



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์
Heteroscorpine-1 ที่ได้จากน้ำพิษแมงป่องช้างเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยาต้าน
เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

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

โดย

อ.ดร.รินา ภัทรมานนท์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

20 มิถุนายน 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์
Heteroscorpine-1 ที่ได้จากน้ำพิษแมงป่องช้างเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยาต้าน
เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

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

โดย

อ.ดร.รินา ภัทรมานนท์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ด้านสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ด้านการเอื้อเฟื้อเงินทุนสนับสนุนบางส่วน ขอขอบคุณ นางสาวสุพรรณิการ์ คลังภูเขียว นักศึกษาปริญญาโท ทุน พสวท. และ นางสาวสุกัลักษณ์ ประสาร นักศึกษาปริญญาโท ทุนมหาวิทยาลัยวิจัย ในการช่วยทำวิจัย ขอขอบคุณรศ.ดร.ศักดา ดาดวง ด้านคำแนะนำการวิจัยด้วยดีมาตลอดจนสิ้นสุดโครงการ

ท้ายที่สุด ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำหรับทุนวิจัยที่เป็นหลักในการทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

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.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

มี ดังนี้

1.1 Functional expression and purification of a novel antimicrobial peptide, recombinant heteroscorpine-1

(นำเสนอผลงานวันที่ 20-21 สิงหาคม 2554 ที่ การประชุมวิชาการระดับชาติ เรื่อง “ศาสนา ประวัติศาสตร์ และศิลปกรรมในภูมิภาคลุ่มน้ำโขง” (Religions, History and Art in the Mekong Region) กำลังส่งตีพิมพ์ Proceeding)

1.2 Thai giant scorpion toxin Heteroscorpine-1 N- and C-terminal domains separately possess bactericidal activity, with more membrane disruption at the N-terminus (กำลังส่งตีพิมพ์วารสารนานาชาติที่มีอิมแพคแฟคเตอร์)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
- เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

ไม่มี

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

มี ดังนี้

3.1 Klungphukiew, S. and Patramanon, R.. (2011) Molecular cloning and expression of a novel anti-malarial peptide, recombinant heteroscorpine-1. Poster presentation. *The 3rd Biochemistry and Molecular Biology International Conference*, Chiang Mai 5-9 April 2011

3.2 Prasan, S. and Patramanon, R.. (2011) How To form Stable and Homogeneous Large Unilamellar Vesicles. Poster presentation. *The Third International Conference on Science and*

Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (3rd STGMS) The Second International Conference on Applied Science (2nd ICAS) Luang Prabang Lao PDR, 24-25 March 2011

3.3 Prasan, S., Plungkhuntod, B., Naree, T., Thammasirak, S., Daduang, S., and Patramanon, R., (2011) Structure-Bactericidal activity relationship of the N-and C- terminal domains of a novel Thai giant scorpion toxin heteroscorpine-1. Poster presentation. *The 3rd Biochemistry and Molecular Biology International Conference*, Chiang Mai 5-9 April 2011

3.4 Pasan, P., Plungkhuntod, B., Patramanon, R (2010) Hybrid Nature of a Novel Scorpine Family Toxin Heteroscorpine-1: Conformation and Antibacterial Activity. Poster presentation. *5th International Peptide Symposium*, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. 5-9 December 2010

สารบัญ

ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์โครงการ	1
วิธีการดำเนินการวิจัย	2
ผลการวิจัย	14
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	30
เอกสารอ้างอิง	31
ร่างต้นฉบับบทความวิจัย 1 (proceeding)	33
ร่างต้นฉบับบทความวิจัย 2	45

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ขนาดของ clear zone ที่ยับยั้งการเติบโตของจุลชีพ	23
ตารางที่ 2	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ (%Inhibition) โดยวิธี Broth microdilution assay	24
ตารางที่ 3	ตารางแสดงค่า %hemolysis	25
ตารางที่ 4 ค่า	Emission สูงสุดของกรดอะมิโนทริปโตเฟนที่ความเข้มข้นเปปไทด์ 5 μ M ในสถานะที่มี DOPG: DOPC (2:3 w/w) LUVs	30

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	แถบพลาสมิดดีเอ็นเอของ pGEX-6P-3-HS-1 และ pET-32a ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21(DE3)	14
ภาพที่ 2.1	การตรวจสอบพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 โดยใช้ไพรเมอร์ HSF4 กับ HSR6 และ HSF33 กับ HSR6	16
ภาพที่ 2.2	การตรวจสอบพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 โดยใช้ไพรเมอร์ HSF7 กับ HSR6	17
ภาพที่ 3	ยีน HS-1 ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์เฉพาะ	17
ภาพที่ 4.1	แผนผังพลาสมิดลูกผสม pET-32a-HS-1	17
ภาพที่ 4.2	โคโลนี <i>E.coli</i> Origami™ หลังจากการรับพลาสมิดลูกผสม	18
ภาพที่ 5	(A) คือ PCR product โดยใช้ pET-32a-HS-1 เป็นเทมเพลต (B) คือ การตรวจสอบพลาสมิด pET-32a-HS-1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์	19
ภาพที่ 6	แสดงแถบแบนของโปรตีนที่ได้จาก bacterial culture	20
ภาพที่ 7	(A) โปรตีน TrxA-His-HS-1 ที่ถูกชะออกมาจาก Ni-NTA affinity column ด้วยความเข้มข้นของ imidazole ต่างๆ (B) แสดงแถบแบนโปรตีน TrxA-His-HS-1 เมื่อผ่านการ dialysis (เลน1) และ PD-10 column (เลน2)	21
ภาพที่ 8.1	แสดงตำแหน่งตัดของ Enterokinase บนโปรตีนลูกผสม TrxA-His-HS-1	21
ภาพที่ 8.2	แสดงแถบแบนของ rHS-1 หลังตัดด้วย Enterokinase	22
ภาพที่ 9.1	แสดงลักษณะ clear zone ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	22
ภาพที่ 9.2	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	24
ภาพที่ 11.1	Limited proteolysis ของ defensin like domain	26
ภาพที่ 11.2	Limited proteolysis ของ cecropin like domain	27
ภาพที่ 12	กราฟแสดงผลการทดสอบ NPN uptake ของเปปไทด์ CD และ DD กับเชื้อ <i>B.subtilis</i> ATCC 6633	28
ภาพที่ 13	กราฟแสดงผลการทดสอบ calcein leakage ของเปปไทด์ CD และ DD กับ liposome	29

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

Heteroscorpine-1 (HS-1) เป็นเปปไทด์ที่สามารถแยกบริสุทธิ์ได้จากพิษของแมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*) ซึ่งเป็นสัตว์ที่พบได้ทั่วไปในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยรวมถึงประเทศใกล้เคียง โดยเมื่อแยกบริสุทธิ์แล้วนำมาศึกษาพบว่า มีขนาด 8293 Da และมีค่า pI คือ 8.79 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งสิ้น 95 ตัว ซึ่งมีส่วน signal region และ mature region ภายในโครงสร้างมีพันธะไดซัลไฟด์ 3 แห่งเนื่องจากมี 6 cysteine และนอกจากนั้นยังพบว่า HS-1 มีคุณสมบัติคล้ายกับโปรตีนในกลุ่ม scorpine ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของช่องส่งผ่านไอออนโพแทสเซียมโดยมีฤทธิ์เป็น potassium channel blocker และเมื่อมีการนำกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับแมงป่องชนิดอื่นทำให้ทราบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับอะมิโนของ Panscorpine ซึ่งเป็นโปรตีนที่สกัดได้จาก *Pandinus imperator* ถึง 82% และ Opiscorpine ที่ได้จาก *Opisthophthalmus carinatus* 72% ซึ่งเปปไทด์เหล่านี้มีฤทธิ์เป็น potassium channel blocker เช่นกัน (นันทวัน เอื้อวงศ์กุล, 2006) นอกจากนี้พบว่า HS-1 ยังมีฤทธิ์สามารถต้านจุลชีพ (antimicrobial) ได้อีกด้วย ปัจจุบันมีการนำโปรตีนและเปปไทด์จากน้ำพิษของสัตว์มาดัดแปลงเพื่อใช้ประโยชน์ทั้งการแพทย์และงานวิจัยมากขึ้น แต่ก็มักประสบปัญหาเนื่องจากโปรตีนและเปปไทด์ที่สกัดจากสัตว์ทดลองมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและได้ปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาด้านต่างๆ ดังนั้นจึงมีการโคลนเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อให้เกิดการแสดงออกในปริมาณมาก

