



โครงการ

การสร้างแบบคทีเรียในลำไส้ที่สามารถผลิตสารแลคโตเฟอรินและผลต่อ
การป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาวที่ได้รับสารเอซอกซีมีเทน

โดย วีระ ชีโวรินทร์ และ คณะ

30 มิถุนายน 2549

โครงการ การสร้างแบบคิเรียในลำไส้ที่สามารถผลิตสารแลคโตเฟอรินและผลต่อ
การป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาวที่ได้รับสารเอชอกซีมีเทน

คณะผู้วิจัย

1. ดร. อีระ ชีโวรินทร์

2. รศ.ดร.วัชระ กสินฤกษ์

สังกัด

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิค
การแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

ในการศึกษารังนี้ได้สร้างแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. alctis* ที่สามารถสร้างแลคโตเฟอร์รินโดยใส่ยีนแลคโตเฟอร์ริน ขนาด 1200, 600 และ 133 คู่เบสเข้าไปโดยใช้พลาสมิด pBE31 ได้ สายพันธุ์ LF001, LFN002 และ LFC003 และเพื่อให้มีการสร้างแลคโตเฟอร์รินที่สร้างออกมาในน้ำเลี้ยงจึงใส่ยีนแลคโตเฟอร์รินส่วน N-lobe ขนาด 600 คู่เบสเข้าไปโดยใช้พลาสมิด pAMJ2008 ได้ สายพันธุ์ ALFN เมื่อตรวจสอบการแสดงออกโดย Western blot analysis โดยใช้ anti-human lactoferrin antibodies พบว่าสามารถตรวจวัดโปรตีนแลคโตเฟอร์รินได้ในสายพันธุ์ *L. lactis* LF001 แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในอีกสองสายพันธุ์ และไม่สามารถตรวจหาโปรตีนในน้ำเลี้ยงได้ เมื่อดูการแสดงออกของยีนโดยการวัดการสร้าง mRNA จากยีนแลคโตเฟอร์ริน โดยใช้ cDNA probe ของยีนแลคโตเฟอร์ริน พบว่ามีการแสดงออกใน *L. lactis* สายพันธุ์ LF001 และ ALFN เท่านั้น จึงใช้สองสายพันธุ์นี้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านรอยโรคเริ่มต้นของการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาว

เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านรอยโรคเริ่มต้นก่อนมะเร็งลำไส้ใหญ่ (aberrant crypt foci ; ACF) ในหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ไดเมทิลไฮดราซีน (dimethylhydrazine; DMH) ในระยะเริ่มต้น พบว่าหนูที่ได้รับ *L. lactis* จะมีจำนวน aberrant crypt foci มากกว่าหนูที่ได้รับเฉพาะ saline และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *L. lactis* ที่ใส่ยีนแลคโตเฟอร์รินเข้าไป (LF001 และ ALFN) พบว่าสามารถลดจำนวน ACF ได้เมื่อเทียบกับ *L. lactis* ที่ใส่เฉพาะพลาสมิด (BE31 และ AMJ2008 ตามลำดับ) และยังสามารถลดจำนวน ACF ที่มีขนาดมากกว่า 3 Ac/f โดยเฉพาะหนูที่ได้ *L. lactis* สายพันธุ์ ALFN สามารถลดจำนวน ACF และ ACF ที่มีมากกว่า 3 Ac/f ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อวัดปริมาณแอมโรบิคแบคทีเรียในอุจจาระของหนูที่ได้รับแบคทีเรียของแต่ละสายพันธุ์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง ซึ่งกลไกการป้องกันการเกิด ACF ในหนูขาวที่ได้รับไดเมทิลไฮดราซีน จะได้มีการศึกษาต่อไป

เมื่อทดสอบในระยะส่งเสริม *L. lactis* ที่ใส่ยีนแลคโตเฟอร์รินเข้าไป (LF001 และ ALFN) มีแนวโน้มที่จะลดจำนวน ACF และ ACF ที่มีขนาดมากกว่า 3 Ac/f ได้เมื่อเทียบกับ *L. lactis* ที่ใส่เฉพาะพลาสมิด (BE31 และ AMJ2008 ตามลำดับ) แต่ไม่พบว่ามีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Abstract

In this study, we constructed lactoferrin-producing, lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* by introducing several size lactoferrin genes (1200 bp, 6000 bp and 133 bp) to *L. lactis* MG1363 using pB31 plasmid generated strain LF001, LFN002, LFC003 respectively. To increase the production of lactoferrin in culture media, 600 bp of N-lobe LF gene was inserted to pAMJ2008 generated ALFN. The recombinant lactoferrin was detected by Western blot analysis using anti-human antibodies. The recombinant lactoferrin was only detectable in the cell of *L. lactis* LF001 but not in other strains and culture supernatant. However, the mRNA expression human lactoferrin or fragment was detected in strain LF001 and ALFN by Northern blot hybridization with N-lobe *hLF* cDNA probe. Therefore, we selected *L. lactis* LF001 and ALFN for anti-colon carcinogenesis determination.

We determined the modulating effect of *L. lactis* LF001 and ALFN on the aberrant crypt foci formation in colon of rat received colon carcinogen, dimethylhydrazine; DMH. The results showed that rat received *L. lactis* exhibited the high number of ACF when compared to control (saline) group. In initiation stage *L. lactis* harboring lactoferrin gene (LF001 and ALFN) can decrease the number of ACF and ACF which has more than 3 Ac/f in DMH treated rat colon compared to *L. lactis* harboring each empty vector (BE31 and AMJ2008, respectively). The rat received *L. lactis* LFN exhibited the significantly low number of ACF and ACF which has more than 3 Ac/f compared to strain AMJ2008 ($p < 0.05$). In addition, there was no significantly different between the number aerobic bacteria from feces of rat treated with DMH treated and *L. lactis* each strain in the initiation stage. The mechanisms of modulating effects of lactoferrin producing *L. lactis* on DMH induced colon carcinogenesis would be further study.

In the promotion stage, *L. lactis* harboring lactoferrin gene (LF001 and ALFN) trended to decrease the number of ACF an ACF which has more than 3 AC/f when compared to each empty plasmid strain (BE31 and AMJ2008, respectively), but there was no statistical difference.

Executive summary

ในปัจจุบันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นสาเหตุการตายที่สำคัญเป็นอันดับ 3 ในเพศชายและอันดับ 5 ในเพศหญิงของผู้ป่วยโรคมะเร็งในประเทศไทย สาเหตุหลักอาจเนื่องมาจากความผิดปกติทางพันธุกรรมและหรือการได้รับสารก่อมะเร็งจากสิ่งแวดล้อมร่วมกับการรับประทานอาหารที่ไม่สมดุล การรักษาโรคมะเร็งลำไส้จำเป็นต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงและอัตราการรอดชีวิตต่ำ ดังนั้นการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งจึงเป็นวิธีที่ดีกว่า การรักษาโรคมะเร็งได้ซึ่งปัจจุบันมีการใช้สารเคมีป้องกัน (chemopreventive agents) จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลอง ซึ่งการใช้สารสกัดจากธรรมชาติจะต้องมีการใช้สารสกัดในปริมาณมากและใช้เวลานานจึงจะเห็นผล ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการให้สารต้านมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

แบคทีเรียในลำไส้มีบทบาทต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถสัมผัสกับเยื่อผนังลำไส้โดยตรงเป็นเวลานานและสามารถสร้างสารก่อการกลายและสารก่อมะเร็งได้โดยตัวมันเองหรือดูดซับสารพิษจากอาหารไว้บนผนังเซลล์ของมัน การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียในลำไส้ให้มีผลป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่หรือให้แบคทีเรียในลำไส้เป็นผู้ผลิตสารต้านมะเร็งลำไส้ให้แก่คนจึงเป็นสมมุติฐานที่ได้เสนอขึ้นมา เนื่องจากยังไม่พบรายงานว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้จะสามารถผลิตสารต้านมะเร็งลำไส้ได้ การสร้างแบคทีเรียในลำไส้โดยการใส่ยีนจำเพาะที่สามารถผลิตสารที่มีประโยชน์เหล่านี้แล้วให้มีการสร้างอย่างต่อเนื่องในลำไส้จึงอาจจะเป็นวิธีการที่ทำให้มีสารต้านมะเร็งเพื่อการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะเพื่อสร้างแบคทีเรียในลำไส้ในกลุ่มของ *Lactococcus lactis* ให้สามารถผลิตแลคโตเฟอรินโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม และทดสอบฤทธิ์ของ recombinant bacteria ที่สร้างขึ้นต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ในหนูขาวที่ได้รับสารไดเมทิลไฮดราซีน (Dimethylhydrazine; DMH) การทดลองนี้ได้สร้างพลาสมิดเพื่อที่จะใช้ในการโคลนยีนที่สร้างแลคโตเฟอรินเข้าสู่แบคทีเรีย *Lactococcus lactis* โดยแบ่งเป็นการโคลนยีนแลคโตเฟอรินเข้าไปใน *Lactococcus lactis* โดยพลาสมิด pBE31 ได้ *L. lactis* สายพันธุ์ LF001 LFN002 และ LFC003 ตามลำดับ รวมทั้งสายพันธุ์ที่ใส่พลาสมิดเปล่า ๆ คือ *L. lactis* BE31 (pBE31) และ pAMJ2008 ได้ ALFN จากการศึกษาแบคทีเรียของแต่ละสายพันธุ์พบว่าพลาสมิดที่มียีนแลคโตเฟอรินสามารถที่จะเพิ่มจำนวนและมีความเสถียรในเซลล์ของ *L. lactis* และเมื่อคุณสมบัติพื้นฐานของ *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์พบว่า *L. lactis* MG1363 ที่เจริญใน M17-G โดยปราศจาก Erythromycin นั้นจะมีการ *L. lactis* MG1363 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วกว่า *L. lactis* ที่เจริญเติบโตใน M17-G5 ที่มียาปฏิชีวนะ Erythromycin และใน *L. lactis* ที่มียีนแลคโตเฟอรินทั้ง 3 ขนาด ได้แก่ LF001, LFN002 และ LFC003 จะมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าสายพันธุ์ BE31 ที่เป็นพลาสมิดเปล่า เมื่อวัด pH ของน้ำเลี้ยงพบว่า pH ของน้ำเลี้ยงจะลดลงจากประมาณ 7.5 ในตอนเริ่มต้นจนถึงประมาณ 6.0 เมื่อถึง stationary phase ซึ่งจะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่พลาสมิดแต่ละชนิดเข้าไปไม่ได้รับกวนขวางการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียเจ้าบ้าน

เมื่อทำการศึกษามวลของแบคทีเรียที่สร้างขึ้นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* พบว่า เมื่อเลี้ยง *L. lactis* ทุกสายพันธุ์ร่วมกับ *E. coli* JM109 ทำให้ *E. coli* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจาก *L. lactis* เมื่อเจริญถึง stationary phase จะทำให้น้ำเลี้ยงมีความเป็นกรดโดยมีค่า pH อยู่ประมาณ 5.5 – 6.0 ซึ่งรบกวนการเจริญเติบโตของ *E. coli* ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ lactic acid bacteria ทำให้ไม่สามารถเห็น

ผลแตกต่างระหว่าง *L. lactis* สายพันธุ์เดิมกับที่ใส่ยีนแลคโตเฟอร์รินได้ ซึ่งจะต้องมีการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาหาผลของแบคทีเรียที่มียีนแลคโตเฟอร์รินต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* ในหลอดทดลอง

ในการทดสอบหาการแสดงออกของยีนแลคโตเฟอร์รินโดยการตรวจหาแลคโตเฟอร์รินที่แบคทีเรียสร้างขึ้นโดยวิธี Western blot (Rabbit anti-human lactoferrin antibody) พบว่าไม่สามารถตรวจพบแลคโตเฟอร์รินในน้ำเลี้ยงของทุกสายพันธุ์ แสดงว่าแลคโตเฟอร์รินที่สร้างขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรียโดยวิธีนี้ไม่มีระบบที่จะหลั่งโปรตีนที่สร้างขึ้นออกมาในน้ำเลี้ยง เมื่อตรวจหาโปรตีนภายในเซลล์สามารถตรวจหาแลคโตเฟอร์รินได้ใน *L. lactis* สายพันธุ์ LF001 มีขนาดประมาณ 80 กิโลดาลตันแต่ไม่สามารถตรวจพบในอีก 3 สายพันธุ์คือ LFN002, LFC003 และ ALFN ซึ่งโปรตีนที่สร้างได้อาจจะมีขนาดเล็กหรืออาจสูญเสียคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนต่อแอนติบอดีที่ใช้จึงต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ อย่างไรก็ตามสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน *L. lactis* สายพันธุ์ LF001 และ ALFN โดยการตรวจหา mRNA ด้วยวิธี Northern blot hybridization โดยใช้ lactoferrin cDNA เป็น probe สำหรับติดตามจึงเลือกใช้ *L. lactis* สองสายพันธุ์นี้ในการศึกษาหาฤทธิ์การต้านการเกิดรอยโรคเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (aberrant crypt foci; ACF) ในหนูขาวที่ได้รับไดเมทิลไฮดราซีน (Dimethylhydrazine; DMH)

