOI 10.1007/s13197-014-1693-z.
- [33] Shu G., Zhang Q., Chen H., Wu H. and Li H., *Acta Univ. Cihitensis, Ser. E: Food Technol.*, 2015; 19: 65-74. DOI 10.1515/aneft-2015-0015.
- [34] Asfy A.E.M.M.R., El Bazouy G.S., El Baz F.K., El Bakry H.H. and Murad A.S., *J. Genet. Eng. Biotechnol. (in press)*, 2018. DOI 10.1016/j.jgeb.2018.01.002.
- [35] O'Sullivan S.M., Lafarga T., Hayes M. and O'Brien N.M., *J. Food Biochem.*, 2017; 41: e12406. DOI 10.1111/jfbc.12406.
- [36] Chi C.F., Hu F.Y., Wang B., Li Z.R. and Loo H.Y., *Mar. Drugs*, 2015; 13: 2580-2601. DOI 10.3390/md13052580.
- [37] Shukla S. and Mehta A., *Chiang Mai J. Sci.*, 2017; 44: 929-938.
- [38] Yun-hui C., Zhang W. and Shi-ying X., *J. Cent. South Univ. T.*, 2006; 13: 160-165.
- [39] Qian Z., Jung W., Byun H. and Kim S., *Bioresour. Technol.*, 2008; 99: 3363-3371. DOI 10.1016/j.biortech.2007.04.005.
- [40] Han Y., Byun S.H., Park J.H. and Kim S.B., *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2015; 50: 1996-2003. DOI 10.1111/ijfs.12890.
- [41] Halliwell B., *Proc. Nutr. Soc.*, 1987; 46: 13-26. DOI 10.1079/PNS19870004.
- [42] Mendis E., Rajapakse N. and Kim S.K., *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53: 581-587. DOI 10.1021/jf048877e.
- [43] Ahmed S.T. and Ivashkin L.B., *J. Immunol.*, 2000; 165: 5227-5237. DOI 10.4049/jimmunol.165.9.5227.
- [44] Mao X.Y., Cheng X., Wang X. and Wu S.J., *Food Chem.*, 2011; 126: 484-490. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.11.025.
- [45] Yoshimura A., Nishinakamura H., Matsumura Y. and Hanada T., *Arthritis Res. Ther.*, 2005; 7: 100-110. DOI 10.1186/ar1741.
- [46] Jun S., Park P., Jung W. and Kim S., *Ear Food Res. Technol.*, 2004; 219: 20-26. DOI 10.1007/s00217-004-0882-9.
- [47] Je J.Y., Qian Z., Byun H. and Kim S., *Process Biochem.*, 2007; 42: 840-846. DOI 10.1016/j.procbio.2007.02.006.
- [48] Kim S.Y., Je J.Y. and Kim S.K., *J. Nutr. Biochem.*, 2007; 18: 31-38. DOI 10.1016/j.jnutbio.2006.02.006.
- [49] Ren J., Zhao M., Shi J., Wang J., Jiang Y., Cui C., Kakuda Y. and Xue S.J., *Food Chem.*, 2008; 108: 727-736. DOI 10.1016/j.foodchem.2007.11.010.
- [50] Ao J. and Li B., *Food Sci. Technol. Int.*, 2012; 18: 425-434. DOI 10.1177/1082013211428219.
- [51] Feng P., Ding H., Lin H. and Chen W., *Sci. Rep.*, 2017; 7: 7449. DOI 10.1038/s41598-017-08115-6.
- [52] Mouze A., Dominguez H. and Parajo J.C., *Process Biochem.*, 2006; 41: 447-456. DOI 10.1016/j.procbio.2005.07.014.
- [53] Vogel H.J., Schibli D.J., Jung W., Lohmeier-vogel E.K., Epand R.F. and Epand R.M., *Biochem. Cell. Biol.*, 2002; 80: 49-63. DOI 10.1139/o01-213.
- [54] Nan Y.H., Park K.H., Jeon Y.J., Park Y.K., Park I.S., Hahn K.S. and Shin S.Y., *Protein Peptide Lett.*, 2007; 14: 1003-1007. DOI 10.2174/092986607782541042.
- [55] Kovacs-Nolan J., Zhang H., Ibuki M., Nakamori T., Yoshizawa K. and Turner P.V., *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1820: 1753-1763. DOI 10.1016/j.bbagen.2012.07.007.
- [56] Chatterton D.E., Nguyen D.N., Bering S.B. and Sangild P.T., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013; 45: 1730-1747. DOI 10.1016/j.bioel.2013.04.028.
- [57] Majumder K., Chakrabarti S., Davidge S.T. and Wu J.J., *J. Agric. Food Chem.*, 2013; 61: 2120-2129. DOI 10.1021/jf3046076.
- [58] Kvak S.J., Kim C.S., Choi M.S., Park T., Sung M.K., Yun J.W., Yoo H., Mine Y. and Yu R., *J. Med. Food*, 2016; 19: 678-685. DOI 10.1089/jmf.2016.3685.

ภาคผนวก 2

ร่างต้นฉบับผลงานวิจัยเพื่อการตีพิมพ์

(Manuscript for Publication)

เรื่องที่ 1

Proteomic analysis of innate immune response in Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) against bacterium *Aeromonas hydrophila*

Bancha Mahong^a, Nisachon Jangpromma^{a,b}, Preeyanan Anwised^a, Wisarut Payoungkiattikun^a, Sakda Daduang^{a,d}, Yosapong Temsiripong^e, Sittiruk Roytrakul^f, Sucheewin Krobthong^g, Sompong Klaynongsruang^{a,c,*}

^aProtein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^bOffice of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^dDivision of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^eSriracha Moda Co., Ltd., Sriracha, Chonburi 20110, Thailand

^fProteomics laboratory, Genome Technology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Rd., Pathumthani Thailand 12120

*E-mail: somkly@kku.ac.th

Keywords: Bacterial inoculation, *Crocodylus siamensis*, *Aeromonas hydrophila*, Proteomics, Innate immunity

Highlights

- Proteomic analysis of WBC crocodile revealing cytoskeletal proteins and gene expression regulators are main up-regulated proteins both 1 and 24 hours after bacterial inoculation.
- Cytoskeletal proteins may contribute WBC to phagocytosis while gene expression regulators would accelerate synthesis proteins of bacterial resistance.
- Predominant serum proteins are down-regulated after bacterial inoculation which several of them playing a role in cell metabolism.

Abstract

Crocodiles have amazing innate immunity, because they have frequent injuries from fighting each other while living in pathogenic environments, but their wound healing recovery undergo rapidly and deaths from infectious diseases are rarely reported. Previously our observation found that RBC and WBC increase cell number around 2-folds after bacterial

inoculation 1 hour and whole blood cell was subjected to transcriptomic analysis to determine differentially expressed genes. The present study inoculated WBC and serum were performed proteomic analysis. In WBC analysis, 58 differentially expressed proteins (DEP) were up-regulated since 1h and other 51 DEPs also up-regulated at 24h when compared with 0h. Both protein groups had mainly biological function involving cell movement and gene expression regulators. This finding suggested that characteristic effective innate immune response in crocodile may accelerate WBCs movement via cytoskeletal protein to undergo phagocytosis along with preparing transcription machinery proteins to arrange the synthesis of bacteria-defense proteins. For serum analysis, predominant DEPs were down-regulated which those mainly played a role in metabolism and signal transduction, suggesting during inoculation crocodile try to be silent and decrease cell metabolism throughout the body for devoting energy to cope the pathogen.

Introduction

The innate immunity or non-specific immune system is the host defense mechanism against pathogen infection by accompanying functions of cell-mediated innate immunity, physical and chemical barriers, and humoral innate immunity mechanisms for eradicating or slowing down pathogen growth or breakthrough. When a microbial pathogen infects the host, the innate immune system initiates detection by pattern-recognition receptors (PRRs). PRRs are host pathological detectors which screen microbial invaders (Kumar et al., 2011). Innate immunity has been intensively investigated in mammals, but in vertebrates like reptiles it is still limited although it is also important in the context of understanding the evolution of primitive creatures to humans. Reptiles have an amazing physiological barrier for preventing pathogen invaders including a special skin structure that forms a thick epidermis (Alibardi et al., 2007), mucous cuticles which mainly are mucopolysaccharides, glycoproteins, glycolipids and lipids (Riera Romo et al., 2016). In addition the mucosa is basically biochemical and has low pH, hydrolytic enzymes that are highly capable at killing invading pathogens. Furthermore, they can secrete microbicidal compounds, for instance lysozyme and a variety of antimicrobial peptides (AMPs) which are the remarkable proteins in innate immunity. The lysozyme protein is usually secreted accompanying mucus that has a capable lysis bacterial cell wall. The reptile family, in particular turtle lysozyme, can damage the cell walls of various bacteria, both Gram-positive and Gram-negative (Thammasiriak et al., 2006). AMPs, which are small proteins, are mainly effective by damaging

bacterial cell walls, but undergo various types of attack (Duplantier and van Hoek, 2013). In reptiles, the relative conserved peptides group across the Reptilia Class includes defensins, cathelicidins and hepcidin. Defensins and cathelicidins are present in the mucous secretion of fish and reptiles like the European pond turtle (*Emys orbicularis*) and the banded krait (*Bungarus fasciatus*) (Riera Romo et al., 2016). Naturally isolated β -defensin and cathelicidin-BF from reptiles display antibacterial activity against *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, as well as antifungal activity against *Candida albicans* (Stegemann et al., 2009; Wang et al., 2008). There are other cationic peptides from different vertebrates such as piscidin, pleurocidin and pelovaterins from fish and turtles (Lakshminarayanan et al., 2008).

Proteomics has been used broadly to study reptiles. Darville et al. (2010) conducted a proteome analysis of WBCs used 2D gel accompany with mass spectrometry from the American alligator (*Alligator mississippiensis*) and found 43 proteins that exhibit sequence similarities to proteins from other vertebrate species. Notably, the proteins related to the cytoskeletal system, which play a crucial role in cell mobility and phagocytosis. Another study established the functional skin proteome of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). The study identified 249 proteins from skin, 155 proteins from mucus, and 97 proteins from molting. Gene Ontology (GO) analysis suggests that there may be proteins involved in various physiological processes (Geng et al., 2015). Proteomics screening of Komodo dragons hosted numerous pathogenic bacteria in saliva and rapid wound healing upon being injured was found, with 48 new cationic antimicrobial peptides from plasma. Some of them showed experimentally effective bacterial resistance against *P. aeruginosa* and *S. aureus* (Bishop et al., 2017). There are a small number of proteomic studies in crocodile and innate immune response studies in crocodiles are still limited. Herein, the innate immunity response against *A. hydrophila*, a heterotrophic gram-negative bacteria, was measured in *C. siamensis*. Then bacterial infection response-proteins during 0h, 1h and 24h after the inoculation were profiled in WBC and serum by a proteomics approach.

Materials and methods

Bacterial preparation

A. hydrophila was pre-cultured in Nutrient Broth (NB) at 37 °C with shaking for 18 h, then inoculated in the same medium and incubated at 37 °C until OD₆₀₀ equaled 1.0, which corresponds to 1×10^9 cells ml⁻¹ (Reyes-Becerril et al., 2016). The bacterial culture was

centrifuged and then washed with phosphate-buffered saline (PBS 7.4). Bacterial cells were re-suspended with PBS again and 1ml of 1×10^9 cells ml^{-1} was used for immunization.

Crocodile treatment

Male crocodiles (*C. siamensis*) around 4-year old from Sriracha Moda Farm Co., Ltd. (Chon Buri, Thailand) were used. A blood sample was withdrawn from the supravertibral branch of the internal jugular vein (pre-inoculation blood sample or 0h), while the withdrawn blood volume from each crocodile was correlated to the size of the animal. Immunization of the crocodile with *A. hydrophila* was done at a concentration of 1×10^9 CFU ml^{-1} ml, by intraperitoneal injection into the bloodstream. At 1h and 24h after inoculation, the inoculated blood was withdrawn. Each blood sample was examined including observation of WBC and red blood cell (RBC) morphological change, WBC and RBC counts.

Preparation and extraction of crocodile protein from WBC and serum

In order to prepare WBC, whole blood was collected in 15 ml sterile tube containing 0.89% EDTA and left at 4 °C for 30 minutes or until plasma, WBC, and RBC level appearing. Afterward, WBC level was gently sucked up. Serum, withdrawn from the whole blood sample, was transferred to 15 ml sterile tubes and left for around 30 minutes. Clotting blood appeared to have two layers; the upper part appearing as a clear red solution is serum, and the lower part appearing as a red solid is RBCs. Serum was centrifuged to completely isolate it from other components.

Sample preparation for gel-based proteomics analysis

Each crude protein of serum and WBC was added to a lysis buffer containing 1% SDS in 50mM Tris-HCl pH 6.8. The solutions were homogenized with sonication ~ 10 sec, twice (Amplitude = 80%). To concentrate protein and remove interfering compounds in the electrophoresis step, crude protein was precipitated in ice-cold acetone, supplemented with 10 (w/v) % trichloroacetic (TCA) and 0.07 (v/v) % β -mercaptoethanol, and was left overnight (for at least 16 hours) at -20 °C. The white platelet pellet was afterwards washed with 50mM Dithiothreitol (DTT) ice-cold acetone twice, being careful to not dislodge the protein pellet. The pellet protein was air dried and consequently used in electrophoresis. For WBC proteomics, inoculated and non-inoculated WBCs were isolated from other contaminants, and then further divided into 2 fractions. The first was subjected to 4-20% gradient Bis-Tris

SDS-PAGE to observe protein features and to compare how three protein sources exhibit different aspects, and another fraction was subjected to liquid chromatography tandem-mass spectrometry or LC-MS/MS mass spectrometry to quantitate and identify proteins. To perform label-free proteomics analysis, the protein pellet was solubilized in 0.2% RapiGest SF Surfactant (Water, USA) in 20 mM ammonium bicarbonate to enhance protein solubilization. The protein concentration was estimated by Micro BCATM protein assay kit (Thermo Scientific, USA) using Bovine Serum Albumin, Factor V (Sigma, USA) as standard (0-40 µg/ml. concentration range). The absorbance at 562 nm was measured to construct the standard curve to evaluate protein concentrations.

Gel-free trypsin digestion for the proteomics approach

The mixture proteins were subjected to in-solution digestion following E-Kobin et al. (2016) with minor modifications. Briefly the sulfhydryl bonds were reduced using 5 mM Dithiothreitol (DTT) in 10 mM ammonium bicarbonate at 60 °C for 1 hour and alkylation of sulfhydryl groups using 15 mM Iodoacetamide (IAA) in 10 mM ammonium bicarbonate at room temperature for 1 hour in the dark. After alkylation, enzymatic digestion was performed using trypsin (Promega, Germany); 1 ng of the enzyme: 50 ng of proteins was added and incubated at 37°C to maximize enzymatic digestion activity overnight. The tryptic peptide solution was dried under vacuum, then re-suspended in 0.1% formic acid in LC-MS water, followed by desalting with a C18-ZipTip (Metler, UK). Eluted peptides (15% - 60% Acetonitrile/0.1%formic acid) were injected into the NanoAcquity system.

Protein quantitation using tandem mass spectroscopy (SynaptHDMS)

Dried peptides were protonated by formic acid before injection into the NanoAcquity system (Waters Corp., Milford, MA). Symmetrical C₁₈ 5 µm, 180-µm × 20-mm Trap column and a BEH-130 C₁₈ 1.7 µm., 100-µm × 100-mm analytical reversed phase column (Waters Corp., Milford, MA) were used. Linear elution was performed with 400 nL/min using 2 eluents. The first eluent was water with 0.1% formic acid and the second eluent was 100% Acetonitrile with 0.1% Formic acid. 100 nanogram of protonated peptides (2 µL) was eluted using a linear gradient for 20 minutes. 200 fmol of [Glu¹] fibrinopeptide B (Waters Corp., Manchester, UK) was used as an external lock mass for calibration. The positive mode of peptides was analyzed using a SYNAPTTM HDMS mass spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK). A quadrupole mass analyzer was adjusted to Data-dependent acquisition

(DDA) mode to scan the range of mass per charge ratio from 300 to 1,800. For quantitative proteomics, DeCyder™ MS 2.0 was used to convert the multiple MS/MS dataset including the observed mass per change (m/z), intensity, and charge state of the precursor peptide into mascot generic format (.mgf) files. The mgf files were identified by searching the MS/MS data against the NCBI-nr database (August 07, 2015) using the MASCOT algorithm (Matrix Science version 2.2, London, UK) available in Bruker Daltonics BioTools 2.2 software (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany). The MASCOT algorithm had the following parameters set during the MS/MS ion search; proteolytic enzyme was set to trypsin, fixed modification was carbamidomethyl and variable modifications was Deamidation (NQ), Oxidation (M), Phospho (ST) and Phospho (Y), 1 site was allowed for missed cleavage.

Statistical Analysis

Averaged protein intensities among 0h, 1h and 24h were subjected to statistical analysis by the pair-wise *t*-test with 95% significance level (p -value <0.05). The mean intensity of the significantly different proteins both up-regulated and down-regulated from WBC and serum generated a Hierarchical clustering using TMEV MeV version 4.9.0 software.

Result

Analysis of protein aspect from WBC and serum on SDS-PAGE

Whole blood is a mixture of various cell types, colloids and crystalloids. it is generally divided into different blood components including RBCs, WBCs, platelets, and plasma. In investigation blood count found both RBC and WBC number increase around two-folds at 1 hour after inoculation compared with pre-inoculation (Unpublished data). Noticeably Siamese crocodile has RBC number higher than WBC around 25-folds in blood stream (Unpublished data) and whole blood cell after inoculation with *A. hydrophila* were performed transcriptomics which mainly represent gene expression in RBC, thus this work the material of interest was WBC and serum to determine in proteomic analysis. The SDS-PAGE analysis of the WBC protein extract from 0h and 1h samples revealed patterns that were little difference. For instance, the protein bands between 0h and 1h of 7-20 kDa range had a similar range, but 20-29 kDa in 1h were thicker (Fig. 1A). However, the 24h protein pattern was obviously different from 0h and 1h across small to big proteins, in other words these proteins are probably responsible for playing crucial roles in biological mechanisms against bacterial infection, thereby causing a dramatic change of proteins revealing both up-

and down-regulation (Fig. 1A). For serum protein analysis in SDS-PAGE, the major protein distribution was dispersed at high molecular weight from 70 kDa to 200 kDa, in which the largest amount of protein in the fraction would be albumin, with apparent size around 80 kDa. Lower, from 7 kDa to 70 kDa, there was a low protein amount and the redundant protein at 26 kDa corresponded to the Immunoglobulin (IgG) light chain. The protein pattern of three time points was not much different. There were several protein bands obviously exhibiting different intensities in 0h compared to 1h and 24h. For instance the protein size around 70 kDa and 7 kDa had a bigger band at 0h over 1h and 24h. On the other hand, the band around 22 kDa at 24h showed a thinner band than 0h and 1h (Fig. 1B).

Identification of WBC protein with LC-MS/MS

Besides SDS-PAGE analysis to determine protein profile, another fraction of WBC and serum protein was subjected to LC-MS/MS. After performing solution tryptic digestion, and then injecting trypsinized mixture peptide into the mass spectrometer, the spectra obtained were blasted against the Mascot search engine (<http://www.matrixscience.com/>). The obtained LC-MS/MS spectra of WBC mostly corresponded with saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). Regarding altered protein intensity with 1.5 fold change both up-regulation and down-regulation and $p < 0.05$ compared with 0h was considered as differentially expressed protein (DEP). There were 109 up-regulated DEPs (Table S1, S2) and 7 down-regulated DEPs (Table S3) compared with 0h. Meanwhile for serum proteomic analysis, there were 3 up-regulated DEPs and 19 down-regulated DEPs compared with 0h (Table S4). All DEPs was further sorted according to their biological functions based on either the UniProtKB Protein knowledgebase <https://www.uniprot.org/uniprot/> or the NCBI database.

The 109 up-regulated DEPs in WBC were further classified into two groups. First group 59 DEPs significantly increased expression since 1h of inoculation (Table S1), while another group 51 up-regulated DEPs increased at 24h (Table S2). When 58 DEPs were sorted according to their biological functions, included 1) cytoskeleton/trafficking/cell movement, 2) transcription/translation, 3) metabolism, 4) signal transduction, 5) miscellaneous protein, 6) unknown function proteins which number of protein ordered 15, 21, 7, 10, 3, 3 respectively and 51 up-regulated DEPs were ordered 19, 14, 3, 4, 9, 1, respectively. Taken together illustrated protein expression level of two groups were shown as a hierarchical clustering (Figure 2A and 2B). Expression protein level was clustered according to level and similarity of

expression pattern that is easily for comparison. For instance, (Figure 2A) gi|1121884878 and gi|1121888712 having similar expression was paced at the top, likewise gi|1121907972, gi|1121821053 and gi|1121821053 also were paced at the bottom. Interestingly, in up-regulated DEPs since 1h, although there were 59 DEPs, 7 DEPs saturated expression since 1 hour of inoculation and plateau until 24 hours (Fig. 4A) which among four of them were transcription factor (TFs) and transcription activators (TRs) including TFs; transcription initiation factor TFIID subunit 1 (TAF1) and zinc finger protein castor homolog 1 (CASZ1) and TR; importin-9 (IPO9) and KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 (KHDRBS1) (Table 1). This finding similar to our transcriptomic result that also found increasing TFs gene expression level since 1 hour of bacterial inoculation. Although 1h consisted of 59 up-regulated DEPs, their heatmap intensity was not different several folds compared with 0h (Fig.2A), whereas intensity of 0h and 1h was comparable but obviously differed with 24h several folds (Fig. 2B). This notice was consistently with SDS-PAGE analysis.

Sorting up-regulated WBC proteins with the Panther classification system

To annotate with a nearby evolutionary organisms, the Panther classification system (<http://pantherdb.org/>) was contributed using chicken (*Galus galus*) as references because was phylogenetically grouped into Archosaur which includes birds and crocodilia (van Hoek, 2014). All 109 up-regulated DEPs could be hit to just 39 gene of *G.galus* following the criteria of Panther classification system. These 39 genes further were grouped against the following 5 categories of PANTHER ontologies. A) Molecular function hit 22 proteins, B) In biological processes corresponded to 46 processes, C) For the cellular component hit 17 component, D) Pathway and F) the protein class had 8 and 18 number of hits respectively (Fig. 5).

Identification of serum protein with LC-MS/MS

Unlike WBC protein profile with almost up-regulating, in serum proteomic detected 19 proteins as down-regulated DEPs and 3 up-regulated DEPs. Their present levels during inoculation were illustrated as a hierarchical clustering (Fig.3) and DEPs were sorted following biological functions groups similar WBC rationale (Table S4). Interestingly, there were some proteins having interesting pattern that may contribute to explain Siamese crocodile response to bacterial inoculation. 8 proteins were immediately down-regulated after inoculation since 1h and constantly expressed until 24h (Fig. 4B) which 3 of 8 DEPs function in lipid metabolism including ADP-ribosylation factor-like protein, lipoxigenase homology

domain-containing protein 1, probable phospholipid-transporting ATPase VB. The finding suggested during initial bacterial infection response, crocodile may decrease cell metabolism rate to keep energy for pathogenic fighting.