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาและโคลน HS-1 เข้าในพลาสมิด PGEX-6p-3 ซึ่งมีการติด GST protein เพื่อให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์และสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกได้ใน *E. coli* JM109 ด้วย IPTG แต่อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนลูกผสมนี้มีปริมาณน้อยและไม่ออกฤทธิ์ ซึ่งอาจเกิดจากการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ผิดปกติซึ่งมักพบได้ในรายงานเกี่ยวกับการโคลนโปรตีนจำพวกพิษ สำหรับการศึกษานี้ได้ทำการโคลน HS-1 เข้าในพลาสมิด pET-32a ซึ่งมีความพิเศษคือมีโปรตีน Thioredoxin ช่วยให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์เกิดได้ดีและถูกต้องมากขึ้นและมีบริเวณที่มี Histidine ต่อกันหลายตัว ทำให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ และชักนำให้เกิดการแสดงออกใน *E. coli* เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของ Heteroscorpine-1

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

Research article “Structural study and membrane disruption mechanism of Heteroscorpine-1, a novel antimicrobial peptide from scorpion venom” Plan to submit in FEBS Letters (Impact

factor = 3.415 in 2006) or Biochemistry (Impact factor = 3.8 in 2005) or Toxicon (Impact factor = 2.225 in 2005) หรือวารสารอื่นๆ ที่มี Impact Factor ไม่น้อยกว่า 1.5

แผนการดำเนินงานโครงการ

1. Expression and purification of Heteroscorpine-1 from bacterial system
2. Conformational analysis of Heteroscorpine-1 to obtain 2^o, 3^o, and 4^o structure
 - 2.1 Analysis of Secondary and tertiary structure using circular dichroism, intrinsic fluorescence spectroscopy, and hydrophobic-sensitive TNS assay
 - 2.2 Analysis of quaternary structure using gel-filtration, EGS chemical crosslinking, limited proteolysis, and SDS-PAGE
3. Study mechanism of action of Heteroscorpine-1 in disrupting bacterial membrane
 - 3.1 Membrane pore formation study by fluorescence-dye leakage assay, intrinsic fluorescence assay

วิธีการดำเนินการวิจัย

1 การสกัดพลาสมิด

สกัดพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 และ pET-32a โดยใช้วิธีการสกัดพลาสมิดจากชุดสกัด พลาสมิดสำเร็จรูป illustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit จากบริษัท Qiagen ดังนี้

- 1.1 นำแบคทีเรีย *E.coli* 21(DE3) 1 โคโลนีมาเลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT แบบเหลวที่มีแอมพิซิลิน 50 µg/ml ปริมาตร 5 ml เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ 37 °C อย่างน้อย 12 ชั่วโมง
- 1.2 ปิเปต cell culture ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร
- 1.3 ปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 g เป็นเวลา 30 วินาที
- 1.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (ชั้น supernatant)ทิ้งเบาๆ โดยไม่ให้สะท้อนชั้นตะกอนเซลล์
- 1.5 เติม Lysis buffer type 7 ปริมาตร 200 µl เพื่อผสมกับตะกอนเซลล์
- 1.6 เติม Lysis buffer type 8 ปริมาตร 200 µl ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน
- 1.7 เติม Lysis buffer type 9 ปริมาตร 400 µl ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน
- 1.8 ปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 g เป็นเวลา 4 นาที
- 1.9 นำส่วน supernatant ใส่ในคอลัมน์เล็ก (plasmid mini column) ที่สวม collection tube แล้วจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 16000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป
- 1.10 ทำการล้างคอลัมน์อีกครั้งด้วยการเติม Lysis buffer type 9 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร
- 1.11 ปั่นเหวี่ยงที่ 16000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป
- 1.12 เติม Wash buffer type 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์เล็ก

1.13 บั่นเหวี่ยงที่ 16000 g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป

1.14 ทำการชะพลาสติกดีเอ็นเอจากคอลัมน์ โดยย้ายคอลัมน์เล็กไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติม Elution buffer type 4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 วินาที

1.15 บั่นเหวี่ยงที่ 16,000 g เป็นเวลา 30 วินาที

1.16 นำส่วนสารละลายพลาสติก มาวัดปริมาณและคุณภาพของพลาสติก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนทำการทดลองขั้นตอนต่อไป

2. วัดปริมาณและคุณภาพของพลาสติก

การวัดปริมาณและคุณภาพของพลาสติกสามารถทำควบคู่กันได้โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer หรือวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอพลาสติกที่จับกับเอธิเดียมโบรไมด์ หลังจากแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis แล้วเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.1 วิธีวัดการดูดกลืนแสง

เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นแสงประมาณ 260 นาโนเมตร ในขณะที่โปรตีนดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร ดังนั้นเมื่อแบ่งพลาสติกดีเอ็นเอมาเจือจางด้วย TE buffer แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร สามารถนำมาหาความบริสุทธิ์ของพลาสติกที่สกัดได้โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ซึ่งพลาสติกดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรมีค่าประมาณ 1.8 หากมีค่าสูงหรือต่ำกว่านี้หมายถึงมีการปนเปื้อนด้วยอาร์เอ็นเอ โปรตีนหรือฟีนอล

สำหรับปริมาณของพลาสติกดีเอ็นเอนั้นสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรมาเทียบหาได้ โดยสารละลายพลาสติกดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สามารถดูดกลืนแสงได้ค่า Absorbance ที่ 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1

2.2 วิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์

วิธีนี้ทำได้โดยนำพลาสติกดีเอ็นเอที่ได้มาทำ Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วยสารเรืองแสงคือเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอ เมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตซึ่งจะเห็นการเรืองแสง ความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว ซึ่งจะสามารถทราบปริมาณของพลาสติกดีเอ็นเอโดยประมาณได้ การตรวจสอบพลาสติกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำได้ดังนี้

2.2.1 เตรียมถาดเจลโดยวางให้มีระดับเท่ากันในแนวราบ

2.2.2 ชั่งอะกาโรส 0.24 กรัมแล้วเติม 1X TAE buffer 30 มิลลิลิตร

2.2.3 ละลายอะกาโรสโดยใช้ไมโครเวฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 40 นาที

2.2.4 นำเจลใส่เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม 1X TAE buffer จนท่วมเจล

2.2.5 ปิเปตสารละลายผสมพลาสติกดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในช่องที่เตรียมไว้

2.2.6 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการ run gel ด้วยใช้ไฟฟ้า 50 โวลต์, 50 นาที

2.2.7 ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลาประมาณ 10 นาที แล้วนำเจลแช่ในน้ำกลั่น

2.2.8 ส่องเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพด้วย gel document unit

2.2.9 คำนวณปริมาณของพลาสติกดีเอ็นเอโดยเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณ

3. การเพิ่มปริมาณยีน Heteroscorpine-1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction)

Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคทางชีวเคมีที่สามารถเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอของ HS-1 ได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเพื่อจับบริเวณ N-terminus และ C-terminus ของยีน HS-1 รวมทั้งสามารถแทรกตำแหน่งจำเพาะเพื่อให้เอนไซม์เข้าจับได้อีกด้วย ในการทดลองนี้มีการออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

Forward primers	
HSF4	5'- (A/C)(A/C)A AAA CAA GAT GAA CA(A/G) CAA GC -3'
HSF7	5'- GGA CT(C/G) (A/G/C)T(A/G) GC(C/G)ATT GCC TC(C/T) TGC -3'
HSF33	5'- CTG TCG AGT TGC GGA ACG CTAG -3'
Reverse primer	
HSR6	5' - (G/T)(C/T)C CC(C/T) (C/T)TT (C/T)GGCT(G/T) CAA TTA -3'

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีส่วนผสมของสารละลายผสมสำหรับปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ได้แก่

- | | | | |
|----|---------------------------------|------|-----------|
| 1. | PCR Master mix | 12.5 | ไมโครลิตร |
| 2. | Forward primer (1 μ M) 0.75 | | ไมโครลิตร |
| 3. | Reverse primer(1 μ M) 0.75 | | ไมโครลิตร |
| 4. | Plasmid | 1 | ไมโครลิตร |
| 5. | น้ำกลั่น | 10 | ไมโครลิตร |

ปิเปตสารทั้งหมดตามลำดับลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยนำไปใส่ในเครื่อง PCR thermocycler โดยตั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบและกำหนดสภาวะการทำงานตามความเหมาะสมของแต่ละโปรแกรม ดังนี้

<u>ขั้นตอนที่ 1</u>	predenaturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	5 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 2</u>	denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	annealing	ที่อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	extension	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	2 นาที
	ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ			
<u>ขั้นตอนที่ 3</u>	final extension	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	7 นาที

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาครบ 40 รอบ จึงเก็บผลผลิตจากปฏิกิริยาแลงซ์โพลีเมอร์เรส (PCR product) ไปทำการตรวจสอบผลผลิตโดยวิธี gel electrophoresis ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพ จากนั้นเก็บรักษาผลผลิต (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การตัดพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