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านการเกิดรอยโรคเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (aberrant crypt foci; ACF) ในหนูขาวที่ได้รับไดเมทิลไฮดราซีน (Dimethylhydrazine; DMH) จะใช้ หนู Wistar อายุ 4 สัปดาห์ โดยป้อน *L. lactis* สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 10^{10} CFU ต่อตัวต่อวัน 1 สัปดาห์ ในกลุ่มทดลองจะได้รับการฉีด DMH สัปดาห์ละครั้งเป็นเวลา 2 ครั้งปริมาณ 40 มก./กก. น้ำหนักตัว ส่วนกลุ่มควบคุมจะได้รับการฉีด Saline จากนั้นป้อนต่อไปอีก 3 สัปดาห์ ส่วนการศึกษาในระยะส่งเสริมหนูจะได้รับ *L. lactis* สายพันธุ์ต่าง ๆ หลังจากฉีด DMH 40 มก./กก. ไปแล้ว 2 สัปดาห์แล้วป้อนต่อไปจนสัปดาห์ที่ หนูทั้งหมดจะถูกฆ่าเพื่อแยกลำไส้และนับปริมาณและขนาดของ aberrant crypt foci ในแต่ละสัปดาห์จะเก็บอุจจาระจากหนูแต่ละกลุ่ม นำมาหาจำนวนแอโรบิคแบคทีเรียโดยละลายและเจือจางใน saline และให้เจริญบน LB plate ที่ 37 °C (*L. lactis* จะไม่เจริญบน LB plate ที่ 37 °C) โดยคำนวณเป็น CFU/กรัมอุจจาระ

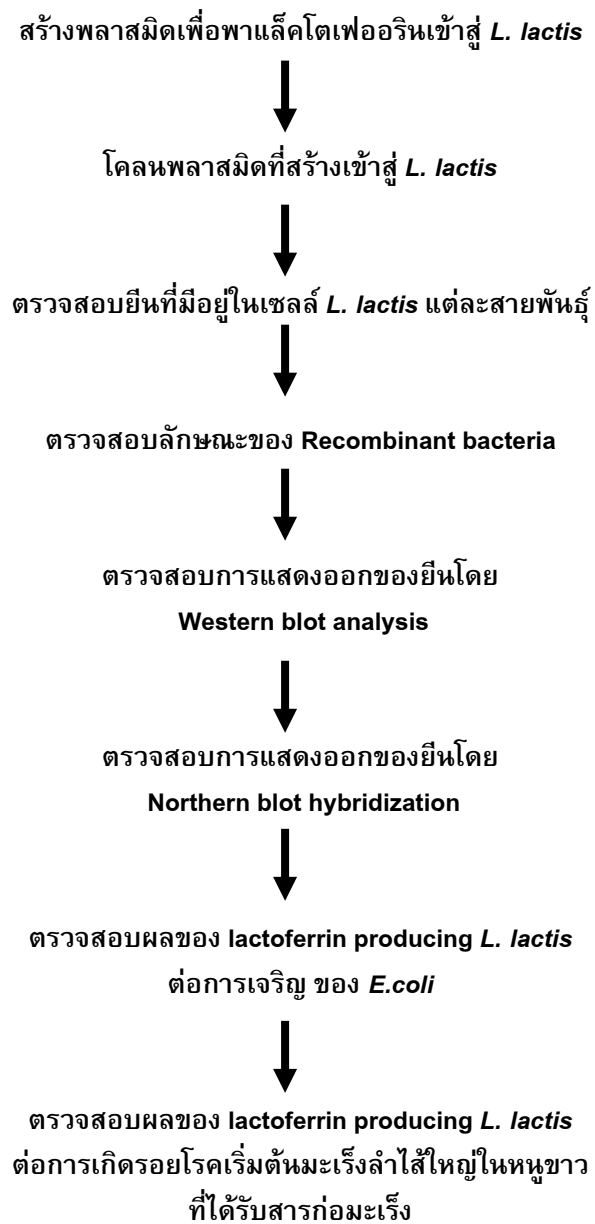
ในการศึกษาระยะเริ่มต้นพบว่าหนูทุกกลุ่มมีน้ำหนักที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง และไม่พบ aberrant crypt foci ในหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีด saline เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับ DMH (ค่าเฉลี่ย 249.0 ± 79.1) หนูที่ได้รับ *L. lactis* ทุกสายพันธุ์จะพบจำนวน ACF มากกว่าหนูที่ได้รับการป้อน saline ส่วนหนูที่ได้รับ *L. lactis* ที่มียีนแลคโตเฟอร์ริน (*L. lactis* LF001) จะมีจำนวน ACF ลดลง 19.5 % เมื่อเทียบกับ *L. lactis* ที่ใส่เฉพาะ พลาสมิด (BE31) และ โดยเฉพาะหนูที่ได้ *L. lactis* สายพันธุ์ ALFN สามารถลดจำนวน ACF และ ACF ที่มีมากกว่า 3 Ac/f ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับการป้อน *L. lactis* AMJ2008 (46.6% และ 68% ตามลำดับ; $p < 0.05$) เมื่อวัดปริมาณแอโรบิคแบคทีเรียในอุจจาระของหนูที่ได้รับแบคทีเรียของแต่ละสายพันธุ์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง ซึ่งกลไกการป้องกันการเกิด ACF ในหนูขาวจะได้มีการศึกษาต่อไป ส่วนการทดสอบในระยะส่งเสริมมีแนวโน้มที่จะให้ผลเช่นเดียวกันกับระยะเริ่มต้น โดยที่หนูที่ได้รับ *L. lactis* ที่มียีนแลคโตเฟอร์ริน (*L. lactis* LF001) จะมีจำนวน ACF และ ACF ที่มีมากกว่า 3 Ac/f ลดลง 27.0 % และ 32.4% 9ตามลำดับเมื่อเทียบกับ *L. lactis* ที่ใส่เฉพาะ พลาสมิด (BE31) แต่ในด้านหนูที่ได้ *L. lactis* สายพันธุ์ ALFN สามารถลดจำนวน ACF ได้เพียง 13.7% เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับการป้อน *L. lactis* AMJ2008 และไม่

พบความแตกต่างของจำนวนACF ที่มีมากกว่า 3 AC/f ระหว่างสองกลุ่มนี้ แสดงให้เห็นว่า *L. lactis* ที่สร้างแลคโตเฟอรินจะไม่แสดงผลในระยะส่งเสริมซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสร้าง *Lactococcus lactis* ที่มียีนของแลคโตเฟอริน
2. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียที่สร้างได้และทดสอบคุณสมบัติของ recombinant lactoferrin ที่สร้างได้
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* ในหลอดทดลอง
4. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ต่อการยับยั้งการเกิด aberrant crypt foci ในหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็งลำไส้เอชอกซีมีเทน ในระยะเริ่มต้น
5. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ต่อการยับยั้งการเกิด aberrant crypt foci ในหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็งลำไส้เอชอกซีมีเทน ในระยะส่งเสริม

ผังการดำเนินการวิจัย



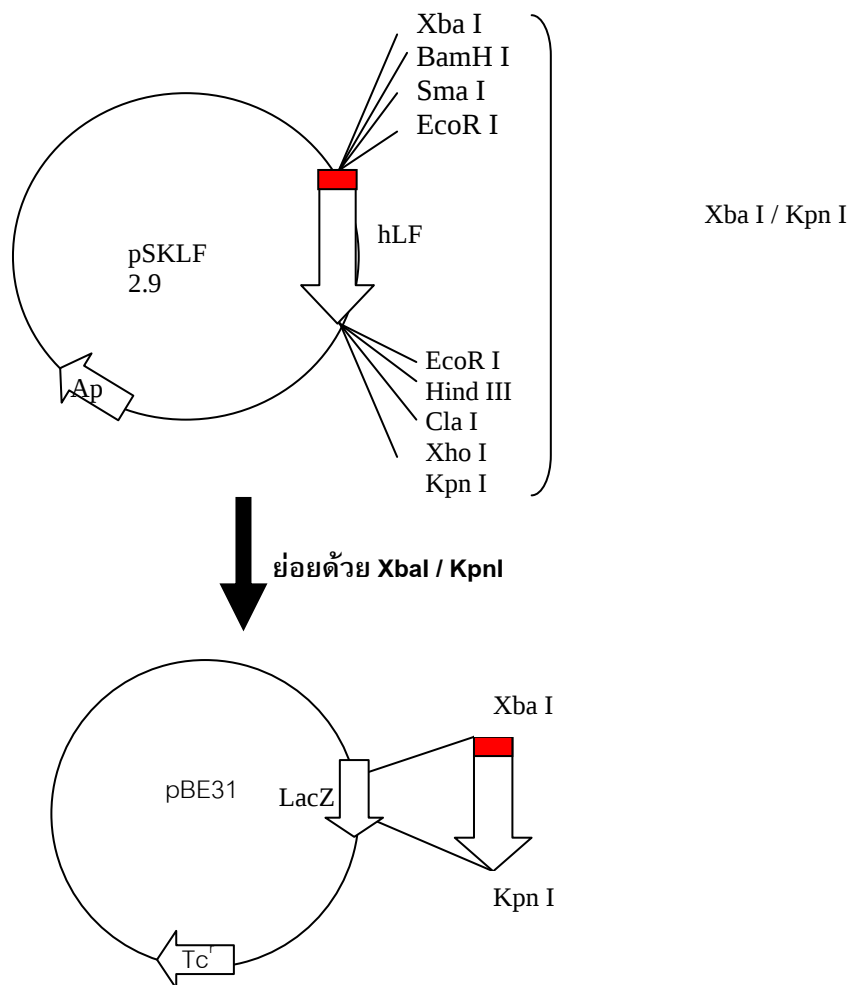
การดำเนินการวิจัย

1. การสร้างพลาสมิดเพื่อพาแลคโตเฟอรินยีนเข้าสู่ *Lactococcus lactis*

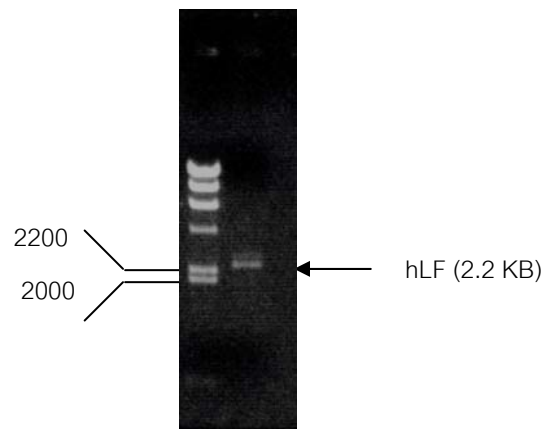
1.1 การโคลนแลคโตเฟอรินยีนเข้าสู่พลาสมิด pBE31 โดยตรง

พลาสมิด pBE31 , *Lactococcus lactis* YIT2081 ได้รับจาก Dr. Tomomi Kuwahara จาก Department of Bacteriology School of Medicine The University of Tokushima, Japan ส่วน human lactoferrin (subclone ในพลาสมิด pSKLF) ได้รับจาก Dr. Dae-Yeul Yu จาก Korea Research Institute of Bioscience&Biotechnology, Korea

pBE31 และ pSKLF จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Xba I และ Kpn I (Pomega) จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนที่ถูกย่อยมาทำการเชื่อมกันโดยเอนไซม์ T4 ligase (Promega) (จากแผนภาพรูปที่ 1.1) จากนั้นนำไปโคลนเข้าใน *E.coli* HB101 เพื่อเพิ่มจำนวนจากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *E.coli* เพื่อนำมาตรวจดูยีน lactoferrin โดยวิธี PCR พบว่าสามารถพบ amplicon ขนาด 2.2 กิโลเบสซึ่งเป็นขนาดของยีนแลคโตเฟอริน (รูปที่ 1.2) ให้ชื่อว่า **pBLF001**



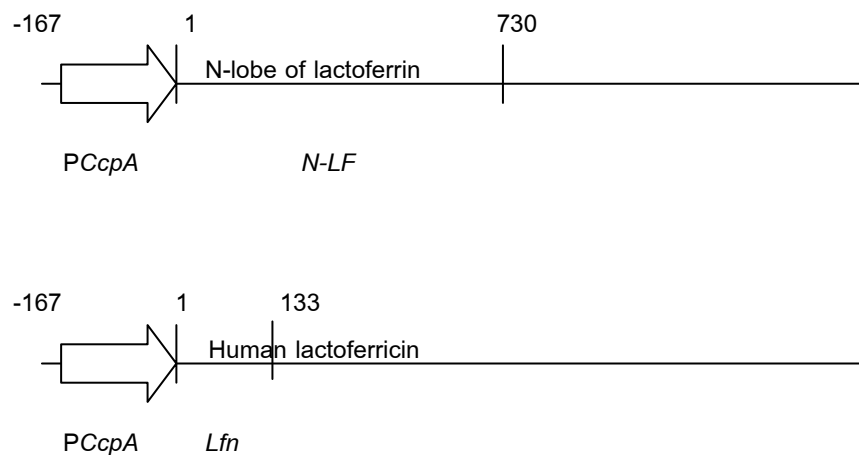
รูปที่ 1.1 แผนภาพการโคลนแลคโตเฟอรินยีนเข้าสู่พลาสมิด pBE31 โดยตรง



รูปที่ 1.2 เลนที่ 1 ใส Hind III marker เลนที่ 2 PCR product ขนาด 2.2 กิโลเบสเมื่อใช้ pBLF001 เป็น template และใช้ primer LFF 5'-GTGTCCATGGCCGTAGGAGAA GGAGTGTTC A G-3' และ LFR 3'-GGACACTTAAG GAGTCCTTCATTAGACTCTTTGGTGT-5'