Discussion

Characteristics of WBC protein profile after 1h and 24h inoculation

After bacterial *A. hydrophila* inoculation by subcutaneous injection to Siamese crocodiles, WBC number was increased around two-folds at 1h compared with 0h (in press data). Straightforwardly bacterial immunization normally boosts up number of WBCs because several types of WBC migrate from bone marrow pool to blood vessel to accomplish killing invader. However, the interesting notice of bacterial challenging in Siamese crocodile is that 1h is too fast of the response compared with other organisms upon bacterial inoculation. Generally in human WBCs initially increase in blood stream around 4-8 hours after infection and their number are peaked around 48h (Honda et al., 2016). This may one of explanation of crocodile having terrific innate immune system via WBC manner before pathogenic spreading out through their body. Thus, it led to curious point how protein level responds to inoculation. Proteomic analysis in WBC was performed to reveal protein expression profile and may address why increase of WBC number and onset of pathogenic response proteins in crocodile is very faster than other animals that spend time of provoking several hours or a few days after infection (Causey et al., 2018; Waage et al., 1989). Bacterial inoculation at 1h found up-regulated 59 DEPs. This group is quite meaningful to contribute understanding and comparing the protein profile difference of innate immune response between crocodile and other vertebrates that susceptible to bacterial infection. These proteins consisted of two main groups, Cytoskeleton/Trafficking/Cell movement and gene expression regulator, suggesting powerful pathogen eradication in crocodile in early response plays through two group protein functions. The response with proteins in Cytoskeleton/Trafficking/Cell movement tasks would be that WBCs undergo phagocytosis or move toward pathogenic bacteria. First, 3 actins which are a monomer of microfilament and main responsibility being cell strength and cell movement were up-regulated namely; actin aortic smooth muscle actin, cytoplasmic 2, actin-like. For other cytoskeletal proteins were kinesins and dyneins. Kinesins move along microtubules to carry cargo such as proteins from the center of a cell to its periphery while dynein also move along microtubules in cells. They may contribute to transfer cellular cargos which are bacterial response proteins, drive the beat of eukaryotic

cilia and flagella (Henry et al., 2006). Moreover other proteins also involve in cell movement such as T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein (Tiam) 1 and 2 contribute cancer cell migration (Adams et al., 2010; Rooney et al., 2010), nephrocystin-4 is an actin cytoskeleton organization (Donaldson et al., 2002). For gene expression regulator, were some transcription factor proteins such as zinc finger and BTB domain-containing protein, zinc finger protein 135-like, zinc finger protein castor homolog 1 which they bind DNA to make certain regions looser and to allow easier association with other molecules, thereby contribute to transcription and translation consequently (Fu and Blackshear, 2017). In addition RRP12-like protein and fibrosin-1-like protein and importin-9 are implicated in importing nuclear proteins to the nucleus, and these proteins play an important role in the transcription machinery (Jäkel et al., 2002). Moreover, some proteins participate in metabolism including Acyl-CoA dehydrogenase family member 9 mitochondrial protein which is an enzyme in fatty acid β -oxidation that contributes to the initial step of fatty acid metabolism (Nouws et al., 2010). Another protein Aldehyde dehydrogenase family 16 member is family participates catalyse the oxidation of aldehydes to carboxylic acids and produce NADH to generate ATP. Generally vertebrate cell can product endogenous aldehydes from metabolism of amino acids, carbohydrates, lipids, biogenic amines etc. (Vasiliou et al., 2005). Crocodile may use these enzymes to increase ATP amount to supply the cytoskeletal protein for their function during movement and phagocytosis. Interestingly of up-regulated DEPs in 1h, 7 proteins increase saturated expression since 1h which 4 of them could accelerate gene transcription rate. They included 2 TAs namely KHDRBS1 and IPO9 and TFs namely TAF1, CASZ1 probably work together to accelerate production new bacterial response proteins.

For WBC proteomic profile of up-regulated DEPs at 24h of inoculation, there still were cytoskeletal proteins up-regulation such as F-actin-capping protein, nebulin, and myosin-10. F-actin capping protein is responsibility to binds in fast-growing ends of actin filaments (barbed end), consequently blocking the exchange of subunits at these ends. The nebulin, myosin-10 and actin bind each other for stability (Root and Wang, 1994). The bind three of them may be synergistic work for effectiveness cytoskeleton in phagocytosis. There are 3 different histone isoforms; histone H1.01-like, histone H1-like, histone H1x. Three of them may possibly function in chromatin modification or maintain chromatin structure to prolong cell death. The increase histone protein level in yeast extends its lifespan (Feser et al., 2010). Two DEPs, histone-lysine N-methyltransferase ASH1L and histone-lysine N-

methyltransferase KMT5B, are responsible for the transfer of a methyl group to lysine and arginine residues of histone which is one of transcription regulation route. Methylated histones in some cases can activate transcription like N-methyltransferase ASH1L, which can bind to the 5'-transcribed region of actively transcribed genes, but it prefers co-functioning with other proteins (Tanaka et al., 2011). In this inoculate we found two kinase proteins up-regulated namely Serine/threonine-protein kinase Sgk3 and receptor tyrosine-protein kinase erbB-4. Phosphorylated proteins are important for host-microbe interactions in term of cell signaling. The importance of phosphoproteomic and kinomic protein as well as how do identify two groups of protein during bacterial challenging was reviewed by (Richter et al., 2016).

In another protein classification to be more confident in biological prediction function, up-regulated WBC proteins were sorted by the Panther classification system using chicken *G. galus* corresponding proteins because crocodile and chicken are highest evolutionally sharing ancestor (van Hoek, 2014). Previously Mikšik et al. (2018) used Panther to group Siamese crocodile eggshell proteins by searching for corresponding human proteins. Since characterization of crocodile protein functions is important in term of to decipher the powerful of innate immunity and evolution from dinosaur, retile and avian. All 109 DEPs found matching to 39 chicken proteins and further classify into 5 ontologies which is worthy for further work to understand the innate immunity in crocodile that currently still is limited information.

Serum protein pattern

Our serum protein expression response to inoculation found contrasting WBC proteomic profile. 19 down regulated-DEPs mainly involved in metabolism and signal transduction processes. Among them there were 8 proteins decrease since 1h after bacterial inoculation and 3 of them including ADP-ribosylation factor-like protein 13B, lipoxygenase homology domain-containing protein 1, probable phospholipid-transporting ATPase VB involving metabolism (Takatsu et al., 2011; Pasqualato et al., 2002), suggesting crocodile try to decrease metabolism late to keep energy for bacterial resistant pathways. Nonetheless, other proteins do not have solid references to precisely point out the reason why they decrease when crocodile is inoculated. Because protein in serum is pooled protein from various cell types throughout crocodile body in particular liver (Infusino and Panteghini, 2013). The decreased protein level may suggest a slowdown of normal metabolism and

signaling for cell growth to keep energy for devoting to pathogen resistant mechanisms. This finding may apply to pathogen infection diagnosis using certain predominant decreasing proteins in this study as protein markers particular in crocodiles, because serum or plasma are easily taken from animals.

Conclusion

Innate immunity in Crocodylidae is far from complete. Crocodile is interesting animal model to study innate immunity because it can response to bacterial infection rapidly. We inspected total WBC number and determine WBC and serum proteomics. We seem to decipher some interesting points that why crocodile has high potential of bacterial eradication in infectious area over other aquatic animals. Increase number of WBCs since 1h of inoculation is too fast in vertebrate system which normally takes several hours or a few days. This observation may be one of reason to raise that crocodile WBCs are partial of professional bacteria killer. Proteomic in WBC also can hint a clue of innate immunity powerful. WBCs consist of different types and slightly different duties to response invading pathogen. Its proteomic profile could detect protein expression change since 1h of inoculation. The outstanding protein groups were protein involving cytoskeleton and cell movement and acceleration of transcription process. In 24 h main up-regulated DEPs still are involving in cell movement and contribution of transcription, suggesting crocodile WBCs may increase rate of phagocytosis and newly synthesizing proteins proportional to time of inoculation. In crocodile system to flight with bacteria invader during first 24 hours of inoculation, WBCs are thought to perform phagocytosis and accelerate synthesizing bacteria-response proteins and speed up metabolism to supple energy for WBC.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

BM, NJ, SD, SOK designed the study. BM, NJ, PA, WP performed the experiments. BM, NJ, SR, SUK analyzed the data. BM, NJ, PA, WP, SD, SOK discussed the results. BM, SOK wrote the manuscript. YT provided Siamese crocodile. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This research was financial supported by the Thailand Research Fund (TRF), grant no. DBG6080016. We are also grateful to the Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University.

References

- Adams H.C., Chen R., Liu Z., Whitehead I.P (2010) Regulation of breast cancer cell motility by T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein. *Breast Cancer Res*12:R69.
- Alibardi, L., Toni, M., Valle, L.D., 2007. Hard cornification in reptilian epidermis in comparison to cornification in mammalian epidermis. *Exp Dermatol.* 16, 961–976.
- Bishop, B.M., Juba, M., Russo, P.S., Devine, M., Barksdale, S.M., Scott, S., Settlege, R., Michalak, P., Gupta, K., Vliet, K., Schnur, J.M., van Hoek, M.L.J., 2017. Discovery of novel antimicrobial peptides from *Varanus komodoensis* (*Komodo Dragon*) by large-scale analyses and de-novo-assisted sequencing using electron-transfer dissociation mass spectrometry. *Proteome Res.* 16, 1470– 1482.
- Causey, D., Pohl, M., Stead, D., Martin, S., Secombes, C., Macqueen, D., 2018. High throughput proteomic profiling of the fish liver following bacterial infection. *BMC Genomics.* 19, 719.
- Darville, L.N.F., Merchant. M.E., Hasan, A., Murray, K. 2010. Proteome analysis of the leukocytes from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol Part D.* 5, 308-316.
- Donaldson J.C., Dise R.S., Ritchie M.D., Hanks S.K. Nephrocystin-conserved domains involved in targeting to epithelial cell-cell junctions, interaction with filamins, and establishing cell polarity. *J. Biol. Chem.* 2002;277:29028–29035.
- Duplantier, A.J., van Hoek, M.L. 2013. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Front. Immunol.* 4, 143 E-
- Kobin, T., Thongarm, P., Roytrakul, S., Meesuk, L., Chumnannpuen, P., 2016. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Comput Struct Biotechnol J.* 14, 49–57.
- Feser, J., Truong, D., Das, C., Carson, J.J., Kieft, J., Harkness, T., Tyler, J.K., 2010. Elevated histone expression promotes lifespan extension. *Molecular Cell.* 39, 724-735.

- Fu, M., Blackshear, P.J., 2017. RNA-binding proteins in immune regulation: a focus on CCCH zinc finger proteins. *Nature Reviews Immunology*. 17, 130-143.
- Geng, X., Wei, H., Shang, H., Zhou, M., Chen, B., Zhang, F., Zang, X., Li, P., Sun, J., Che, J., Zhang, Y., Xu, C., 2015. Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *J Proteomics*. 119, 196-208.
- Henry, T., Gorvel, J.P., Meresse, S., 2006. Molecular motors hijacking by intracellular pathogens. *Cell Microbiol*. 8, 23–32.
- Honda, T., Uehara, T., Matsumoto, G., Arai, G., Sugano, M., 2016. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta*. 457, 46–53.
- Jäkel, S., Mingot, J.M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., Görlich, D. 2002. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J*. 21, 377–386.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2011. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*. 30, 16–34.
- Lakshminarayanan, R., Vivekanandan, S., Samy, R.P., Banerjee, Y., Chi-Jin, E.O., Teo, K.W., Jois, S.D., Kini, R.M., Valiyaveetil, S., 2008. Structure, self-assembly, and dual role of a β -defensin-like peptide from the Chinese soft-shelled turtle eggshell matrix. *J Am Chem Soc*. 130, 4660–4668
- Mikšik, I., Paradis, S., Eckhardt, A., Sedmera, D., 2018. Analysis of Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Eggshell Proteome. *Protein J*. 37, 21-37.
- Nouws, J., Nijtmans, L., Houten, S.M., van den Brand, M., Huynen, M., Venselaar, H., Hoefs, S., Gloerich, J., Kronick, J. Hutchin, T. Willems, P. Rodenburg R., Wanders, R. van den Heuvel, L., Smeitink, J., Vogel, R.O., 2010. Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell Metab*. 12, 283-294.
- Pasqualato S, Renault L, Cherfils J (2002). "Arf, Arl, Arp and Sar proteins: A family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication". *EMBO Reports*. 3 (11): 1035–1041.
- Řehulka, J., 2002. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology, and biochemistry. *Acta Veterinaria Brno*. 71, 351-360.
- Reyes-Becerril. M., Angulo. C., Angulo, M., Ascencio, F., 2016. Changes in transferrin gene expression after exposure to iron and *Aeromonas hydrophila* infection in yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*). *Agri Gene*.1, 79-87.

- Richter, E., Mostertz, J., Hochgräfe, F., 2016. Proteomic discovery of host kinase signaling in bacterial infections. *Proteomics. Clinical Applications*, 10, 994–1010.
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., Castillo Ferrer, C., 2016. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*. 148, 125–139.
- Rooney C, White G, Nazgiewicz A, Woodcock SA, Anderson KI, Ballestrem C, and Malliri A (2010) The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO Rep*. 11:292–298.
- Root D.D., Wang, K., 1994. Calmodulin-sensitive interaction of human nebulin fragments with actin and myosin. *Biochemistry* 33, 12581–12591.
- Stegemann, C., Kolobov, A.J., Leonova, Y.F., Knappe, D., Shamova, O., Ovchinnikova, T.V., Kokryakov, V.N., Hoffmann, R., 2009. Isolation, purification and de novo sequencing of TBD-1, the first β -defensin from leukocytes of reptiles. *Proteomics*. 9, 1364–73.
- Takatsu, H. et al. ATP9B, a P4-ATPase (a Putative Aminophospholipid Translocase), localizes to the trans-golgi network in a CDC50 protein-independent manner. *J. Biol. Chem.* 286, 38159–38167 (2011).
- Tanaka, Y., Kawahashi, K., Katagiri, Z., Nakayama, Y., Mahajan, M., Kioussis, D., 2011. Dual function of histone H3 lysine 36 methyltransferase ASH1 in regulation of Hox gene expression. *PLoS ONE*. 6, e28171.
- Thammasiriak, S., Ponkham, P., Preecharram, S., Khanchuan, R., Phonyothee, P., Daduang, S., Srisomsap, C., Araki, T., Svasti, J., 2006. Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. *Comp Biochem Physiol*. 143, 209–17.
- van Hoek, M.L., 2014. Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals* (Basel). 7, 723–53.
- Vasiliou, V., Nebert, D.W., 2005. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene family. *Human Genomics*. 2, 138–143.
- Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T., 1989. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*. 169, 333–338.
- Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Wang, A., Lin, D., Lai, R., 2008. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotic. *PLoS ONE* 3, e3217.

Figure legend

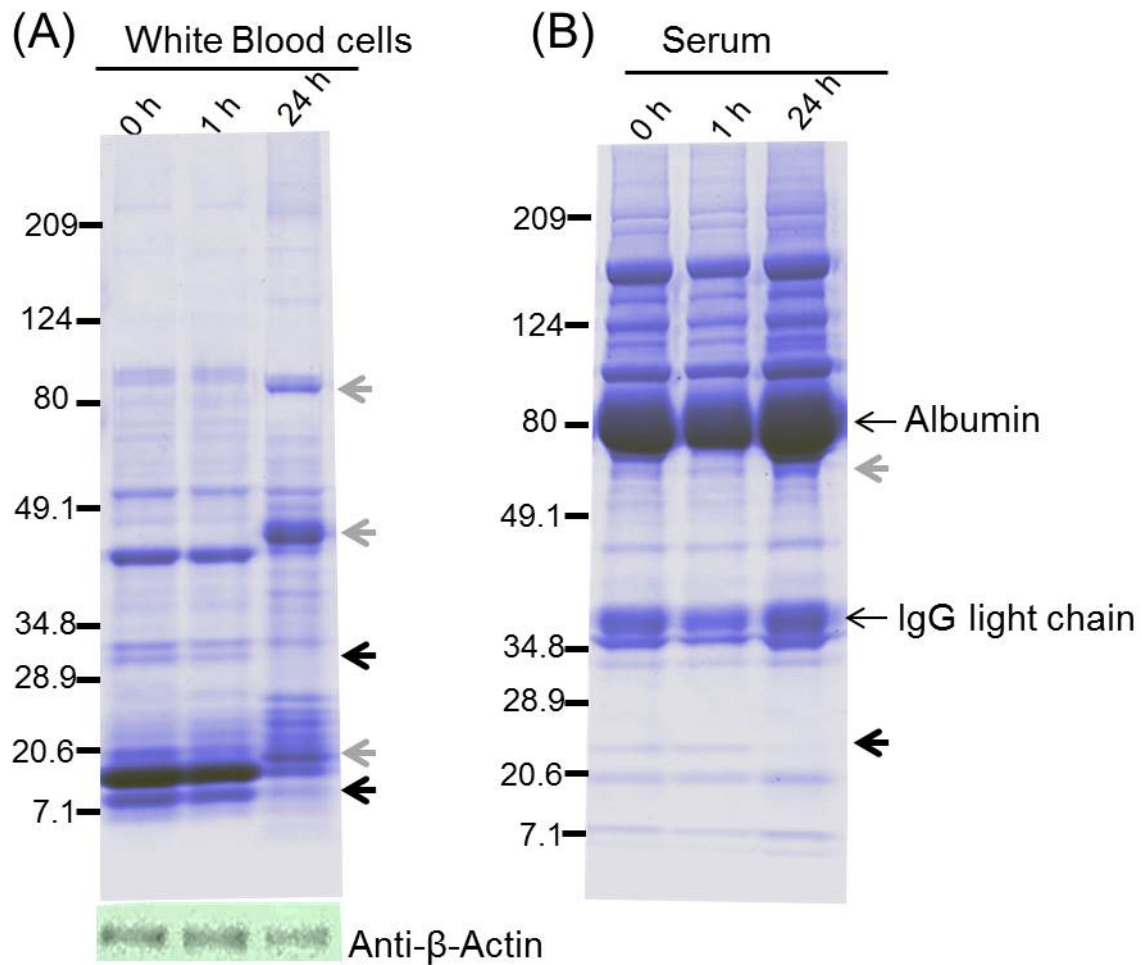


Figure 1 Analysis of protein aspect with 4-20% gradient Bis-Tris SDS-PAGE gel (MES buffer running system). Total protein from white blood cell was normalized by western blot with anti- β actin (A), total protein from serum (B). Gray and black arrows indicate increased and reduced protein expression in 24h sample compared 0h and 1h samples.

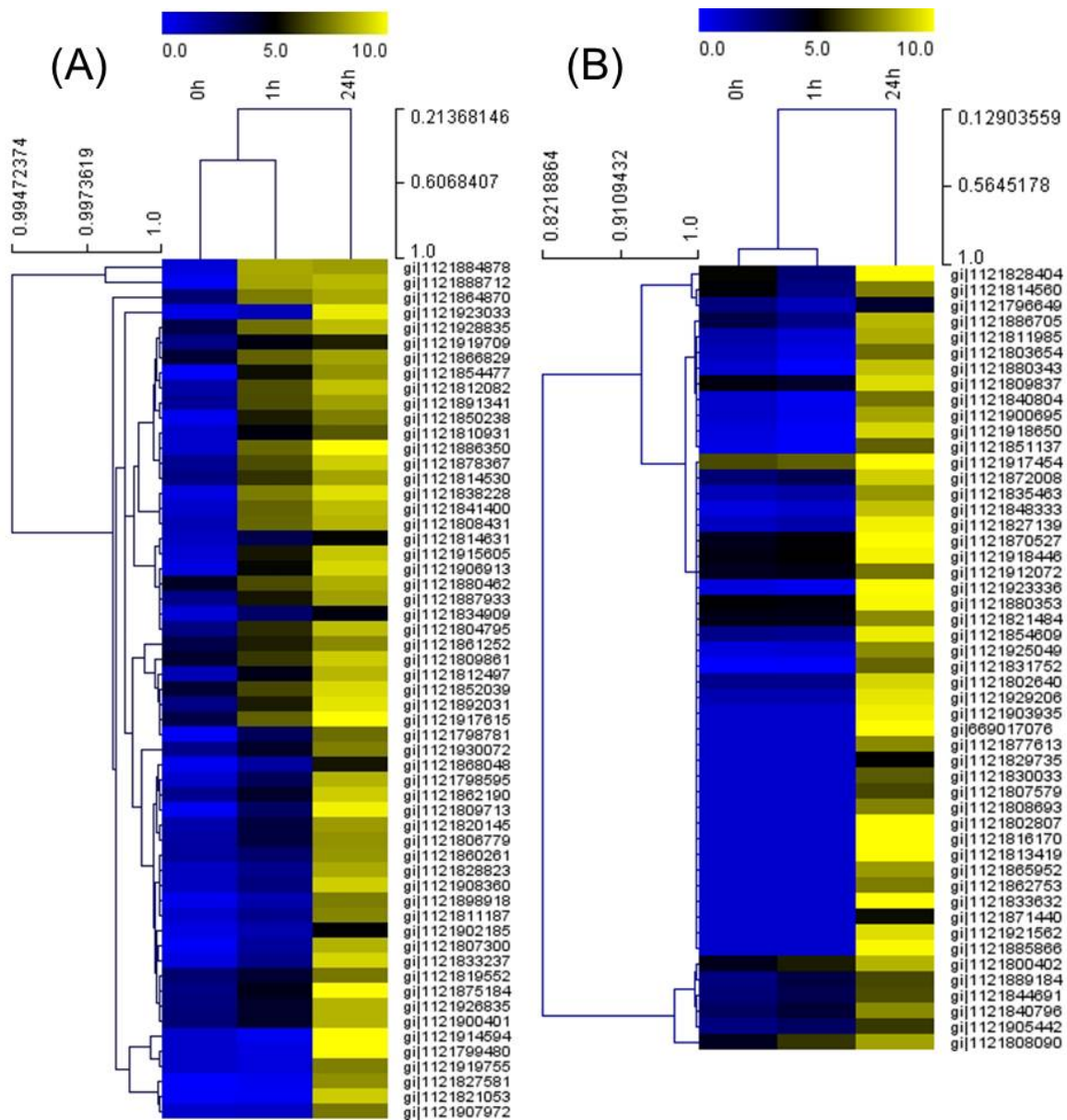


Figure 2 Hierarchical clustering for up-regulated protein expression in WBC. (A) Up-regulated DEPs since 1h after inoculation compared with 0h. (B) Up-regulated DEPs at 24h after inoculation compared with 0h. The analysis was built using MeV software. Each protein was demonstrated by a single row of colored boxes, and a single column represents different time points inoculation. Protein expression level corresponds with scale bars color; blue indicates lowest protein level (0.0) black is middle level (5.0) and yellow is highest level (10.0). The gil and ten numbers afterward represent protein name in GI number.

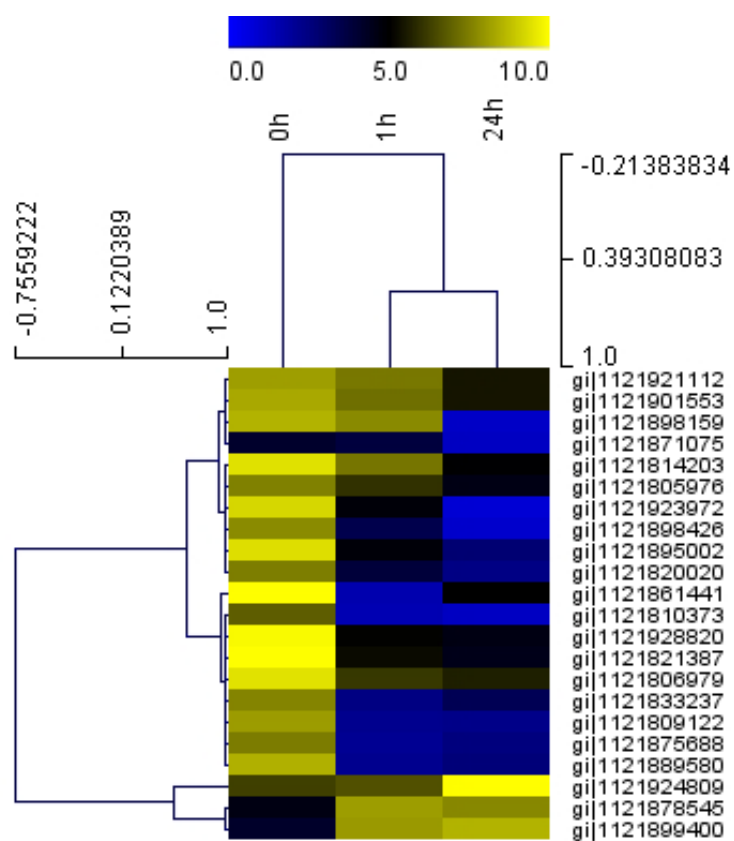


Figure 3 Hierarchical clustering for protein expression data analysis in serum. The discription similar to Figure 2.

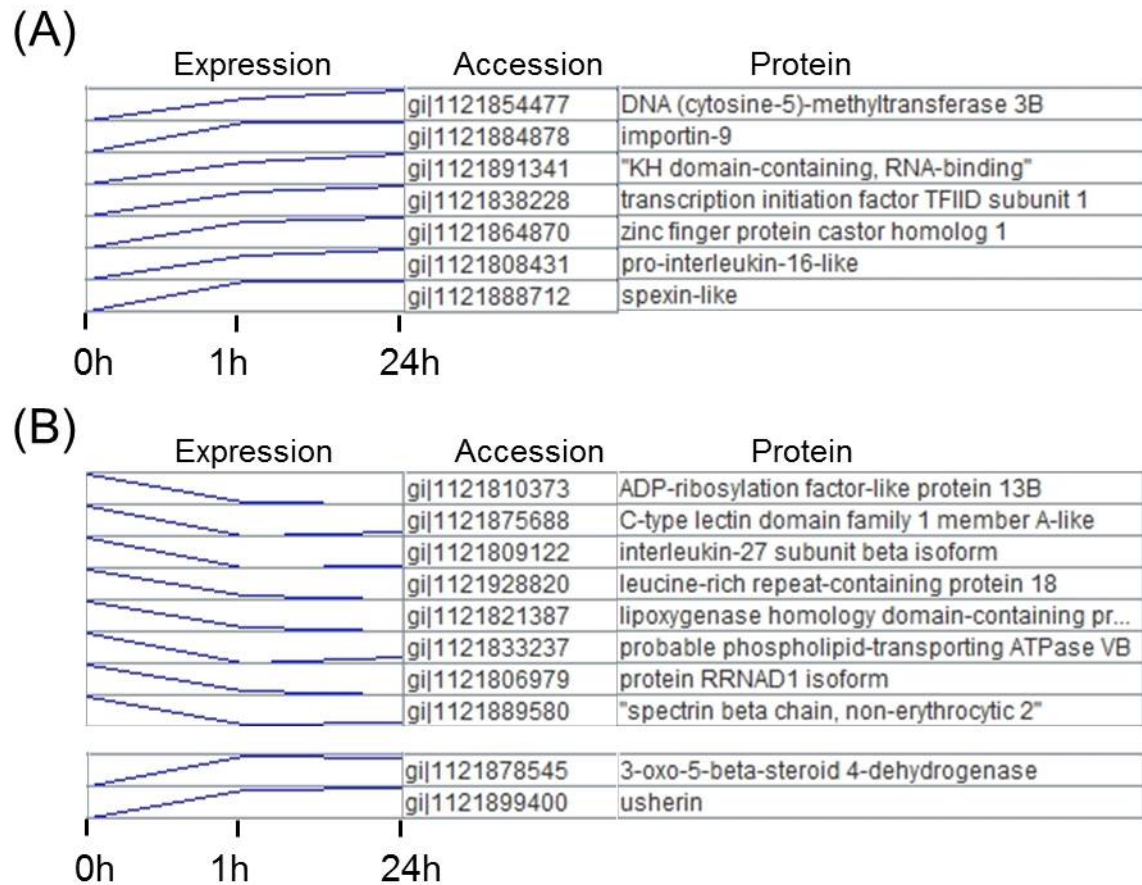


Figure 4 saturated expression level proteins since 1h. (A) saturated high expression protein of WBC, (B) both increase and decrease saturated protein expression of serum.