PCR product คอยีน HS-1 ที่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *BamH1* และ *Xho1* ซึ่งในส่วนของพลาสมิด pET-32a ก็มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ทั้งสองเช่นกัน โดยมีลำดับดังนี้

BamH1 5' - GGATCC - 3'

Xho1 5' - CTCGAG - 3'

เนื่องจากใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ทำให้สามารถตัดได้ที่ละชนิดหรือพร้อมกัน 2 ชนิดเลยก็ได้ จึงได้ทำการหาความเหมาะสมของสภาวะการตัดทั้งด้านบัพเฟอร์ ชนิดของเอนไซม์และระยะเวลา ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

4.1 คำนวณจำนวนเอนไซม์และปริมาณของพลาสมิดที่ใช้ตัด

4.2 ใส่สารต่างๆ ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ตามลำดับ (ปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร)

น้ำกลั่น	6	ไมโครลิตร
10X Buffer (buffer R)	2	ไมโครลิตร
<i>BamH1</i>	2	ไมโครลิตร
Plasmid	10	ไมโครลิตร

4.3 ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน โดยทำการปั่นเหวี่ยงระยะเวลาสั้นๆ

4.4 ทำการบ่มหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1.5-3 ชั่วโมง

4.5 แบ่งสารละลายของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamH1* มา 3 ไมโครลิตรเพื่อทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของการตัดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.6 ทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Xho1* โดยใส่สารต่างๆ ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ตามลำดับ (ปริมาตรสุดท้ายคือ 40 ไมโครลิตร)

น้ำกลั่น	18	ไมโครลิตร
10X Buffer (buffer R)	6	ไมโครลิตร
<i>Xho1</i>	2	ไมโครลิตร
Plasmid	34	ไมโครลิตร

4.7 ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน โดยทำการปั่นเหวี่ยงระยะเวลาสั้นๆ

4.8 ทำการบ่มหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12-15 ชั่วโมง

4.9 แบ่งสารละลายของพลาสมิดที่ถูกตัดแล้วมาทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของการตัดด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

5. การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ HS-1 กับพลาสมิด pET-32a

โดยทั่วไปหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์แล้ว สามารถแยกดีเอ็นเอของยีนที่สนใจได้ด้วยการทำ gel electrophoresis แล้วตัดเจลบริเวณที่มีแถบแบนของดีเอ็นเอที่สนใจ แล้วทำการชะดีเอ็นเอนั้นออกมาจากเจล แล้วเชื่อมต่อโดยใช้เอนไซม์ DNA ligase จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 12-16 ชั่วโมงหรือข้ามคืน

6. การส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

6.1 การเตรียมคอมพีเทนเซลล์

6.1.1 นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) มา streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT แบบวงที่ไม่มียาปฏิชีวนะและให้เจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อข้ามคืน

6.1.2 นำแบคทีเรีย 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT แบบเหลว 3 มิลลิลิตร ให้แบคทีเรียเจริญในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 ชั่วโมง

6.1.3 นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาใส่ในฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT แบบเหลว 50 มิลลิลิตร ให้เจริญในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

6.1.4 เมื่อ OD₆₀₀ มีค่าประมาณ 0.45-0.55 ให้นำเซลล์ใส่ในขวดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อที่อยู่ในกล่องน้ำแข็ง

6.1.5 ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.1.6 เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกซ้างๆ โดยไม่ให้สะเทือนชั้นตะกอนเซลล์

6.1.7 เติมน้ำเกลือแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) ที่เย็นจัด 10 มิลลิลิตร ค่อยๆ กระจายเซลล์ให้เข้ากับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

6.1.8 บั่นเหรียญที่ 4,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.1.9 เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกซางๆ โดยไม่ให้สะท้อนชั้นตะกอนเซลล์

6.1.10 เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เย็นจัด 4 มิลลิลิตร ค่อยๆ กระจายเซลล์ให้เข้ากับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

6.1.11 เติมสารละลาย 80% glycerol ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนขวดเซนตริฟิวจ์ วางไว้ในกล่องน้ำแข็ง 10 นาที

6.1.12 ปิดเตาแบคทีเรียที่ได้มา 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่เย็นจัด ที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

6.2 การส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

6.2.1 นำคอมพีเทนท์เซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ได้มาวางบนน้ำแข็ง

6.2.2 เติมสารละลายพลาสมิดลูกผสมที่ผ่านการเชื่อมต่อแล้วลงในหลอดในข้อ 6.2.1 จากนั้นผสมพลาสมิดให้เข้ากับเซลล์โดยการเคาะหลอดเบาๆ

6.2.3 วางหลอดไว้บนน้ำแข็งกลับหลอดผสมไปมาเบาๆ ทุก 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที

6.2.4 บ่มสารละลายในข้อ 6.2.3 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-60 วินาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที

6.2.5 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT แบบเหลวปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.2.6 นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT แบบวุ้นที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

6.2.7 เก็บจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. การคัดเลือกโคโลนีของ pET-32a-HS-1

โดยทั่วไปแล้วการคัดเลือกโคโลนีในขั้นต้นนั้น สามารถทำได้จาก antibiotic selection ในงานวิจัยนี้พลาสมิด pET-32a มียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะคือแอมพิซิลิน ดังนั้นจึงใช้อาหารแข็งที่มีความเข้มข้นแอมพิซิลิน 100 µg/ml เพื่อคัดเลือกโคโลนีของ pET-32a-HS-1

8. การแสดงออกของโปรตีน HS-1 ลูกผสม

1. นำเซลล์จาก -70 องศาเซลเซียส มาเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (เติมแอมพิซิลิน 5 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า

2. นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร 2XYT แบบวุ้นโดยวิธีขีดเชื้อ (streak plate) เพื่อให้ได้เซลล์แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนในตู้บ่มเชื้อ

3. นำเซลล์จากจานเพาะเชื้อมา 1 โคโลนี เพื่อเลี้ยงใน อาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (เติมแอมพิซิลิน 5 ug/ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า
4. นำเซลล์ที่ได้เลี้ยงต่อใน ฟลasksซึ่งมีอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลิน 500 ug/ml จากนั้นบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
5. วัดค่า OD₆₀₀ ทุกๆ ชั่วโมงให้ได้ค่า 0.6-0.7
6. เติม IPTG 500 µl ฟลasksซึ่งมีแบคทีเรียเจริญในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า
7. เก็บเซลล์ไว้ 1 มิลลิลิตร ทุกๆ medium หลังจากเติม IPTG ที่ทำการเลี้ยงเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

9. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วย SDS-PAGE

1. เตรียมเจล SDS-PAGE ดังนี้

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้ายของเจล	
	13% Separating gel (µl)	4% Stacking gel (µl)
Solution A:30%T acrylamide	1733	265
Solution B:1.5MTris-Hcl pH 8.8	1000	-
Solution C:1.5MTris-Hcl pH 6.8	-	500
Double distilled water	1183	1183
10% SDS	40	20
ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติม 10 % ammonium persulphate (10%APS) และ TEMED		
10% APS	40	30
TEMED	4	2

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้ายของเจล	
	16.5% Separating gel (µl)	4% Stacking gel (µl)

SolutionA:30%T acrylamide	2200	265
SolutionB:1.5MTris-Hcl pH 8.8	1000	-
SolutionC:1.5MTris-Hcl pH 6.8	-	500
Double distilled water	716	1183
10%SDS	40	20
ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติม 10 % ammonium persulphate (10%APS) และ TEMED		
10%APS	40	30
TEMED	4	2

- นำตัวอย่าง medium ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย IPTG และก่อนการกระตุ้นด้วย IPTG มาเติม sample loading dry ให้ได้ ปริมาตร 100 μ l นำไปต้มในน้ำเดือด
- load ตัวอย่างลงใน well เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน
- แยกโปรตีนจากส่วนต่างๆ โดยใช้ 16.5 % separating, 4% stacking gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 volts/gel เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาทีหรือจนกระทั่งสีวิ่งถึงขอบเจล
- ย้อมแผ่นเจลโดยใช้ 0.1 % coomassie brilliant blue R-250
- ล้างสีย้อมออกโดยใช้ destain solution
- ทำให้เจลแห้งโดยใช้เครื่อง gel dryer

10. การแยกบริสุทธิ์โปรตีน TrxA- His-HS-1 ด้วย Ni-ion affinity chromatography

เนื่องจากในโปรตีนลูกผสมที่ได้จากการแสดงออกของพลาสมิด pET-32a จะมีส่วนของ His-tag ซึ่งทำให้สามารถแยกบริสุทธิ์ได้โดยใช้ Ni-ion affinity chromatography ซึ่ง His-tag กับ Ni^{2+} สามารถจับกันได้ด้วยพันธะโคออดิเนตโควาเลนต์ แล้วชะออกโดยใช้ imidazole เข้มข้น จากนั้นกำจัด imidazole ด้วย dialysis และผ่านคอลัมน์ PD-10 เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน rHS-1