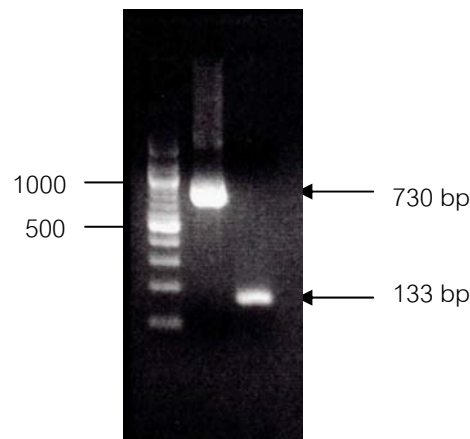
1.2 เชื่อมยีนแลคโตเฟอริน N-lobe และแลคโตเฟอริซินกับ promoter และ signal peptide (SP) เพื่อเพิ่มการสังเคราะห์ที่ได้ออกนอกเซลล์

ยีนของ human lactoferrin จะถูกนำไปเชื่อมต่อกับ promoter ของ ยีน *CcpA* ของ *Lactococcus lactis* เพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างแลคโตเฟอรินในเซลล์ โดยแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ lactoferrin N-lobe (ขนาด 730 bp) และ lactoferricin (ขนาด 133 bp) ดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 แผนภาพการเชื่อมต่อ lactoferrin N-lobe และ lactoferricin เข้ากับ *CcpA* promoter

เมื่อ amplify ยีน *CcpA* promoter โดยใช้ genomic DNA ของ *Lactococcus lactis* เป็น template และใช้ Primer 2 ชนิดคือ CCPF : 5' – ACA ACT CTA GAT CCA TTC TAC GCT ATT TTT – 3' และ CCPR : 5' – GTT GTG AAT TCT TCT ACC ATG GTT GGC TAT CCT C – 3' โดยมี *Xba* I *Nco* I และ *Eco*R I เป็น subcloning site และได้ amplify ยีนของ human lactoferrin และ lactoferricin โดยใช้ pSKLF เป็น template และใช้ primer LFF : 5'-GTGTCCATGGCCGTAGGAGAA GGAGTGTTC A G-3' กับ LFNR: 5' – GCA TGG AAT TCT TAC CGG GCC AGA TGG – 3' สำหรับ lactoferrin N-lobe และ LFF: 5'-GTGTCCATGGCCGTA GGAGAA GGAGTGTTC A G-3' LFcR: 5' – TTT TCG AAT TCT TAC TGG ATA CAC TGG – 3' สำหรับ lactoferricin โดยได้เพิ่มส่วนของ *Nco* I และ *Eco*R I site เข้าไปเพื่อเชื่อมกับส่วน Promoter ใน plasmid จากนั้นก็โคลนเข้าใน *E.coli* HB101 เพื่อเพิ่มจำนวนจากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *E.coli* เพื่อนำมาตรวจดูยีน lactoferrin โดยวิธี PCR พบว่าสามารถพบ amplicon ขนาด 730 basepair ซึ่งเป็นขนาดของยีน lactoferrin N-lobe ให้ชื่อว่า **pBLF002 (LF-N-lobe)** และ amplicon ขนาด 133 basepair ซึ่งเป็นขนาดของยีน lactoferricin (รูปที่ 1.4) ให้ชื่อว่า **pBLF003 (lactoferricin)** ตามลำดับ สามารถสรุปผลการสร้างพลาสมิดและคุณสมบัติของพลาสมิดที่จะนำไปขนถ่ายเข้าสู่ *Lactococcus lactis* ดังตารางที่ 1.1



รูปที่ 1.4 Lactoferrin (N-lobe) และ lactoferricin amplicon : เลนที่ 1 DNA 100 basepair markers เลนที่ 2 PCR product ขนาด 730 bp เมื่อใช้ pBLF002 เป็น template และ ใช้ primer LFF 5'-GTGTCCATGGCCGTAGGAGAA GGAGTGTTC A G-3' และ LFNR 5' – GCA TGG AAT TCT TAC CGG GCC AGA TGG – 3' เลนที่ 3 PCR product ขนาด 730 bp เมื่อใช้ pBLF003 เป็น template และ ใช้ primer LFF 5'-GTGTCCATGGCCGTAGGAGAA GGAGTGTTC A G-3' และ LFcR: 5' – TTT TCG AAT TCT TAC TGG ATA CAC TGG – 3'

ตารางที่ 1.1 คุณสมบัติพลาสมิดเพื่อที่จะใช้ในการผลิตแลคโตเฟอรินใน *L. lactis*

พลาสมิด	คุณสมบัติ
pBE31	pUC ori ⁺ , AMB1 ori ⁺ , LacZ ⁺ , Em ^r
pBLF001	pBE31 + full length human lactoferrin (2.2 KB)
pBLF002	pBE31 + CcpA promoter + human lactoferrin N-lobe (730 bp)
pBLF003	pBE31 + CcpA promoter + human lactoferricin (133 bp)

2. การโคลนพลาสมิดที่สร้างขึ้นเข้าสู่ *Lactococcus lactis*

การเตรียม Competent cell ของ *L. lactis*

Lactococcus lactis สายพันธุ์ MG1363 ได้รับจากบริษัท Bionere ประเทศเดนมาร์ก เป็น ชนิด Prophage-cure และไม่มีพลาสมิดภายในเซลล์ (plasmid free) ซึ่งปรับปรุงสายพันธุ์มาจาก *L. lactis* subsp. Cremonis NCD0712 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก และมีการใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 (ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)

เตรียมเลี้ยง *L. lactis* MG1363 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17-G5 ขำคืนที่ 30 °ซ โดยไม่ต้องเขย่า จากนั้นนำไป inoculate ใน M17 ที่มี 1% glycine , 17 % sucrose และ 0.5 % glucose ปริมาตร 100 มล. บ่มที่ 30 °ซ จนได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4-0.7 ทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g 10 นาที ที่ 4 °ซ จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 17 % sucrose ที่มี 10% glycerol (สารละลาย 1) ปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g 10 นาที ที่ 4 °ซ จากนั้น suspend เซลล์ที่ได้ในสารละลาย 1 ที่เย็นปริมาตร 1 มล. ใช้เซลล์ปริมาตร 40 ไมโครลิตรในการ transformation แต่ละครั้ง

การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *L. lactis* โดย electroporation

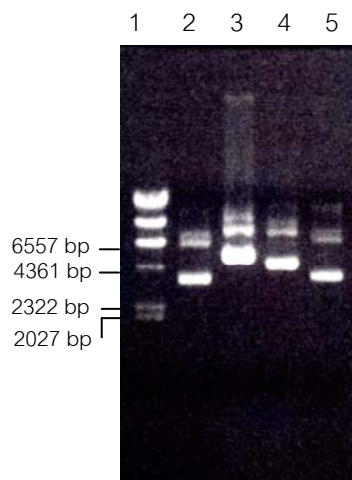
ทำการผสม competent cell 40 ไมโครลิตรกับพลาสมิดดีเอ็นเอ 0.1-1 ไมโครกรัม จากนั้นถ่ายลงสู่ cuvette สำหรับ electroporation (ขนาด 0.2 cm) วางบนน้ำแข็ง ทำการ electroporation ที่ 25 mF, 2 kV, 200 ohm จากนั้นเติมอาหาร M17-SGCaMg (M17 ที่มี sucrose 17%, glucose 0.5% , CaCl₂ 2 mM และ MgCl₂ 20 mM) ปริมาตร 960 ไมโครลิตร ลงใน cuvette นำไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแบ่งเซลล์มา spread บน M17-SGCaMg Agar ที่มี Erythromycin 1 ไมโครกรัม/มล. เลี้ยงไว้ 1 –2 วัน นำโคโลนีที่ได้มา แยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว แล้วเลือกมาเพื่อตรวจสอบหาพลาสมิดและแลคโตเฟอรินในเซลล์ของ *L. lactis* ที่ถูก transform เข้าไป สายพันธุ์ของ *L. lactis* ที่ได้แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ของ *L. lactis* ที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้

Clone	คุณสมบัติ
<i>L. lactis</i> MG1363	Prophage-cure and plasmid free
<i>L. lactis</i> BE	<i>L. lactis</i> MG1363 ที่ที่พลาสมิด pBE31 เป็น vector control
<i>L. lactis</i> LF001	<i>L. lactis</i> MG1363 ที่ที่พลาสมิด pBLF001 (full length human lactoferrin)
<i>L. lactis</i> LFN002	<i>L. lactis</i> MG1363 ที่ที่พลาสมิด pBLF002 (human lactoferrin N-lobe (730 bp))
<i>L. lactis</i> LFC003	<i>L. lactis</i> MG1363 ที่ที่พลาสมิด pBLF003 (human lactoferricin (133 bp))

3. การตรวจสอบหาพลาสมิดและยีนแลคโตเฟอรินที่ใส่เข้าไปใน *L. lactis*

เลือกโคลนของ *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์ (4 สายพันธุ์ได้แก่ BE31 LF001, LF002 และ LF003) ที่เจริญบน erythromycin มา enoculate ใน M17-G5 ปริมาตร 10 มล. บ่มที่ 30 °ซ ชั่วโมง จึงได้นำไปแยกหาพลาสมิดของแต่ละสายพันธุ์โดยนำน้ำเลี้ยงข้ามคืนมาแยกเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g 15 นาที 4 °ซ จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ในสารละลาย sucrose 25% ที่มี Lysozyme 30 มก./มล. ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย alkaline SDS (3%SDS ใน 0.2 M NaOH) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลาย 3 M sodium acetate pH 4.8 ปริมาตร 300 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกตะกอนที่ 15000 g 15 นาที ที่ 4 °ซ นำส่วนใสมาใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย isopropanol 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นแยกตะกอนที่ 15000 g 15 นาที ที่ 4 °ซ ละลายตะกอนในน้ำ ปริมาตร 320 ไมโครลิตร เติม 7.5 M ammonium acetate ที่มี ethidiumbromide 0.5 มก./มล 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเติม Phenol: chloroform (5:1) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน



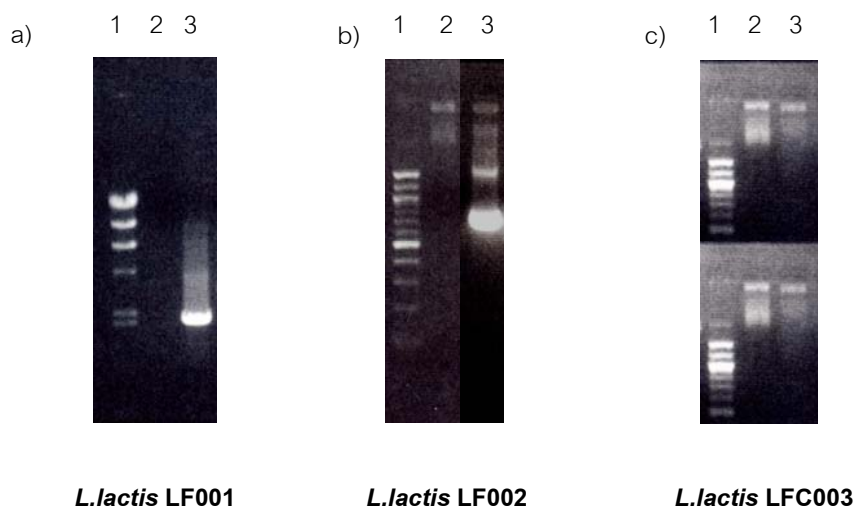
รูปที่ 3.1 พลาสมิดที่แยกได้จาก *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์

BE31 lane 2 ; LF001 lane 3; LF002 Lane 4; LF003 lane 5 และ
λ Hind III marker lane 1

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15000 g 15 นาที ที่ 4 °C ดูดเอาส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ เดิมเอธานอลที่เย็น 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกตะกอนที่ 15000 g 15 นาที ที่ 4 °C ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70 % ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องละลายใน TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปทำ electrophoresis โดยใช้ 0.7% agarose gel ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.1

จากรูปที่ 3.1 จะแสดงให้เห็นว่าพลาสมิด pBE31 และพลาสมิดที่มียีนแลคโตเฟอรินสามารถที่จะ replicate และมีความเสถียรในเซลล์ของ *L. lactis* สายพันธุ์ MG1363 ซึ่งสามารถสกัดพลาสมิดจากแต่ละสายพันธุ์โดยสกัดได้ pBE31 ขนาด 5.3 KB จากสายพันธุ์ BE31 pBLF001 ขนาด 7.5 KB จากสายพันธุ์ *L. lactis* 001 pBLF002 ขนาด 6.2 KB จากสายพันธุ์ *L. lactis* 002 และ pBLF003 ขนาด 5.5 KB จากสายพันธุ์ *L. lactis* 003

เมื่อตรวจสอบดูยีนของแลคโตเฟอรินในพลาสมิดที่สกัดได้จาก *L. lactis* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยการ amplify ยีนขนาดต่าง ๆ ของ lactoferrin โดยวิธี PCR เมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดได้จากแต่ละสายพันธุ์ พบว่าสามารถพบ amplicon ขนาด 2200 basepair ซึ่งเป็นขนาดของยีนแลคโตเฟอรินขนาด (รูปที่ 3.2a) ขนาด 730 basepair ซึ่งเป็นขนาดของยีน lactoferrin N-lobe (รูปที่ 3.2b) และ amplicon ขนาด 300 basepair ซึ่งเป็นขนาดของยีน lactoferricin เชื่อมกับ *CcpA* promoter (รูปที่ 3.2c)