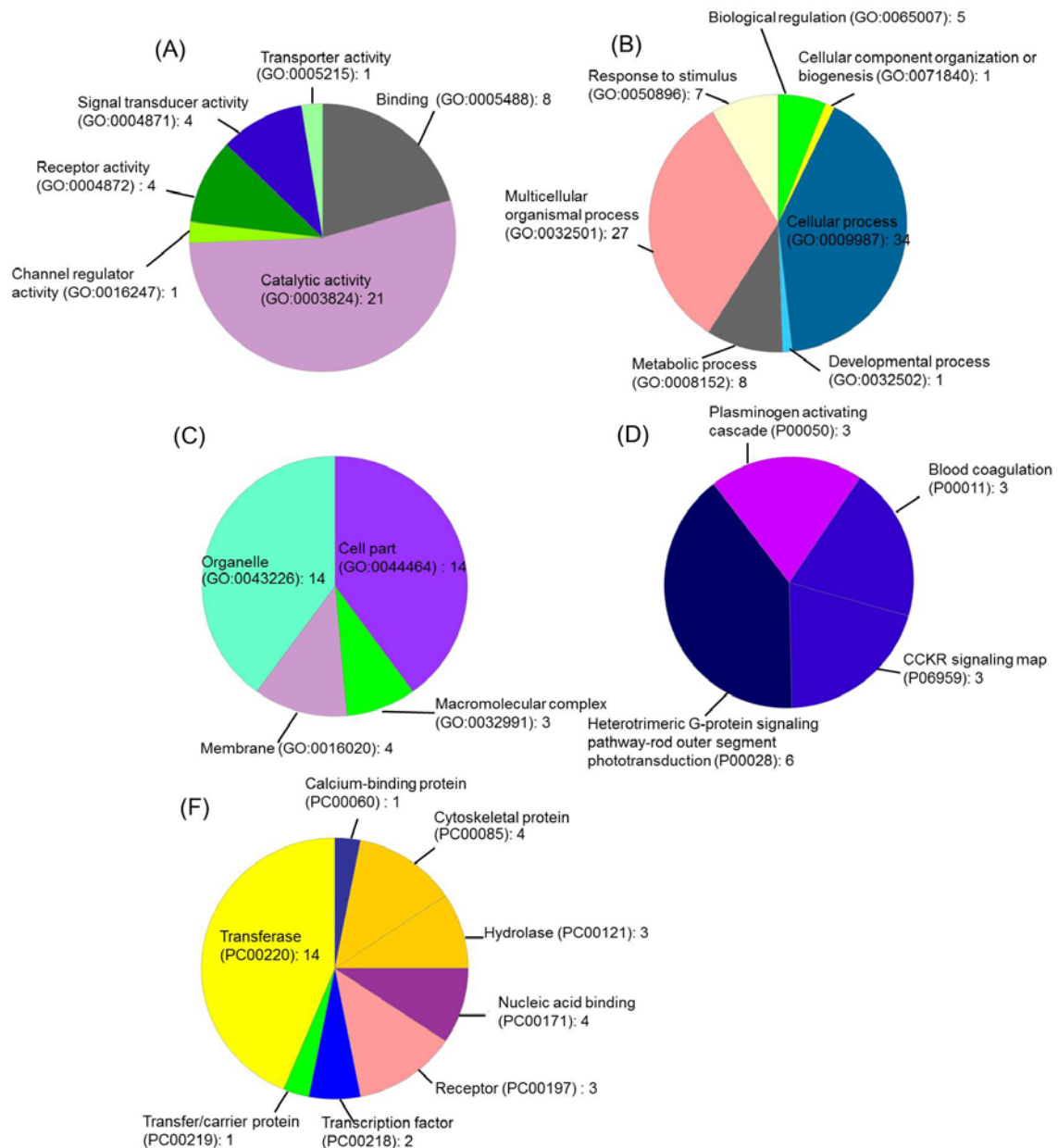


Figure 5 Up-regulated WBC proteins classified according to the Panther classification system. Searches employed chicken *Galus galus* corresponding. (A) Molecular function (B) Biological process (C) cellular component (D) Pathway (F) Protein class. Letter and number in parentheses represent Gene Ontology ID. Numbers after parentheses represent number of hit genes in each biological function.

Table 1 Comparison of TF and transcription activator DEPs of *C. porosus* to their orthologs

DEPs ^a	Ortholog ^b	Identity (%) ^c	Protein named
gi 1121838228 (XP_019391885.1)	NP_620278.1 (<i>Homo sapiens</i>)	86	Transcription initiation factor TFIID subunit 1
gi 1121864870 (XP_019397221.1)	NP_001073312.1 (<i>Homo sapiens</i>)	73	Zinc finger protein castor homolog 1
gi 1121884878 (XP_019401855.1)	NP_060555.2 (<i>Homo sapiens</i>)	94	Importin-9
gi 1121891341 (XP_019403345.1)	NP_989561.1 (<i>Gallus gallus</i>)	96	KH domain-containing, RNA- binding, signal transduction associated protein 1

^aGI and Accession number of up-regulated TFs and TRs^bAccession number of ortholog protien^cPercentate identity of DEPs and its ortholog protein

Supplement data

Supplemental Table 1. Level expression of up-regulated DEPs of WBC since 1h of bacterial inoculation

GI number	Protein	0h	1h	24h
Cytoskeleton/Trafficking/Cell movement				
gi 1121928835	actin, aortic smooth muscle	3.55	7.22	8.74
gi 1121868048	actin, cytoplasmic 2	0.28	1.87	5.44
gi 1121908360	actin-like	1.23	2.51	9.08
gi 1121914594	alpha-adducin	0.00	0.22	10.07
gi 1121798595	armadillo repeat-containing protein 4	0.00	3.21	8.55
gi 1121923033	coiled-coil domain-containing protein 141	0.44	1.33	9.67
gi 1121878367	diacylglycerol kinase iota	2.45	6.53	9.06
gi 1121919709	dynein heavy chain 7	2.40	4.66	5.61
gi 1121860261	formin-binding protein 1	1.90	2.81	7.98
gi 1121820145	kinesin-like protein KIF2C	1.58	3.74	8.07
gi 1121814631	mitotic-spindle organizing protein 1	1.23	3.48	5.10
gi 1121862190	nephrocystin-4	2.17	4.17	9.03
gi 1121875184	protein piccolo	2.43	4.52	10.24
gi 1121810931	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1	0.00	4.73	6.76
gi 1121902185	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2	0.54	1.59	4.98
Gene expression regulator				
gi 1121809861	breast cancer type 2 susceptibility protein	4.09	6.10	9.02
gi 1121854477	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B	0.07	5.31	7.90
gi 1121827581	endonuclease 8-like 1	0.01	0.28	7.84
gi 1121852039	fibrosin-1-like protein	3.96	6.38	9.30
gi 1121799480	glucocorticoid-induced transcript 1 protein	0.00	0.54	10.42
gi 1121828823	high affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A	1.18	2.25	8.36
gi 1121809713	histone H2A-beta, sperm-like	0.23	3.01	9.80
gi 1121880462	histone H2B 7	4.26	6.50	8.44

GI number	Protein	0h	1h	24h
Gene expression regulator				
gi 1121884878	importin-9	0.74	8.32	8.11
gi 1121866829	integrator complex subunit 1	3.93	6.95	8.23
gi 1121891341	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	2.01	6.51	8.14
gi 1121887933	kin of IRRE-like protein 3	2.30	5.47	8.14
gi 1121821053	LOW QUALITY PROTEIN: plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	0.06	0.20	9.02
gi 1121807300	RNA-binding protein 7	0.10	1.93	8.52
gi 1121886350	RRP12-like protein	0.00	7.04	10.53
gi 1121812082	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 3	1.70	6.56	8.82
gi 1121838228	transcription initiation factor TFIID subunit 1	0.57	7.47	9.45
gi 1121806779	vitamin D3 receptor	1.79	3.78	7.90
gi 1121861252	zinc finger and BTB domain-containing protein 26	3.53	5.57	7.74
gi 1121930072	zinc finger protein 135-like	2.25	4.18	7.50
gi 1121864870	zinc finger protein castor homolog 1	2.73	7.47	8.32
Metabolism				
gi 1121819552	15 kDa selenoprotein	2.80	4.01	7.39
gi 1121841400	acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	0.00	6.97	8.73
gi 1121906913	aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	0.53	5.14	9.25
gi 1121878367	diacylglycerol kinase iota	2.12	6.53	9.06
gi 1121915605	NEDD4-binding protein 2	0.88	5.47	8.90
gi 1121898918	phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein isoform X3	0.36	1.56	7.48
gi 1121917615	sepiapterin reductase, partial	3.56	6.92	11.15

GI number	Protein	0h	1h	24h
Signal transduction				
gi 1121834909	alveolar macrophage chemotactic factor-like	0.79	2.94	4.70
Signal transduction				
gi 1121850238	ankyrin-3	0.30	5.55	7.50
gi 1121814530	ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5	2.35	6.01	8.25
gi 1121812497	gamma-taxilin	1.43	4.50	8.61
gi 1121811187	intersectin-1	0.00	2.17	7.64
gi 1121808431	pro-interleukin-16-like	1.40	7.04	8.54
gi 1121919755	receptor tyrosine-protein kinase erbB-4	0.00	0.67	7.53
gi 1121926835	rho GTPase-activating protein 22	2.54	4.14	8.56
gi 1121804795	serine/threonine-protein kinase Sgk3	2.38	5.88	8.72
gi 1121888712	spexin-like	0.19	8.26	8.63
Miscellaneous protein				
gi 1121892031	ficolin-3	2.42	5.55	9.50
gi 1121833237	probable phospholipid-transporting ATPase VB	0.57	2.29	9.21
gi 1121798781	sickle tail protein homolog isoform X11	0.12	3.24	7.17
Unknown function proteins				
gi 1121824667	uncharacterized protein LOC109308304	0.00	1.51	3.39
gi 1121900401	uncharacterized protein LOC109319854	2.68	4.19	8.56
gi 1121907972	uncharacterized protein LOC109320983	0.00	1.05	7.37

Supplemental Table 2. Level expression of up-regulated DEPs of WBC at 24h of bacterial inoculation

GI number	Protein	0h	1h	24h
Cytoskeleton/Trafficking/Cell movement				
gi 1121903935	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	0.00	0.00	9.75
gi 669017076	ATP synthase F0 subunit 8 (mitochondrion)	0.00	0.00	11.38
gi 1121917454	cilia- and flagella-associated protein 99	6.48	6.89	10.87
gi 1121844691	dystonin	2.67	3.43	6.55
gi 1121877613	F-actin-capping protein subunit alpha-3	0.00	0.00	7.73
gi 1121835463	hydrocephalus-inducing protein homolog	1.45	1.78	7.98
gi 1121929206	kinesin-like protein KIF11	1.53	1.52	9.54
gi 1121814560	LIM domain only protein 7	4.85	2.45	7.53
gi 1121831752	lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	0.02	0.09	7.00
gi 1121829735	microtubule-associated protein 1A	0.00	0.00	5.02
gi 1121870527	myosin-10	4.45	4.88	10.63
gi 1121918650	nebulin	0.68	0.14	9.22
gi 1121918446	obscurin-like protein 1	4.70	5.02	9.84
gi 1121848333	paralemmin-1	0.60	0.00	8.82
gi 1121828404	protein unc-13 homolog C	5.12	2.69	10.03
gi 1121827139	spatacsin, partial	1.25	1.66	9.76
gi 1121796649	vimentin	2.53	1.39	4.14
gi 1121809837	WD repeat and FYVE domain-containing protein 2	4.69	4.14	9.35
gi 1121811985	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator	1.72	0.83	8.38
Gene expression regulator				
gi 1121830033	adenosine deaminase domain-containing protein 1	0.00	0.00	6.79
gi 1121800402	CCR4-NOT transcription complex subunit 10	4.46	5.56	8.56

GI number	Protein	0h	1h	24h
gi 1121802640	chromodomain Y-like protein	2.23	2.26	9.20
gi 1121923336	doublesex- and mab-3-related transcription factor 2	0.64	0.31	11.13
gi 1121807579	Fanconi anemia group M protein	0.00	0.00	6.41
gi 1121880353	histone H1.01-like	4.93	4.75	9.91
gi 1121880343	histone H1-like	0.00	0.02	8.82
gi 1121840796	histone H1x	3.11	3.93	7.73
gi 1121808693	histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	0.00	0.00	7.58
gi 1121889184	histone-lysine N-methyltransferase KMT5B	2.50	3.72	6.43
gi 1121872008	KRR1 small subunit processome component homolog	2.68	3.36	9.06
gi 1121821484	single-stranded DNA-binding protein 2	4.54	4.50	7.75
gi 1121802807	zinc finger protein 40	0.00	0.00	10.47
gi 1121854609	zinc finger SWIM domain-containing protein	2.29	2.13	9.68

Metabolism

gi 1121816170	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	0.00	0.00	10.29
gi 1121813419	LOW QUALITY PROTEIN: lysozyme g-like	0.00	0.00	10.40
gi 1121865952	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	0.00	0.00	8.04

Signal transduction

gi 1121886705	adenylate cyclase type 10-like	3.60	2.38	8.61
gi 1121803654	AFG3-like protein 2 isoform X2	1.41	0.58	7.16
gi 1121840804	collagen alpha-1(VII) chain	0.00	0.26	7.28
gi 1121912072	SNW domain-containing protein 1	4.40	4.59	7.30

Miscellaneous protein

gi 1121925049	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	0.64	0.82	7.75
---------------	-----------------------------------	------	------	------

GI number	Protein	0h	1h	24h
gi 1121900695	HEAT repeat-containing protein 5B	0.00	0.37	8.26
gi 1121862753	MORN repeat-containing protein 1	0.00	0.00	7.45
Miscellaneous protein		0h	1h	4h
gi 1121833632	PRELI domain-containing protein 2	0.00	0.00	11.25
gi 1121851137	probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4	0.54	0.13	6.93
gi 1121871440	putative ciliary rootlet coiled-coil protein 2	0.00	0.00	5.27
gi 1121905442	retinoblastoma-like protein	2.50	3.12	6.14
gi 1121921562	solute carrier family 15 member 2	0.00	0.00	9.39
gi 1121885866	solute carrier family 26 member 9	0.00	0.00	9.94
Unknown function proteins				
gi 1121808090	uncharacterized protein LOC109324692	4.36	6.06	8.18

Supplemental Table 3. Level expression of down-regulated DEPs WBC of bacterial inoculation

GI number	Protein	0h	1h	24h
Down-regulated protein				
gi 1121916820	Alstrom syndrome protein 1	8.97	8.90	5.94
gi 1121907253	cation channel sperm-associated protein subunit beta	10.46	9.79	5.72
gi 1121821684	coiled-coil domain-containing protein 68	11.71	10.92	7.59
gi 1121832357	high mobility group protein B2	7.04	7.51	2.99
gi 1121829845	la-related protein 1B	5.68	5.08	3.00
gi 1121875030	PRKC apoptosis WT1 regulator protein, partial	6.06	8.06	4.01
gi 1121859423	syntaxin-binding protein 1	11.12	12.90	7.04

Supplemental Table 4. Level expression of DEPs of Serum during bacterial inoculation

GI number	Protein	0h	1h	24h
Down-regulated				
gi 1121921112	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase	8.13	7.38	5.42

GI number	Protein	0h	1h	24h
gi 1121861441	actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	10.78	1.56	4.98
gi 1121810373	ADP-ribosylation factor-like protein 13B	6.88	1.50	1.16
gi 1121805976	beta-1-syntrophin	7.56	5.99	4.60
gi 1121898426	cilia- and flagella-associated protein 36	7.75	3.48	0.00
gi 1121901553	constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma	8.33	7.21	5.43
gi 1121875688	C-type lectin domain family 1 member A-like	7.47	2.13	2.52
gi 1121898159	EH domain-binding protein 1	8.51	7.74	1.11
gi 1121809122	interleukin-27 subunit beta	8.08	2.18	2.32
gi 1121814203	KDEL motif-containing protein 1	9.45	7.33	4.95
gi 1121928820	leucine-rich repeat-containing protein 18	9.91	5.07	4.63
gi 1121821387	lipoxygenase homology domain-containing protein 1	10.24	5.22	4.52
gi 1121871075	ovotransferrin-like	4.12	3.75	1.16
gi 1121923972	perilipin-2	9.22	4.83	0.82
gi 1121895002	piggyBac transposable element-derived protein 5	9.38	4.82	2.75
gi 1121833237	probable phospholipid-transporting ATPase	7.62	2.44	3.35
gi 1121806979	protein RRNAD1	9.46	6.10	5.61
gi 1121820020	protein SZT2	7.49	3.86	2.38
gi 1121889580	spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	8.49	2.19	2.64
Up-regulated protein				
gi 1121878545	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	4.62	8.11	7.70
gi 1121924809	acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 1-like	6.27	6.59	11.13
gi 1121899400	usherin	4.17	8.05	8.52

เรื่องที่ 2

Transcriptomic analysis of innate immune response genes of *Crocodylus siamensis* bacterial inoculated blood cells

Bancha Mahong¹, Nisachon Jangpromma^{1,2}, Preeyanan Anwised¹, Wisarut Payoungkiattikun¹
Sakda Daduang^{1,4}, Yosapong Temsiripong⁵, Sompong Klaynongsruang^{1,3*}

¹Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI),
Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

²Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002,
Thailand

⁴Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon
Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁵Sriracha Moda Co., Ltd., Sriracha, Chonburi 20110, Thailand

* Corresponding author.

E-mail adress: somkly@kku.ac.th

Abstract

Innate immune response in crocodilian remains poorly understand, although they possess amazing system in context of contribution quickly wound healing upon their flight each other. This study attempts to discover innate immune responded-genes and understand the powerful of innate immune system of crocodilian coping pathogen invading via blood cell count and transcriptomics. Increase number of red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) in 1 hour after inoculation around two-times was considered so fast response compared with other vertebrates and may be a powerful manner to resist invading bacteria. Whole blood which mostly is RBC was performed transcriptomic analysis among 1 hour, 24 hours compared pre-inoculation or 0 hour. 107,592 unigenes of Siamese crocodile were detected and then annotated with 7 well known databases which around haft of them was able to be annotated. When compared gene expression in response to bacterial inoculation between two time points, 22 unigenes were up-regulated and 6 unigenes down-regulated in 0h versus 1h, 372 unigenes were up-regulated and 47 unigenes down-regulated in 0h versus 24h and 340 unigenes up-regulated and 82 unigenes down-regulated in 1h versus. KEGG pathway analysis revealing in first hour of inoculation increased expression of

TFs and TRs genes and later on those TFs and TRs probably contribute to provoke expression of hundreds of genes with verities of functions in inflammation, bacterial killing, metabolism to synchronously attempt resistance of bacteria invader which was appeared the increase of gene expression at 24 hours.

Keywords: RNA-seq analysis, *Crocodylus siamensis*, bacterial inoculation, Innate immunity

Introduction

Despite of crocodile habitant plentiful bacterial pathogen and their behavior favorable fighting thereby frequently getting injury, their wound is no seriously infectious and healing take place quickly (van Hoek, 2014). This notice is quite interesting in term of how does crocodile immune system so powerful, but intensive study in crocodile of this issue is still lack. Incidentally, investigations in context of seeking the way to employ crocodile as traditional medicine are being interesting issue. Thought of some Asian cultures, consuming crocodile blood can improve human health and furthermore it has been developed as food supplement which is able to be alternative medicine for curing some diseases such as allergy and asthma as well as prolonging the life of the patients (Chaeychomsri et al., 2009). The ancient people belief is constantly with modern scientific reports, because plasma alligator consists of mixture of proteins and peptides which are effective bioactive antimicrobial agent against multi-drug resistant bacterial pathogens (Barksdale et al., 2016). Alligator serum (*Alligator mississippiensis*) was proved obviously to be antibacterial agent better than 10 folds compared human serum as well as wider broad spectrum to inhibit bacterial cell growth (Merchant et al., 2003). While leukocyte extract also is antimicrobial agent, it is able to inhibit growth of six species of yeast, 10 bacterial species and two viruses (Merchant et al., 2006). Crocodylidae family also had been intensively investigated of hematology in particular antimicrobial agent investigation, possibility of using crocodile blood for non-communicable diseases therapeutic intervention (Phupiewkham et al., 2018; Phosri et al., 2018). In addition crocodile blood also carries anti-oxidant, anti-inflammation, anti-cancer activity etc. (Phosri et al., 2014; Ou and Ho, 2016). However, so far innate immune responded-genes and proteins of crocodile has been still small amount information. It would be worthy, if such genes and proteins will be revealed further which may choose strong candidate either gene or protein for determination in therapeutic intervention or other proposes.

The transcriptomics in immunology is a screening useful technique for initial understanding of host defense, pathogenic microbial escape from eradication, host-pathogen interactions, eventually leading to identification of new disease targets, vaccine and antibody candidates for therapeutic interventions. RNA-seq (RNA sequencing) or whole transcriptome shotgun sequencing, is used to explore in context of both qualitative and quantitative measurement of gene expression in given condition (Chu and Corey, 2012; Wang et al., 2009). Investigating transcriptomics of low evolutionary vertebrates like crocodiles is interesting, because they are unique and may profoundly understand the evolutionary immunology from reptiles to humans. So far our group have reported some articles proposing that Siamese crocodile blood components such as serum, plasma and white blood cell (WBC) extract contain a mixture of antibacterial proteins ranking from small proteins to bulky proteins (Theansungnoen et al., 2014; Jangpromma, et al., 2016; Kommanee et al., 2012), but have not been yet figuring out how many number of either genes or proteins expression as well as timing of their expression. Thus we anticipate transcriptomic analysis of bacterial inoculated blood may provide informative bacterial-responded genes of Siamese crocodile. In addition, currently the therapy of microbial infectious diseases with peptides is interesting, because the drawback of antibiotic drug applications in infectious diseases is that in the long term it affects drug resistance. Thus crocodile peptide is an opportunistic therapy choice. The discovery of effective antimicrobial peptides from crocodile blood to replace antibiotic drug use is a promising hope. Furthermore, for another purpose, transcriptomics could hopefully monitor the similarities or differences in the innate immunity systems between crocodiles and intensively studied animals, like several species of mammals, through altered gene expression level during *A. hydrophila* inoculation at 1h and 24h compared to 0h.

Materials and methods

Bacterial preparation

Aeromonas hydrophila was pre-cultured in Nutrient broth (NB) at 37 °C with shaking for 18 h, then inoculated in the same medium and incubated at 37 °C until OD₆₀₀ equal 1.0 which corresponds to 1×10^9 cells ml⁻¹ (Reyes-Becerril et al., 2016). The bacterial culture was centrifuged and then washed with phosphate-buffered saline (PBS 7.4). Bacterial cell was re-suspended with PBS again for inoculation.

Crocodile treatment

Male crocodiles (*C. siamensis*) around 4-year old from Sriracha Moda farm Co., Ltd. (Chon Buri, Thailand) were used. Blood sample was withdrawn from the supravertibral branch of the internal jugular vein (pre-immunized blood sample or 0 h), while the withdrawal blood volume from each crocodile was correlated to the size of the animal. The crocodile was inoculated with 1 ml of *Aeromonas hydrophila* at a concentration of 1×10^9 CFU ml⁻¹, by intraperitoneal injection into the bloodstream. After injection 1h and 24h, blood was withdrawn and transferred to a 15 ml sterile centrifuge tubes which one fraction contained 1 ml. All samples were kept on ice until further use.