11. การทดสอบสมบัติทางชีวภาพของ synthetic peptides (HS-1 และอนุพันธ์) ต่อ cell pathogen และ mammalian cell

MIC assay:

- เซลล์แบคทีเรีย 18-24 ชั่วโมงจาก agar plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 5-6 ชั่วโมงให้ได้ค่า OD₆₅₅ ~ 0.5-0.6
- เจือจางเซลล์ให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 0.5 McFaland
- ปิเปตเซลล์จำนวน 100 μ l ลงใน 96 well plate

4. เตรียมสารที่ต้องการทดสอบโดยเจือจางให้เป็น Two fold
5. เติมน้ำที่ต้องการทดสอบลงไป 30 µl
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น และนำเพลตไปบ่มข้ามคืนที่ 37 °C
7. วัดค่าการดูดกลืนแสง พร้อมคำนวณ % inhibition

หมายเหตุ กำหนดให้ Blank เป็นตัวที่ใช้ละลายสารที่ใช้ทดสอบหาค่า MIC

Hemolytic assay:

1. เลือดจากคลังเลือดกลาง (โรงพยาบาลศรีนครินทร์) ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 4,290 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
2. นำส่วนที่เป็น pellet มาล้างด้วย 0.9% NaCl 3 ครั้ง
3. จากนั้นเติม 0.9% NaCl ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาณเลือดที่มี
4. เติมน้ำไปไทด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งได้แก่ความเข้มข้นที่ 20 และ 50 µM
5. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
6. จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 4,290 rpm เป็นเวลา 5 นาที
7. โหลตัวอย่างเลือดที่ centrifuge แล้วลงใน flat-bottom 96 well plat
8. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง micro-plate reader บันทึกค่า และวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยคำนวณค่า %Haemolysis จากสมการ

$$\% \text{Haemolysis} = 100 \times \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{triton}} - A_{\text{blank}}}$$

Thavie et al. (2000)

12. Limited proteolysis

ทดสอบโครงสร้างอนุพันธ์ของ HS-1 (Cecropin like domine (CD), Defensin like domain (DD)) โดยวิธี Limited proteolysis เพื่อศึกษาสถานะที่มี TFE และไม่มี TFE (สถานะเสมือนบริเวณเยื่อเซลล์ของเชื้อจุลชีพ) ต่อการม้วนพับให้มีโครงสร้างที่เหมาะสมของทั้ง CD และ DD โดยทำการทดลองดังนี้

1. ทำการเติมเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.01 mg ปริมาณ 5 µl ในสถานะที่มีเปปไทด์ที่ความเข้มข้นที่ 2 mM CD และ 4 mM DD
2. เปรียบเทียบ 2 สถานะได้แก่ สถานะที่เปปไทด์ละลายอยู่ใน 30%TFE และไม่มี 30%TFE
3. เปรียบเทียบเวลาที่ 0, 10 และ 30 นาที ที่เกิดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ที่ 25 °C
4. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปซินด้วย 1 M Tris pH8
5. ทำการวิเคราะห์ผลของโปรตีนกับเอนไซม์ทริปซินด้วย 16.5% Tris-Tricine SDS PAGE

13. ทดสอบการเกิดการซึมผ่านเยื่อเซลล์บริเวณ outer membrane จากผลของเปปไทด์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ HS-1 (Cecropin like domain (CD), Defensin like domain(DD))

NPN uptake assay

ทำการเตรียมตัวอย่างการวัดฟลูออเรสเซนซ์

1. ซึ่งในการทดลองจะทำการทดสอบกับเชื้อ *B.subtilis* (ATCC 6633) ทำการเลี้ยงเชื้อให้โตในช่วงระยะ log phase เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 5-6 ชั่วโมงให้ได้ค่า OD₆₅₅ ~ 0.5-0.6
2. นำเชื้อไป centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C แล้ว rinse ด้วย HEPES buffer pH 7.2 และทำการ fix cell ด้วย HEPES+KCN buffer และนำไป treat กับ เปปไทด์ CD และ DD ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 µM โดยมี Gentamicin เป็น antibiotic เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับเปปไทด์ และ TritonX100 เป็น control ของการแตกของเซลล์ที่ 100%

หมายเหตุ ** Gentamicin และ TTX เติมลงไปขณะกด Run เนื่องจากการวัดการเกิดปฏิกิริยาของการเกิด permeabilization ของเชื้อจากสารดังกล่าวจากนาฬิกาที่ 0

3. ใช้เครื่อง Spectrofluorometer รุ่น RE 5301 PC SHIMADZU
4. นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาทำการวัดฟลูออเรสเซนซ์ โดยเปิดโปรแกรม RF 5301 PC จากนั้นเลือก acquire mode และไปที่ Time cross จากนั้นทำการกำหนดค่าดังต่อไปนี้
 - Excitation และ Emission wavelength ของสารที่ต้องการวัด ในที่นี้คือ NPN โดยมีค่า Ex 350 และ Em 410 nm
 - กำหนดช่วงเวลาที่ต้องการวัด (ต้องการวัดทุก ๆ กี่นาฬิกา รวมทั้งหมดเป็นเวลา กี่นาฬิกา?)
5. นำตัวอย่างมาทำการวัดค่าการเรืองแสงของ NPN โดยใส่คิวเวทต์ควอตซ์ลงไปที่ตำแหน่ง sample holder และปิดฝา (สารที่ต้องการวัดซึ่งอยู่ในคิวเวทต์ได้แก่ *B.subtilis*, เปปไทด์ และสารเรืองแสง NPN)
6. เมื่อเตรียม sample เรียบร้อยแล้ว บรรจุลงไปยัง sample holder ของเครื่อง และปิดฝา กด start จากโปรแกรม บันทึกข้อมูล
7. Plot กราฟ แสดงความสัมพันธ์โดยแกน x แสดงความเข้มข้นของเปปไทด์ และแกน y แสดงเปอร์เซ็นต์ NPN uptake จากสูตร

$$\% \text{ NPN uptake} = 100 \times \left[\frac{F - F_0}{F_t - F_0} \right]$$

F ; intensity ของ

แบคทีเรียเมื่อเติมเปปไทด์

F₀; intensity ของแบคทีเรียก่อนเติมเปปไทด์

F_t; intensity ของแบคทีเรียเมื่อเติม TTX

14. การเตรียมลิโปโซมจากฟอสโฟลิปิดสังเคราะห์ (Christoph Gelhaus et al. 2008)

การทดสอบการรั่วของลิโปโซมที่เกิดขึ้นจากอันตรกิริยากับอนุพันธ์ของ HS-1 (Cecropin like domine

(CD), Defensin like domain(DD))

1. สั่งซื้อฟอสโฟลิปิดสังเคราะห์ชนิด PG (Phosphatidylglycerol) และPC (Phosphatidylcholine) จากนั้นนำทั้งสองมาละลายใน chloroform: methanol (2:1/V)
2. solvent จากการละลายของฟอสโฟลิปิด นำมาระเหยด้วย Nitrogen gas จะได้แผ่นฟิล์มบางเคลือบอยู่บนผิวของ evaporation flask
3. จากนั้น นำทำให้แห้งโดยผ่านเครื่อง vacuum evaporation เป็นเวลาข้ามคืน
4. นำส่วนของ lipid film ที่ได้มาผสมกับ buffer (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4) เพื่อให้เกิดการ hydration ระหว่าง buffer กับ lipid ในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการ trap สารเรืองแสงเข้าไปยังภายในก้อน liposome ดังนั้น ในขั้นตอนของการเกิดการ hydration จะมีการเติมสารเรืองแสง calcein เข้าไปถัดจากการละลายด้วย buffer
5. นำทั้งหมด (ฟอสโฟลิปิด, buffer, สารเรืองแสง calcein) มาทำการ Freeze-thaw 4 รอบ โดยทำการ freeze ด้วยไนโตรเจนเหลว และทำการ thaw ด้วย น้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C
6. จากนั้นนำมาทำให้มีขนาด 100 μm ด้วยเครื่อง Mini-Extruder โดยดันกลับไป-มา ทั้งหมด 17 รอบ
7. นำ liposome ที่ได้มาแยกเอาเฉพาะ liposome ที่ trap สารเรืองแสงไว้โดยการใช้ PD10 column โดยใช้ Elution buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) จะได้เยื่อเซลล์จำลองของเชื้อจุลินทรีย์ และนำไปเป็นตัวแทนเพื่อใช้ศึกษาในด้านของกลไกการเข้าทำลายของเปปไทด์ได้
8. ทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ต่อเยื่อเซลล์จำลองของจุลินทรีย์โดยเติมเปปไทด์ CD และ DD ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 20, 40 และ 80 μM โดยมี Dermaseptin เป็นเปปไทด์มาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง และ TritonX100 เป็น control ของการแตกของลิโปโซมเยื่อเซลล์จำลองที่ 100%
9. วัดค่า Ex ที่ 490 nm และ Em ที่ 520 nm บันทึกค่า และวิเคราะห์ผลการทดลอง