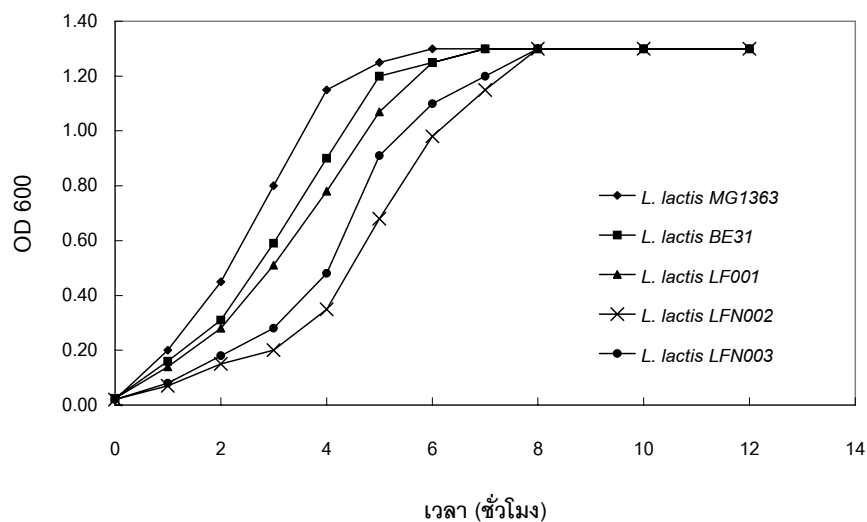
รูปที่ 3.2 Amplicon ของ Lactoferrin (2.2 KB), Lactoferrin (N-lobe) และ lactoferricin โดยใช้พลาสมิดที่สกัดได้จาก a) *L. lactis* สายพันธุ์ LF001 เป็น template และ ใช้ primer LFF: 5'-GTGTCCATGGCCGTAGGA GAAGGAG-3' และ LFR: 5'-GGTTTGAATTCTTACTTCCTGAGGAAT-3. b) *L. lactis* สายพันธุ์ LF002 เป็น template และ ใช้ primer CCPF 5'-ACAACTCTAGATCCATTCTACG CTATTTTT-3' และ LFNR 5'-GCA TGG AAT TCT TAC CGG GCC AGA TGG - 3') *L. lactis* สายพันธุ์ LF003 เป็น template และ ใช้ primer CCPF 5'-ACAACTCTAGATCCATTCT ACGCTATTTTT G-3' และ LFCr: 5'-TTT TCG AAT TCT TAC TGG ATA CAC TGG - 3'. โดยเลนที่ 1 ของแต่ละรูปจะเป็น DNA 100 basepair markers และเลนที่ 2 จะเป็น template ที่สกัดจาก *L. lactis* สายพันธุ์ BE31

4. การทดสอบคุณสมบัติของ Recombinant bacteria ที่สร้างได้

เมื่อทำการศึกษาถึงคุณสมบัติโดยทั่วไปของ *L. lactis* ที่ใส่พลาสมิดแต่ละชนิดเข้าไป ซึ่งคุณสมบัติของ *L. lactis* นั้นจะหลังการดัดแปลงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของเซลล์ออกมาเมื่อเซลล์เจริญถึง stationary phase จึงทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของ *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์โดยการวัดความขุ่นที่ OD₆₀₀ โดยทำการ enoculate น้ำเลี้ยงข้ามคืน 1 มล. ใน M17-G5 ปริมาตร 50 มล (1:5) จากนั้นวัด OD600 ทุก ๆ ชั่วโมงและทำการวัด pH ของน้ำเลี้ยงของแต่ละสายพันธุ์โดยกระดาษ Universal indicator ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดง pH ของน้ำเลี้ยงของแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	pH ของน้ำเลี้ยง							
	ก่อนเลี้ยง	2 ชม.	3 ชม.	4 ชม.	5 ชม.	6 ชม.	7 ชม.	12 ชม.
<i>L. lactis</i> MG1363	7.5	7.5-7	6.5	6.5	6	6	6	6
<i>L. lactis</i> BE	7.5	7.5-7	6.5	6.5	6.5-6	6	6	6
<i>L. lactis</i> LF001	7.5	7.5-7	7	7-6.5	6.5	6	6	6
<i>L. lactis</i> LFN002	7.5	7.5	7	7	7	6.5	6.5	6
<i>L. lactis</i> LFC003	7.5	7.5	7	7	7	6.5	6.5	6



รูปที่ 4.1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของ *L. lactis* สายพันธุ์ MG1363 (เซลล์เจ้าบ้าน เจริญเติบโตใน M17-G5 โดยปราศจาก Erythromycin) BE31, LF001, LFN002 และ LFC003 ตามลำดับ เจริญเติบโตใน M17-G5 ที่มี Erythromycin 1 ไมโครกรัม/มล.)

จากรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 จะแสดงให้เห็นว่า *L. lactis* MG1363 ที่เจริญใน M17-G โดยปราศจาก Erythromycin นั้นจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วกว่า *L. lactis* ที่เจริญเติบโตใน M17-G5 ที่มี Erythromycin 1 ไมโครกรัม/มล. และใน *L. lactis* ที่มียีนแลคโตเฟอรินทั้ง 3 ขนาด ได้แก่ LF001, LFN002 และ LFC003 จะมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าสายพันธุ์ BE31 ที่เป็นพลาสมิดเปล่าและพบว่าสายพันธุ์ LFN002 มีการเจริญเติบโตช้าที่สุด ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเนื่องจากเซลล์จะต้องมีการสร้าง recombinant protein ในขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตจึงทำให้การเจริญเติบโตมีอัตราที่ช้ากว่าเซลล์ที่ไม่ได้ใส่พลาสมิดหรือที่ใส่พลาสมิดเปล่า แต่ก็สามารถเจริญเติบโตได้จนถึง stationary phase ได้เช่นเดียวกัน เมื่อตรวจสอบการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์พบว่า pH ของน้ำเลี้ยงจะลดลงจากประมาณ 7.5 ในตอนเริ่มต้นจนถึงประมาณ 6.0 เมื่อถึง stationary phase จะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ จากการวัด pH ของน้ำเลี้ยงแสดงให้เห็นว่าการใส่พลาสมิดแต่ละชนิดเข้าไปไม่ได้รับกวนขบวนการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียเจ้าบ้าน

5. การตรวจวัดการสร้างแลคโตเฟอรินโดย Western blot analysis

วิธีการทดลอง

การเตรียม Cell lysate และ culture supernatant ของแบคทีเรียสำหรับทำ SDS-PAGE

แยกน้ำเลี้ยงขำคินของ *L. alctis* แต่ละสายพันธุ์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm 5-10 นาที ที่ 4 °ซ แยกเอาเซลล์ของแบคทีเรียและน้ำเลี้ยง เก็บไว้ที่ - 20 °ซ เพื่อเตรียมตัวอย่างต่อไป

การเตรียมส่วนของ Cell lysate

นำเซลล์ที่เตรียมได้มาล้างใน TE buffer ปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm 5-10 นาที ที่ 4 °ซ นำเซลล์ที่ปั่นแยกได้มา suspend ใน TE buffer ปริมาตร 1 มล. จากนั้นเติม trichloroacetic acid (TCA 100%) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 20 นาทีเพื่อหยุดขบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g 15 นาที ที่ 4 °ซ จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย acetone 80% ปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 g 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดเอาส่วนใสทิ้ง จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที นำเซลล์ที่ได้มาเติม TE ที่มี lysozyme 5 มก./มล. ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าอย่างแรงเพื่อให้เซลล์แตกตั้งทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เติม SDS 20% ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นเติม sampling buffer สำหรับ SDS-PAGE ปริมาตรเท่ากัน (100 ไมโครลิตร) นำไปต้มอีก 5 นาที vortex ให้เข้ากัน เก็บไว้เพื่อทำ SDS-PAGE

การเตรียมส่วนของ Culture supernatant

นำส่วน Culture supernatant ปริมาตร 800 ไมโครลิตรมาเติม TCA 100% ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 g 30 นาที ที่ 4 °ซ นำตะกอนมาล้างด้วย acetone ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ละลายตะกอนใน sodium hydroxide (NaOH 50 mM) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้นเติม sampling buffer สำหรับ SDS-PAGE ปริมาตรเท่ากัน (80 ไมโครลิตร) นำไปต้ม 5 นาที vortex ให้เข้ากัน เก็บไว้เพื่อทำ SDS-PAGE

การทำ SDS-PAGE

ใช้ 8% Acrylamide gel

200 Volt 60 นาที

การทำ Western blot analysis

Membrane : ใช้ Nitricellulose membrane

Blotting condition : 60 mA 2 ชั่วโมง

Blotting condition

Primary antibody: Anti-human lactoferrin antibody (Sigma)

ใช้ dilution = 1:1000

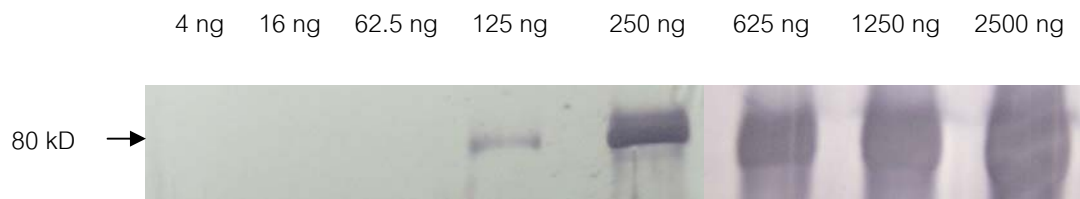
Secondary antibody: Goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma)

ใช้ dilution = 1:30,000

Visualization: NBT/BCIP dye (Promega)

การทดสอบแอนติบอดีต่อแลคโตเฟอรินมาตรฐาน

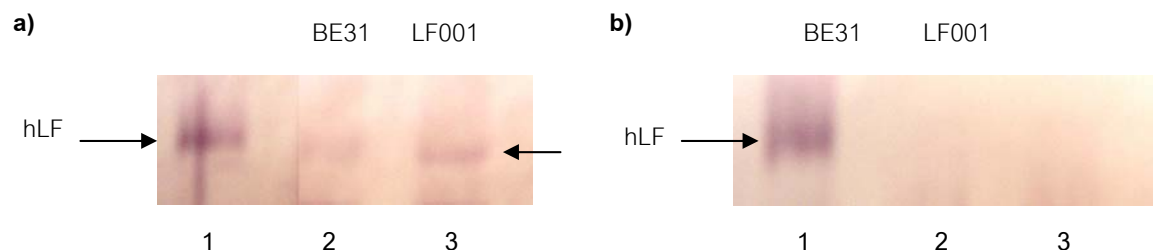
เมื่อทดสอบการตรวจวัดแลคโตเฟอรินโดย Western blot analysis โดยใช้ความเข้มข้นของแลคโตเฟอรินมาตรฐานตั้งแต่ 2500, 1250, 625, 250, 62.5, 16 และ 4 นาโนกรัมตามลำดับพบว่าสามารถที่จะตรวจสอบได้จนถึงระดับ 62.5 นาโนกรัมและไม่สามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ 16 นาโนกรัมเป็นต้นไป ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่ง ความเข้มข้นของแลคโตเฟอรินตั้งแต่ 125 นาโนกรัม ลงมาไม่สามารถย้อมเพื่อดูโปรตีนได้โดย Coomassie staining ได้ (ไม่ได้แสดงรูป)



รูปที่ 5.1 การทดสอบแอนติบอดีต่อแลคโตเฟอรินมาตรฐาน (Sigma) ความเข้มข้น 4, 16, 62.5, 125, 625, 1250, และ 2500 นาโนกรัม ตามลำดับ

การตรวจสอบการแสดงออกของแลคโตเฟอรินใน *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์โดย

Western blot analysis



รูปที่ 5.2 การตรวจหาการแสดงออกของโปรตีนแลคโตเฟอรินใน *L. lactis* LF001 โดย Western blot analysis a) ภายในเซลล์ และ b) ในน้ำเลี้ยง เลน 1 แลคโตเฟอรินมาตรฐาน 62.5 นาโนกรัม เลน 2 ตัวอย่างจาก *L. lactis* BE31 เลน 3 ตัวอย่างจาก *L. lactis* LF001

จากผลการทดลองจะเห็นว่าสามารถเห็นแถบของโปรตีนที่จับได้กับแลคโตเฟอรินแอนติบอดีในตำแหน่งที่ประมาณ 80 กิโลดาลตัน (รูปที่ 5.2 a) ซึ่งเป็นโปรตีนแลคโตเฟอริน ในการทดลองนี้แลคโตเฟอรินจะแสดงออกในปริมาณค่อนข้างต่ำซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากแลคโตเฟอรินหรือแลคโตเฟอริน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ส่วนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของแลคโตเฟอรินในปริมาณมากนั้นอาจจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเซลล์และทำให้พลาสมิดที่มีอยู่ไม่สามารถสร้างโปรตีนที่ต้องการได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะได้ตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับการ transcription โดยการวัด mRNA ด้วยวิธี Northern blot hybridization ต่อไป

ในการตรวจหาในน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียนั้น ไม่สามารถตรวจพบโปรตีนแลคโตเฟอรินโดยแอนติบอดีได้ (รูปที่ 5.2b) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนในน้ำเลี้ยงมีปริมาณน้อยเกินไปหรือถูกย่อยสลายหรืออาจจะไม่มีการปล่อยแลคโตเฟอรินออกมาสู่น้ำเลี้ยงเลย ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาพลาสมิดที่ใช้แสดงออกโปรตีนชนิดนี้ต่อไป