RNA-seq sequencing, gene annotation, differentially expressed genes identification

Whole blood was performed RNA extraction with TRIzol™ reagent and isolation following Invitrogen™ manufacturer's recommendation (California, USA). Total RNA was treated with DNAase. RNA samples were validated quality which needs to pass through the following three steps including 1) Nanodrop with evaluation of preliminary quantitation, 2) Agarose gel electrophoresis to tests RNA degradation and potential contamination, 3) Agilent 2100: checks RNA integrity and quantitation. Afterward, library construction and quality assessment were performed. mRNA from total blood of 3 samples were enriched from total RNA using oligo(dT) beads. The mRNA was fragmented randomly, followed by cDNA synthesis, sequencing by Illumina Sequencer and transcript assembly. To achieve gene functional annotation, seven databases including NR (NCBI non-redundant protein sequences), Nt (NCBI nucleotide sequences), KO (KEGG Orthology), SwissProt, Pfam (Protein family), GO (Gene Ontology), KOG (euKaryotic Orthologous Groups) are applied by Novogene approach. In gene expression analysis, de novo transcriptome filtered by Corset is used. RSEM (Li et al., 2011) mapped reads back to transcriptome and quantified the expression level. Read count value obtained from the gene expression analysis is used as the input data to do differential expression analysis. Volcano plot was used to infer the overall distribution of differential gene expressions (DEG). The threshold was normally set as: $[\log_2(\text{Fold Change})] > \text{or} < 1$ and $q\text{-value} < 0.005$ and the Venn diagram presented the number of genes that were uniquely expressed differentially within each group. In GO Enrichment analysis of DEGs, Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) is a major bioinformatics initiative to unify the presentation of gene and gene product. While the KEGG pathway enrichment analysis, the interactions of multiple genes may be involved in certain biological

functions was used to do pathway enrichment analysis and identify significantly enriched metabolic pathways or signal transduction pathways associated with DEGs compared with the whole genome background. KEGG enrichment scattered plot showed the DEGs enrichment analysis results in KEGG pathway. The degree of KEGG enrichment was measured by Rich factor, q-value and the number of genes enriched in this pathway. Rich factor refers to the ratio of the DEGs number in the pathway and the number of all genes annotated in the pathway. Q-value is the p-value after normalization and its range is 0 to 1.

Results

Inspection of inoculated Crocodile

After inoculation male Siamese crocodiles (*C. siamensis*) around 4-year old by syringe injection with *A. hydrophila*, physiological and morphological inspection were done. The examination after inoculation 1h and 24h did not show any behavior change. Afterward 24h after inoculation crocodiles were opened body to dissect pathological change. There was no significance of morphological change between non-inoculated and 24h inoculated crocodiles.

Number of WBC and RBC during inoculation

A. hydrophila is a heterotrophic, Gram-negative, rod-shaped bacterium found in a warm climate region and was used in this study as a bacterial pathogen infectious to *C. siamensis*. Morphological features of WBC and RBC of 0h, 1h and 24h looked comparable. The number of WBC at 0h was nearly 1,900 cells μl^{-1} , but at 1h their number dramatically increased to nearly 3,700 cells μl^{-1} . However at 24h their number dropped down to around 2,200 cells μl^{-1} (Fig. 1A). Likewise for RBC observation, at 0h the total number was 50,000 cells μl^{-1} , but at 1h the cells were boosted up to near 90,000 cells μl^{-1} (approximately 2-fold) and dropped down to near 67,000 cells μl^{-1} in 24h (Fig. 1B).

De novo assemblies and data analysis

Although did not notice obvious change after 24h of bacterial inoculation, it is possible that the onset of morphological change may take place longer than 24h that is consistent with our expectation. However, we expect the use of transcriptomic analysis may get the valuable clue for further study to understand mechanism of innate immune system of crocodilian that be considered powerful in pathogen invading eradication. Considering in blood stream, RBC number of Siamese crocodile was kept higher WBC around 25 folds in

three time point (Figure 1), thus gene expression profile in this study has a tendency represent RBC pattern. Transcriptome data of 3 different samples were generated by whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-Seq). 60,866,148 59,042,408 and 62,101,112 were raw reads 59,436,942 57,560,316 and 60,556,164 were clean reads 49655960, 47761848 and 50115898 were total mapped read for 0h, 1h and 24h, respectively (Table 1). The transcripts and unigenes length revealed orderly 500-1kbp > 200-500bp > longer 2kbp > 1-2kbp (Table 2). Totally the number of transcripts of three samples was 107,679 and total number of unigene was 107,592 (Table 2). Annotation 107,592 unigenes with 7 databases namely NR, NT, KO, SwissProt, PFAM, GO, KOG (Table 3), among them no any databases could annotate reaching 50% of total unigenes which the most effective database was NT that was able to annotated 49.13% and KOG database could annotate the lowest number of unigene 19%. 11,912 unigens or 11.07% all databases could be annotated and 60,912 unigenes or 56.61% at least one database could be annotated (Table 1), suggesting crocodile gene functional characterization relatively limit investigation so far.

When characterization of crocodile unigenes were searched against the non-redundant protein database (Nr), the E-value used to indicate the similarity of unigenes against the database by which the low E-value is directly proportional to the high similarity. This study E-value <1.0e-45 was use as critical threshold based on Song et al. criteria (2017) which found 71% , whereas E-value range around 1.0e-45-1.0e-5 was 29% (Fig. 2A). For similarity distribution analysis of unigenes range 80-95% shared 48.7% and the range 95-100% shared 25.6% to available reference sequences (Fig. 2B). The unigene sequences had quite high homology with *Alligator mississippiensis* and *Alligator sinensis* as 34.7% and 31.3% respectively which they are phenogenetically grouped into Family Crocodylidae along with Siamese crocodile, followed by those of *Chrysemys picta* and *Chelonia mydas* that were turtle with the similarity to 4.6% and 3.4%, whereas the similarity to *Homo sapiens* just was hit 1.6% (Fig. 2C).

Unigene analysis upon bacterial immunization

In comparison unigene expression level between two time points to consider how many of DGEs were up- or down-regulated, the $\log_2$ (fold change) was used and lower than -1 and higher than 1 was interpreted to be down-regulated and up-regulated significant expression respectively. Upon comparison the expression of 1h and 0h (a) found 22 up-regulated and 6 regulated unigenes, while comparison between 24h and 1h (b) found 372

up-regulated and 47 regulated unigenes and comparison between 24h and 0h (c) found 340 up-regulated and 82 regulated unigenes (Fig. 3A-C). With either up- or down-regulated DEGs, there were merely 7 unigenes overlapping between (a) and (b) and 13 unigenes between (a) and (c), while the overlapping unigenes between (b) and (c) were 334. The exclusive unigenes of (a), (b) and (c) were 8, 78 and 75 respectively (Fig. 3D).

Furthermore Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was exploited to illustrate blood cells response to bacterial inoculation via the change of DEGs. KEGG mapped DEGs to several canonical reference pathways and the most top 20 enriched key pathways significantly enriched (q-value <0.05). In comparison up-regulated DEGs of 1h versus 0h, predominant enriched KEGG pathways were TNF signaling pathway, Osteoclast differentiation (Table 4) which almost them were genes encoded TF. Because genes in TNF signaling and Osteoclast differentiation pathway had overlapping members, up-regulated unigenes of both pathways corresponded 5 TFs of Crocodilia namely XP_006262364.1, XP_006271086.1, XP_006267477.1 corresponding to *Alligator mississippiensis* and XP_006014950.1, XP_006015445.1 corresponding to *Alligator sinensis* (Table 5). All of them would be thought to accelerate newly synthesizing bacterial pathogen responding-genes. For 24h versus 0h and 1h almost proteins in inflammation and bacterial response would affect the TF up-regulated at 1h of inoculation such as Tuberculosis, Phagosome, Pertussis (Table 4).

Moreover cathelicidin genes were considered because they encode antimicrobial peptide that are powerful peptide to kill bacteria and are remarkable peptide in innate immunity of crocodile. In this study 7 genes named as Cs-CATH#1- Cs-CATH#7 were detected and only Cs-CATH#6 did not up-regulated significant expression at 24 hour, but other genes were (Table 6). In addition for analysis of down-regulated DEG with KEGG Enrichment pathway, there was no gene different between 0h and 1h. However for 24h compared to 1h and 0h two interesting pathways were intestinal immune network for IgA production and primary immunodeficiency that were the two tops of enriched key pathways (Table 7).

Discussion

Order Crocodilia includes three true crocodiles, but they are phylogenetically grouped to different family namely Crocodylidae, Alligatoridae, Gavialidae. They are interesting vertebrate in term of primitive animal which are considered as only evolutionarily surviving relatives of dinosaurs (van Hoek, 2014) and possessing high effective pathogenic innate immune response. Currently there are a few investigations using transcriptomic analysis reveal Crocodilia gene expression, for instance the utilization RNA-seq to verify alligator genes governing temperature-dependent sex determination (Yatsu et al., 2016). In addition the evaluating study in measure GC content of EST in Crocodilia compared with avian and human found pretty same level, but differ from amphibians and fish that have lower GC-rich isochore (Chojnowski et al., 2007). Since there are subtle transcriptomic information in Crocodilia, our work wish fills up the gene expression information as well as bacterial innate immune response information.

Total of WBC and RBC change after bacterial immunization

Count of blood cells and comparison the number before and after inoculation found both WBC and RBC numbers were increased around two-folds at 1h. Generally in human bacterial infectious boosts up number of WBCs (Aminzadeh and Parsa 2011) because several types of WBC migrate from bone marrow pool to blood vessel. However, the interesting notice is that 1h is too fast of the response compared with other organisms upon bacterial inoculation. In human WBCs initially increase in blood stream around 4-8 hours after infection and their number are peaked around 48h (Honda et al., 2016). This may one of explanation of crocodile can terrifically heal their injury rapidly via WBC manner before pathogenic spreading out through their body. Another reasoning observation is that RBC also increased. Minasyan (2014) proposed that WCB cannot effectively phagocytize invading bacteria in blood stream because strongly blood flow hurdle of engulfing. Instead RBCs can do so to catch bacteria by electric charge; thereby bacteria are fixed on the surface of RBC and then are killed by exocytosis with oxygen released from oxyhemoglobin (Minasyan 2018). In addition supporting evidence of RBC contribution of destroying invading bacteria, infected RBC of rainbow trout fish 24 h with LPS study can stimulate gene expression involving inflammation system such as tumor necrosis factor like, oxidative-stress responsive 1, interferon regulatory factor etc. (Morera and MacKenzie, 2011). Our findings suggest that

fast increase of RBC after inoculation may be apart effective innate immune response crocodile to kill invader.

Transcriptomics information contributing to crocodilia gene annotation

Our work found that 107,592 unigenes were detected and used 7 databases for gene annotation according to biological gene product function in which around half of them could annotate and classify via rationale categories of each database. BLASTX analysis against the Nr protein database depicted reliable information with E-value ranging $e \leq 45$ 72% of unigene, percentage similarity distribution during 80-100% being 74.3% of unigene and unigene hit to the *Alligator mississippiensis* and *Alligator sinensis* 66%. Moreover this study is useful for product recombinant protein. Producing mass valuable protein using heterologous expression in favorite organisms like *E.coli* and Yeast is general platform. The expressed protein so called recombinant protein is applied extensively. Recombinant protein hepcidin possessing antibacterial activity is able to inhibit growth of various bacteria (Hao et al., 2012). According to the discovery so far blood crocodile proteins and/or peptides have abroad range of functions for instance antimicrobial, anti-inflamtion, and even anti-HIV anti-cancer (Maijaroen et al., 2018; Lueangsakulthai et al., 2018; Kozłowski et al., 2016). Since crocodile genes are majorly gene family do not know which gene and how much are expressed in blood cell in particular bacterial infection circumstance. Currently their gene expression level are still limited and until now there are no cDNA library of crocodile. Our RNA-seq information would inform which genes in curtain family responsibly function and could point out which genes are low or high abundant which is useful for considering which genes is important among their gene family. In addition, the unigene sequence from this study can compared sequence with other organisms either reptile group or mammal group to understand evolution of innate immunity via bacterial pathogen responded-genes. Although three crocodilians have been done genome sequencing and leased publishable genomic information along with comparing how closed they are to their ancestor (Green et al., 2014), until now gene expression level information versus any challenges still limited. The study of temperature-dependent sex determination of alligator study also used RNA-seq to explore DEGs and found 375.2 million paired-end reads of RNA-seq yielded, but this study did not mention how any unigens were revealed (Yatsu et al., 2017).

Gene expression in bacterial inoculation

Figuring out DEGs as many as possible upon inoculated crocodile blood cell compared with non-inoculated sample is worth information for understanding innate immune response in particular up-regulated DEGs. This transcriptomic work using whole blood has advantage point because injection of bacterial pathogen directly to blood stream, gene expression profile in RBC is discovered since it is major directly respond invader rather than WBC according to Minasyan (2018) proposed and fortunately our work used whole blood cell to perform RNA-seq in which Siamese crocodile RBC prominently exist around 25-folds over WBC. Moreover ratio RBC/WBC of *Crocodylus palustris* is around 120 folds (Arikan and CiCek, 2014). Thus gene expression profile may weight to RBC rather than WBC. Considering up-regulated DEGs between pre-inoculation and inoculation 1h, in KEGG pathway Osteoclast differentiation and TNF signaling were two top pathways. The member of two pathways is TFs. When blast nucleotide those unigenes to NCBI database, they hit to 5 TFs namely transcription factor jun-B, transcription factor Spi-B-like, proto-oncogene c-Fos, partial, transcription factor jun-D, suppressor of cytokine signaling 3, CCAAT/enhancer-binding protein beta. The increase of TFs expression at 1 hour suggests that crocodile blood cell will accelerate a number of genes expression after 1 hour of inoculation to resist the enemy. In comparison 24h to 0h or 24h to 1h, the up-regulated pathway seem to similar. The pathway can divide into two groups, fist bacterial killing such as Tuberculosis, Legionellosis Leishmaniasis, Malaria, pertussis Phagosome and pathogen infection response such as Rheumatoid arthritis, Cytokine-cytokine receptor interaction, Complement and coagulation cascades, Salivary secretion, Inflammatory bowel disease. Furthermore one of protein family that is powerful in innate immune response, especially crocodile is antimicrobial peptide. Only cathelicidin antimicrobial peptide family was detected in this analysis. cathelicidin in *Alligator sinensis* consists of 6 genes and measured gene expression in As-CATH1–6 are mainly expressed in immune organs and epithelial tissues, but did not determine the expression in blood cell (Chen et al., 2017), while *Alligator mississippiensis* and *Crocodylus siamensis* also reported antimicrobial efficacy, but did not propose number of gene in such organisms (Barksdale et al., 2017; Tankrathok 2018). This analysis 9 cathelicidin unigenes were found, but hit to 5 cathelicidins of Crocodilia. 7 of them showed up-regulated DEG at 24 hours, but not at 1 hour. This is a worth preliminary information to follow understanding this antimicrobial peptide family.

Conclusion

Siamese crocodile transcriptomic analysis with RNA sequencing of whole blood cell which represent gene expression profile mainly of RBC rather than WBC according to prominent available in blood cell population is worthily informative of Order Crocodilia to figure out how it due with pathogenic bacterial inoculation. At 1h it obvious TNF cytokine action to run on bacterial management via TNF signaling pathway a long with increase of a number of TFs to promote bacterial response genes. While the response at 24h provoked genes implicated in inflammation, antimicrobial, metabolism.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This research was financial supported by the Thailand Research Fund (TRF), grant no. DBG6080016. We are also grateful to the Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University.

References

- Aminzadeh, Z., Parsa, E. 2011. Relationship between Age and Peripheral White Blood Cell Count in Patients with Sepsis. *Int J Prev Med.* 2:238-42.
- Arikan, H. and Çiçek, K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review *NORTH-WESTERN JOURNAL OF ZOOLOGY* 10: 190-209.
- Barksdale, S.M., Hrifko, E.J. and van Hoek, M.L. 2017. Cathelicidin antimicrobial peptide from *Alligator mississippiensis* has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Dev. Comp. Immunol.* 70, 135–144.
- Barksdale, S. M., Hrifko, E. J., Chung, E. M.-C., van Hoek, M. L., 2016. Peptides from American alligator plasma are antimicrobial against multi-drug resistant bacterial pathogens including *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology* 16, 189.
- Chaeychomsri, W., Chaeychomsri, S. Siruntawineti, J. Hengsawadi, D. Cuptapun, Y., 2009. Freeze-Dried Crocodile Blood Production as Food Supplement. *Biologic Sciences Bioengineering* 108, S22.

- Chen, Y., Cai, S., Qiao, X., Wu, M., Guo, Z., Wang, R., Kuang, Y.Q., Yu, H., Wang, Y. 2017. As-CATH1-6, novel cathelicidins with potent antimicrobial and immunomodulatory properties from *Alligator sinensis*, play pivotal roles in host antimicrobial immune responses. *Biochem J.* 474:2861-2885.
- Chojnowski, J.L., Franklin, J., Katsu, Y., Iguchi, T., Guillette, L.J., Kimball, R.T., Braun, E.L., 2007. Patterns of vertebrate isochore evolution revealed by comparison of expressed mammalian, avian, and crocodilian genes. *J Mol Evol.* 65, 259–266.
- Chu, Y., Corey, D.R., 2012. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics* 22, 271–274.
- Green, R.E., Braun, E.L., Armstrong, J., Earl, D., Nguyen, N., Hickey, G., Vandeweghe, M.W., St John, J.A., Capella-Gutierrez, S., Castoe, T.A. et al., 2014. Three crocodilian genomes reveal ancestral patterns of evolution among archosaurs. *Science* 346, 1254449.
- Hao, J., Li, Y.W., Xie, M.Q., Li, A.X., 2012. Molecular cloning, recombinant expression and antibacterial activity analysis of hepcidin from *Simensis* crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Comp. Biochem. Phys. Part B* 163, 309–315.
- Jangpromma, N., Preecharram, S., Srilert, T., Maijaroen, S., Mahakunakorn, P., Nualkaew, N., Daduang, S., Klaynongsruang, S., 2016. In vitro and in vivo wound healing properties of plasma and serum from *Crocodylus siamensis* blood. *J Microbiol Biotechnol* 26, 1140-1147.
- Kozłowski, H.N., Lai, E.T., Havugimana, P.C., White, C., Emili, A., Sakac, D., Binnington, B., Neschadim A, McCarthy SD, Branch DR. 2016. Extracellular histones identified in crocodile blood inhibit in-vitro HIV-1 infection. *AIDS* 30, 2043-52.
- Kommanee, J., Preecharram, S., Daduang, S., Tamsiripong, Y., Dhiravisit, A., Yamada, Y., Thammasirirak, S., 2012. Antibacterial activity of plasma from crocodile (*Crocodylus siamensis*) against pathogenic bacteria. *Annals Clin Microbiol Antimicrobial* 11, 12.
- Li, B., Dewey, C. N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data
- Lueangsakulthai, J., Phosri, S., Theansungnoen, T., Jangpromma, N., Tamsiripong, T., Mckendrick, J.E., Khunkitti, W., Klaynongsruang, S. 2018. Novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) hemoglobin hydrolysate. *Biotechnol Appl Biochem.* 65:455-466.with or without a reference. *BMC Bioinformatics* 12, 323.

- Maijaroen. S., Jangpromma, N., Daduang, J., Klaynongsruang, S., 2018. KT2 and RT2 modified antimicrobial peptides derived from *Crocodylus siamensis* Leucrocin I show activity against human colon cancer HCT-116 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 62, 164-176.
- Merchant, M.E., Leger, N., Jerkins, E., Mills, K., Pallansch, M.B., Paulman, R.L., Ptak, R.G., 2006. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet. Immunol. Immunopathol* 110, 221-228.
- Merchant, M.E., Roche, C., Elsey, R.M., Prudhomme, J., 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. biochem. Physiol.Part B* 136, 505-513.
- Minasyan, H. 2018. Phagocytosis and oxycytosis: two arms of human innate immunity *Immunol Res* 66:271-280.
- Ou, Y., Ho, W.S., 2016. Crocodile blood extract induces the apoptosis of lung cancer cells through PTEN activity. *Oncol Rep* 36,1457-1466.
- Phosri, S., Mahakunakorn, P., Lueangsakulthai, J., Jangpromma, N., Swatsitang, P., Daduang, S., Dhiravisit, A., Thammasirirak, S. 2014. An investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities from blood components of Crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Protein J* 33:484-492.
- Phosri, S., Jangpromma, N., Chang, L.C., Tan, G.T., Wongwiwatthananut, S., Maijaroen, S., Anwised, P., Payoungkiattikun. W., Klaynongsruang, S., 2018. Siamese Crocodile White Blood Cell Extract Inhibits Cell Proliferation and Promotes Autophagy in Multiple Cancer Cell Lines. *J Microbiol Biotechnol* 28, 1007-1021.
- Phupiewkham, W., Lu, Q., Payoungkiattikun, W., Temsiripong, T., Jangpromma, N., Lai, R., Klaynongsruang, S., 2018. Development and Characterization of an Anti-Acne Gel Containing Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Leukocyte Extract. *J Microbiol Biotechnol* 28, 707-717.
- Reyes-Becerril, F. Ascencio-Valle, M.E. Macias, M. Maldonado, M. Rojas, M.A. Esteban 2012. Effects of marine silages enriched with *Lactobacillus sakei* 5-4 on haemato-immunological and growth response in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Aeromonas veronii* *Fish Shellfish Immunol.* 33: 984-992.
- Song, X., Hu, X., Sun, B., Bo, Y., Wu, K., Xiao, L., Gong, C., 2017. A transcriptome analysis focusing on inflammation-related genes of grass carp intestines following infection with *Aeromonas hydrophila*. *Scientific reports* 7, 40777.

- Tankrathok, A., Punpad, A., Kongchaiyapoom, M., Sosiangdi, S., Jangpromma, N., Daduang, S., Klaynongsruang, S. 2018. Identification of the first *Crocodylus siamensis* cathelicidin gene and RN15 peptide derived from cathelin domain exhibiting antibacterial activity. *Biotechnol Appl Biochem.* 66(2): 42–152.
- Theansungnoen, T., Yarksa, N., Daduang, S., Dhiravisit, A., Thammasirirak, S., 2014. Purification and Characterization of Antioxidant Peptides from Leukocyte Extract of *Crocodylus siamensis*. *Protein J* 33, 24–31.
- van Hoek, M.L., 2014. Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals (Basel)*. 7, 723–53.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10, 57–63.
- Maijaroen S, Jangpromma N, Daduang J, Klaynongsruang S. (2018) KT2 and RT2 modified antimicrobial peptides derived from *Crocodylus siamensis* Leucrocine I show activity against human colon cancer HCT-116 cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 62:164–176.

Figure legends

Figure 1. Change in number of WBC and RBC among non-immunized (0h) and immunized 1h and 24h.

Figure 2. BLASTX analysis of unigenes identified from the *C. siamensis* transcriptome. A total of 107,592 unigenes were queried against the nonredundant (Nr) protein database. The pie charts show the species distribution (A) E-value (B) similarity distribution (C) species classification.

Figure 3. DEGs in the RNA-Seq data. Volcano plot of statistically significant DEGs at $P \leq 0.05$ identify from the RNA-Seq. The X-axis shows the fold change in gene expression between different samples, and the Y-axis shows the statistical significance of the differences. (A–C) Statistically significant differences are represented by lower -1 and higher 1 of $\log_2$ (fold change) corresponding to down- and up-regulated DEG respectively. (D) The venn diagram presents the number of different expressed genes between each group and the overlaps between groups

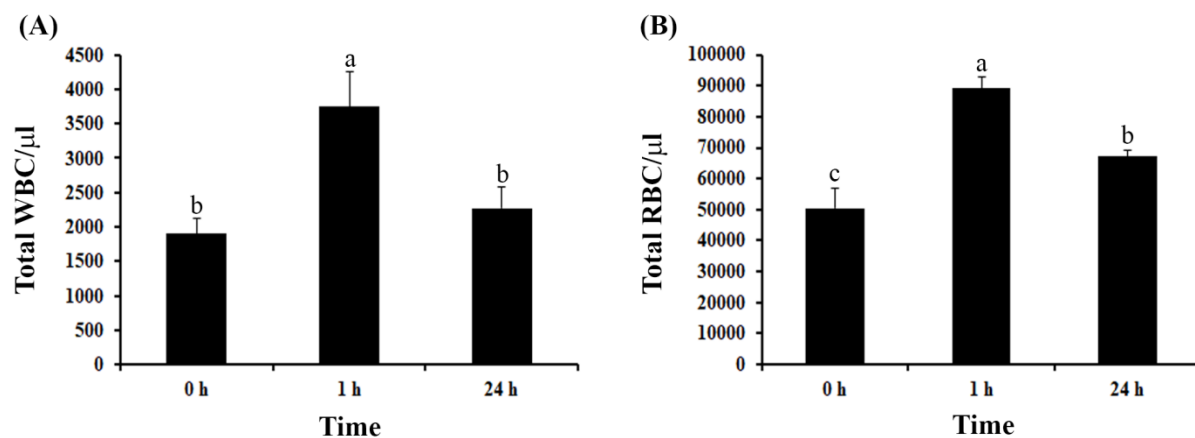


Figure 1 Change in number of WBC and RBC among non-immunized (0h) and immunized 1h and 24h.