15. Tryptophan Fluorescence Blue Shift

ทำการวิเคราะห์การเรืองแสงของกรดอะมิโน W ที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ CD และ DD เพื่อวิเคราะห์การเข้าจับบริเวณผิวของลิโปโซมเยื่อเซลล์จำลอง

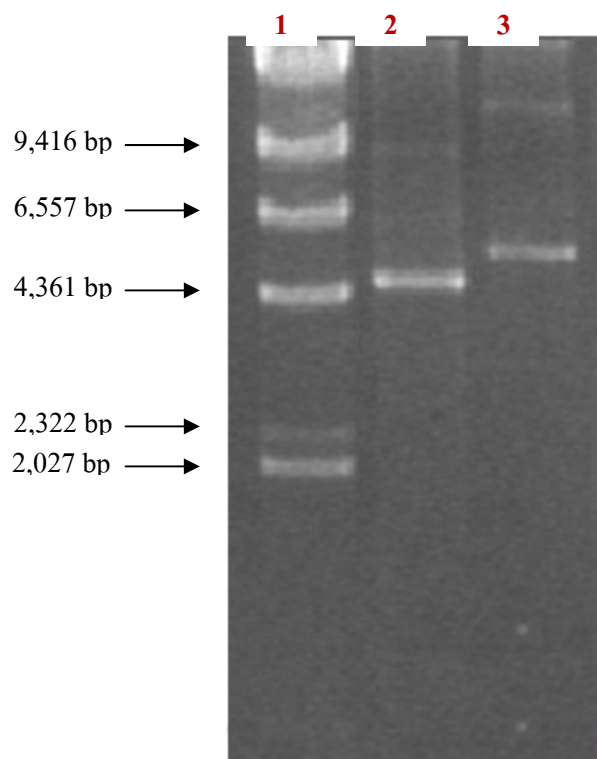
1. ทำการเตรียม liposome โดยใช้ DOPG:DOPC (2:3 w/w) ละลายใน HEPES buffer (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4)
2. ใช้คิวเวทท์ควอตซ์ขนาด 0.5x0.5 cm

3. ทำการไปเปิด liposome ใส่ในคิวเวทท์ และเติมเปปไทด์ CD และ DD โดยกำหนดความเข้มข้นของ stock เปปไทด์ 5 M โดยให้มีอัตราส่วนระหว่าง เปปไทด์ต่อ liposome 1:200 \
4. บ่มตัวอย่างเป็นเวลา 10 นาทีที่ 20°C
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนทริปโตเฟนโดยการ scan ค่า Em ช่วง 300-420 nm โดย Ex ที่ 280 nm
6. บันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลการวิจัย

1. การสกัดพลาสมิด

ในการวิจัยสกัดพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 และ pET-32a โดยใช้วิธีการสกัดพลาสมิดจากชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (Qiagen) แล้วตรวจสอบผลด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ได้ผลการวิจัยดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 1 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอของ pGEX-6P-3-HS-1 และ pET-32a ที่สกัดได้จาก

แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)

สัญลักษณ์ของตัวอย่าง: หมายเลข 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lamda HindIII)

หมายเลข 2 คือ พลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1

หมายเลข 3 คือ พลาสมิด pET-32a

เนื่องจากพลาสมิดมักจะพบ 3 แบบแบ่งตามรูปร่าง นั่นคือแบบเส้นตรง (linear form) ปลายเปิด 1 ข้างของสายคู่ดีเอ็นเอ (supercoil form) และแบบวงกลม (circular form) เมื่อพลาสมิดเคลื่อนที่ภายใต้กระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจลแล้วจะมีการเคลื่อนที่ผ่านช่องพรุนของเจลด้วยความเร็วต่างกันแม้ว่าขนาดจะเท่ากัน โดยแบบ circular plasmid จะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด ตามด้วย supercoil form และ linear form ตามลำดับ ซึ่งการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pGEX-6P-3-HS-1 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ ปรากฏที่

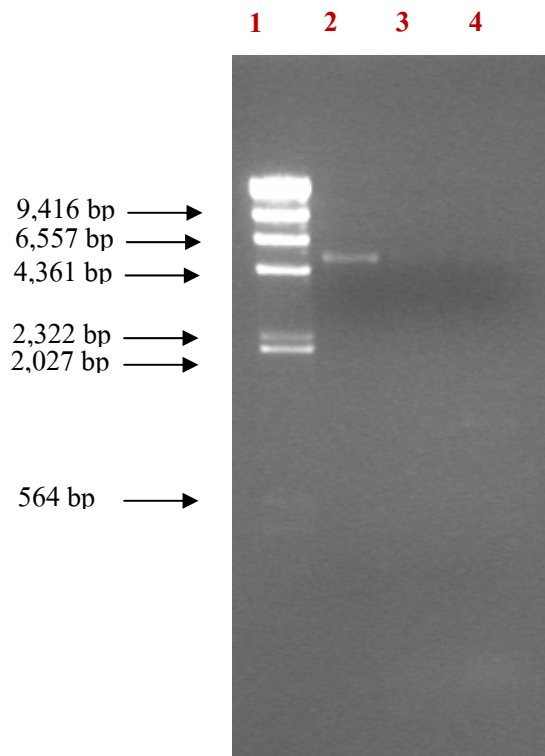
บริเวณขนาดประมาณ 9,000 bp, 6,300 bp และ 5,000 ตามลำดับเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานในเลนที่ 1 โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นชัดที่สุดคือขนาด 5,000 คู่เบส เป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับ pGEX-6P-3-HS-1 คือประมาณ 5,100 คู่เบส และเมื่อนำไปวัดปริมาณและคุณภาพของพลาสมิดแล้วพบว่ามีปริมาณ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} มีค่า 1.74 ในขณะเดียวกันพลาสมิด pET-32a ก็มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 แถบ ที่ตำแหน่งประมาณประมาณ 10,000 และ 6,000 คู่เบสตามลำดับ โดยแถบที่ปรากฏชัดที่สุดคือประมาณ 6,000 คู่เบส ใกล้เคียงกับข้อมูลของ พลาสมิด pET-32a ซึ่งเป็น พลาสมิดที่มีขนาด 5,900 คู่เบส

2. การตรวจสอบพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 ที่สกัดได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

การตรวจสอบพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ HSF4 กับ HSR6, HSF7 กับ HSR6 และ HSF33 กับ HSR6 นั้นพบว่า ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.2-4.3 ซึ่งใช้โปรแกรมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เหมาะสม ดังนี้

<u>ขั้นตอนที่ 1</u>	predenaturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	5 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 2</u>	denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	annealing	ที่อุณหภูมิ	40 องศาเซลเซียส	40 วินาที
	extension	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	2 นาที
	ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ			
<u>ขั้นตอนที่ 3</u>	final extension	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	7 นาที

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา นำผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR product) ที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 0.8% อะกาโรสเจล พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 ได้คือคู่ของ HSF7 กับ HSR6 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบสเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานในเลนที่ 1 เกิดขึ้น (ดังภาพที่ 4.3)



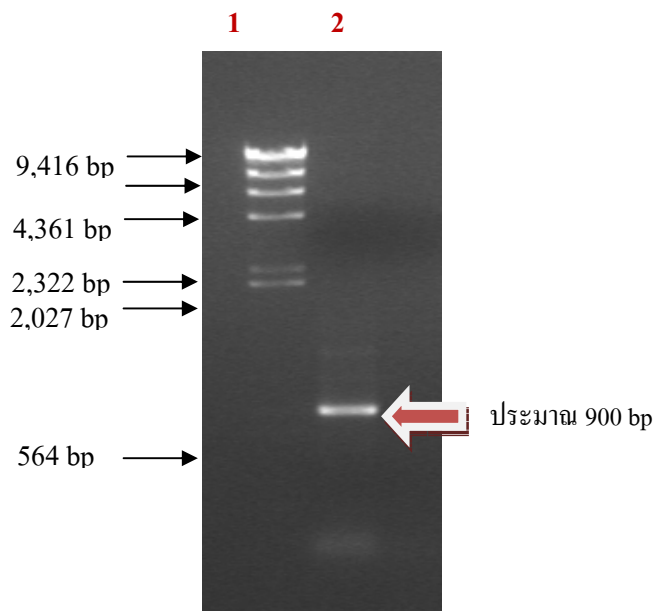
ภาพที่ 2.1 การตรวจสอบพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 โดยใช้ไพรเมอร์ HSF4 กับ HSR6 และ HSF33 กับ HSR6