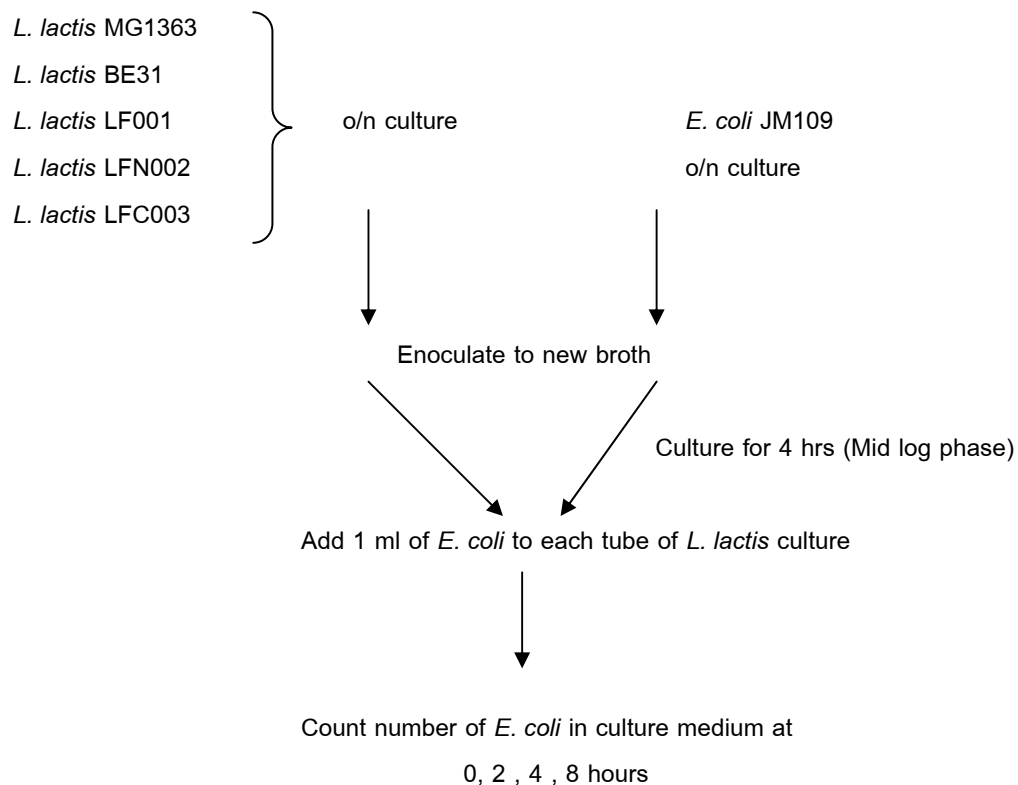
6. การศึกษาผลของ *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์ ต่อการเจริญเติบโตของ *E.coli* JM109

สมมุติฐาน เนื่องจาก Lactoferrin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถสร้าง lactoferrin จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในหลอดทดลองได้

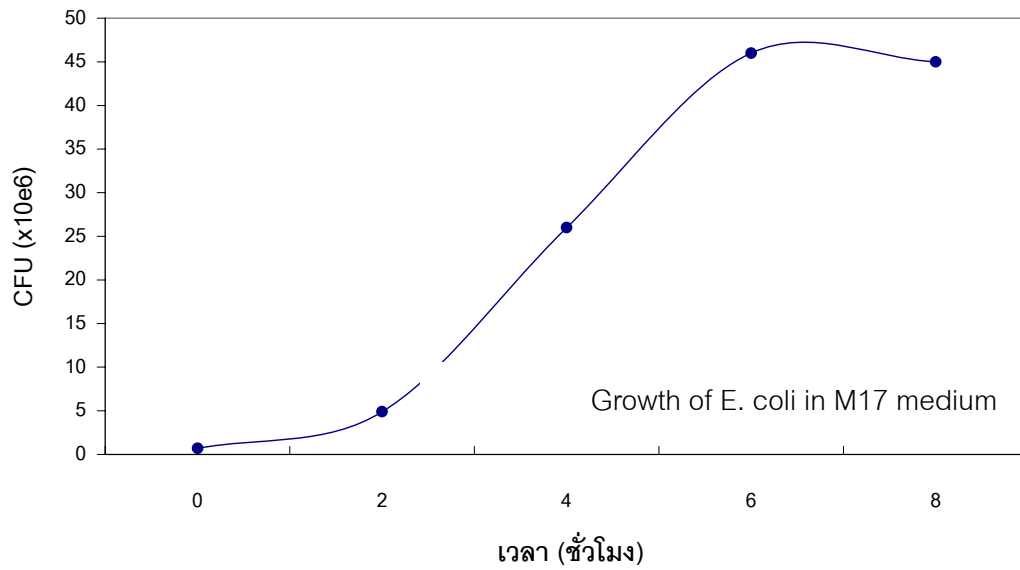
วัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* JM109 ในหลอดทดลอง

วิธีการทดลอง

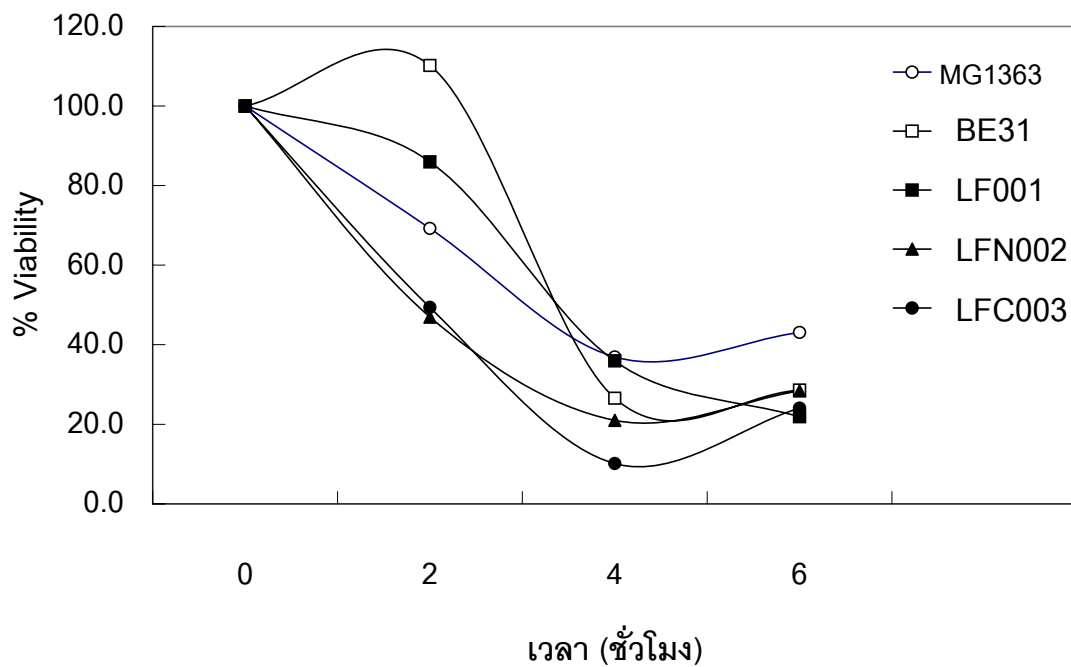
วิธีการทดลองได้สรุปดังรูปที่ 6.1 โดยทำการเลี้ยง *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์ และ *E. coli* JM109 ข้ามคืนที่ 30 °ซ และ 37 °ซ ตามลำดับจากนั้นแบ่ง *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์ และ *E. coli* JM109 500 ไมโครลิตร เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จากนั้นเลี้ยงต่อไปอีก 4 ชั่วโมงจากนั้นแบ่ง *E. coli* ที่เจริญจนถึง log phase 1 มล. เติมลงใน *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์ จากนั้นเริ่มนับจำนวน *E. coli* JM109 ที่เจริญร่วมกับ *L. lactis* ในแต่ละสายพันธุ์ ที่เวลา 0, 2, 4 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ โดยให้ *E. coli* ที่เจริญใน M17 broth เพียงชนิดเดียวเป็นตัวเปรียบเทียบ



รูปที่ 6.1 ไตอะแกรมแสดงวิธี Co-culture ของ *E.coli* และ *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์



รูปที่ 6.2 รูปแสดงการเจริญของ *E. coli* JM109 ในน้ำเลี้ยง M17 ที่ 30 °ซ โดยไม่มีการเขย่า



รูปที่ 6.3 การเจริญเติบโตของ *E. coli* ร่วมกับ *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์ ในน้ำเลี้ยง M17 ที่ 30 °ซ

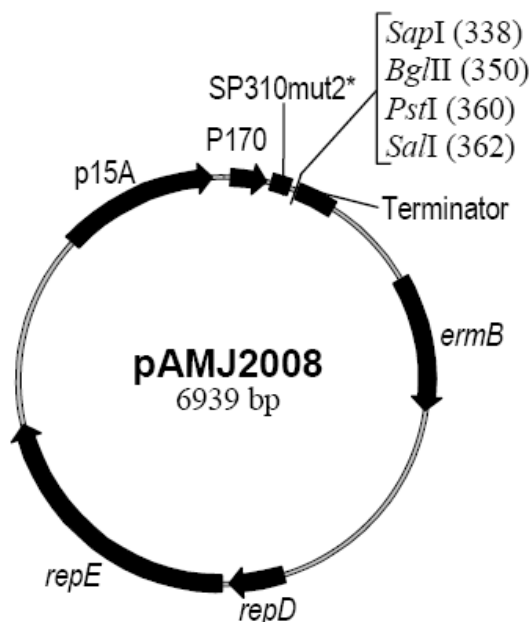
ผลการทดลอง

E. coli JM109 สามารถเจริญเติบโตได้ใน M17 medium ที่ใช้เลี้ยง *L. lactis* ได้ ที่ 30 °ซ โดยไม่มีการเขย่า แสดงให้เห็นว่าน้ำเลี้ยงที่มี Erythromycin 1 มก./มล. ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* JM109 แต่เมื่อเลี้ยง *E. coli* JM109 ร่วมกับ *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์ จะเห็นว่า *E. coli* ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับตอนเริ่มต้น ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าน้ำเลี้ยงของ *L. lactis* นั้นจะมีค่า pH ลดต่ำลงเมื่อ *L. lactis* เจริญจนถึง stationary phase ทำให้ *E. coli* ไม่สามารถเจริญเติบโต และมีจำนวนลดน้อยลงเมื่อเวลาในการ co-culture เพิ่มขึ้น ทำให้ไม่สามารถที่จะเห็นผลของ *L. lactis* สายพันธุ์ที่สร้างขึ้นต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* ในหลอดทดลองเนื่องจากความเป็นกรดของน้ำเลี้ยง *L. lactis* ซึ่งอาจต้องเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของ *E. coli* หรือหาวิธีที่จะศึกษารูปแบบนี้ต่อไป

7. การสร้าง *L.lactis* ที่สร้างแลคโตเฟอรินโดยใช้ P170 expression system

Background

P170 expression system เป็นการสร้างโปรตีนโดยใช้ *L.lactis* strain MG1363 และ พลาสมิด AMJ2008 ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 7.1



รูปที่ 7.1 ภาพแสดงโครงสร้างพลาสมิด pAMJ2008 [pAMb1, p15A, ermB, SP310mut2]

โดยที่ระบบการสร้าง *L. lactis* MG1363 เป็นระบบที่มีการสร้างโปรตีนที่สามารถส่งออกมาน้ำเลี้ยงได้โดย signal peptide ของ SP310mut2 ทำให้สามารถสร้าง recombinant lactoferrin ที่สามารถปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงได้ ซึ่ง plasmid pAMJ2008 และ *L. Lactis* MG1363 ได้รับจากบริษัท Bioneer ประเทศเดนมาร์ก

วิธีสร้าง *L. lactis* สายพันธุ์ ALFN

ทำการเพิ่มจำนวนยีนของ human lactoferrin บริเวณ N-lobe โดยใช้ pSKLF ดังการทดลองที่ 1 เป็น template และใช้ primer LFF : 5'-GTGTCCATGGCCGTAGGAGAA GGAGTGTTC A G-3' กับ LFNR: 5' – GCA TGG AAT TCT TAC CGG GCC AGA TGG – 3' โดยได้เพิ่มส่วนบริเวณตัดของเอ็นไซม์ *Sap I* และ *Sal I* เข้าไปเพื่อเชื่อมกับส่วน Promoter ใน plasmid AMJ2008 จากนั้นก็ใส่พลาสมิดที่สร้างขึ้นเข้าไปใน *E.coli* HB101 เพื่อเพิ่มจำนวนจากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *E.coli* เพื่อนำมาตรวจดูยีน lactoferrin โดยวิธี PCR พบว่าสามารถพบ amplicon ขนาด 730 basepair ซึ่งเป็นขนาดของยีน lactoferrin N-lobe ให้ชื่อว่า pALFN นำพลาสมิดทั้งหมดส่งไปหาลำดับของ DNA เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ Subcloning site ของแต่ละพลาสมิดโดยใช้ pSEQ insite reverse primer ที่ 240 bp ซึ่งเมื่อตรวจสอบลำดับของดีเอ็นเอบริเวณที่มีการโคลนพบว่ามีการ subcloning ถูกต้องดังตัวอย่าง subcloning site รูปที่ 7.2

