

Project Code : MRG5280019

(รหัสโครงการ)

Project Title : การศึกษาโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์ Heteroscorpine

(ชื่อโครงการ) 1 ที่ได้จากน้ำพิษแมงป่องช้างเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

(Structural analysis and mechanism of action of a novel scorpion antimicrobial peptide, Heteroscorpine-1)

Investigator : รินา ภัทรมานนท์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : narin@kku.ac.th

Project Period : 31 มีนาคม 2552- 30 มิถุนายน 2554

(ระยะเวลาโครงการ)

Heteroscorpine-1 (HS-1) เป็นเปปไทด์ที่สกัดได้จากพิษของแมงป่องช้างสปีชีส์ *Heterometrus laoticus* ลำดับกรดอะมิโนของ HS-1 จะคล้ายกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ cecropin และ defensin. HS-1 มีขนาด 8.293 kDa และมีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาโครงสร้างและการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของ HS-1 โดยจะทำการเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนท์ HS-1 ในระบบของแบคทีเรีย โดยการสร้างพลาสมิดลูกผสม pET-32a-HS-1 ด้วยวิธีการตัดต่อยีนและโคลน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HS-1 ได้รับการยืนยันว่าถูกต้องหลังจากทำ DNA sequencing ลำดับถัดมาผู้วิจัยเพิ่มจำนวนพลาสมิดในแบคทีเรียเจ้าบ้านและกระตุ้นให้มีการแสดงออกของพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวแล้วและแยกบริสุทธิ์ด้วยแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี ผู้วิจัยนำ rHS-1 ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ กล่าวคือ การต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. aureus*, *Ps. Aeruginosa*, และ *K. pneumoniae* พบว่า rHS-1 สามารถยับยั้งการเติบโตของ *B. subtilis* เมื่อใช้วิธี disc diffusion assay และเมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution assay พบการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *Ps. Aeruginosa*, และ *K. pneumoniae* แต่ไม่พบการยับยั้งใน *S. aureus* นอกจาก rHS-1 ที่ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ ผู้วิจัยได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของอนุพันธ์ของ HS-1 ในส่วนของ N- และ C-terminal domains หรือที่เรียกว่า CD และ DD โดเมน เพื่อทดสอบความสามารถในการทำงานแยกกันของทั้งสองโดเมน พบว่า CD สามารถเข้าทำลายเยื่อเซลล์จำลองได้ดีกว่า DD ซึ่งเป็นผลมาจากโครงสร้างที่มีลักษณะของความเป็น helical และ ความเป็น amphipatic มากกว่าของ CD งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงสมบัติของเปปไทด์ HS-1 และอนุพันธ์ในการต้านเชื้อจุลชีพก่อโรค ในลำดับต่อไปควรได้มีการนำเปปไทด์และอนุพันธ์ไปทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคที่หลากหลายขึ้น เช่น โรคเมลิออยโดซิส เลปโตสไปโรซิส ซึ่งเป็นโรคที่พบบ่อยในภาคอีสาน รวมไปถึงการศึกษากลไกเชิงลึกทางด้านเทอร์โมไดนามิกส์ของการก่อโรคเหล่านี้ เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานก่อนที่จะประยุกต์ใช้เป็นยาต้านเชื้อก่อโรคต่อไป

Keywords : scorpine, antimicrobial activity, membrane disruption, cecropin, defensin, model

(คำหลัก) membrane

Abstract

Heteroscorpine-1 (HS-1) is found in crude venom of Thai giant scorpion (*Heterometrus laoticus*), it is a cecropin-defensin hybrid peptide of 8.293 kDa with 3 disulfide bonds. This study aims to obtain large amount of active HS-1 in bacterial expression system. pET-32a-HS-1 was constructed by molecular cloning in bacterial system using fusion of Thioredoxin tag for assisting corrected disulfide bonds of rHS-1. pET-32a-HS-1 nucleotide sequence was confirmed by DNA sequencing. Active rHS-1 was then tested for functional activities including bactericidal effect on *B. subtilis*, *S. aureus*, *Ps. Aeruginosa*, and *K. pneumoniae*. The result showed marginal inhibition of rHS-1 on *S. subtilis* in disc diffusion assay. The more sensitive broth microdilution assay showed inhibition of rHS-1 on *B. subtilis*, *Ps. Aeruginosa*, *K. pneumonia* but not *S. aureus*. In this present study, structure-bactericidal relationship of chemically synthesized HS-1 N- and C-termini was also investigated. CD displayed more compact structure than DD when placed in membrane-mimicking environment as observed with limited proteolysis. CD could kill *B. subtilis* comparable to gentamycin, giving 55.9 % inhibition. CD also caused more cell wall deformation than DD when observed with SEM. When determining the mode of action by NPN-uptake assay, calcein leakage assay, and tryptophan blue shift fluorescence, CD exerted stronger outer membrane penetration and more permeabilization than DD. In conclusion, we suggest that in HS-1 structure 1) both domains separately possess antimicrobial activity and 2) CD appears to be stronger determinant than DD in bacterial killing action. Separable antimicrobial activity reflects the hybrid nature of scorpine family toxin and its evolutionarily multi-function. Future study should focus on testing bactericidal activity of HS-1 and its derivatives, CD and DD, on pathogenic microorganisms that cause diseases in northeastern area of Thailand like Melioidosis or Leptospirosis. Thermodynamics of HS-1 variants binding on live and model membrane should be investigated to provide basis underlying mode of action, information obtained might be helpful in designing antimicrobial agents.