สัญลักษณ์ของตัวอย่าง: หมายเลข 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lamda HindIII)

หมายเลข 2 คือ พลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1

หมายเลข 3 คือ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ HSF4 กับ HSR6

หมายเลข 4 คือ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ HSF33 กับ HSR6



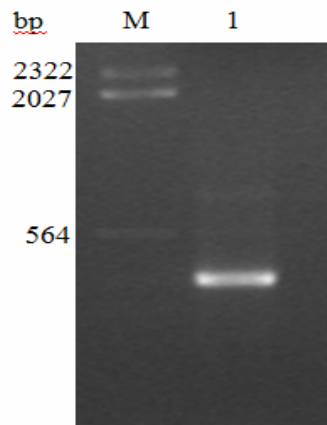
ภาพที่ 2.2 การตรวจสอบพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 โดยใช้ไพรเมอร์ HSF7 กับ HSR6

สัญลักษณ์ของตัวอย่าง: หมายเลข 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lamda HindIII)

หมายเลข 2 คือ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ HSF7 กับ HSR6

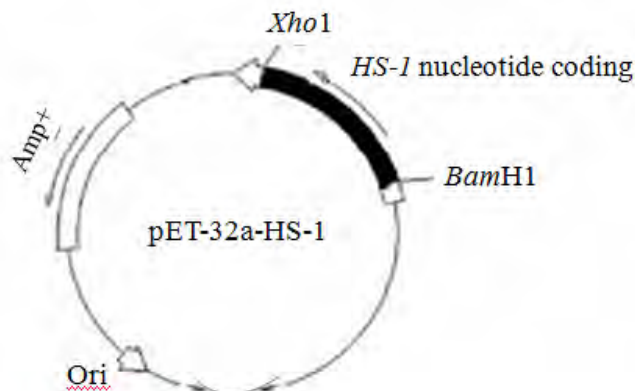
3. การเพิ่มปริมาณยีน HS-1 ด้วยปฏิกิริยา PCR

เมื่อทำการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pGEX-6P-3-HS-1 ว่ามียีน HS-1 แล้ว จึงทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนโคลนยีนต่อไป ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ที่มีการใส่ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะได้แก่ *Bam*H1 และ *Xho*1 ซึ่งเมื่อผ่านปฏิกิริยา PCR แล้วจะได้ยีน HS-1 ที่มีตำแหน่งตัดขนาด 252 คู่เบส (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 3 ยีน HS-1 ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์เฉพาะ

4. การคัดเลือกโคลนี *E.coli* สายพันธุ์ *Origami*[™] ที่มีพลาสมิด pET-32a-HS-1



ภาพที่ 4.1 แผนผังพลาสมิดลูกผสม pET-32a-HS-1

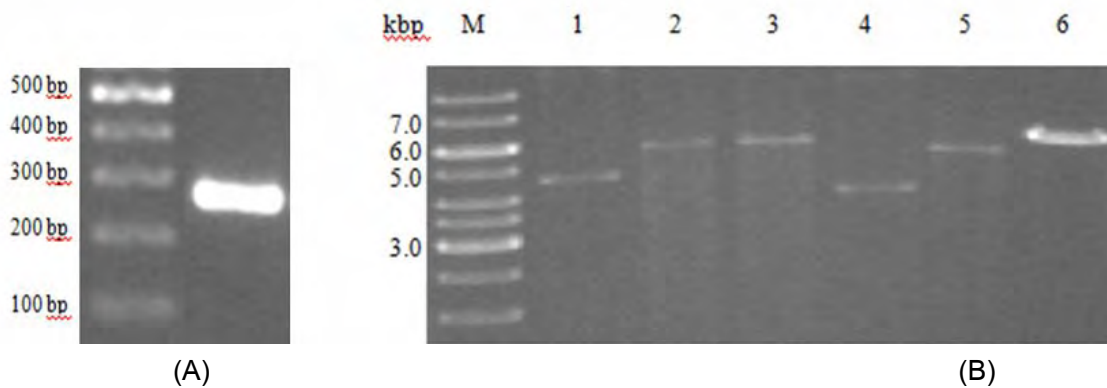
เมื่อทำการตัดพลาสมิด pET-32a และยีน HS-1 และด้วยเอนไซม์ *Bam*H1 และ *Xho*1 แล้ว เชื่อมต่อพลาสมิดแล้วจึงส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมที่ได้นั้นเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ *Origami*TM แล้ว นำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น 2XYT ที่มียาปฏิชีวนะคือแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 µg/ml เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มี pET-32a-HS-1 เนื่องจากในเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียนั้นไม่สามารถต้านแอมพิซิลินได้ แต่เซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด pET-32a-HS-1 จะมีส่วน coding ที่สามารถสร้างโปรตีนต้านทานต่อแอมพิซิลินดังแผนภาพที่ 4.5 และเมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงพบลักษณะของโคโลนี *E.coli* สายพันธุ์ *Origami*TM 2 โคโลนีมีขนาดประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร มีสีขาวขุ่น (ภาพที่ 4.6)



(A) (B) (C)
ภาพที่ 4.2 โคโลนี *E.coli* *Origami*TM หลังจากการรับพลาสมิดลูกผสม
 สัญลักษณ์ของตัวอย่าง: (A) ไม่มีพลาสมิด
 (B) พลาสมิด pET-32a-HS-1
 (C) พลาสมิด pET-32a

5. การตรวจสอบ pET-32a-HS-1 ด้วยวิธี PCR และเอนไซม์ตัดเฉพาะ

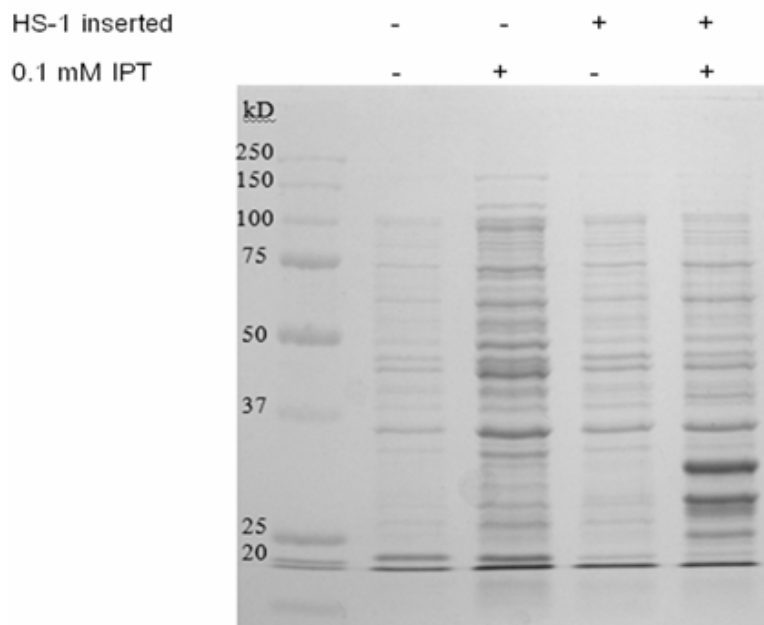
โคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นด้วยแอมพิซิลินแล้วจะถูกนำมาตรวจสอบต่อการสกัดพลาสมิดแล้วผ่านขั้นตอน PCR เพื่อตรวจสอบชิ้น HS-1 ว่ามีอยู่จริง (ภาพที่ 4.5 A) ซึ่งควรจะได้ PCR product ขนาด 252 คู่เบสซึ่งเป็นขนาดของยีน HS-1 ส่วนพลาสมิดจะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์เดี่ยวคือ *Bam*H1, *Xho*1 และ *Eco*R1 เพื่อให้ทราบขนาดที่แท้จริงในรูป linear พลาสมิดควรจะถูกตัดด้วย *Bam*H1, *Xho*1 ได้ ในขณะที่ *Eco*R1 ตัดไม่ได้ เนื่องจากในขั้นตอนของการโคลนได้กำจัดการตำแหน่งตัดของ *Eco*R1 ออกไปแล้ว ส่วนเลนที่ 5 และ 6 แสดงการตัดด้วยเอนไซม์คู่ได้แก่ *Bam*H1 และ *Xho*1 ซึ่งจะเห็นว่าในเลนส์ที่ 5 นั้นพลาสมิดลูกผสมที่ถูกตัด 252 คู่เบสออกไปจะแสดงขนาดต่ำกว่าพลาสมิดที่ไม่ถูกตัดเล็กน้อย (ภาพที่ 4.5 B)