5'-

ATTTACTTCGGAGAGGGTTATTTTCAGATAAAAAAATCCTTAGCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGGC
 AGGGGCGGAGAGACTCGAACTCCCAACACCCGGTTGTGCACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGA
 TTCTCGATGCTCTTCCGCAAGGCCGTAGGAGAAGGAGTGTTCAAGTGGTGCGCCGTATCCCAACCC
 GAGGCCACAAAATGCTTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAAAA -240

รูปที่ 7.2 ลำดับของดีเอ็นเอบริเวณ subcloning site โดยใช้ sequencing primer pSEQ

เมื่อตรวจสอบลำดับและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพลาสมิดถูกต้องแล้วจึงนำ pALFN ไป
 ขนถ่ายเข้าสู่ *Lactococcus lactis* โดยวิธี Electroporation ดังอธิบายในข้อ 2 จากนั้นได้คัดเลือกสายสาย
 พันธุ์ *L. lactis* (ALFN) เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติต่อไป

8. การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการตรวจหา mRNA ด้วยวิธี Northern blot hybridization

วิธีทำการทดลอง

เลี้ยง *L. alctis* แต่ละสายพันธุ์ ในน้ำเลี้ยงที่ 30 °ซ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm 15 นาที ที่ 4 °ซ แยกเอาเซลล์ของแบคทีเรียออกมาจากนั้นนำมาสกัด total RNA ด้วย RNA extraction Kit (Qiagen RNAEasy Mini kit) จากนั้นวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้แล้วปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.5 µg/µl

การทำ Formaldehyde agarose gel electrophoresis

1. เตรียม 1.2% agarose gel ที่มี 18% formaldehyde
2. เตรียม RNA sample โดยการปรับปริมาตรของ RNA ให้เท่ากับ 6 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 55 °ซ 15 นาที แล้วนำไปแช่อ่างน้ำแข็งทันทีเพื่อ denature RNA แล้วจึงเติม 2 ไมโครลิตรของ loading buffer
3. หยอดตัวอย่างทั้งหมดลงในหลุมแล้วทำ electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 50 Volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน MOPS buffer

การถ่ายดีเอ็นเอสู่เมมเบรน

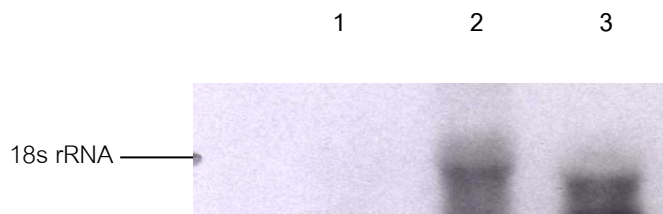
4. นำเจลที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง แล้วจึงนำ RNA ที่แยกได้ถ่ายลง Nylon Membrane ด้วย Air dry blotting โดยใช้ 1xSSCE เป็น blotting buffer ปล่อยให้แห้งสนิท
5. นำเมมเบรนที่ได้มาล้างด้วย SSC buffer จากนั้นนำไปอบให้แห้งแล้วตรึง RNA บนเมมเบรนโดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (254 nm) 2 ครั้ง ๆ ละ 10 วินาที

RNA Hybridization

6. เตรียม lactoferrin -N lobe probe ที่ติดฉลากด้วย Digoxigenin (DIG) โดยใช้ DIG high prime and detection kit. และใช้ primer ในการสร้าง probe เหมือนกันกับการเตรียมชิ้น DNA LFN
7. นำเมมเบรนที่เตรียมได้มาล้างด้วย SSC buffer 5 ครั้ง เติม pre-hybridization buffer แล้ว incubate ด้วย Hybridization buffer ที่มี DNA probe จากนั้น incubate ข้ามคืน
8. เมื่อครบเวลาล้างเมมเบรน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีด้วย washing buffer จากนั้นล้างอีกครั้งด้วย SSC
9. แช่ใน Blocking buffer 10 นาที แช่ต่อใน Antibody solution อีก 30 นาที ล้างเมมเบรนแล้ว แช่ใน Detection buffer 10 นาที
10. หยดสับสเตรท CSPD 5-10 หยด แล้วห่อด้วยพลาสติก นำไปประกบฟิล์ม X-ray

ผลการทดลอง

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนแลคโตเฟอร์รินในระดับ transcription โดยวิธี Northern blot hybridization ด้วย DNA probe ที่จำเพาะต่อ mRNA ของแลคโตเฟอร์ริน พบว่าสามารถตรวจวัดระดับ mRNA ของยีนแลคโตเฟอร์รินที่แสดงออกใน *L.lactis* สายพันธุ์ LF001 และ ALFN แสดงในรูปที่ 8.1 แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในสายพันธุ์ที่ใส่พลาสมิดนำพาอย่างเดียว (BE31) และสายพันธุ์ที่ใส่ยีนแลคโตเฟอร์รินที่เชื่อมต่อกับ CcpA Promoter (LFN002 และ LFC003; ไม่ได้แสดงในภาพ) อาจเป็นเนื่องจาก Promoter นี้จำเป็นต้องมีการควบคุมอย่างอื่นร่วมด้วยหรือ mRNA ที่ได้จากการแสดงออกนี้ไม่เสถียรซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *L. lactis* สายพันธุ์ LF001 และ ALFN สามารถแสดงออกยีนแลคโตเฟอร์รินในระดับ mRNA ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Northern blot hybridization จึงคัดเลือกเอาสองสายพันธุ์นี้ไปศึกษาผลในการต้านการเกิดรอยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ aberrant crypt foci ในหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็งไดเมทิลไฮดราซีน



รูปที่ 8.1 Northern blot hybridization โดยใช้ Lactoferrin cDNA probe เป็นตัวติดตาม เลน 1 RNA สกัดจาก *L. lactis* (pBE31), เลน 2 RNA สกัดจาก *L. lactis* (LF001), เลน 3 RNA สกัดจาก *L. lactis* (ALFN),

9. การศึกษาผลของ *Lactococcus lactis* ที่ใส่ยีนแลคโตเฟอรินต่อการเกิดรอยโรคเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะเริ่มต้น

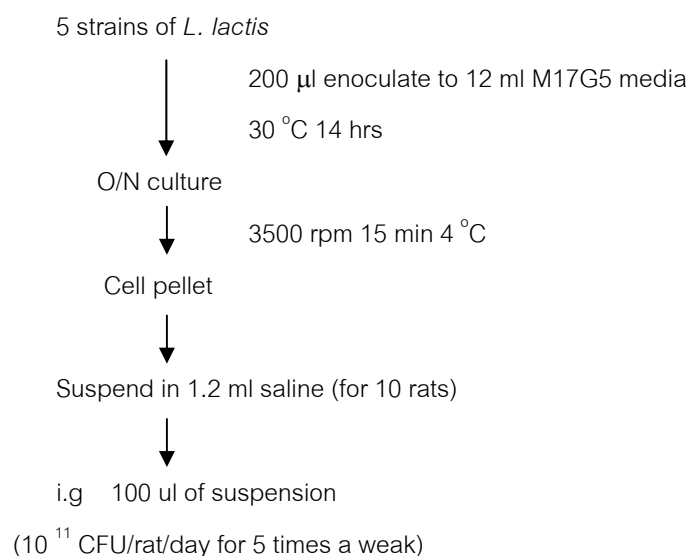
วัตถุประสงค์ เพื่อที่จะศึกษาถึงผลของ *L. lactis* ที่มียีนที่ผลิตแลคโตเฟอรินต่อการเกิดรอยโรคเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Aberrant crypt foci; ACF) ในระยะเริ่มต้น

วิธีการทดลอง

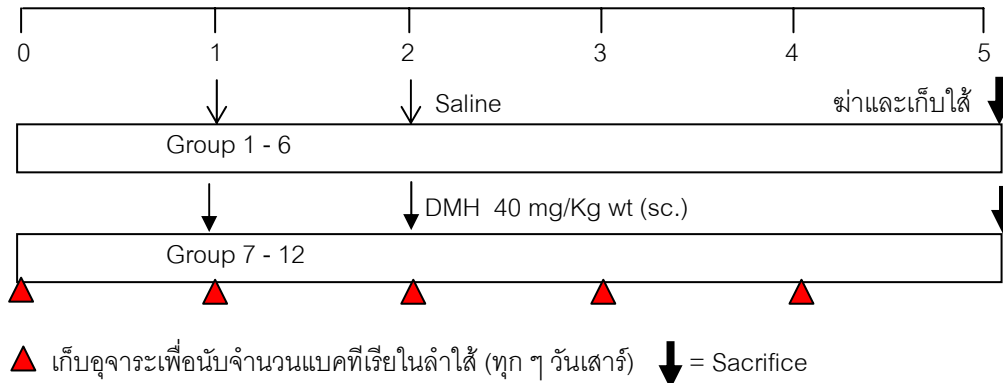
ในการศึกษานี้จะใช้หนู Wistar อายุ 4 สัปดาห์ (80 – 90 กรัม) โดยจะแบ่งหนูเป็นกลุ่มดังนี้

กลุ่ม 1	Saline + Saline
กลุ่ม 2	<i>L. Lactis</i> MG1363
กลุ่ม 3	<i>L. Lactis</i> MG1363 BE31 + saline
กลุ่ม 4	<i>L. Lactis</i> MG1363 LF01 + saline
กลุ่ม 5	<i>L. Lactis</i> MG1363 (pAMJ2008) + saline
กลุ่ม 6	<i>L. Lactis</i> MG1363 (pALFN) + saline
กลุ่ม 7	Saline + DMH 40 mg/kg wt
กลุ่ม 8	<i>L. Lactis</i> MG1363 + DMH 40 mg/kg wt
กลุ่ม 9	<i>L. Lactis</i> MG1363 BE31 + DMH 40 mg/kg wt
กลุ่ม 10	<i>L. Lactis</i> MG1363 LF01 + DMH 40 mg/kg wt
กลุ่ม 11	<i>L. Lactis</i> MG1363 (pAMJ2008) + DMH 40 mg/kg wt
กลุ่ม 12	<i>L. Lactis</i> MG1363 (pALFN) + DMH 40 mg/kg wt

โดยหนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการป้อน *L.lactis* ในแต่ละสายพันธุ์ที่แขวนลอยใน saline หรือ ป้อน saline สำหรับกลุ่มควบคุม โดยการเตรียม *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์จะเตรียมให้ได้ปริมาณเซลล์ 10^{11} เซลล์/ 100 ไมโครลิตร ดังนี้



สัปดาห์ที่



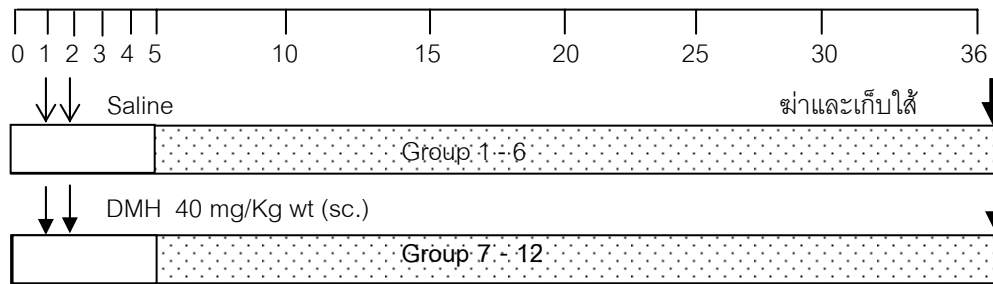
รูปที่ 9.1 Protocol สำหรับการศึกษาระยะเริ่มต้น

ในระยะเริ่มต้นหนูจะได้รับการป้อนเซลล์แบคทีเรียก่อน 1 สัปดาห์ และต่อเนื่องไปตลอดการทดลอง และจะฉีด Dimethyl hydrazine (DMH) 40 mg/Kg wt ได้ผิวนิ่งบริเวณไหล่ขวาปริมาตร 0.1 มล.ต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว สัปดาห์ละครั้ง จำนวน 2 ครั้ง (DMH จะเตรียม 40 มก./มล. ในสารละลาย 0.4 N Sodium Hydroxide เพื่อปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.3) ตาม protocol เมื่อครบ 5 สัปดาห์หนูทุกตัวจะถูกฆ่าโดย diethyl ether จากนั้นผ่าแยกลำไส้ใหญ่ และ ฉีด 10% Formalin เข้าไปในลำไส้เพื่อขยายแล้ววางบนน้ำแข็งอย่างน้อย 15 นาที จากนั้นตัดแยกเป็นชิ้น ๆ แล้วตรึงไว้บนกระดาษกรอง แช่ใน 10% Formalin แล้วจึงย้อมด้วย 2% methylene blue นับและบันทึกจำนวน ACF และ ขนาด

ในแต่ละสัปดาห์จะนำอุจจาระของหนูในแต่ละกลุ่มมาหาปริมาณแอโรบิคแบคทีเรีย โดยนำอุจจาระหนูที่เก็บได้จากทวารหนักหนู มา เจือจางใน saline อัตราส่วน 1:10 จากนั้นเจือจางต่อเนื่องจนได้ 1: 10⁶ นำไปเพาะเลี้ยง LB agar plate บ่มไว้ที่ 37 °C ซ้ำมคืน จากนั้นนำมานับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนแต่ละเพลทหา ค่าเฉลี่ยจากหนูสามตัวต่อกลุ่มแล้วคำนวณเป็น CFU/กรัมของอุจจาระ