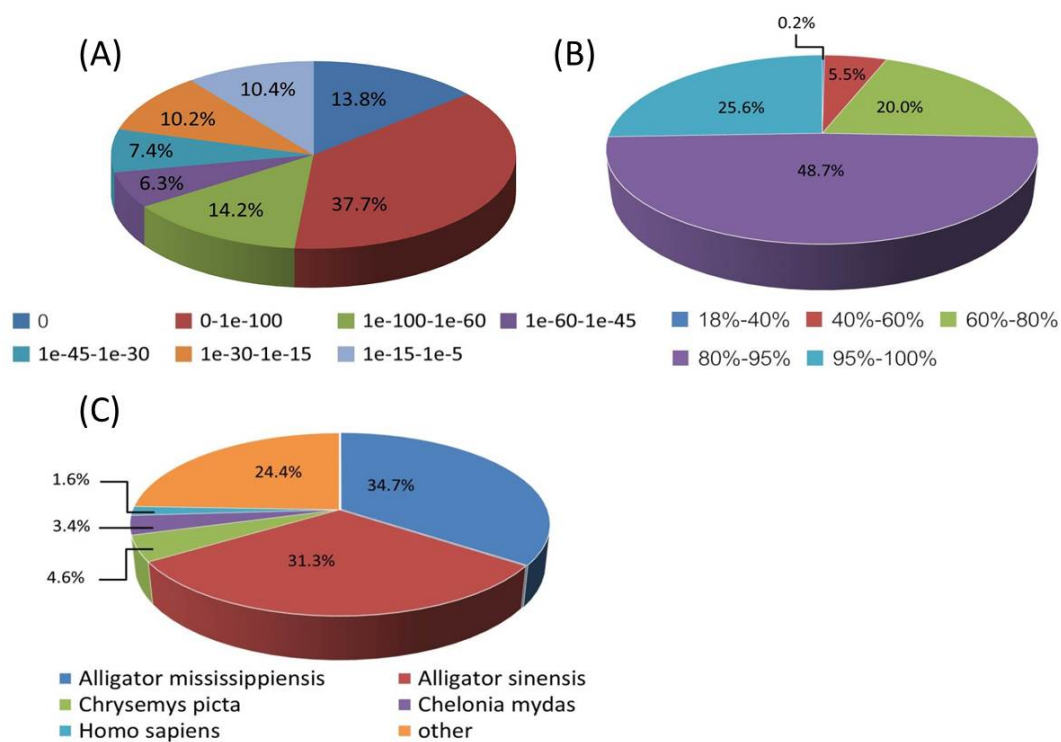


Figure 2 BLASTX analysis of unigenes identified from the *C. siamensis* transcriptome.

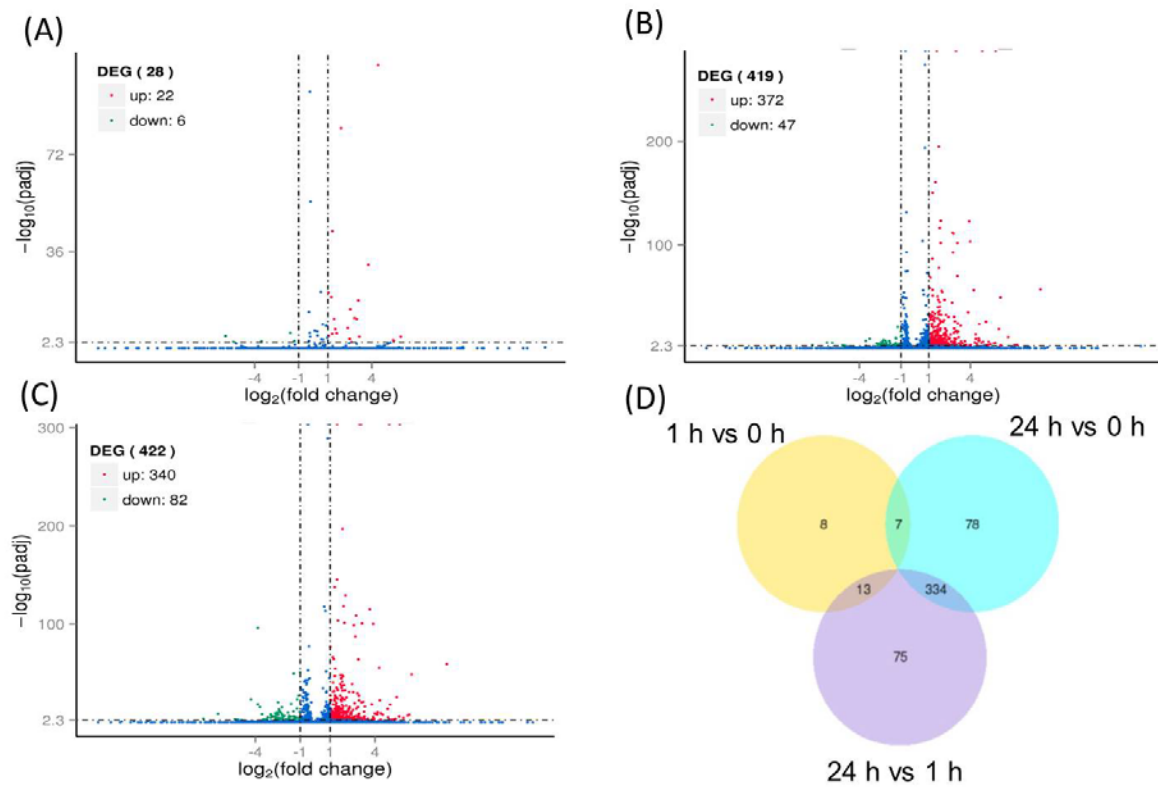


Figure 3 DEGs in the RNA-Seq data.

Table 1 Overview of the number of transcripts and unigenes in different length intervals

Transcript length interval	200-500bp	500-1kbp	1k-2kbp	>2kbp	Total
Number of transcripts	27413	34514	20704	25048	107679
Number of unigenes	27326	34514	20704	25048	107592

Table 2 The Ratio of Successfully Annotated Genes in each data base.

Annotated in	Number of Unigenes	Percentage (%)
NR	43934	40.83
NT	52866	49.13
KO	22620	21.02
SwissProt	38118	35.42
Pfam	37187	34.56
GO	37270	34.64
KOG	20441	18.99
Annotated in all Databases	11919	11.07
Annotated in at least one Database	60912	56.61
Total Unigenes	107592	100

Percentage in parenthesis indicates number of annotated total reads with databases.

Annotation databases; NR (NCBI non-redundant protein sequences), Nt (NCBI nucleotide sequences), KO (KEGG Orthology), SwissProt , Pfam (Protein family),GO (Gene Ontology), KOG (euKaryotic Orthologous Groups)

Table 3 Number of read in 3 different times investigation

Sample name	Raw Reads	Total reads	Total mapped
0h	60866148	59436942	49655960 (83.54%)
1h	59042408	57560316	47761848 (82.98%)
24h	62101112	60556164	50115898 (82.76%)

Percentage in parenthesis indicates reads that can be mapped to the reference genome

Table 4 KEGG Enrichment pathway of up-regulated DEGs in comparison in two time points

1 h vs 0 h		24 h vs 0 h		24 h vs 1 h	
Pathway	gene number	Pathway	gene number	Pathway	gene number
Osteoclast differentiation	6	Tuberculosis	22	Tuberculosis	18
TNF signaling pathway	5	Pertussis	10	Phagosome	14
Prolactin signaling pathway	3	Rheumatoid arthritis	10	Salivary secretion	9
Amphetamine addiction	2	Biosynthesis of amino acids	10	Rheumatoid arthritis	9
MAPK signaling pathway	4	Phagosome	13	Complement and coagulation cascades	7
Circadian entrainment	2	Cytokine-cytokine receptor interaction	15	Cytokine-cytokine receptor interaction	13
Oxytocin signaling pathway	3	Complement and coagulation cascades	7	Pertussis	8
HTLV-I infection	4	Salivary secretion	8	Prion diseases	5
Pertussis	2	Legionellosis	8	Biosynthesis of amino acids	8
Salmonella infection	2	Leishmaniasis	9	Staphylococcus aureus infection	6
Rheumatoid arthritis	2	Prion diseases	5	Legionellosis	7
Herpes simplex infection	3	Malaria	7	Malaria	6
Leishmaniasis	2	Inflammatory bowel disease	7	Inflammatory bowel disease	6
Dopaminergic synapse	2	TNF signaling pathway	10	Leishmaniasis	7
Colorectal cancer	2	Staphylococcus aureus infection	6	Collecting duct acid secretion	3
Cholinergic synapse	2	Osteoclast differentiation	11	Amoebiasis	8
Toll-like receptor signaling	2	Galactose metabolism	5	Chagas disease	8
B cell receptor signaling	2	African trypanosomiasis	5	Galactose metabolism	4
Chagas disease	2	Amoebiasis	9	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	4
Hepatitis C	2	Salmonella infection	7	Starch and sucrose metabolism	4

Table 5 Up-regulated DEGs transcription factors since 1 hour after bacterial inoculation

Unigene ^a	Accession ^b	Coreresponse gene ^c	Function ^d
Cluster-2754.36308	XP_006262364.1	Transcription factor jun-B	Transcription factor involved in regulating gene activity following the primary growth factor response
Cluster-2754.41660	XP_006014950.1	Transcription factor Spi-B-like	Acting as a sequence specific transcriptional activator
Cluster-2754.35538	XP_006015445.1	Proto-oncogene c-Fos, partial	Transcription factor recognizing and binding to the enhancer heptamer motif
Cluster-2754.39612	XP_006271086.1	Transcription factor jun-D	Transcription factor binding AP-1 sites
Cluster-2754.36850	XP_006267477.1	CCAAT/enhancer-binding protein	Transcription factor regulating the expression of genes involved in immune and inflammatory responses

^aThe name of unigene of this work

^bAccession number that have high nucleotide sequence similar to Siamese crocodile cluster

^cGene name correspond accession number

^dPossible gene function according to the UniProt Knowledgebase (UniProtKB) <https://www.uniprot.org/>

Table 6 Comparison cathelicidins of *C. Siamensis* and their orthologs

Unigene ^a	log2 Fold ^b 1h/0h	log2 Fold ^c 24h/1h	Accession ^d	% identity ^e	query cover ^f
CS cathelicidin #1	-0.33964	5.4489	XM_019482930.1	82%	70%
CS cathelicidin #2	-0.29315	6.4476	XM_006037211.3	91%	82%
CS cathelicidin #3	-0.028455	1.295	XM_014606513.2	85%	83%
CS cathelicidin #4	-0.11067	4.9506	XM_006026411.3	87%	97%
CS cathelicidin #5	0.10023	1.4655	XM_006026410.3	91%	34%
CS cathelicidin #6	0.060913	0.52344	XM_006026410.3	90%	40%
CS cathelicidin #7	-0.072179	4.4788	XM_006262429.3	91%	11%

^aNumbers of unigene in RNA-seq analysis were named CS (*C. siamensis*) cathelicidin following the sequence number

^bLog2 fold change CS cathelicidins gene expression level of 0h compared 1h

^cLog2 fold change CS cathelicidins gene expression level of 1h compared 24h

^dHighest score of hit accession number in NCBI all of them are gene of *Alligator mississippiensis*

^e% identity between accession number and CS cathelicidin

^fQuery cover between accession number and CS cathelicidin

Table 7 KEGG Enrichment pathway of down-regulated DEGs in comparison in two time points

24 h vs 0 h		24 h vs 1h	
Pathway	gene number	Pathway	gene number
Intestinal immune network for IgA production	5	Primary immunodeficiency	6
Primary immunodeficiency	5	Intestinal immune network for IgA production	5
Asthma	4	Rheumatoid arthritis	6
Hematopoietic cell lineage	6	Asthma	4
Dilated cardiomyopathy	5	Leishmaniasis	6
Viral myocarditis	5	Hematopoietic cell lineage	6
Staphylococcus aureus infection	4	B cell receptor signaling pathway	7
Allograft rejection	4	Staphylococcus aureus infection	4
Autoimmune thyroid disease	4	Allograft rejection	4
Leishmaniasis	5	Autoimmune thyroid disease	4
Phagosome	6	Systemic lupus erythematosus	4
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	4	Salmonella infection	4
Systemic lupus erythematosus	4	Viral myocarditis	4
Rheumatoid arthritis	4	Toll-like receptor signaling pathway	5
B cell receptor signaling pathway	5	T cell receptor signaling pathway	5
Hypertrophic cardiomyopathy	3	Phagosome	5
Inflammatory bowel disease	3	Inflammatory bowel disease	3
Tuberculosis	5	Osteoclast differentiation	5
African trypanosomiasis	2	HTLV-I infection	8
Graft-versus-host disease	2	Colorectal cancer	4

เรื่องที่ 3

Identification and characterization of the novel cathelicidin gene from *Rana tigerina*

Anupong Tankrathok^{1,2,*}, Arporn Punpad¹, Chutima Karnmongkol¹, Wutti Rattanavichai², Piyachat Wiriyaumpaiwong¹, Nattapong Srisamoot¹

¹*Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, Kalasin University, Kalasin 46000, Thailand,*

²*Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Technology, Kalasin University, Kalasin, Thailand*

* Corresponding author. Fax: +66 43 812583. E-mail address: anupong2.ta@ksu.ac.th

Key words: antioxidant peptide; cathelicidin; frog

Abstract

Cathelicidins, a group of vertebrate multifunctional molecules play role in innate immunity. Cathelicidins are antimicrobial peptides that involve in the protection against microbial invasion. Nowadays, amphibian cathelicidin-like antimicrobial peptides have been identified from only 10 species and some of these cathelicidins have not yet been functionally characterized. In this study, a novel cathelicidin was identified from the lung of frog, *Rana tigerina*. A cDNA sequence (786 bp) encodes a predicted 157-residue prepropeptide of *R. tigerina* cathelicidin (Rt-CATH), which comprised of a 20-residue signal peptide, a 108-residue cathelin domain and a 29-residue mature cathelicidin peptide (PCR29). The multiple sequence alignment and phylogenetic analysis demonstrated that Rt-CATH shared a high degree of similarity with other amphibian cathelicidins. The synthetic PCR29 peptide possesses antimicrobial activity against only *Bacillus subtilis*. However, the N-terminal twelve amino acid residues of PCR29 (PCR12) peptide was used as a template peptide for designing novel antimicrobial peptide. Two candidate (PCR12 template and PCR12modify6) peptides were selected for investigation of antimicrobial activity. Only four residues were changed from the PCR12 template line, the net charge was increased to 6 and presented α -helix structure. PCR12modify6 peptide performed an antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. This is the first cathelicidin identified from *R. tigerina* and highlighted its derivative peptide potent the novel peptide antibiotics template.

1. Introduction

Cathelicidin is a class of antimicrobial peptide which found in almost all vertebrates (Avila., 2017). The cathelicidin prepropeptides contains the N-terminus conserve region named is ‘cathelin’ and the variable C-terminus mature peptide region perform the antimicrobial activities (Zaiou and Gallo, 2002). Moreover, not only antimicrobial activity but cathelicidin also involve in other biological roles including angiogenesis, cytolysis induction and chemotaxis for immune system cell (Ramanathan et al., 2002).

Amphibians live in harsh environments, with their exposed skin making them vulnerable to microorganisms, ultraviolet radiation and injury (Xu et al., 2015). To combat these factors, they have evolved a unique and highly effective polypeptide defense system in their skin (Yang et al., 2012). Amphibian skin have been proven to secrete diversity of small bioactive peptides with diverse pharmacological bioactivities, including antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory activities (Zhang et al., 2015). Previous research has demonstrated that amphibian skin can repair itself quickly after damage, and thus has potential in wound healing drug development (Ferris et al., 2010; Rezazade Bazaz et al., 2015). However, research on wound-healing promoting peptides, especially those found in amphibian species, is still in its infancy.

Cathelicidins have been identified in multiple vertebrates, but not in many amphibian species. To data, only five amphibian cathelicidins have been identified, including cathelicidin-RC1 and RC2 from *Rana catesbeiana*, cathelicidin-AL from *Amolops loloensis*, cathelicidin-PY from *Paa yunnanensis*, and Lf-CATH1 and 2 from *Limnonectes fragilis* (Hao et al., 2012; Ling et al., 2014; Wei et al., 2013; Yu et al., 2013). In the current study, we characterized a novel cathelicidin from *R. tigerina* (cathelicidin-RT). Moreover, cathelicidin-RT peptide was used as a peptide template for designing novel peptide with improving of antimicrobial activity.

2. Materials and Methods

2.1 RACE amplification and gene expression

Total RNA was extracted from frog lung by using GF-1 Total RNA extraction Kit (Vivantis, USA) following the manufacturer’s instructions then quantitated by spectrophotometer. The experimental protocol was approved by the animal ethics committee of Kalasin University. The first strand cDNA was synthesized using Viva 2-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with M-MuLV reverse transcriptase by oligonucleotide d(T) (Vivantis,

USA). The cDNA was amplified with forward primer rcCATH-F (5'-GCTGTCAACTTCTACAACC-3') and reverse primer rcCATH-R (5'-CGTTGTCCTGGAAGTCGC-3') with designed based on the conserved domain of *R. catesbiana* cathelicidin (cathelicidin-RC) genes. The 3'-RACE was amplified using 5'-specific forward primer SF-F (frogCATH34-f) (5'-GCTGTCAACTTCTACAACCAACA-3') and oligonucleotide d(T) primer. The PCR reaction was carried out on T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). The PCR products were purified by gel electrophoresis with GF-1 AmbiClean kit (Vivantis, USA). The cDNA sequence was analyzed by standard nucleotide sequencing (Macrogen, South Korea).

2.2 Bioinformatic analysis

The amphibian cathelicidin amino acid sequences were obtained from NCBI BLAST search. Then the amino acid sequence alignments were building using ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Based on the proregion and mature domain phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method (Mega, version 4.0; www.megasoftware.net) by calculating the proportion of amino acid differences among all sequences. Tertiary and secondary structure was performed by I-TASSER (Yang et al., 2015) and PEP-FOLD servers (Thévenet et al., 2012), respectively. The structure graphics was generated in *PyMol* (Schrödinger LLC). Antimicrobial domain of protein was predicted by Antimicrobial Sequence Scanning System (AMPA) server (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/>) (Torrent et al., 2012). The physicochemical properties of peptides were analyzed through APD2: The antimicrobial peptide database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) (Wang et al., 2009). The predicted peptide structure PDB file was used for calculation of peptide positioning in membranes by PPM server (<http://opm.phar.umich.edu/server.php>) (Lomize et al., 2012).

2.3 Peptide synthesis

PCR29 peptide was synthesized by GenScript (NJ, USA). The purity was analyzed by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and peptide sequence was confirmed by electrospray ionization mass spectrometry.

2.4 Antimicrobial activity assay

Antimicrobial activity of all peptides was determined using the broth assay. Briefly, bacterial cells were grown to mid-log phase in nutrient broth at 37 °C, and the bacteria were diluted

to 10^4 CFU/ml. The 50 μ l of bacterial suspension was added to each tube together with 50 μ l of peptide. After incubation at 37 °C for 18-22 h, the value of OD at 600 nm in each well was observed for bacterial growth with spectrophotometer. The percentage of inhibition was calculated according to following formula: % inhibition = [(OD600 nm, control – OD600 nm, sample) / (OD600 nm, control – OD600 nm, blank)] $\times$ 100. All % inhibition results were performed in triplicate tests.

3. Results and discussions

3.1 Identification and expression of cathelicidin-RT

To identify cathelicidin gene in *R. tigerina*, the frog lung was collected then analyzed by RT-PCR with the conserve *R. catesbiana* cathelicidin gene primer. Furthermore, the complete the full length of cathelicidin-RT gene, the 5'- and 3'- ends was determined by RACE-PCR. The complete translate region of prepropeptide sequence cathelicidin-RT cDNA sequence was shown in Figure 1. The 786 bp prepro-cathelicidin-RT nucleotide encoded 157 amino acid residues.

3.2 Amino acid sequence analysis of cathelicidin-RT

The analysis of prepro-cathelicidin-RT amino acid sequence with ExPASy showed the molecular weight of 17.97 kDa with the 6.59 of pI. In addition, after sequence analysis with SignalP 4.0 servers indicated the signal peptide located at first 20 amino acid residues on N-terminus site. The conserved cathelin domain comprised of 108 residues whereas 29 amino acid residues at C-terminal end indicated the mature cathelicidin-RT peptide with released from elastase cleaving with the molecular weight of 3.18kDa and the 10.86 of pI. The amino acid sequence alignment found that prepro-cathelicidin-RT showed 62% similarity with cathelicidin-PY1 precursor (*Nanorana yunnanensis*) and performed 54% and 41% with cathelicidin-RC2 preproprotein *R. catesbeiana* and cathelicidin-BG (*Bufo gargarizans*), respectively (Figure 2). The N-terminal cathelin domain showed highly conserved sequence among amphibian species. In the other hand, the C-terminal cathelicidin domain accomplished the variety of amino acid sequence. From the phylogenetic tree analysis (Figure 3), amphibian cathelicidins was classified into three clusters. Cluster I was the group with the largest number of cathelicidins consist of cathelicidin-RC1 cathelicidin-RC2 cathelicidin-PY cathelicidin-PP (*Polypedates puerensis*) and cathelicidin-RT. Cluster II comprised of cathelicidin-BG and cathelicidin-DM. For cluster III, this cluster has only one cathelicidin members, cathelicidin-AL (*Amolops loloensis*). Predicted tree dimensional

structure from amino acid sequence displayed similar as other known cathelicidin structures especially the highly conserved sequence cathelin domain. The cathelicidin-RT structure contained one α -helical, four β -strand and the C-terminal end random coiled. Beside, this structure presented two disulfide bridges locating on both cathelin domain and mature cathelicidin peptide site (Figure 4).

3.3 Analysis of candidate cathelicidin-RT derived peptide

The candidate three peptide denoted as PCR29; NH₂-PCRGIFCRTGSRSPKAKP SKDNLVRMSLS-COOH, PCR12; NH₂-PCRGIFCRTGSR-COOH and LT12; NH₂-LTKTSRVKRSNR-COOH. The predicted secondary structures of these peptides were presented in Figure 5. The three candidate cathelicidin-RT peptides, PCR29, PCR12 and LT12 peptide was composed of 29, 12 and 12 amino acid residues, respectively. For total net charge, the PCR12 and LT12 peptide performed the cationic peptide property with +3 and +5 net charge, respectively. Although, both PCR12 and LT12 peptide expressed positive total net charge but only PCR12 peptide presented the hydrophobic ratio percent at the level of major group of AMPs. The hydrophobic ratio was 33% and 16% for PCR12 and LT12 peptide, respectively. The three peptides showed distinct characteristic of predicted secondary structure. The PCR29 peptide presented the β -strand model whereas PCR12 peptide performed the random coil loop. Moreover, for LT12 peptide, the predicted secondary structure presented α -helix model. However, the predicted α -helix structure and cationic properties made the LT12 peptide resembled the common AMPs. However, the AMPA server analysis indicated that PCR12 peptide denoted the bactericidal stretch with 13 % probability (data not shown).

3.4 Antimicrobial activity of cathelicidin-RT peptide

The PCR29, PCR12 and LT12 peptide was chemically synthesized by solid phase peptide synthesis. The antimicrobial activity of three peptides was examined by the broth assay (Figure 6). The results cleared that synthetic PCR29 peptide efficiently inhibited the growth of both *Bacillus subtilis* TISTR124 and *Enterococcus faecalis* TISTR927. Wherewith, the PCR12 and LT12 peptide exhibited low antimicrobial activity against both gram positive and gram negative bacteria. The results indicated that PCR29 peptide potent antibacterial peptide.

4. Conclusions

In conclusion, a novel cathelicidin peptide was identified from *R. tigerina* that offers new insights into the role of cathelicidin in the amphibian innate immune system. The sequence alignment and phylogenetic analysis revealed cathelicidin-RT share the conserved sequence among the amphibian cathelicidins. The PCR29 peptide was expected as AMPs released from mature cathelicidin-RT perform antimicrobial activity. Our results provide a novel template for the development of potent peptide antibiotics.

5. Acknowledgements

This work was supported by Thailand Research Fund grants TRG5880148 and DBG6080016, Rajamangala University of Technology Isan, Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Khon Kaen University, and Kalasin University.