ภาพที่ 5 (A) คือ PCR product โดยใช้ pET-32a-HS-1 เป็นเทมเพลต
 (B) คือ การตรวจสอบพลาสมิด pET-32a-HS-1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์
 สัญลักษณ์ของตัวอย่าง: เลนที่1 pET-32a-HS-1 uncut
 เลนที่2 pET-32a-HS-1 ตัดด้วย *Bam*H1
 เลนที่3 pET-32a-HS-1 ตัดด้วย *Xho*1
 เลนที่4 pET-32a-HS-1 ตัดด้วย *Eco*RH1
 เลนที่5 pET-32a-HS-1 ตัดด้วย *Bam*H1 และ *Xho*1
 เลนที่6 pET-32a-HS-1 ตัดด้วย *Xho*1

6. การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม TrxA-His-HS-1

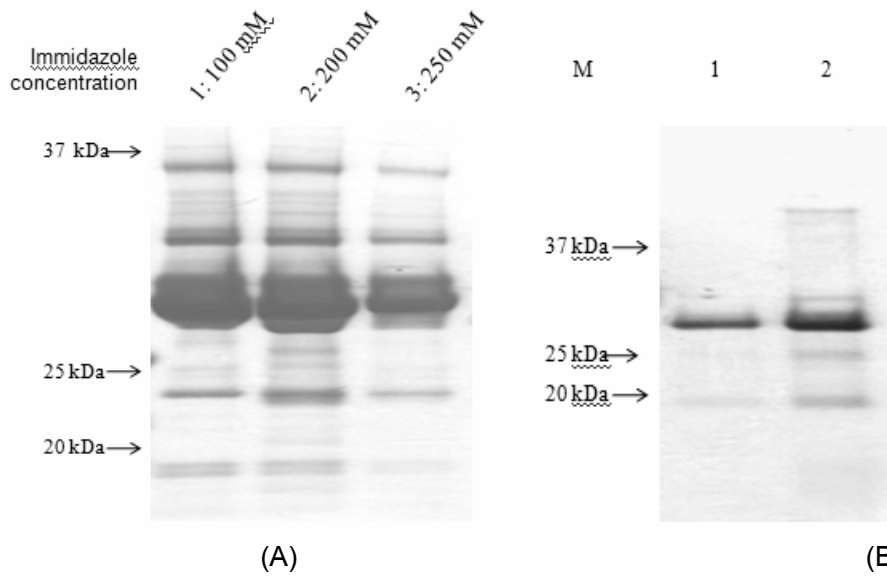
E.coli OrigamiTM ที่มี pET-32a-HS-1 ถูกนำมาเพิ่มจำนวนใน 2XYT medium จนกระทั่ง A600 ประมาณ 0.6-0.7 จากนั้นนำมา induce ให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมด้วย 0.1 mM IPTG แล้วนำมาตรวจสอบด้วย 13% SDS-PAGE (ภาพที่ 4.6) พบว่ามีแบนขนาดประมาณ 30 kDa เกิดขึ้นซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่ได้จากการคำนวณของ TrxA-His-HS-1 หรือ rHS-1



ภาพที่ 6 แสดงแถบแบนของโปรตีนที่ได้จาก bacterial culture
ทั้งที่ไม่มี (เลน1,2) และมีพลาสมิด pET-32a-HS-1 (เลน 3,4)

7. การแยกบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม TrxA-His-HS-1

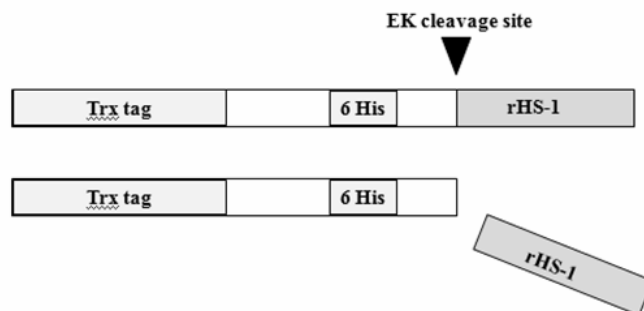
เนื่องจากโปรตีนลูกผสม TrxA-His-HS-1 มีส่วนของ 6 histidine ซึ่งสามารถจับกับ Ni^{2+} ได้ ด้วยพันธะโคออดิเนตโควาเลนต์ ดังนั้นจึงใช้ Ni-NTA affinity column เพื่อแยกบริสุทธิ์ หลังจากปล่อยโปรตีนผ่านคอลัมน์ไปแล้ว โปรตีนลูกผสม TrxA-His-HS-1 จะจับกับคอลัมน์ ส่วนโปรตีนอื่นๆ จะถูกล้างออกมาด้วย washing buffer จากนั้นจึงชะ TrxA-His-HS-1 ออกมาด้วย elution buffer โปรตีนจะถูกชะออกมาได้ด้วย ความเข้มข้นของ imidazole มากขึ้น ซึ่ง imidazole มีหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างคล้ายกับฮิสทีดีน จึงแย่งจับกับ Ni^{2+} บนคอลัมน์ได้ ในงานวิจัยนี้ได้ชะ TrxA-His-HS-1 ออกมาโดยใช้ความเข้มข้น 100, 200 และ 250 mM ตามลำดับดังภาพที่ 4.6A จากนั้นนำไปทำ dialysis เพื่อกำจัด imidazole (ภาพที่ 4.6B) แล้วพบว่าความเข้มข้นโปรตีนน้อย จึงนำมาผ่าน PD-10 column แล้วชะออกมาด้วยสารละลายในปริมาณที่น้อยๆ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TrxA-His-HS-1



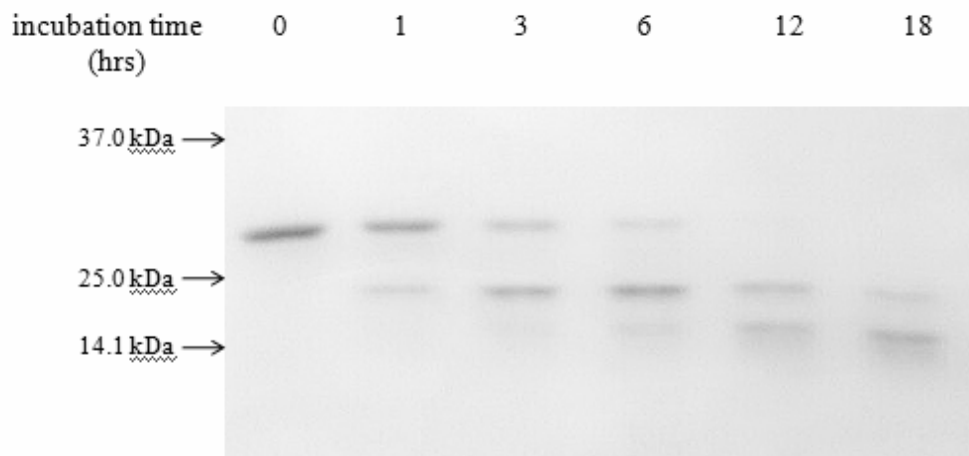
ภาพที่ 7 (A) โปรตีน TrxA-His-HS-1 ที่ถูกชะออกมาจาก Ni-NTA affinity column ด้วยความเข้มข้นของ imidazole ต่างๆ
(B) แสดงแถบแบนโปรตีน TrxA-His-HS-1 เมื่อผ่านการ dialysis (เลน1) และ PD-10 column (เลน2)

8. การตัด TrxA-His-HS-1 ด้วย Enterokinase (EK)

หลังจากแยกบริสุทธิ์ TrxA-His-HS-1 แล้ว ได้ทำการตัด tag อื่นๆ ออกโดยใช้ Enterokinase ซึ่งมีตำแหน่งตัดหน้าโปรตีนลูกผสม (ภาพที่ 4.7.1) ซึ่งจะทำให้ TrxA-His-HS-1 ถูกแยกเป็น 2 ส่วนคือส่วน tag ที่มีขนาดประมาณ 20 kDa และส่วน rHS-1 ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าประมาณ 10 kDa ดังภาพที่ 4.7.2 ซึ่งแสดงระยะเวลาหลังจากตัดด้วย Enterokinase ที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่ามีการตัดอย่างสมบูรณ์ที่เวลา 12 ชั่วโมง