ส่วนในระยะส่งเสริม แผนการทดลองแสดงในรูปที่ 9.2 หนูจะได้รับการฉีด Dimethylhydrazine (DMH) 40 มก./กก. น้ำหนักตัว สัปดาห์ละ ครั้ง จำนวน 2 ครั้งเช่นเดียวกับในระยะเริ่มต้น จากนั้นสัปดาห์ที่ 5 จึงเริ่มป้อนเซลล์แบคทีเรีย และต่อเนื่องไปตลอดการทดลอง ตาม แผนการทดลอง เมื่อครบ 36 สัปดาห์หนูทุกตัวจะถูกฆ่าโดย diethyl ether จากนั้นผ่าแยกลำไส้ใหญ่ และ ฉีด 10% Formalin เข้าไปในลำไส้เพื่อขยายแล้ววางบนน้ำแข็งอย่างน้อย 15 นาที จากนั้นตัดแยกเป็นชิ้น ๆ แล้วตรึงไว้บนกระดาษกรอง แช่ใน 10% Formalin แล้วจึงย้อมด้วย 2% methylene blue นับจำนวน ACF ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับและบันทึกจำนวน และขนาดของ ACF ในลำไส้ของหนู

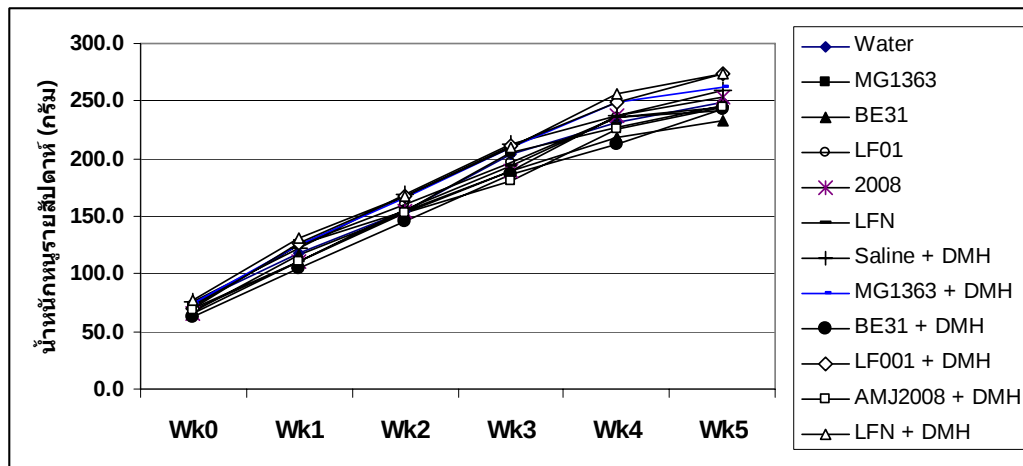
สัปดาห์ที่



รูปที่ 9.2 แผนการทดลองสำหรับการศึกษาในระยะส่งเสริม

ผลการทดลอง

ในการศึกษาระยะเริ่มต้นพบว่าหนูทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวที่ไม่แตกต่างกันตลอดการทดลอง แสดงในรูปที่ 9.3 แสดงให้เห็นว่าการได้รับแบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลอง เมื่อตรวจสอบการเกิด Aberrant crypt foci ในลำไส้ของหนูทดลอง ไม่พบ การเกิด aberrant crypt foci ในหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีด saline เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DMH หนูที่ได้รับการป้อน *L. lactis* ทุกสายพันธุ์จะพบจำนวน ACF มากกว่าหนูที่ได้รับการป้อน saline (249.0 ± 79.1 ACF/rat) ส่วนหนูที่ได้รับ *L. lactis* ที่มียีนแลคโตเฟอริน (*L. lactis* LF001); 222.7 ± 14.7 ACF/rat) จะมีจำนวน ACF ลดลง 19.5% เมื่อเทียบกับ *L. lactis* ที่ใส่เฉพาะ พลาสมิด (BE31; 277.0 ± 45.9) และ โดยเฉพาะหนูที่ได้ *L. lactis* สายพันธุ์ ALFN สามารถลดจำนวน ACF (155.2 ± 22.8 ACF/rat) และ ACF ที่มีมากกว่า 3 Ac/f (16.7 ± 18.8 ACF/rat) ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับการป้อน *L. lactis* AMJ2008 (290.8 ± 59.7 ACF/rat; $p < 0.05$) (46.6% และ 68.0% ตามลำดับ) แสดงในตารางที่ 9.1 และรูปที่ 9.4 เมื่อนำแอโรบิคแบคทีเรียในอุจจาระของหนูที่ได้รับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าแต่ละกลุ่มมีจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ที่ไม่แตกต่างกันในช่วง 1.6×10^9 - 4.8×10^9 CFU/กรัมอุจจาระ ตลอด 5 สัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 9.5 แสดงให้เห็นว่าการได้รับ *L. lactis* แต่ละสายพันธุ์ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ของหนูแต่ละกลุ่ม ดังนั้นการยับยั้งการเกิด ACF โดย *L. lactis* ที่แสดงออกยีนแลคโตเฟอรินนั้นไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรียเจ้าบ้านในลำไส้ของหนูขาวและพบว่า การได้รับแบคทีเรีย *L. lactis* ร่วมกับ DMH จะกระตุ้นให้มีการเกิด ACF มากกว่าที่ได้รับ DMH เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ *L. lactis* ที่มีการแสดงออกของแลคโตเฟอรินทั้งสองสายพันธุ์จะเห็นว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถที่จะยับยั้งกระบวนการเกิด Aberrant crypt foci ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับ DMH เมื่อเปรียบเทียบกับ *L. lactis* ที่มี empty plasmid ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาถึงกลไกในการกระตุ้นการเกิด ACF โดย *L. lactis* และการยับยั้งโดยแลคโตเฟอรินที่สร้างจาก *L. lactis* ต่อไป

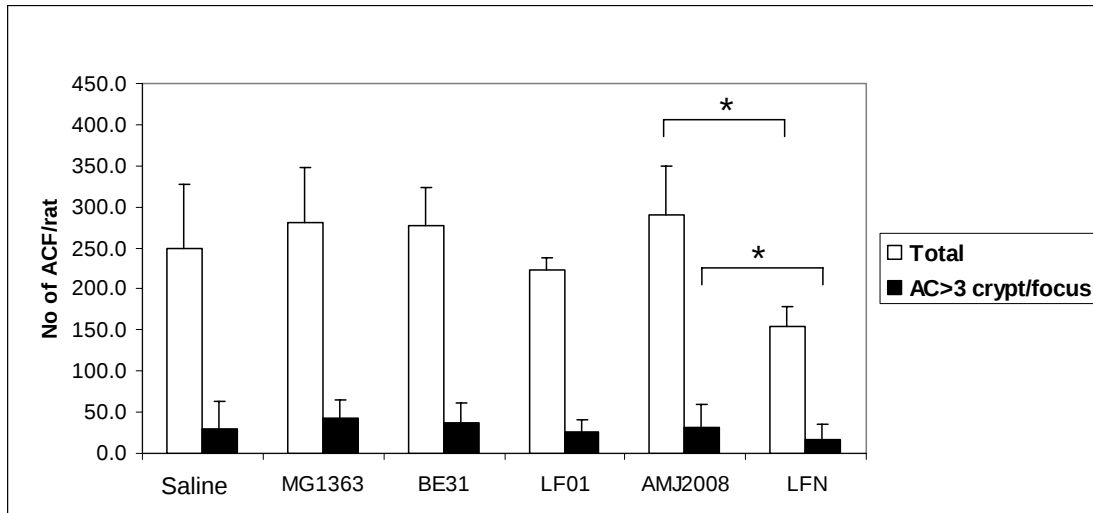


รูปที่ 9.3 แสดงน้ำหนักหนูเฉลี่ยเป็นรายสัปดาห์ในทุก ๆ กลุ่ม

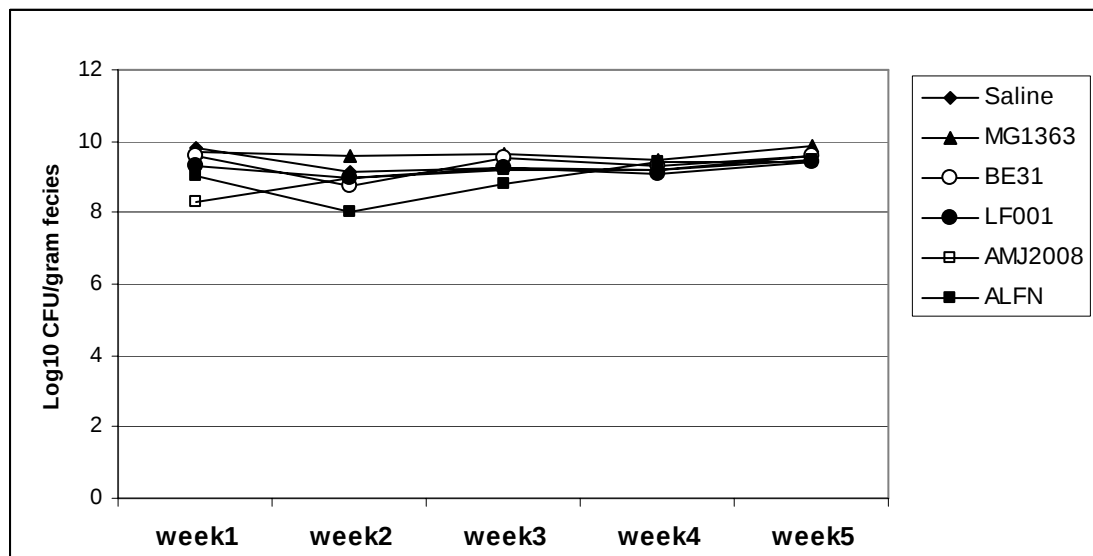
ตารางที่ 9.1 ตารางแสดงจำนวน aberrant crypt foci (ACF) ขนาด (เฉลี่ย aberrant crypt/focus ; Ac/f) และ ACF ที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 Ac/focus ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับ dimethyl hydrazine (DMH) และ *L. lactis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในระยะเริ่มต้น (แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD)

กลุ่ม	Treatment	จำนวน	Aberant crpt foci		AC/F
			Total	AC>3	
1	Saline	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
2	<i>L.lactis</i> MG1363	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
3	<i>L.lactis</i> BE31	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
4	<i>L.lactis</i> LF001	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
5	<i>L.lactis</i> 2008	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
6	<i>L.lactis</i> ALFN	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
7	Saline + DMH	6	249.0 ± 79.1	29.8 ± 33.3	1.98 ± 0.21
8	<i>L.lactis</i> MG1363 + DMH	6	281.7 ± 65.2	42.8 ± 21.6	2.21 ± 0.17
9	<i>L.lactis</i> BE31+ DMH	6	277.0 ± 45.9	36.5 ± 24.7	2.07 ± 0.20
10	<i>L.lactis</i> LF001+DMH	6	222.7 ± 14.7	25.8 ± 15.1	2.09 ± 0.19
11	<i>L.lactis</i> 2008 +DMH	6	290.8 ± 59.7	52.2 ± 27.5	1.96 ± 0.21
12	<i>L.lactis</i> ALFN+DMH	6	155.2 ± 22.8 *	16.7 ± 18.8*	2.02 ± 0.38

* significant (p<0.05) เทียบกับกลุ่ม *L.lactis* 2008 +DMH



รูปที่ 9.4 แสดงจำนวน aberrant crypt foci (ACF) และ ACF ที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 Ac/focus ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับ dimethyl hydrazine (DMH) และ *L. lactis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในระยะเริ่มต้น * $p < 0.05$

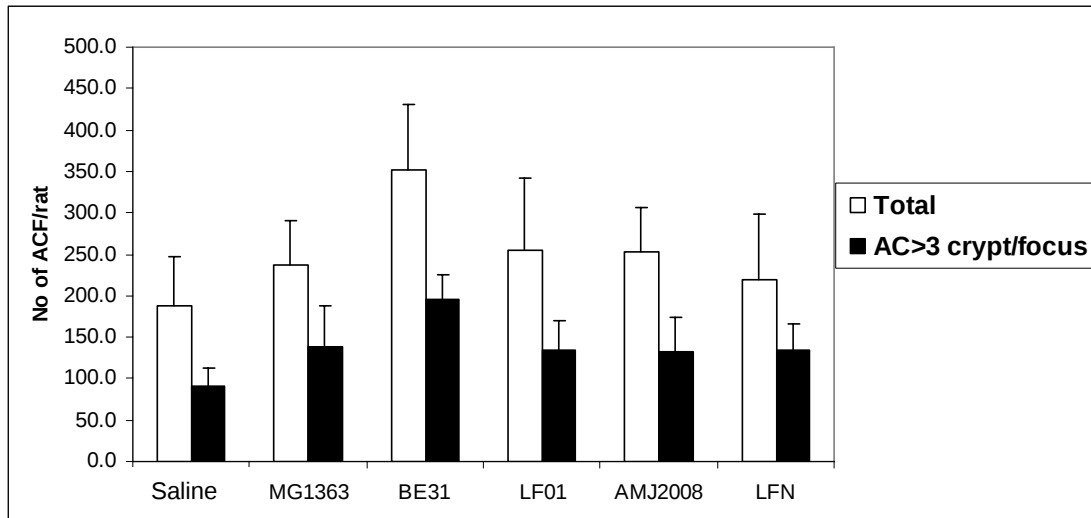


รูปที่ 9.5 จำนวนแบคทีเรียในอุจจาระของหนูขาวที่ได้รับ DMH และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ค่าที่ได้แสดงเป็น log CFU/ กรัม เฉลี่ยจากสามตัวต่อ 1 กลุ่ม