6. References

- Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. (1995) FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 195-9.
- Avila EE. (2017) Functions of Antimicrobial Peptides in Vertebrates. *Curr Protein Pept Sci*. 18(11): 1098-1119.
- Bals R. and Wilson J. M. (2003) Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides *Cell. Mol. Life Sci*. 60:711–720.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 13(1): 42-51.
- Cavalcante CS, Falcão CB, Fontenelle RO, Andreu D, Rádis-Baptista G. (2017) Anti-fungal activity of Ctn[15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *J Antibiot (Tokyo)*. 70(3): 231-237.
- Epand RM, Vogel HJ. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*, 1462: 11-28.
- Falcao CB, de La Torre BG, Pérez-Peinado C, Barron AE, Andreu D, Rádis-Baptista G. (2014). Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids*. 46(11): 2561-2571.
- Falcao CB, Pérez-Peinado C, de la Torre BG, Mayol X, Zamora-Carreras H, Jiménez MÁ, Rádis-Baptista G, Andreu D. (2015) Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom

- Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. *J Med Chem.* 58(21): 8553-8563.
- Ferris DR. et al. (2010) Ex vivo generation of a functional and regenerative wound epithelium from axolotl (*Ambystoma mexicanum*) skin. *Dev. Growth Differ.* 52: 715–724.
- Gennaro R, Skerlavaj B, Romeo D. (1989) Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect Immun.* 57(10): 3142-3146.
- Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. (2005). A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Curr. Eye Res.* 30(7): 505-515.
- Hancock RE, Chapple DS. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(6), 1317–1323.
- Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic [alpha]-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 90(3), 369–383.
- Kokryakov VN, Harwig SS, Panyutich EA, Shevchenko AA, Aleshina GM, Shamova OV, Korneva HA, Lehrer RI. (1993) Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* 327: 231-6.
- KoŚciuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, JóŻwik A, Horbańczuk J, KrzyŻewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. (2012) Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep.* 39(12): 10957-10970.
- Ling G, Gao J, Zhang S, Xie Z, Wei L, Yu H, Wang Y. (2014) Cathelicidins from the bullfrog *Rana catesbeiana* provides novel template for peptide antibiotic design. *PLoS One.* 9: e93216
- Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. (2012) OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* 40: D370-D376.
- Lu Z, Wang Y, Zhai L, Che Q, Wang H, Du S, Wang D, Feng F, Liu J, Lai R, Yu H. (2010) Novel cathelicidin-derived antimicrobial peptides from *Equus asinus*. *FEBS J.* 277: 2329-39.
- Malanovic N, Lohner K. (2016) Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals (Basel).* 9(3), 59.
- Oyston PCF, Fox MA, Richards SJ, Clark GC. (2009). Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J Med Microbiol*, 58(8), 977-87.

- Pontes DS, de Araujo RSA, Dantas N, Scotti L, Scotti MT, de Moura RO, Mendonca-Junior FJB. (2018) Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. *Curr Top Med Chem*. doi: 10.2174/1568026618666180206095224.
- Popsueva AE, Zinovjeva MV, Visser JW, Zijlmans JM, Fibbe WE, Belyavsky AV. (1996) A novel murine cathelin-like protein expressed in bone marrow. *FEBS Lett*. 391: 5-8.
- Rezazade Bazaz, M. et al. (2015) Evaluation of Antimicrobial and Healing Activities of Frog Skin on Guinea Pigs Wounds. *Jundishapur J. Microbiol*. 8: e21218.
- Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F. (2002) Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect*. 4(3): 361-372.
- Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 97(12): 3951-3959.
- Tajbakhsh M, Karimi A, Tohidpour A, Abbasi N, Fallah F, Akhavan MM. (2018) The antimicrobial potential of a new derivative of cathelicidin from *Bungarus fasciatus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol*. 56(2): 128-137.
- Teixeira V, Feio MJ & Bastos M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res*. 51(2): 149–177.
- Thévenet P, Shen Y, Maupetit J, Guyon F, Derreumaux P, Tufféry P. (2012). PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res*. 40: W288-W293.
- Tongaonkar P, Golji AE, Tran P, Ouellette AJ, Selsted ME. (2012). High fidelity processing and activation of the human alpha-defensin HNP1 precursor by neutrophil elastase and proteinase 3. *PloS One*, 7: e32469.
- Tomasinsig L, Zanetti M. (2005). The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr. Protein Pept. Sci*. 6(1): 23-34.
- Torrent M, Di Tommaso P, Pulido D, Nogués MV, Notredame C, Boix E, Andreu D. (2012) AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions. *Bioinformatics*. 28: 130-131.
- van Dijk A, Veldhuizen EJ, van Asten AJ, Haagsman HP. (2005) CMAP27, a novel chicken cathelicidin-like antimicrobial protein. *Vet Immunol Immunopathol*. 106: 321-327.
- van Dijk A, Tersteeg-Zijderveld MH, Tjeerdsma-van Bokhoven JL, Jansman AJ, Veldhuizen EJ, Haagsman HP. (2009) Chicken heterophils are recruited to the site of Salmonella

- infection and release antibacterial mature Cathelicidin-2 upon stimulation with LPS. *Mol Immunol Rev.* 46: 1517-1526
- van Dijk A, Molhoek EM, Bikker FJ, Yu PL, Veldhuizen EJ, Haagsman HP. (2011) Avian cathelicidins: Paradigms for the development of anti-infectives. *Vet Microbiol.* 153: 27-36.
- van Hoek ML. (2014) Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals (Basel).* 7(6): 723-753.
- Wang G, Li X, Wang Z. (2009) APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 37: 933-937.
- Wang Y, Lu Z, Feng F, Zhu W, Guang H, Liu J, He W, Chi L, Li Z, Yu H. (2011) Molecular cloning and characterization of novel cathelicidin-derived myeloid antimicrobial peptide from *Phasianus colchicus*. *Dev Comp Immunol.* 35: 314-22.
- Xiao Y, Cai Y, Bommineni YR, Fernando SC, Prakash O, Gilliland SE, Zhang G. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity. *J Biol Chem.* 2006; 281: 2858-2867.
- Xu X, and Lai R. (2015) The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical reviews.* 115: 1760–1846,
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 12: 7-8.
- Yang X, Lee WH, and Zhang Y. (2012) Extremely abundant antimicrobial peptides existed in the skins of nine kinds of Chinese odorous frogs. *J. Proteome Res.* 11: 306–319.
- Yount NY, Bayer AS, Xiong YQ, Yeaman MR. (2006). Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers.* 84(5): 435–458.
- Yu H, Cai S, Gao J, Zhang S, Lu Y, Qiao X, Yang H, Wang Y. (2013) Identification and polymorphism discovery of the cathelicidins, Lf-CATHs in ranid amphibian (*Limnonectes fragilis*). *FEBS J.* 280: 6022-32.
- Zanetti M. (2004) Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol.* 75(1): 39-48.
- Zanetti M. (2005) The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7: 179–196.
- Zaiou M. and Gallo R. L. (2002). Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J. Mol. Med.* 80: 549–561.
- Zhang, Y. (2015) Why do we study animal toxins?. *Zoological research* 36, 183–222.

Figure captions

Figure 1 The cDNA sequence and the predicted prepropeptide sequence of cathelicidin-RT. The predicted mature peptide is displayed in bold. The predicted signal peptides are underlined. An asterisk (*) indicates the stop codon.

Figure 2 The amino acid sequence alignment of cathelicidin-RT complete peptide with other amphibian cathelicidins. The highly conserved amino acid are shaded. The mature peptides are underlined.

Figure 3 The phylogenetic analysis of cathelicidin-RT complete peptide with other crocodilian cathelicidins.

Figure 4 Predicted peptide tertiary structure of cathelicidin-RT.

Figure 5 Predicted peptide secondary structure of PCR29 (A), PCR12 (B) and LT12 (C).

Figure 6 The inhibition percentage of cathelicidin-RT peptide.

atgaagatctggcagtggtgtgttctggattttcgcaatcacattgcagtcagctcactct	60
<u>M K I W Q C V F W I F A I T L Q S A H S</u>	20
gagtctccagatcaggatgagtggatcagagaggccttagatctctacaaccagaaggat	120
<u>E S P D Q D E W I R E A L D L Y N Q K D</u>	40
aatggaaagtgttctataagcaactgtccgatctccggctggcatcctggaggaagag	180
<u>N G K C F Y K Q L S D L P A G I L E E E</u>	60
gaagactctcccacagtcagggttctttataaaggagacagaatgcctcaagtctgaagat	240
<u>E D S P T V R F F I K E T E C L K S E D</u>	80
atagacttggcccagtggtgactacaagaaggatgggcagggtgaaggcctgtgcattgtac	300
<u>I D L A Q C D Y K K D G Q V K A C A L Y</u>	100
ccggaggagggggagacctcaaagactctgaaatgcgtcagcttgaccaagacctccgt	360
<u>P E E G E T S K T L K C V S L T K T S R</u>	120
gttaaacgatcaaatagatcacaacctgcaggggtatctttttagaactggatccaga	420
<u>V K R S N R S Q P C R G I F C R T G S R</u>	140
agtccgattgccaagccaagcaaagacaatttagttcggatgtcactgtcttaa	474
<u>S P I A K P S K D N L V R M S L S *</u>	157

Figure 1 The cDNA sequence and the predicted prepropeptide sequence of cathelicidin-RT. The predicted mature peptide is displayed in bold. The predicted signal peptides are underlined. An asterisk (*) indicates the stop codon

```

cathelicidin-BG      MRSWWLSLLLVSAVTLHGCLSDTAEPEVQDGRSIGDVIDLYNQREGVTTYLYKSLDQLPPV
cathelicidin-DM      MRSWRLSLLLVSAVTLHGCLSDPAEPEVQDGRSIEDVIDLYNQREGVTTYLYKSLDQLPPV
cathelicidin-RT      MKIWQC-VFWIFAITLQSAHSESPD---QDEWIREALDLYNQKDKGKCFYKQLSDLPAG
NP-CATH1             MKVWQC-ALWISALTQLAARSQSPD---REEWIKREALDLYNQREDGEFFFKFLSDLPAA
cathelicidin-PY1     MKVWQC-VLWISALTQLMARSQSPD---QDGWIREALDLYNQREDGEFFFKFLSDLPDV
NP-CATH2             MKVWQC-ALWISALTQLAARSQSPD---REEWIREALDLYNQREDGEFFFKFLSDLPAA
NP-CATH3             MKVWQC-ALWISALTQLAARSQSPD---REEWIKREALDLYNQREDGEFFFKFLSDLPAA
cathelicidin-RC2     MKIWQC-VVWLCAITLVAHSQSPD---REGWITEALDLYNQREDGEFLFKLSELPA
cathelicidin-RC1     MKIWQC-VVWLCAITLVAHSQSPD---REGWIREALDLYNQREDGEFLFKLSELPGP
* : * . : * : * . : * : : * : : * : : : : * : : * : * : * : * : * : *

cathelicidin-BG      PMEEDENPNRRGFIIKETVCLKSENPDLTQCDFKPDGDVKICSLDLGDE-DPEDIMCTSL
cathelicidin-DM      PMEEDENPNRRGFIMKETVCLKSENPDLTQCDFKPDGDVKICSLDLGDE-DPEDIMCFSL
cathelicidin-RT      ILEEEEDSPVTRFFIKETECLKSEDIDLAQCDYKKGQVKAALYPEEGETSKTLKCVSL
NP-CATH1             PLEEE-NNPTIAFLIKETECLKSEDINLEECDYKKGGEVKVGLYPAEGETMKTLLKCVGL
cathelicidin-PY1     LLEEEGDSIPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKCDYRKDGEVKVCTLYREEE----DVKCVSL
NP-CATH2             PLEEEGDSIPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKRDYRKDGEVKVCALYREEE----DVKCVSL
NP-CATH3             PLEEEGDSIPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKRDYRKDGEVKVCALYREEE----DVKCVSL
cathelicidin-RC2     LLEEEGDSIPAIGFLIKETDCPKSEENDLEGCDYSKDGEVKVCAHREDE----DVKCVSL
cathelicidin-RC1     LLEEEGDSIPAIGFLIKETDCPKSEIDLERCDYSKDGEVKVCAHQEEQ----DVKCVSL
: * : : : * : * * * * * * * : * : * : * * * * * : : * : *

cathelicidin-BG      NKEVRVKRSNRRRPCRGSCSPWLRGAYTL----IGRPAKNQNRPKYMWV----
cathelicidin-DM      NKEVRMKRSSRRKPKCKGLCKLKRGGYTL----IGSA-TNLNRPYTVRA----
cathelicidin-RT      TKTSRVKRSNRSQPCRGIFCRTGS-----RSPIAKP----SKDNLVRMSLS-
NP-CATH1             TKANGKAESAVKI-VK-NVCKKAQ---SDGKDQ--WKAILQWRNTPVTGMDSSC
cathelicidin-PY1     SKNSRTRRAGTKRKN-FLCKLKEKLRITVITS-HIDK-VLRPQG-----
NP-CATH2             SKDSRTRRSGTKRNCN-FLCKVKQRLRSASSTSHIGMAIPRPRG-----
NP-CATH3             SKDSRTRRSGTKRNCN-FLCKVKQRLRSASSTSHIGMAIPRPRG-----
cathelicidin-RC2     TAENSRSKRSSNKKCG-FFCKLKNKLKSTGSRSNIAAG--THGGTFRV-----
cathelicidin-RC1     TENSRSKRSSKKKKCK-FFCKVKKKIKSIGFIPIVSI--PFK-----
. . . . .

```

Figure 2 The amino acid sequence alignment of cathelicidin-RT complete peptide with other amphibian cathelicidins. The highly conserved amino acid are shaded. The mature peptides are underlined

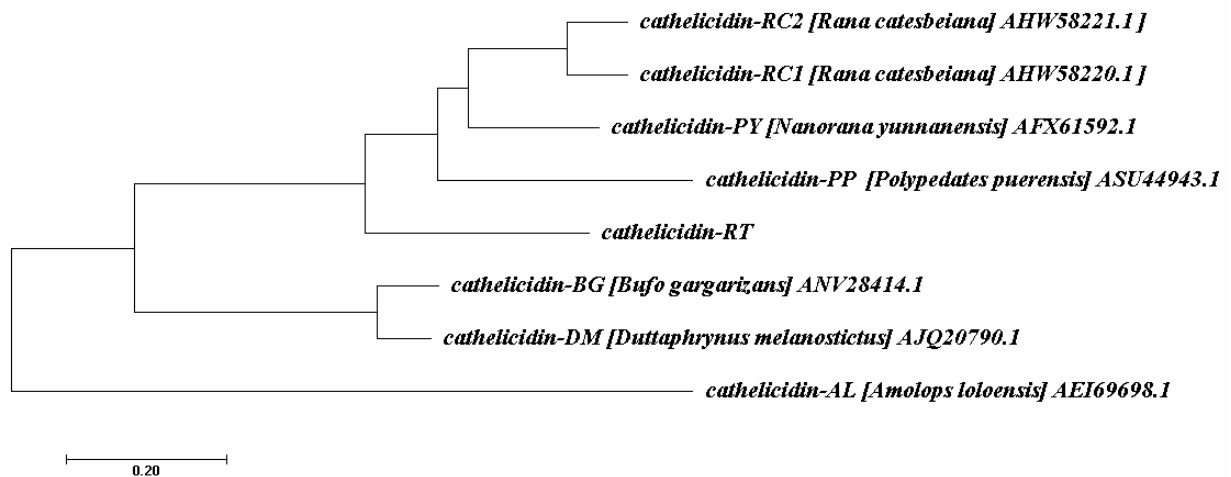


Figure 3 The phylogenetic analysis of cathelicidin-RT complete peptide with other crocodilian cathelicidins

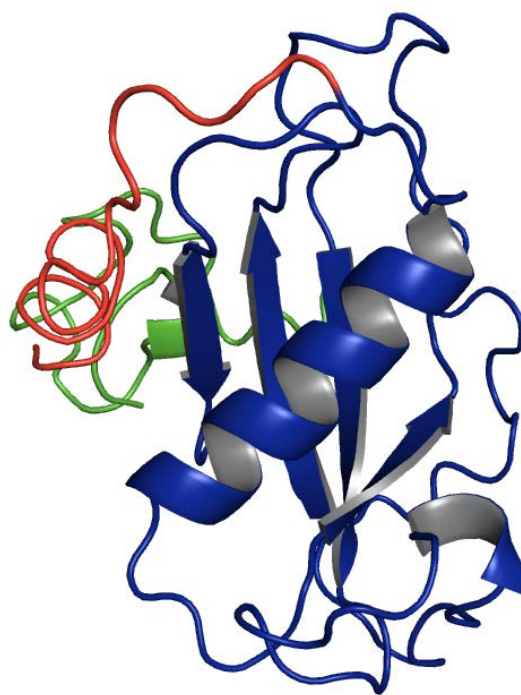


Figure 4 Predicted peptide tertiary structure of cathelicidin-RT

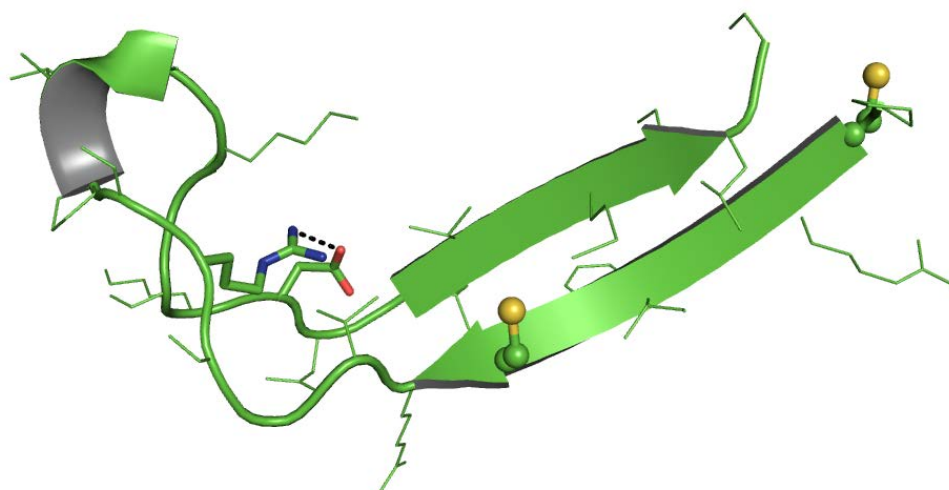


Figure 5 Predicted peptide secondary structure of PCR29

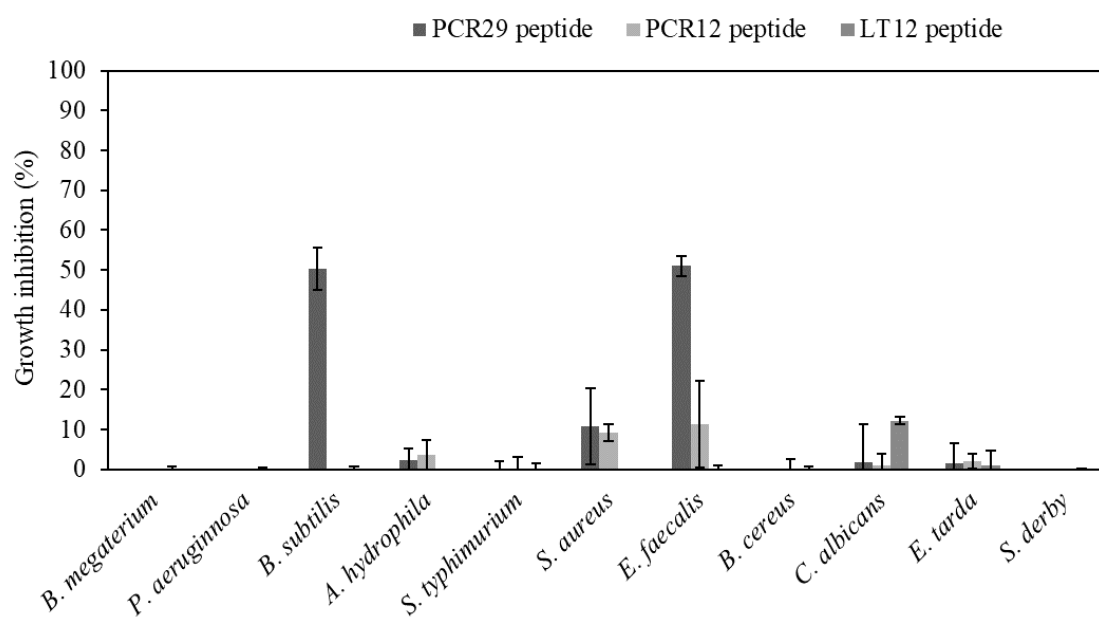


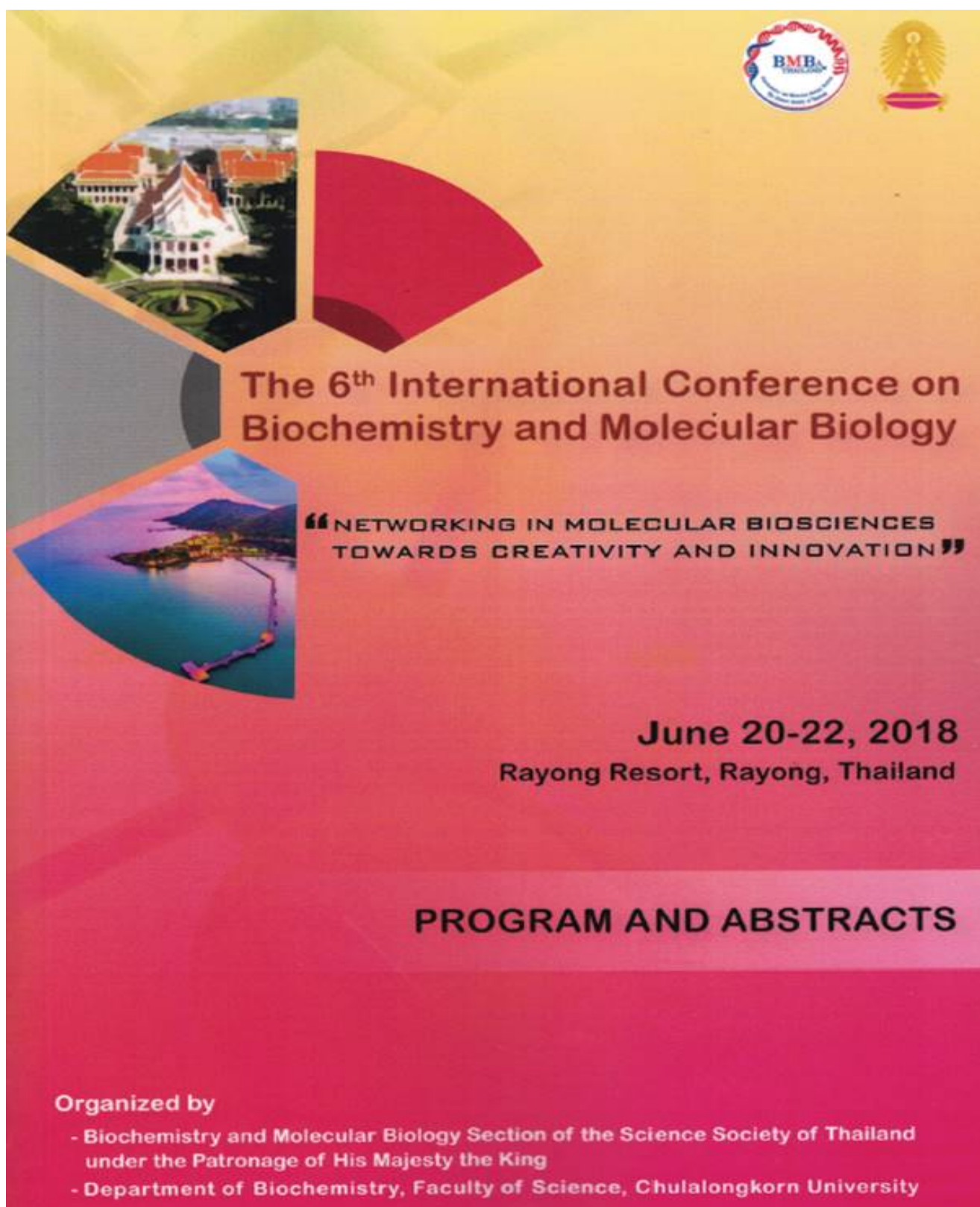
Figure 6 The inhibition percentage of cathelicidin-RT peptide

ภาคผนวก 3

การเข้าร่วมงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

ระหว่างวันที่ 20-22 มิถุนายน 2561

The 6th Biochemistry and Molecular Biology
International Conference (6th BMB): Networking in
Biosciences for Creativity and Innovation



**The 6th International Conference on
Biochemistry and Molecular Biology**

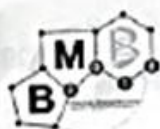
**“NETWORKING IN MOLECULAR BIOSCIENCES
TOWARDS CREATIVITY AND INNOVATION”**

June 20-22, 2018
Rayong Resort, Rayong, Thailand

PROGRAM AND ABSTRACTS

Organized by

- Biochemistry and Molecular Biology Section of the Science Society of Thailand
under the Patronage of His Majesty the King
- Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University



S1-O-01

**TYROSINASE INHIBITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
LEUCROCIN I AND ITS DERIVATIVES**

**Anupong Joompang^{1,2}, Nisachon Jangpromma^{2,3},
Sompong Klaynongsruang^{1,2,*}**

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*E-mail: cthuwait@yahoo.com

This research was aimed to investigate tyrosinase inhibitory activity and antioxidant activity of antimicrobial peptide, Leucrocine I. Our results demonstrated that it showed uncompetitive inhibitory property with IC_{50} of $401.97 \pm 9.55 \mu M$ and $205.00 \pm 10.32 \mu M$ toward monophenolase and diphenolase, respectively, but lacking antioxidant activity. To improve the tyrosinase inhibitory activity and antioxidant activity, Leucrocine I-based design peptide was performed. Three rationally designed peptides, T1, T2 and T3, were obtained with non-hemolysis activity was detected toward red blood cell. T1 and T2 exhibited competitive inhibition with IC_{50} toward diphenolase less than Leucrocine I approximately 1.48- and 1.60-fold, respectively. Furthermore, T1 and T2 dramatically increased lag time of monophenolase activity. In terms of T3, both diphenolase and monophenolase inhibitory activity were dramatically decreased when compared to Leucrocine I. CD spectroscopy indicated that Leucrocine I, T1 and T2 caused the change of native secondary structure of tyrosinase resulting in decreasing of tyrosinase activity. Moreover, T1 and T2 exhibited stronger antioxidant activity toward DPPH and ABTS radical than that of Leucrocine I. These results suggested that Leucrocine I, T1 and T2 are promising peptide to develop as ingredients contained in skin whitening cosmetic and hyperpigmentation treatment agent.



