

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180114

ชื่อโครงการ : การเพิ่มจำนวนยีน การศึกษาคุณลักษณะของยีนและการศึกษาผลต่อเซลล์
เมมเบรนของเพปไทด์ชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรีย
ก่อโรคดื้อยาสายพันธุ์ MRSA และ VRE

ื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีวรรณ อุ่นแพทย์
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail Address : Aunpad@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤษภาคม 2551 ถึง 14 พฤษภาคม 2554

ในปัจจุบัน เพปไทด์และแบคทีเรียโอซินได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาเพื่อต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยา *B. pumilus* สายพันธุ์ WAPB4 สร้างแบคทีเรียโอซินชื่อว่า “Pumilicin 4” ที่มีความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคดื้อยาสายพันธุ์ MRSA จากงานวิจัยครั้งนี้ ยีนที่แสดงออกเป็นเพปไทด์โฮลิน ที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียโอซินชื่อว่า “BhIA” ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 ตัว และยีนที่แสดงออกเป็นเพปไทด์โฮลิน ที่ชื่อว่า “XhIB” ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งสิ้น 86 ตัวได้ถูกเพิ่มจำนวน เมื่อทำการศึกษาคูณลักษณะของยีนและเพปไทด์พบว่า เพปไทด์ “BhIA” เป็นเพปไทด์ที่ประกอบด้วย transmembrane domain จำนวนหนึ่งชุดที่ปลาย N-terminus และปลาย C-terminus ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นจำนวนมาก เพปไทด์ “XhIB” นั้นประกอบด้วย transmembrane domain จำนวนสองชุดที่ปลาย N-terminus โดยทั้งสองชุดต่อกันด้วยโครงสร้างแบบ β -turn ส่วนปลาย C-terminus ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้แล้วยังพบ dual start motifs ในเพปไทด์ทั้งสองชนิดนี้ด้วย คุณลักษณะทั้งหลายนี้ทำให้สามารถจัดจำแนกได้ว่าเพปไทด์ “BhIA” และ “XhIB” ของเชื้อ *B. pumilus* สายพันธุ์ WAPB4 นี้เป็นเพปไทด์ชนิดโฮลิน ยีนที่แสดงออกเป็นเพปไทด์โฮลิน “BhIA” ได้ถูกเชื่อมกับพาหะชนิด pET23a+ และถูกนำเข้าสู่ *Escherichia coli* BL21(DE3) เพื่อเพิ่มปริมาณการแสดงออก ผลปรากฏว่าเพปไทด์โฮลิน “BhIA” เป็นพิษต่อเซลล์ *E. coli* เนื่องจากหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* เมื่อทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG และเมื่อทำการศึกษาผลของเพปไทด์โฮลิน “BhIA” ต่อเซลล์ของ *E. coli* ด้วยเทคนิค SEM และ TEM พบว่าเพปไทด์โฮลิน “BhIA” นี้ทำลายเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์เกิดการรั่วไหลของไซโทพลาสซึมและตายในที่สุด โดยไม่ทำให้เซลล์เกิดการแตก เพปไทด์โฮลิน “BhIA” นี้จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาการติดเชื้อก่อโรคดื้อยาในแง่ของการใช้เป็นยาร่วมได้ในอนาคต

คำหลัก : เพปไทด์โฮลินที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียโอซิน/ เพปไทด์โฮลิน/ BhIA / XhIB/ *B. pumilus*

Abstract

Project code : MRG5180114
Project Title : Cloning and characterization of gene encoding a novel bioactive peptide with anti-MRSA and anti-VRE activity and its effect on cell membrane
Investigator : Assistant Professor Dr. Ratchaneewan Aunpad
Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University
E-mail Address : Aunpad@yahoo.com
Project Period: 15 May 2008 – 14 May 2011

Recently, the use of antibacterial peptides and bacteriocins as replacement for currently used antibiotics is promising. *Bacillus pumilus* strain WAPB4 produced bacteriocin with remarkable activity against MRSA. The potential use might be exploited as an alternative antibacterial agent for controlling MRSA in the future. An open reading frame encoding a 71 amino acid BhIA bacteriocin-related holin-like peptide was present upstream of 86 amino acid โหลิน-like peptide, *xhIB*, encoding gene in the genome of *B. pumilus* strain WAPB4. Analysis of BhIA using TMHMM server suggested one putative transmembrane domain (TMD) at the N-terminal part and a number of highly charged amino acid residues at the C-terminal part. *XhIB* of *B. pumilus* strain WAPB4 composed of two putative transmembrane domains separated by a β -turn, and numerous charged residues in the C-terminus. The dual start motifs were found in both BhIA and *XhIB*. Structural analysis of their sequence revealed features characteristic for holin. To analyze the effect of BhIA on bacteria cell, its ORF was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). Expression of holin-like peptide, BhIA, was found to be toxic to the host cell. The site of action of BhIA is on the cell membrane and caused bacterial death by cell membrane disruption as clearly demonstrated by SEM and TEM. Therapeutic applications of BhIA could be considered as a combination therapy to promote the drug efficacy.

Keywords : bacteriocin-related holin-like peptide, holin-like peptide, BhIA, *XhIB*, *Bacillus pumilus*