ส่วนการทดสอบในระยะส่งเสริมมีแนวโน้มที่จะให้ผลเช่นเดียวกับระยะเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 9.2 และรูปที่ 9.6 โดยที่หนูที่ได้รับ *L.lactis* ที่มียีนแลคโตเฟอริน (*L. lactis* LF001) จะมีจำนวน ACF และ ACF ที่มีมากกว่า 3 Ac/f เท่ากับ 255.8 ± 86.7 และ 135.2 ± 35.6 ซึ่งมีจำนวนลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ *L.lactis* ที่ใส่เฉพาะ พลาสมิด (BE31) ($ACF = 352.7 \pm 78.1$ $ACF > 3 = 196.2 \pm 29.8$) สามารถคิดเป็นร้อยละได้เท่ากับ 27.0 % และ 32.4% ตามลำดับ แต่ในด้านหนูที่ได้ *L. lactis* สายพันธุ์ ALFN สามารถลดจำนวน ACF ได้เพียง 13.7% เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับการป้อน *L. lactis* AMJ2008 และไม่พบความแตกต่างของจำนวน ACF ที่มีมากกว่า 3 Ac/f ระหว่างสองกลุ่มนี้ แสดงให้เห็นว่า *L. lactis* ที่สร้างแลคโตเฟอรินจะไม่แสดงผลชัดเจนในระยะส่งเสริม ซึ่งกลไกที่ชัดเจนยังต้องมีการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 9.2 ตารางแสดงจำนวน aberrant crypt foci (ACF) ขนาด (เฉลี่ย aberrant crypt/focus ; Ac/f) และ ACF ที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 Ac/focus ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับ dimethyl hydrazine (DMH) และ *L. lactis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ใน Promotion stage (แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD)

กลุ่ม	Treatment	จำนวน	Aberant crpt foci		AC/F
			Total	AC>3	
1	Saline	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
2	<i>L.lactis</i> MG1363	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
3	<i>L.lactis</i> BE31	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
4	<i>L.lactis</i> LF001	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
5	<i>L.lactis</i> 2008	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
6	<i>L.lactis</i> ALFN	4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	-
7	Saline + DMH	6	186.8 ± 59.7	90.5 ± 21.3	4.17 ± 1.02
8	<i>L.lactis</i> MG1363 + DMH	6	263.3 ± 53.8	131.8 ± 50.4	4.52 ± 1.34
9	<i>L.lactis</i> BE31+ DMH	6	352.7 ± 78.1	196.2 ± 29.8	4.79 ± 1.13
10	<i>L.lactis</i> LF001+DMH	6	255.8 ± 86.7	135.2 ± 35.6	4.29 ± 0.83
11	<i>L.lactis</i> 2008 +DMH	6	253.0 ± 54.1	132.7 ± 41.1	4.51 ± 1.31
12	<i>L.lactis</i> ALFN+DMH	6	218.1 ± 79.8	135.5 ± 31.9	4.94 ± 1.25



รูปที่ 9.6 แสดงจำนวน aberrant crypt foci (ACF) ขนาด (เฉลี่ย aberrant crypt/focus ; Ac/f) และ ACF ที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 Ac/focus ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับ dimethyl hydrazine (DMH) และ *L. lactis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ใน Promotion stage

สรุปผลงานวิจัย

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะเพื่อสร้างแบคทีเรียในลำไส้ในกลุ่มของ *Lactococcus lactis* ให้สามารถผลิตแลคโตเฟอรินโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม และทดสอบฤทธิ์ของ recombinant bacteria ที่สร้างขึ้นต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ในหนูขาวที่ได้รับไดเมทิลไฮโดรซีน

จากการทดลองสรุปว่าผู้วิจัยสามารถสร้าง *L. lactis* ที่สามารถแสดงออกของยีนแลคโตเฟอริน แต่การตรวจสอบในระดับโปรตีนสามารถทำได้อย่างจำกัดเนื่องจากการสร้างโปรตีนของมนุษย์ในแบคทีเรียเซลล์ซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถจับได้กับแอนติบอดีส์ หรือเนื่องจากแลคโตเฟอรินและส่วนย่อยของแลคโตเฟอรินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทำให้การแสดงออกต้องถูกจำกัด อย่างไรก็ตามผู้วิจัยสามารถตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ภายในเซลล์ของแบคทีเรียในสายพันธุ์ที่นำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิด aberrant crypt foci ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็ง Dimethylhydrazine (DMH)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิด aberrant crypt foci ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็ง DMH ในระยะเริ่มต้นพบว่าหนูที่ได้รับ DMH ร่วมกับ *L. lactis* ทุกสายพันธุ์เหี่ยวงาให้เกิด ACF เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับ DMH เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม หนูที่ได้รับ *L. lactis* ที่แสดงออกยีนแลคโตเฟอริน (LF01 และ LFN) ก็สามารถที่จะลดอุบัติการณ์ของการเกิด ACF ได้เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับ *L. lactis* ที่มีพลาสมิดนำพาเท่านั้น (BE31 และ AMJ2008) และก็มีแนวโน้มที่จะมีผลในระยะส่งเสริม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากการทดลองจึงเป็นแนวทางเริ่มต้นที่จะพัฒนาการผลิตแบคทีเรียในลำไส้ที่สามารถผลิตสารที่มีประโยชน์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่ปลอดภัย ภายในลำไส้ใหญ่เพื่อป้องกันการเกิดความผิดปกติและการพัฒนาไปเป็นมะเร็งลำไส้ต่อไป

การเสนอผลงาน

นำเสนอผลงานในรูปแบบของโปสเตอร์

1. Construction of lactoferrin-producing *Lactococcus lactis* and properties of its recombinant protein การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 14-16 มกราคม 2548 โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี
2. Construction of lactoferrin-producing *Lactococcus lactis* and properties of its recombinant protein การประชุม The third Takeo Wada Cancer Research Symposium วันที่ 24-25 กุมภาพันธ์ 2548 มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น
3. Modulation of dimethylhydrazine (DMH)-induced aberrant crypt foci formation by lactoferrin-producing *Lactococcus lactis* การประชุม APCOCP Satellite meeting; Modeling for detection of environmental carcinogens and modifying agents in the Asian Pacific. วันที่ 6-7 พฤศจิกายน 2549 ณ โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์ จ. เชียงใหม่

ภาคผนวก

POSTER SESSION

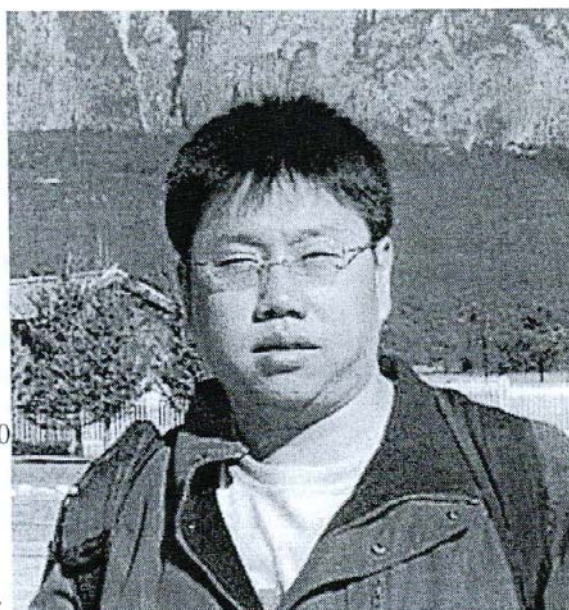
Modulation of Dimethylhydrazine (DMH)-induced Aberrant Crypt Foci Formation by Lactoferrin-producing *Lactococcus lactis*

Teera Chewonarin¹, Watchara Kasinork²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, ²Department of Clinical immunology, Faculty of Medical Technology, Chiangmai University, Chiangmai 50200, Thailand

Abstract

To construct lactoferrin-producing *L. lactis*: pBE31 and pAMJ2008 were used to construct plasmid that carry hLF to *L. lactis*. Two strains of lactoferrin harboring *L. lactis* were constructed as *L. lactis* LF001 (full length 2200 bp) and *L. lactis* LFN (N-lobe 730 bp), respectively. The growth rate of each strain was not significantly different but the *L. lactis* harboring lactoferrin gene trended to be slower. The pH of bacteria culture media was decreased from 7.5 at starting of cultivation to 6.0 when the bacteria reached to stationary phase. The expression of recombinant lactoferrin in *L. lactis* was determined by Western blot analysis using anti-human lactoferrin antibody. The modifying effects of *L. lactis* in each strain on the development of dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic aberrant crypt foci (ACF) were investigated in male Wistar rats. In initiation stage, rats were given subcutaneous injection of DMH (40 mg/kg body weight) once a week for two weeks to induced ACF and fed bacterial suspension of strains MG1363 (parental strain) BE31(control plasmid), LF001, AMJ2008 (control plasmid) and LFN, respectively for 5 weeks starting one week before the first week of carcinogen. In promotion stage, rats were fed bacterial suspension in each strain after 3 weeks after second dose of carcinogen for 16 weeks. Treatment of bacteria culture trended to increase the number of ACF formation in DMH treated rat. *L. lactis* harboring human lactoferrin gene can decrease both the number of ACF formation and the multiplicity of ACF in rat colon but there is no significantly different. The results lead to further study in anti-colon cancer properties of modified intestinal bacteria.



This research was supported by the Thailand Research Fund (TRF).

P-01

CONSTRUCTION OF LACTOFERRIN-PRODUCING *LACTOCOCCUS LACTIS* AND PROPERTIES OF ITS RECOMBINANT PROTEIN

Teera Chewonarin¹, Watchara Kasinrerk²

¹Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Chiang
Mai University, Chiang Mai
50200, Thailand

²Department of Clinical
immunology, Faculty of
Medical Technology, Chiang
Mai University, Chiang Mai
50200, Thailand

Lactoferrin-producing bacterium was proposed to be a tool for anti-colon cancer in this study. *L. lactis* was selected as a host for recombinant lactoferrin production. *E. coli*-*Lactococcus* shuttle vector, pBE31 was used to construct plasmid that carry hLF to *L. lactis*. Three size of hLF genes were amplified including LF (2200 bp), LFN (N-lobe; 730 bp) and Lfc (lactoferricin; 133 bp), and linked to *Lactococcus* CcpA promoter. These recombinant lactoferrin genes then were inserted into pBE31 at designed subcloning site. Plasmids which carried various size of hLF gene were transferred to *L. lactis* MG1363 by electroporation generated four strains these were *L. lactis* BE31 LF001 (full length 2200 bp), LFN002 (M-lobe 780 bp) and LFC003 (lactoferricin 180 bp), respectively. Plasmids in all strains were extracted to determine the existing of hLF gene by PCR, then subject to PCR for sequencing. The growth rate of each strain was not significantly different but the *L. lactis* harboring lactoferrin gene trended to be slower. The pH of bacteria culture media was decreased from 7.5 at starting of cultivation to about 6.0 when the bacteria reached to stationary phase. The results shown that the plasmids inserted to *L. lactis* of each strain were stable and did not interrupt lactic acid production of host cell. The expression of recombinant lactoferrin in *L. lactis* was determined by western blot analysis. Moreover its biological functions of these bacteria and recombinant protein will be further studied.

Acknowledgements: This work is supported by Thailand Research Fund (TRF).

Construction of Lactoferrin-producing *Lactococcus lactis* and properties of its recombinant protein

Teera Chewonarin^{a,*}, Watchara Kasinrer^b

^a Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiangmai University, Chiangmai 50200, Thailand

^b Department of Clinical immunology, Faculty of Medical Technology, Chiangmai University, Chiangmai 50200, Thailand

Abstract—To construct lactoferrin-producing intestinal bacteria, *L. lactis*: lactic acid bacteria which shown human health promotion, was selected as a host for recombinant lactoferrin production. *E.coli*-*Lactococcus* shuttle vector, pBE31 was used to construct plamid that carry hLF to *L. lactis*. Three size of hLF genes were amplified including LF (2200 bp), LFN (N-lobe; 730 bp) and Lfc (lactoferricin; 133 bp), and linked to *Lactococcus* CcpA promoter. These recombinant lactoferrin genes then were inserted into pBE31 at designed subcloning site. Plasmids which carried various size of hLF gene were transferred to *L. lactis* MG1363 by electroporation generated four strains these were *L. lactis* BE31 LF001 (full length 2200 bp), LFN002 (M-lobe 780 bp) and LFC003 (lactoferricin 180 bp), respectively. Plasmids in all strains were extracted to determine the existing of hLF gene by PCR, then subject to PCR for sequencing. The growth rate of each strain was not significantly different but the *L. lactis* harboring lactoferrin gene trended to be slower. The pH of bacteria culture media was decreased from 7.5 at starting of cultivation to about 6.0 when the bacteria reached to stationary phase. The results shown that the plasmids inserted to *L. lactis* of each strain were stable and did not interrupt lactic acid production of host cell. The expression of recombinant lactoferrin in *L. lactis* and its biological function is on process.

Keywords—Lactoferrin-producing *Lactococcus lactis*, functional bacteria

* Corresponding author. Tel.: 66-53-945325 ext 232 ; fax: 66-53-894031; e-mail: tchewonarin@hotmail.com.