S1-O-02

IDENTIFICATION OF BROAD BIOLOGICAL ACTIVITIES INVOLVEMENT IN ANTI-INFLAMMATION OF KT2, CATIONIC PEPTIDES, AGAINST LIPOPOLYSACCHARIDE-STIMULATED MACROPHAGES

**Wisarut Payoungkiattikun¹, Nisachon Jangpromma^{1,2},
Sompong Klaynongsruang^{1,3,*}**

¹ Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*E-mail: somkly@kku.ac.th

Within the last decades, the peptide-based compounds display to conduce the novel anti-inflammatory agents. In the present study, we evaluated the anti-inflammatory activity and other interrelated biological events of cationic peptide, KT2. Our findings demonstrated that KT2 could reduce various inflammatory marker molecules including nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α from LPS-stimulated RAW 264.7 cells in a dose dependent manner. Herein, the molecular mechanisms involved in anti-inflammatory property of KT2 were also elucidated. In detail, KT2 at a concentration between 5-30 μ g/ml could suppress nitric oxide synthase (iNOS), TNF- α , signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1), c-Jun N-terminal kinases-1 (JNK-1), nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and p38 mRNA expression level. On the other hand, this peptide could up-regulate anti-inflammatory related mRNA expression levels including extracellular signal-regulated kinases (ERK) and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1). In addition, the production of reactive oxygen species (ROS) which involve to the progression of inflammatory disorders was also observed to be markedly reduced. Moreover, KT2 peptide was exhibited anti-apoptotic property. Taken collectively, the obtained results indicate that this peptide may provide a potential therapeutic approach for the treatment of inflammation-related diseases.

S1



S1-P-22

CHARACTERIZATION OF MODIFIED CROCODILE (*Crocodylus siamensis*) HEMOGLOBIN USING BIS(3,5-DIBROMOSALICYL) FUMARATE

**Napaporn Roamcharern^{1,2}, Wisarut Payoungkiattikun²,
Nisachon Jangpromma^{2,3}, Sompong Klaynongsruang^{1,2,4}**

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI)

³ Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*E-mail: somkly@kku.ac.th

A variety of cross-linked cell-free hemoglobin (CL-Hb) compounds have been developed with the aim of creating novel hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs). In general, derived CL-Hb using different cross-linking agents exhibits a lower oxygen affinity than native hemoglobin. Therefore, crocodile (*C. siamensis*) hemoglobin (cHb) constitutes an interesting new approach in HBOC development, as it was reported to possess a higher oxygen affinity than human hemoglobin (hHb). In this study, we performed a modified cHb through cross-linking with bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate (DBBF) and aimed to investigate its basically physiological and biological functions as comparing with hHb. The DBBF-cHb plays a different characteristic of cross-linking, since there was the absence of $\beta\beta$ -dimer band on SDS-PAGE. It is important to note that DBBF-cHb exhibited a higher oxygen affinity than DBBF-hHb with P50 value of 20.1 mm Hg ($n = 2.5$). In conclusion, cHb exhibited oxygen binding characteristics that may benefit the development of a cHb-based oxygen carrier suitable for human use in the future.

S1



The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology
"Networking in Molecular Biosciences towards Creativity and Innovation"

S1-P-40

***In vitro* ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AND APOPTOSIS
INDUCING ACTIVITY OF RT2, MODIFIED PEPTIDE OF
LEUCROCIN I, ON HUMAN COLON CANCER HCT-116 CELLS**

**Surachai Maijaroen^{1,2}, Nisachon Jangpromma^{2,3}, Jureerut Daduang⁴,
Sompong Klaynongsruang^{1,2,*}**

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*E-mail: somkly@kku.ac.th

S1

Colon cancer is the third most common cancer causing high mortality rates world-wide. In light of recorded incident, hence, the present study aimed to investigate the effect of RT2, a modified cationic Leucrocine I peptidized from *Crocodylus siamensis*, against HCT-116 human colon cancer cell lines. Using MTT assay, results demonstrated that RT2 at the concentrations of 37.5, 75 and 150 µg/mL exhibited strong cytotoxic effect against HCT-116 cell lines after 24 h of treatment ($IC_{50} = 87.84 \mu\text{g/mL}$). This peptide found to be non-toxic to Vero cells. Additionally, RT2 treatment caused a significant reduction in the colony forming ability of cancer cells. A remarkable suppression of cancer cells migration was observed after treatment with RT2, indicating potent anti-metastatic properties. The mechanism involved in cancer cell cytotoxicity of this peptide was shown to be associated with the induction of apoptosis, as evidenced by annexin V-FITC/PI staining flow cytometry analysis. Moreover, the molecular mechanisms of RT2 in apoptosis induction were observed to decrease the mRNA expression levels of Bcl-2 and XIAP and increase expression of Cytochrome C, Caspase-3, and Caspase-9. These collected data clearly demonstrated that RT2 offered great potential in the treatment of human colon cancer cells.



S2-P-02

DESIGN OF POTENT ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM CROCODILIAN CATHELICIDINS

Anupong Tankrathok^{1,2}, Arpaporn Punpad¹, Sirinthip Sosiangdi^{2,3}, Monrudee Kongchaiyapoom³, Nisachon Jangpromma^{2,4}, Sompong Klaynongsruang^{2,3,*}

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University, Kalasin 46000, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*E-mail: somkly@kku.ac.th

Cathelicidins are antimicrobial peptides that play role in the host defense mechanism against microorganism of vertebrate. In crocodilian species, cathelicidin has been identified from four species (*Alligator mississippiensis*, *Alligator sinensis*, *Crocodylus porosus* and *Crocodylus siamensis*). The aim of the study was to design novel peptide analogs with improved antimicrobial activity base on crocodilian cathelicidin templates. The 17 cathelicidin have been reported in database, one from *C. siamensis* (CsCATH), four from *C. porosus* (CpCATH) and six from both *A. sinensis* (AsCATH) and *A. mississippiensis* (AmCATH). Thirteen peptides show potential to possess antimicrobial activity and 12 peptides contain alpha-helical structure. The antimicrobial sequence scanning system analysis revealed that three (FN12, RN12 and TR13) peptides from cathelicidin sequences exhibited the highest probability percentage to have antimicrobial activity. Since RN12 located on the putative mature CsCATH peptide (RN15). Therefore, RN15 was used as template peptide for designed RN15modify peptide. Only four residues were changed from the template line, the net charge was increased to 4.9 and showed complete α -helix structure. From minimum inhibition concentration (MIC) and scanning electron microscopy (SEM), RN15modify peptide performed a better antimicrobial activity than RN15 template peptide. Besides, both peptides showed low hemolytic activity and cytotoxic activity. Therefore, the RN15modify peptide might be served as a novel candidate peptide antibiotic.



S4-P-01

SCREENING OF RESPONDED INNATE IMMUNE GENES FROM BACTERIAL IMMUNIZED *Crocodylus siamensis*

**Bancha Mahong¹, Nisachon Jangpromma^{1,2}, Sakda Daduang^{1,4},
Yosapong Temsiripongb⁵, Sompong Klaynongsruang^{1,3,*}**

¹ Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁵ Sriracha Moda Co., Ltd., Sriracha, Chonburi 20110, Thailand

*E-mail: somkly@kku.ac.th

The immune response pathways in model mammalian organisms have been intensively investigated, but the mechanisms of immune responses in reptiles, in particular crocodiles, remains poorly understood. Crocodile has terrific innate immune system, because they usually get a lot of injuries throughout life cycle from fighting each other and live in abundant pathogenic microorganism pool, but there are no crocodile death reports from infection diseases. To explore innate immune response with transcriptomics, Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) was immunized with *Aeromonas hydrophila*. Then, the number of total white blood cell (WBC) and gene expression level from whole blood at pre-immunized (0 h), 1 h and 24 h of immunization was evaluated. There was a two-fold increase in WBC counts 1 h after immunization; however, at 24 h after immunization the levels of WBC counts declined to slightly higher the basal level (0 h). Transcriptomic analysis of whole blood using RNA-seq revealed that, after filtering low quality reads, a total of 59,436,942, 57,560,316, and 606,556,164 clear reads were detected at 0 h, 1 h, and 24 h, respectively and sum of all reads in three time points were corresponded to 107,592 unigenes. Comparative gene expression with 0 h found that 22 unigenes were up-regulated and 6 unigenes down-regulated in 1 h, while 372 unigenes were up-regulated and 47 unigenes down-regulated in 24 h. Among 22 unigenes mainly encoded protein involved in cytoskeleton and transcriptional and translational machinery, while 372 unigenes encoded protein involved in signal transduction, metabolism, antimicrobial resistant and so on. Our finding suggests that the initial innate immune (1 h) of crocodile like WBC may move toward invader and phagocytosis, afterward (24 h) various biological mechanisms are raised to eliminate pathogen.

S4



S4-P-11

**POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DESIGNED
Crocodylus siamensis HEMOGLOBIN-BASED PEPTIDES**

**Sirinthip Sosiangdi^{1,2}, Anupong Tankrathok³, Sompong Klaynongsruang^{1,2},
 Nisachon Jangpromma^{2,4,*}**

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University, Kalasin 46000, Thailand

⁴ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*E-mail: nisaja@kku.ac.th

In a previous study, we reported an antibacterial peptide derived from *Crocodylus siamensis* hemoglobin hydrolysate, named QL17 (QAIHNEKVV AHGKKVL); however this peptide has a narrow spectrum of activity. To improve the antimicrobial activity of the peptide, it was used as the template to design novel effective peptides. The helical wheel diagram was used to monitor and evaluate hydrophobicity and hydrophilicity after the positional change and substitution of certain amino acids. Lysine (K) and arginine (R) were appropriately selected to extend the hydrophilicity, whereas hydrophobic residues such as leucine (L), isoleucine (I) or tryptophan (W) were used to increase the hydrophobicity. As appropriate, two novel peptides were synthesized and named as IL-K (IKHWKKVWKHWKKKL) and IL-R (IRHWRRVWRHWRRRL), which had the same hydrophobicity and net charge at 40% and +7, respectively. Evaluation of the antimicrobial activity by broth microdilution assay revealed that IL-K had a slightly higher inhibition activity than IL-R at concentrations of 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml. Both peptides had approximately 2-fold percentage inhibition higher than penicillin and as the QL17 parental peptide against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. Our findings suggest that the novel designed peptides are promising to be new antibacterial agents for further development and for use as antibiotics.

S4



S4-P-13

**ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
PLASMA FROM CROCODILE (*Crocodylus siamensis*) AND
HUMAN**

**Thanawan Srilert^{1,2}, Sasinapa Sitthisuan^{1,2},
Sompong Klaynongsruang^{1,2}, Nisachon Jangpromma^{2,3,*}**

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes ProCCh, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*E-mail: nisaja@kku.ac.th

Crocodylus siamensis is a small freshwater crocodilian. In the wild, crocodiles live in environments with high risk of bacterial infection, but they normally suffer no adverse effects. Even though the immune system of crocodiles has not been well characterized, it was believed that the powerful innate immunity of crocodiles was derived from their blood, especially plasma. In the present study, we have examined both antibacterial and antioxidant properties of *C. siamensis* plasma by comparing those activities with human plasma. In terms of antibacterial properties, broth dilution assay revealed that *C. siamensis* plasma had significantly higher potent effect on *Staphylococcus* spp. than human plasma. At a concentration of 1000 µg/ml, the percentage of *S. aureus* ATCC 25923 inhibition of *C. siamensis* plasma was determined as 97%, while 60% inhibition was observed in human plasma. In addition, 1,000 µg/ml *C. siamensis* plasma strongly inhibited growth of bacterial drug-resistant strain (methicillin-resistant *S. aureus* DMST 20652 (MRSA)) with the percentage of inhibition at 99%. However, 1,000 µg/ml human plasma was able to inhibit growth of *S. aureus* (MRSA) by only 60%. To investigate antioxidant activity, an ABTS assay was performed, which revealed the ability of crocodile plasma to possess antioxidant activity higher than human plasma. Our data directly indicates that *C. siamensis* plasma is potentially useful as a pharmaceutical agent against disease.

S4



S6-O-02

EXPRESSION OF ALPHA HEMOGLOBIN FROM SIAMESE CROCODILE (*Crocodylus siamensis*) UNDER ANAEROBIC CONDITION

Preeyanan Anwised¹, Nisachon Jangpromma^{1,2}, Sompong Klaynongsruang^{1,3,*}

¹ Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 4002, Thailand

² Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 4002, Thailand

*E-mail: somkly@kku.ac.th

Crocodile hemoglobin (cHb) has been reported to contain various bioactive peptides which have antibacterial and antioxidant activities. From previously work, the separated individual α -globin chain led to enhance the biological activities. Therefore, in order to deep understand on the cHb properties, large amount of single chain cHb is required. In the present study, we demonstrated the expression of cHb in *E. coli* by fusion tags in pET-17b. Interestingly, the soluble α -globin subunit with heme incorporated without requiring external-heme reconstitution was successfully expressed and purified. The result from UV-visible absorption spectra revealed that recombinant α -globin showed oxy-form similar to those of natural cHb. In addition, the secondary structure of recombinant α -globin was mainly displayed α -helix and also exhibited antioxidant and antibacterial activities. To investigate the oxygen fixation efficiency of recombinant α -globin, the *E. coli* intracellular expression of recombinant α -globin under anaerobic conditions was evaluated by comparing to the wild type *E. coli*. Our result demonstrates that low oxygen condition reduced growth of wild type *E. coli*. However, the significantly increased of *E. coli* survival under low oxygen stress was correlated by intracellular expression of recombinant α -globin. These evidences suggested that recombinant α -globin mediated anaerobic tolerance in *E. coli* due to it has high oxygen binding affinity property. Taken collectively, the derived results suggested that the recombinant α -globin accomplished express in *E. coli* and could possess their biological properties in common as the natural.

S6



S6-P-03

**PRELIMINARY STUDY ON THE PARTIAL MOLECULAR
CLONING OF DEFENSIN GENE FROM SIAMESE CROCODILE
(*Crocodylus siamensis*)**

**Boonpob Nowichai¹, Preeyanan Anwised¹, Nisachon Jangpromma^{1,2},
Sompong Klaynongsruang^{1,3,*}**

¹ Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI),
Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002,
Thailand

*E-mail: somkly@kku.ac.th

Defensin, a cationic antimicrobial peptide, is the major peptide which plays an important role in innate immunity system of vertebrates such as mammals, birds, and reptiles. Among reptiles, crocodilian was believed to possess an effective inherited innate immunity. However, defensin still has not been observed in Siamese crocodile. So, this study aims to investigate the nucleotide sequence of *C. siamensis* defensin. Specific primers were designed by using defensin nucleotide sequence from crocodile database (Crocbase). The PCR reaction was performed. The resulted PCR product in the length of 88 bp was ligated into pGEMT-easy vector and transformed into *Escherichia coli* (DH5α). To prove whether recombinant *E. coli* carries the target gene, the expected clones were picked up for plasmid extraction and performed DNA sequencing analysis. The regions of similarity between biological sequences were identified using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The result demonstrated that the PCR product gene sequence displayed 80-95%, 100% and 96% identity to defensin of avian families, saltwater crocodiles, and gavials, respectively. In addition, the deduced amino acid sequence of target gene was aligned and analyzed among evolutionary related species. Hence, this is the first report of partial *C. siamensis* defensin gene sequence.

S6

การเข้าร่วมประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่เชียงใหม่
ระหว่างวันที่ 6-8 พฤศจิกายน 2560

The workshop on Science and Technology Cooperation
Biodiversity: Global Awareness and Sustainability

The Workshop on Science and Technology Cooperation

Biodiversity: Global Awareness and Sustainability

Organized by
The Thailand Research Fund (TRF)
Chinese Academy of Sciences (CAS)
November 6 - 8, 2017
Chiang Mai, Thailand



Vespid Wasp Venom Hyaluronidases: Purification and Specific Detection Tools for Hyaluronic acid

Sakda Daduang

Associate Professor, Division of Pharmacognosy and Toxicology,
Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
sakdad@kku.ac.th

Vespid wasps are ones of the most dangerous venomous animals. Their venom are mixtures of proteins, enzymes, toxins, etc., even causing fatalities in serious cases in humans and animals whom are envenomated. The major biologically active protein are protease, phospholipase, hyaluronidase, allergen, antigen 5 and mastoparan [1]. Hyaluronidase (HAase), well known as a "spreading factor", is a glycoside hydrolase that hydrolyses β -1, 4-glycosidic bonds between *N*-acetylglucosamine and *D*-glucuronic acid of hyaluronic acid (HA), a primary component of the extracellular matrix of tissues facilitating venom toxin diffusion into the tissue and blood circulation of prey. Venom of two vespids, *Vespa affinis* and *V. tropica* are focused. The higher in potency of *V. tropica* than *V. affinis* corresponded to the higher proportion of HAase in *V. tropica* than *V. affinis* [2]. That was suggested to be the direct effects of HAase to the potency of the venom. Primary structures of *V. tropica* HAase had been clarified. There are at least 2 isoforms: type A (an active form) and type B (an inactive form). They shared about 70% of similarity [3]. The catalytic amino acid residues of type A (Asp and Glu) were substituted by Asn in type B, resulting in the loss of activity. However, the binding

activity is predicted to be unaffected cause of the binding region still being conserved. The recombinant HAase type A and B are genetically produced in *E.coli*. Surprisingly, type B showed one-third of activity lower than type A. The substitution of catalytic residues from Asp or Glu (in type A) to Asn (in type B) is not completely inactive, as being predicted.

For hyaluronic acid (HA), it is well known for medical and pharmaceutical applications including cosmetics and nutraceuticals. The biological sources for HA is quite limited. HA-rich animal sources such as bovine synovial fluid, rooster combs need suitable technology to purify and detection of HA.

The HAase of both types are under investigation for trying to use for applications. One of the most possible one is to develop them as a ligand as a purification tool for HA. Another application is for high specific detection of HA in various sources. However, the mutation will be necessary for completely remove the enzyme activity. The substitution may be from Asp, Glu or Asn to Ala, the smallest amino acid without any charges and steric hindrances. The studies are under investigation.

1. Kolarich D, Léonard R, Hemmer W, Altmann F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. FEBS J. 2005 Oct;272(20):5182-90. PubMed PMID: 16218950.
2. Rungsa P, Incamnoi P, Sukprasert S, Uawonggul N, Klaynongsruang S, Daduang J, Patramanon R, Roytrakul S, Daduang S. Comparative proteomic analysis of two wasps venom, *Vespa tropica* and *Vespa affinis*. Toxicon. 2016 Sep 1;119:159-67.
3. Rungsa P, Incamnoi P, Sukprasert S, Uawonggul N, Klaynongsruang S, Daduang J, Patramanon R, Roytrakul S, Daduang S. Cloning, structural modelling and characterization of VesT2s, a wasp venom hyaluronidase (HAase) from *Vespa tropica*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2016 Oct 22;22:28.



Sakda Daduang, Chiang Mai Univ. (B. Pharmacy, 1988, The First honors degree.), The University of Tokyo (Ph.D. in Applied Biological Chemistry, 1997), Associate Dean for Special Affairs and Organization Development, Faculty of Pharmaceutical Science, KCU (2015-present). Specialties: Biochemistry, Immunological Biochemistry, Enzyme Technology, Molecular biology, Toxicology, Toxinology, Pharmacogenetics

15

The Workshop on Science and Technology Cooperation
Biodiversity: Global Awareness and Sustainability

A Potential Wound Healing Ability of Plasma from *Crocodylus siamensis*

Nisachon Jangpromma^{1,2*}, Thanawan Srilert^{2,3}, Sakda Daduang^{2,4},
Sompong Klaynongsruang^{2,3}

¹ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

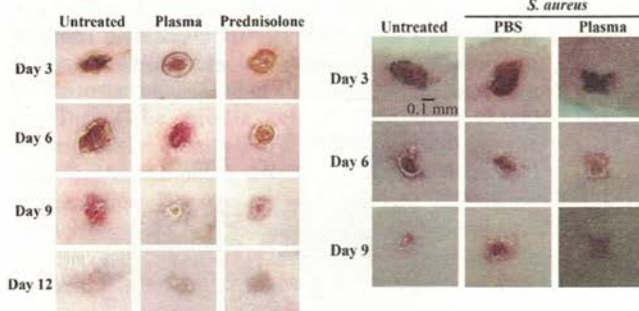
⁴ Department of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

*nisaja@kku.ac.th

Crocodylus siamensis share their aquatic living environments with a variety of opportunistic pathogens and microbes. Although wounds resulting from fighting with other crocodiles or different species occurring frequently, they appear to heal rapidly and without any infection, despite the harsh environment. This anecdotal evidence suggests the probably that *C. siamensis* plasma might be exhibited wound healing property. Therefore, to determine the role of *C. siamensis* plasma during wound healing, the *in vitro* human keratinocytes cell line (HaCaT) was firstly focused on functional analyzed regarding to

proliferation and migration effects. Additionally, *in vivo* mouse excisional skin wound healing and wound infection healing models were used to study the cutaneous regeneration during skin tissue recovering. The collected data from scratch wound experiment demonstrates that crocodile plasma was able to decrease the gap of wounds in a dose-dependent manner. Consistent with *in vitro* results, remarkably enhanced wound repair was also observed in a mouse excisional skin wound model after treatment with plasma. The size of skin wounds after treatment with plasma was more rapidly decreased and almost

complete wound closure was observed after 9 days. The effects of *C. siamensis* plasma on wound healing were further elucidated by treating wound infections by *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 on mice skin. The results indicate that crocodile plasma promotes the prevention of wound infection. Therefore, this work strongly supports the utilization of *C. siamensis* as injured skin therapeutic products.



50

1. Prajanban, B.; Jangpromma, N.; Araki, T.; Klaynongsruang, S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2017, 859(5), 860-869.
2. Phosri, S.; Jangpromma, N.; Patramanon, R.; Kongyingyoes, B.; Mahakunakorn, P.; Klaynongsruang, S. *Inflammation*. 2017, 40(1), 205-220.
3. Pakdeesuwan, A.; Araki, T.; Daduang, S.; Payoungkiattikun, W.; Jangpromma, N.; Klaynongsruang, S. *J Microbiol Biotechnol*. 2016, 27(1), 26-35.
4. Jangpromma, N.; Preecharram, S.; Srilert, T.; Maijaroen, S.; Mahakunakorn, P.; Nualkaew, N.; Daduang S.; Klaynongsruang, S. *J Microbiol Biotechnol*. 2016, 26, 1140-1147.



Nisachon Jangpromma, Khon Kaen Univ. (B.Sc., 2004), Khon Kaen Univ. (M.Sc., 2008), Khon Kaen Univ. (Ph.D., 2012). Research fields: Protein purification, Proteomics, Molecular cloning, Cell culture

A soluble protein expression and characterization of *Crocodylus siamensis* hemoglobin in *Pichia pastoris*

Preeyanan Anwised^{1,2}, Nisachon Jangpromma^{1,3}, Sakda Daduang^{1,4},
Sompong Klaynongsruang^{1,2}

¹ Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI),
Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

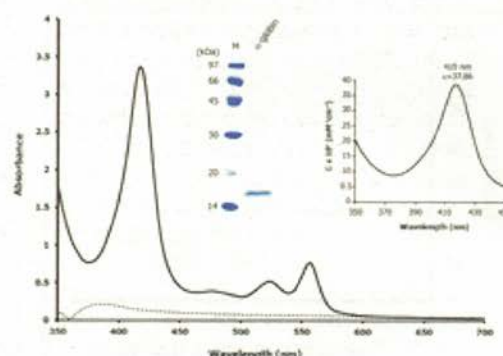
³ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Department of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Science,
Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

somkly@kku.ac.th

The function of crocodile hemoglobin (cHb) is transporting oxygen from lungs to tissues of the body, but it also contains a source of antimicrobial peptides on their molecule. In the present study, the eukaryotic expression system was chosen. Like yeast, crocodiles are eukaryotic cell, so the metabolic pathway is the same as yeast. The *Pichia pastoris* expression system is being successfully used for the production of various recombinant heterologous proteins. It can further be grown to high cell densities and therefore constitutes a fast and cost-effective platform allowing high protein expression yields and success rates for a variety of recombinant proteins. A 15-kDa of soluble protein was succeeding from *P. pastoris* expression after 72 h at 25°C. The authenticity of recombinant cHb was confirmed using LC/MS-MS, resulting in α -globin chain. The characteristic of recombinant hemoglobin was confirmed using heme insertion method. The heme content of recombinant α -globin was calculated to be 0.2 mol of heme/mol of globin. In addition, the quantitative analysis of the iron in recombinant protein revealed that recombinant α -globin contained 0.031 g of atom iron/mol. Additionally, the UV-VIS profile presented a specific signal pattern at 415 nm, indicating that the recombinant protein formed a heme complex identical

to active oxyhemoglobin (540 nm and 580 nm). Moreover, the extinction coefficient of heme was determined by converting the recombinant α -heme to the pyridine hemochrome as described above. By pyridine hemochrome assay, the extinction coefficient of heme-containing protein (ϵ_{415}) was 378.6 mM⁻¹ cm⁻¹. Taken collectively, the derived results of this work could therefore be applied in further expression studies of heme-bound proteins. Moreover, the presented methodology may serve as an attractive option for protein production and purification on a large-scale, which is deemed important for further investigation and characterization of the structural features of the cHb protein.



51

1. Rachel, D.; Hearn, M. J. *Mol. Recognit.* 2005, 18, 119-138.
2. Pakdeesuwan, A.; Araki, T.; Daduang, S.; Payoungkiattikun, W.; Jangpromma, N.; Klaynongsruang, S. *J Microbiol Biotechnol.* 2016, 27(1), 26-35.
3. Srihongthong, S.; Pakdeesuwan, A.; Daduang, S.; Araki, T.; Dhiravisit, A.; Thammasirak, S. *The Protein Journal*, 31(6), 466-476.



Preeyanan Anwised, Khon Kaen Univ. (B.Sc., 2005), Khon Kaen Univ. (Ph.D., 2015).
Research fields: Protein purification, Molecular cloning, Protein expression

Studying on Anticancer Activity of KT2, Antimicrobial Peptide Analogs from Siamese crocodile Leucrocin I

Surachai Maijaroen^{1,2}, Nisachon Jangpromma^{2,3}, Jureerut Daduang⁴,
Sakda Daduang^{2,5}, Sompong Klaynongsruang^{2,3}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI),
Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

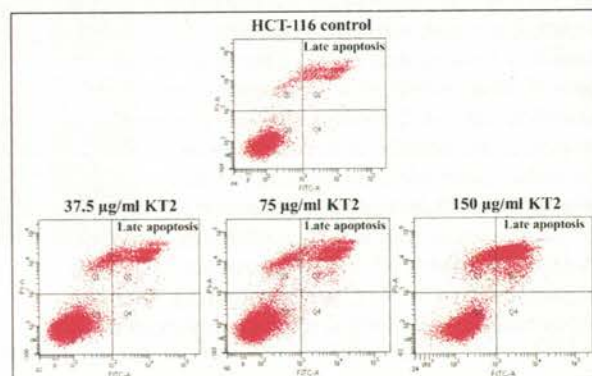
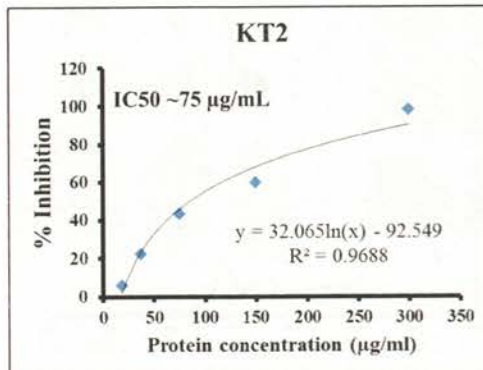
⁴ Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences,
Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁵ Department of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

somkly@kku.ac.th

Cancer represents one of the most significantly threat to human health on a global scale; hence, the development of effective cancer prevention strategies, as well as the discovery of novel therapeutic agents against cancer are urgently required. In light of this challenge, the present study aimed to investigate the effect of KT2, a cationic Leucrocin I analogs from *Crocodylus siamensis* against HCT-116 human colon cancer cell lines. Using MTT assay, results demonstrated that KT2 at the concentrations of 37.5, 75 and 150 $\mu\text{g/mL}$ exhibited strong cytotoxic

effect against HCT-116 cell lines after 24 h of treatment (IC_{50} 75 $\mu\text{g/mL}$). The mechanism involved in cancer cell cytotoxicity of this peptide was shown to be associated with the induction of apoptosis, as evidenced by annexin V-FITC/PI staining flow cytometry analysis. Moreover, the significantly inhibited S-G2/M transition in the cancer cell, leading to the arrest of cell population growth was observed when treated with KT2. These collected data clearly demonstrated that KT2 has great potentially in the treatment of human colon cancer cells.



52

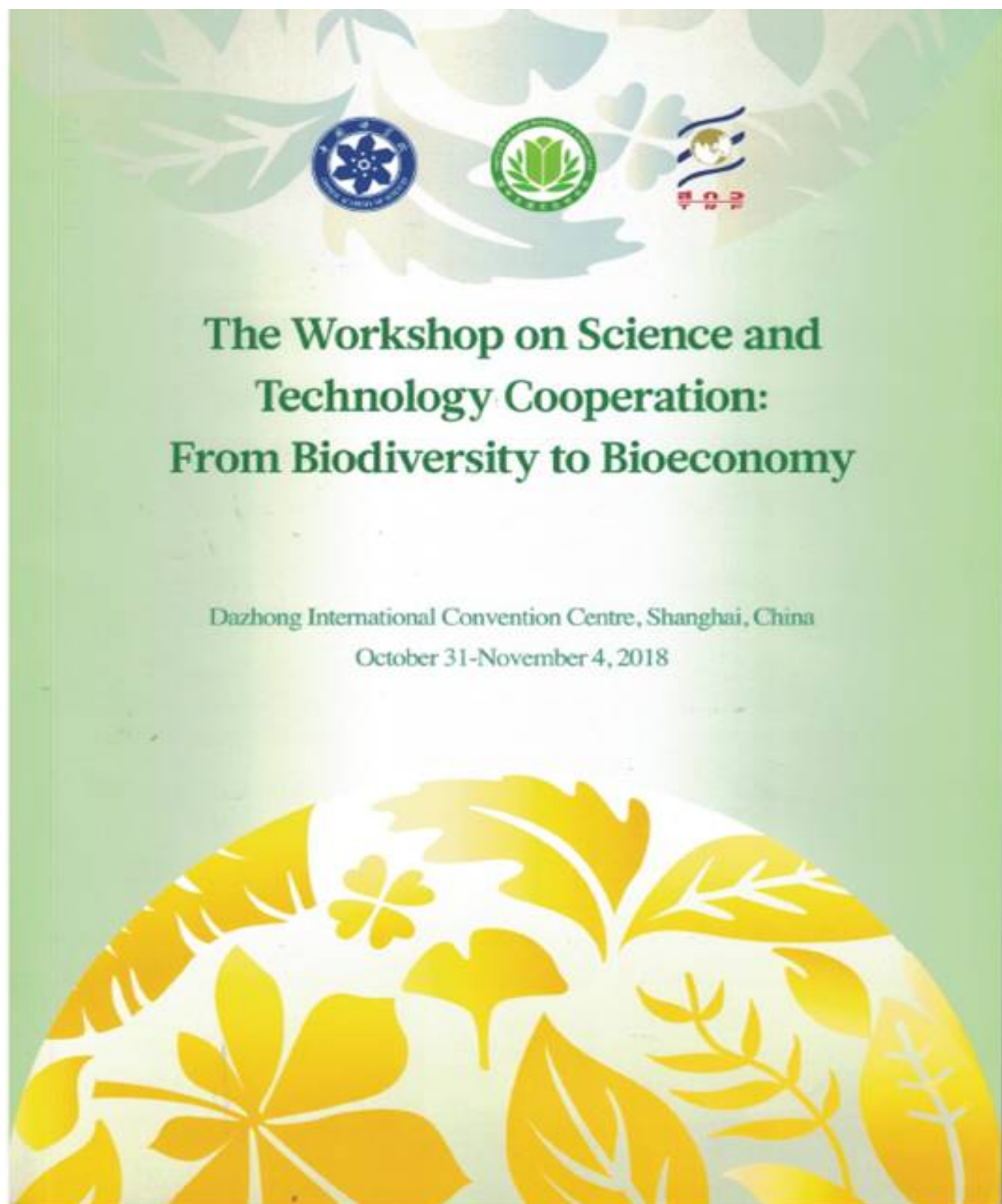
The Workshop on Science and Technology Cooperation
Biodiversity: Global Awareness and Sustainability

1. Shapira, S.; Fokra, A.; Arber, N.; Kraus, S. *Curr Med Chem.* 2014, 21(21), 2410-2416.
2. Anunthawan, T.; Yarksa, N.; Phosri, S.; Theansungnoen, T.; Daduang, S.; Dhiravisit, A.; Thammasirirak, S., *Bioorg Med Chem Lett.* 2013, 23(16), 4657-4662.
3. Yarksa, N.; Anunthawan, T.; Theansungnoen, T.; Daduang, S.; Araki, T.; Dhiravisit, A.; Thammasirirak, S. *J Antibiot (Tokyo).* 2014, 67(3), 205-212.



Surachai Maijaroen, Khon Kaen Univ. (B.Sc., 2010), Khon Kaen Univ. (M.Sc., 2015),
Khon Kaen Univ. (Ph.D. student). Research fields: Protein purification, Proteomics,
Molecular cloning, Cell culture

การเข้าร่วมประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่ประเทศจีน
ระหว่างวันที่ 31 ตุลาคม 2561 ถึง 4 พฤศจิกายน 2561
The workshop on Science and Technology Cooperation:
From Biodiversity to Bioeconomy





Sakda Daduang, Khon Kaen University, Thailand (sakdad@kku.ac.th)

Sakda Daduang, Chiang Mai Univ. (B. Pharmacy, 1988, The First honors degree.), The University of Tokyo (Ph.D. in Applied Biological Chemistry, 1997), Associate Dean for Special Affairs and Organization Development, Faculty of Pharmaceutical Science, KCU (2015-present).

Research fields: Biochemistry, Immunological Biochemistry, Enzyme Technology, Molecular biology, Toxicology, Toxinology, Pharmacogenetics

Peptide diversities in Siamese crocodile blood and arthropod venom from proteomic and transcriptomic studies

Crocodile has terrific the innate immunity because they usually get injury for fighting each other as well as living in redundant pathogenic environment but their death from infected diseases is hardly reported. To elucidate innate immune in crocodile, *Crocodylus siamensis* was immunized with crocodile pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, after immunization 1h and 24h total blood cell counting, proteomics and transcriptomics were compared with pre-immunization (0h). Total amount of both white and red blood cell were significantly increase in 1h and dropped in 24h. When performed proteomics of WBC, regardless 1h or 24h compared with 0h, there are 112 up-regulated proteins and 7 down-regulated proteins in which those up-regulated proteins mainly involved in cell movement/vesicle trafficking and transcriptional/translational proteins, suggesting accelerating phagocytosis and moving towards to pathogen and de novo protein synthesis are undergone during first 24h of infection. Transcriptomics of total blood cell using RNA-seq after filtering low quality read found that 0h, 1h, and 24h detected 59,436,942, 57,560,316, and 606,556,164 clear reads, respectively and sum of all reads in three time points were corresponded to 107,592 unigenes. Based on annotation of 7 databases, only half of them could define the function. In comparison gene expression level found that 22 unigenes were up-regulated and 6 unigenes down-regulated within 1h. Regarding to 24h, they are found

that 372 unigenes were up-regulated and 47 unigenes down-regulated when compared with 0h. Those up-regulated unigenes based on KEGG databases annotation showed that at 1h Tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway was increase, but at 24h bacterial response pathway and inflammatory pathway were increase.



Prapenpuksiri Rungsa, Khon Kaen University, Thailand (prapenpuksiri@gmail.com)

Prapenpuksiri Rungsa, Thaksin Univ. (B.Ed., 2007),
Khonkaen Univ. (M.Sc., 2009), Khonkaen Univ.
(Ph.D., 2016), Khonkaen Univ. (Postdoc, 2017)

Research fields: Study of protein and enzyme in poison
insect venom using molecular biology technique

**Expression, purification and characterization of
recombinant *Vespa tropica* venom active
hyaluronidase protein in *Escherichia coli***

Arthropod venom such as bees, wasps, hornets and ants are contained several pharmacologically active molecules, such as proteins and peptides, which are used by the host as venom in order to repel predators, for self defense, or for protection of their nest. There venom upon envenomation, cause severe pain, local damage, allergic reaction and even death in a very low concentrations. This suggest that these components are potentially interesting for the development of novel pharmaceutical compounds. One such category of components with a potential pharmaceutical application are hyaluronidase. Hyaluroinidase (HAase) is one of the major proteins commonly found in insect venom. In this work, *V. tropica* hyaluronidase was successfully expressed, purified and characterized in prokaryote and eukaryote systems. The recombinant active HAase (rHAase) was heterogeneously expressed as a mature protein with an N-fusion His-tag using the *E. coli* Rosetta-gami (DE3) and Yeast *Pichia pastoris*. The *E. coli* rHAase was expressed in insoluble fraction. The *E. coli* rHAase was solubilized, purified and refolded. The *E. coli* rHAase showed relatively same activity as commercial HAase (from bovine testes, SIGMA Life Science), 5.85 and 5.0% decreasing HA per 1 microgram protein, after investigation using turbidimetric method.

ภาคผนวก 4

การบริการวิชาการแก่สังคมและการถ่ายทอดเทคโนโลยี

การจัดประชุมเสวนาวิชาการ “การต่อยอดผลงานวิจัยพื้นฐานสู่การพัฒนานวัตกรรมเชิงพาณิชย์” ณ ห้องประชุมสิริคุณากร 3 ชั้น 2 อาคารสิริคุณากร มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น วันอังคารที่ 12 มิถุนายน 2561

หลักการและเหตุผล

เนื่องด้วยความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปัจจุบันนี้ก้าวหน้าแบบก้าวกระโดด แต่ความรู้เหล่านี้จะกระจุกอยู่แต่ในวงการณ์วิชาการ และนักวิชาการเองก็อาจจะมีความรู้ความเข้าใจในเชิงลึกเฉพาะศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญ ดังนั้นศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จึงเล็งเห็นความสำคัญของการนำองค์ความรู้พื้นฐานทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (Basic knowledge) เพื่อการพัฒนาต่อยอดสู่นวัตกรรมเชิงพาณิชย์ (Translational research for innovative products) ซึ่งเป็นการบูรณาการองค์ความรู้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เนื่องด้วยศูนย์วิจัยฯ มีพันธกิจหลักในการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับโปรตีนและเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ อาทิ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ฤทธิ์การสมานบาดแผล และฤทธิ์ต้านอักเสบ ฯลฯ โดยมุ่งเน้นศึกษาค้นคว้าเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจระเข้สยามจนสามารถเข้าใจกระบวนการทำงานเชิงลึกของเปปไทด์ที่ค้นพบได้อย่างครบถ้วนสมบูรณ์ ทั้งนี้คาดหวังเป็นอย่างยิ่งว่าองค์ความรู้ที่เกิดจากผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งหากมีการพัฒนาต่อยอดสู่ผลิตภัณฑ์นวัตกรรมด้านต่างๆ ได้แก่ ด้านเวชสำอาง ด้านอาหารเสริมสุขภาพ รวมถึงด้านการแพทย์ ด้วยเหตุนี้ศูนย์วิจัยฯ จึงเล็งเห็นว่าน่าจะจัดประชุมสัมมนาเพื่อเผยแพร่องค์ความรู้จากการจากการวิจัยในห้องปฏิบัติการ แก่นักวิชาการในแขนงอื่น ตลอดจนผู้ประกอบการธุรกิจเช่น ด้านอาหารเสริม เครื่องสำอางและผู้ประกอบการเลี้ยงจระเข้ ที่น่าจะนำความรู้ที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการเป็นส่วนหนึ่งในการปรับปรุงธุรกิจ นอกจากนั้นการประชุมสัมมนาดังกล่าวยังจะมีประโยชน์ต่อนักศึกษา และบุคคลทั่วไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อนำองค์ความรู้ที่เกิดจากการศึกษาและการวิจัยของศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์ฯ เผยแพร่แก่นักวิชาการในแขนงอื่น ตลอดจนผู้ประกอบการธุรกิจและบุคคลทั่วไป เพื่อเป็นการบูรณาการองค์ความรู้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดอย่างเป็นรูปธรรมในทุกภาคส่วน ตลอดจนเปิดโอกาสในการซักถามอภิปราย แสดงความคิดเห็นและกำหนดทิศทางการจะสร้างคุณค่าทางเศรษฐกิจของจระเข้สยามอย่างยั่งยืนในอนาคต

ผลสัมฤทธิ์จากโครงการ

1. นักวิจัยได้เห็นขั้นตอนและปัญหาที่เกิดขึ้นกับการเลี้ยงจระเข้ และการสร้างผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและเครื่องสำอาง อันจะนำไปสู่การต่อยอดงานวิจัย สู่ผลิตภัณฑ์นวัตกรรมในรูปแบบต่างๆ เช่น อาหารเสริม เครื่องสำอาง เป็นต้น
2. ผู้เลี้ยงจระเข้เห็นแนวทางเพิ่มเติม ในการดำเนินและขยายธุรกิจในการแปรรูปผลิตภัณฑ์และการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากจระเข้ในด้านการที่จะพัฒนาไปเป็นอาหารเสริมและเครื่องสำอาง
3. เมื่อเปิดโอกาสให้ซักถาม อภิปรายทั้งสามภาคส่วนคือ นักวิจัย ผู้เลี้ยงจระเข้ และผู้ประกอบการธุรกิจ สามารถเห็นรูปแบบและกำหนดแนวทางร่วมกันในการสร้างคุณค่าทางเศรษฐกิจของจระเข้สยาม

4. สามารถสร้างเครือข่ายนักวิจัยร่วมกับภาคอุตสาหกรรม เพื่อบูรณาการงานวิจัยพื้นฐานสู่เชิงพาณิชย์

ภาพกิจกรรม

ในการจัดงานประชุมเสวนาครั้งนี้ได้แบ่งส่วนการเสวนาออกเป็น 3 ส่วนหลักๆ ได้แก่ 1) การเสวนาเชิงวิชาการโดยผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาต่างๆ เป็นวิทยากรให้ความรู้ อาทิ การบรรยายเรื่อง “การจัดการทรัพยากรจระเข้ไทยอย่างยั่งยืน” โดยคุณยศพงศ์ เต็มศิริพงศ์ เลขาธิการสมาคมส่งเสริมการอนุรักษ์และเพาะเลี้ยงจระเข้แห่งประเทศไทย การบรรยายเรื่อง “องค์ความรู้จากเลือดจระเข้สู่การพัฒนาเปปไทด์ต้านจุลชีพ” โดยศาสตราจารย์สมปอง คล้ายหนองสรวง ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม การบรรยายเรื่อง “Siamese crocodile genome: current research in genomics and diversity” โดย ผศ.ดร. ครุฑ ศรีกฤษณา ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน 2) การนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ และการจัดนิทรรศการแสดงผลงานวิจัยที่มีการต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ 3) การเสวนากลุ่มย่อยเพื่อบูรณาการร่วมกันในทุกภาคส่วน ทั้งนักวิจัย ผู้ประกอบการ โดยมีภาพกิจกรรมดังนี้



โครงการค่ายวิชาการห้องเรียนพิเศษวิทยาศาสตร์ ระหว่างวันที่ 5-6 กรกฎาคม 2561 ณ ห้องศรีจันทร์บอลรูม โรงแรมเจริญธานี จังหวัดขอนแก่น

ด้วยคณะกรรมการเครือข่ายเพื่อพัฒนานักเรียนในโครงการห้องเรียนพิเศษวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม กลุ่มเครือข่ายภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มีมติให้โรงเรียนขอนแก่นวิทยายน จัดกิจกรรมค่ายวิชาการห้องเรียนพิเศษวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม ระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 ประจำปีการศึกษา 2561 เพื่อเป็นการกระตุ้นให้นักเรียนเกิดแรงบันดาลใจ เกิดแนวความคิดและตระหนักถึงการทงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์อย่างแท้จริง

ตามมติคณะกรรมการจัดงานเห็นควรมีการจัดให้นักเรียนได้รับประสบการณ์ตรงจากหน่วยงานภายนอกสถานศึกษาที่มีบทบาทโดยตรงในการศึกษาวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้จึงใคร่ขอความร่วมมืออนุเคราะห์วิทยากรและจัดแสดงนิทรรศการงานวิจัยจากศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อแนะนำงานวิจัยและนวัตกรรมที่เกิดจากผลงานวิจัยแก่นักเรียนในโครงการดังกล่าว ในวันที่ 5 กรกฎาคม 2561 เวลา 13.00-17.00 ณ ห้องศรีจันทร์บอลรูม โรงแรมเจริญธานี จังหวัดขอนแก่น โดยอาจารย์ประจำศูนย์วิจัยฯ คือ ผศ.ดร.ริษา ภัทรมานนท์เป็นวิทยากรบรรยายในหัวข้อ “การสร้างแรงบันดาลใจในการทงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์และการกำหนดหัวข้อโครงการวิทยาศาสตร์” เพื่อให้ความรู้และสร้างแรงบันดาลใจแก่นักเรียน โดยภาพกิจกรรมการดำเนินงานดังนี้





**การเข้าร่วมงานมหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ Thailand Research Expo 2018
ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และบางกอกคอนเวนชัน เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ
ระหว่างวันที่ 9-13 สิงหาคม 2561**

ด้วยสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ได้จัดงาน “มหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ 2561” (Thailand Research Expo 2018) ภายใต้แนวคิด “วิจัยเพื่อพัฒนาประเทศสู่ความมั่นคง มั่งคั่ง และยั่งยืน” โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นเวทีระดับประเทศในการแสดงผลงานการสร้างสรรค์ผลงานวิจัยที่มีคุณภาพและศักยภาพเพื่อการพัฒนาประเทศ ตลอดจนการขับเคลื่อนให้เกิดการนำองค์ความรู้ ผลผลิต เทคโนโลยี และนวัตกรรมจากผลงานวิจัยไปสู่การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ในวงกว้าง โดยการบูรณาการความร่วมมือระหว่างองค์กรและเครือข่ายในระบบวิจัยทั่วประเทศ ทั้งนี้ศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้เข้าร่วมจัดแสดงนิทรรศการผลงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง “โครงการพัฒนาตำรับครีมเวชสำอางจากเลือดจระเข้สยามสำหรับผิวหนัง” โดยมีภาพกิจกรรมดังนี้



ภาคผนวก 5

การสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับนักวิจัยต่างชาติ

การจัดสัมมนาสร้างความร่วมมือและเครือข่ายงานวิจัยกับนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยคุนหมิง ประเทศจีน วันที่ 28 เมษายน 2561 ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การดำเนินโครงการวิจัยนี้ได้มีการสร้างเครือข่ายกับนักวิจัยต่างชาติจากประเทศจีน คือ Prof. Ren Lai จาก Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences China, Kunming Medical University ซึ่งมีความชำนาญและความเชี่ยวชาญที่ลึกซึ้งในเรื่องของโปรตีนหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์หลากหลายชนิด เช่น สัตว์เลื้อยคลาน (reptile) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) และ สัตว์ข้อปล้อง (arthropods) โดยได้สร้างความร่วมมือเบื้องต้นผ่านการเข้าร่วมงานประชุมวิชาการ ในหัวข้อ The Workshop on Science and Biotechnology Cooperation biodiversity: Global Awareness and sustainability ซึ่งจัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ Chinese Academy of Sciences ณ จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 6-8 พฤศจิกายน 2560 ซึ่งนักวิจัยได้มีการปรึกษาหารือ และแลกเปลี่ยนความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีใหม่ๆ ตลอดจนแลกเปลี่ยนความรู้และแสวงหาแนวทางในการทำวิจัยร่วมกันระหว่างประเทศ และได้จัดงานสัมมนาพิเศษโดยเชิญนักวิจัยผู้เชี่ยวชาญ จากมหาวิทยาลัยคุนหมิง ประเทศจีน มาบรรยายพิเศษ ในวันที่ 28 เมษายน 2561 โดยมีการสร้างเครือข่ายการวิจัยในแง่ของการส่งนักศึกษาเพื่อไปศึกษาวิจัย ณ มหาวิทยาลัยคุนหมิง ประเทศจีน ในอนาคต โดยเฉพาะงานวิจัยทางด้าน proteomics และ transcriptomics โดยภาพกิจกรรมมีดังนี้