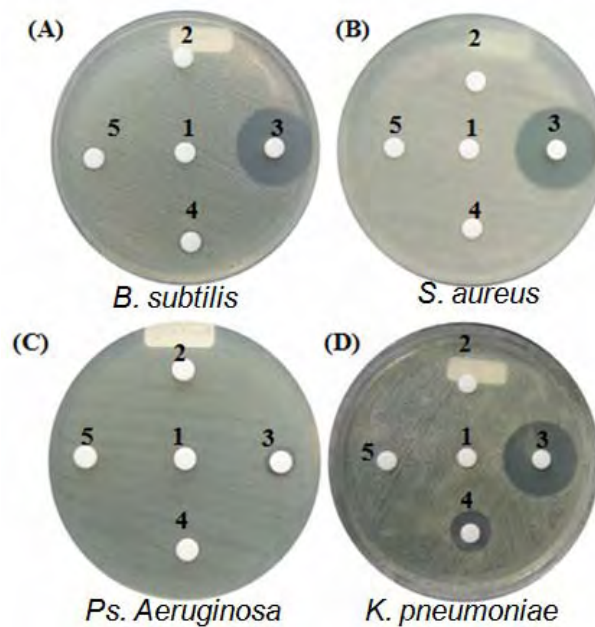
ภาพที่ 8.1 แสดงตำแหน่งตัดของ Enterokinase บนโปรตีนลูกผสม TrxA-His-HS-1



ภาพที่ 8.2 แสดงแถบแบนของ rHS-1 หลังตัดด้วย Enterokinase

9. การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ rHS-1

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของ rHS-1 ด้วยแบคทีเรีย 4 ชนิดได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่ *Krebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas Aeruginosa* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบโดยใช้วิธี disc diffusion assay และ microplate assay



ภาพที่ 9.1 แสดงลักษณะ clear zone ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

สัญลักษณ์ของตัวอย่าง:	1	น้ำกลั่น
	2	Tris-cl pH 7.4
	3	Gentamicin
	4	Dermaseptin
	5	rHS-1

Disc diffusion assay เป็นวิธีทดสอบการต้านจุลชีพบนอาหารแข็ง ซึ่งจากผลการทดลองในภาพที่ 4.2.1 พบว่า rHS-1 สามารถต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้เพียงชนิดเดียว โดย clear zone มีขนาด 7.25 ± 0.10 มม. (ตารางที่ 1) ในขณะที่ dermaseptin ต้านการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ *K. pneumoniae* ได้ แต่น้อยกว่า gentamicin ที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ 3 ชนิดได้ดี แต่ต้านการเจริญของ *Ps. Aeruginosa* ได้น้อย

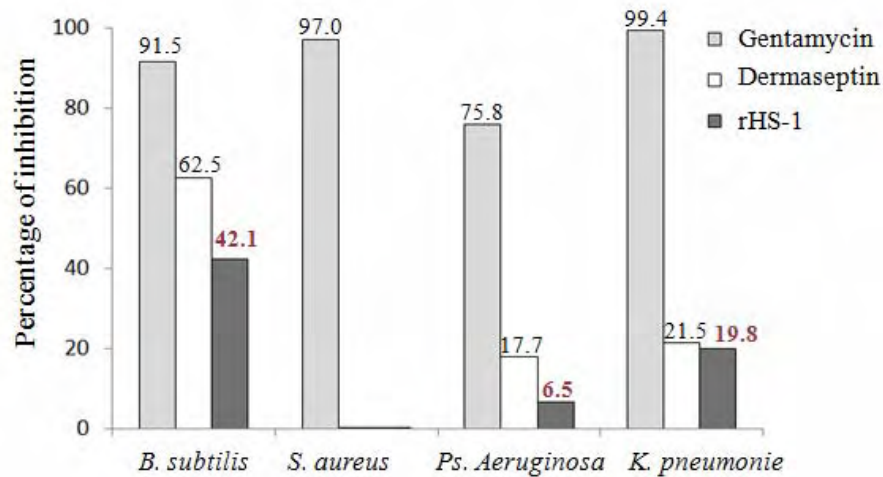
ตารางที่ 1 แสดงขนาดของ clear zone ที่ยับยั้งการเติบโตของจุลชีพ

Treatment	concentration	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureu</i>	<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Gentamicin	0.20 mg/ml	27.75 ± 0.75	24.75 ± 0.25	8.35 ± 0.1	23.0 ± 0
Dermaseptin	0.75 mg/ml	8.50 ± 0.25	-	-	10.50 ± 0.15
rHS-1	0.75 mg/ml	7.25 ± 0.10	-	-	-

- is No inhibition, measurement area of inhibition in mm.

สำหรับ microplate assay เป็นการทดสอบผลการยับยั้งจุลชีพในอาหารเหลว ซึ่งมีข้อดีกว่าคือ เซลล์แบคทีเรียสัมผัสสารทดสอบได้โดยตรงและตรวจสอบผลโดยการวัดด้วยค่า absorbance ที่ 655 นาโนเมตร วิธีนี้จึงมีความไวมากกว่า ผลการวิจัยนี้แสดงดังภาพที่ 4.8.2 พบว่า rHS-1 และ dermaseptin สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้ 3 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis*, *Ps. Aeruginosa* และ *K. pneumoniae* โดย rHS-1 ยับยั้งได้น้อยกว่าคือ 42.1%, 6.5% และ 19.8% ตามลำดับ ในขณะที่ gentamicin ยับยั้งการเจริญของทุกเชื้อได้ดีมาก

ผลการวิจัยทั้ง 2 ส่วนคือ disc diffusion assay และ microplate assay มีความสัมพันธ์กัน ด้วยเห็นผลการยับยั้ง *B. subtilis* ได้ชัดเจนทั้งคู่ ส่วน *Ps. Aeruginosa* และ *K. pneumoniae* ยับยั้งได้น้อยมาก ซึ่งความเข้มข้นที่ 0.75 mg/ml ของ rHS-1 อาจไม่มากพอสำหรับการเกิด clear zone ใน disc diffusion assay



ภาพที่ 9.2 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

10. ผลการทดสอบสมบัติทางชีวภาพของ synthetic peptides (อนุพันธ์ของ HS-1, CD และ DD) ต่อ cell pathogen และ mammalian cell MIC assay

ผลการทดลอง Broth microdilution test เพื่อดำหนดค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อก่อโรค (%Inhibition)

Microbes	% Inhibition								
	0.1mg/ml gentamicin	Cecropin-like domain (μM)				Defensin-like domain (μM)			
		20	40	80	160	20	40	80	160
<i>S.aureus</i>	92.4	N.A	N.A	N.A	30.53±7.21	N.A	N.A	11.93±1.50	15.71±5.75
<i>K.pneumoniae</i>	86.47	N.A	N.A	N.A	20.8±1.56	N.A	N.A	N.A	15.22±4.75
<i>B.subtilis</i>	59.62	55.9±3.35	37.84±11.98	38.54±8.53	N.A	33.35±13.13	49.16±7.09	22.89±17.42	40.4±11.47
<i>Ps.aeruginosa</i>	45.08	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธี Broth microdilution assay กับเชื้อ *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *B.subtilis* 6633 and *Ps.aeruginosa*

จากตารางแสดงผลการทดลอง โดยวิธี Broth microdilution assay กับเชื้อ *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *B.subtilis* 6633 and *Ps.aeruginosa* และใช้ 0.1 กรัม Gentamycin เป็น positive control พบว่าเปปไทด์ cecropin like domain สามารถยับยั้งเชื้อ *B.subtilis* 6633 ได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 20-80 μM และเปปไทด์ defensin like domain สามารถยับยั้งเชื้อ *B.subtilis* 6633 ได้ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 20-160 μM อีกทั้ง cecropin like domain ที่ความเข้มข้น 160 μM และ defensin like domain ที่ความเข้มข้น

80 และ 60 μM สามารถยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ได้ สำหรับเชื้อ *K.pneumoniae* ถูกยับยั้งได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของ cecropin และ defensin like domain เป็น 160 μM

Hemolytic assay

ผลการทดลอง

ได้ทำการทดลองด้วยวิธี hemolytic assay เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์สังเคราะห์เปรียบเทียบกับตัว positive control และเปปไทด์มาตรฐาน โดยคำนวณ ปอร์เซ็นต์การแตกของเม็ดเลือดแดงจากสมการ

$$\% \text{Haemolysis} = 100 \times \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{triton}} - A_{\text{blank}}}$$

Thavie et al. (2000)

และผลการทดลองคำนวณแสดงดังตาราง

ผู้วิจัยทำการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของเปปไทด์ที่แตกต่างกันต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง ซึ่งทำการทดสอบกับเปปไทด์ที่ความเข้มข้นที่คาดว่าจะมีผลเม็ดเลือดแดงน้อยที่สุดที่ 25 μM เปรียบเทียบกับ 50 μM แสดงผลและคำนวณผลแสดงดังตาราง

Condition	Ab ₅₅₀						%Haemo lysis	%Haem olysis
	Ab 550		X 25 μM	Ab 550		X 50 μM	25 μM	50 μM
Cecropin	-0.415	-0.004	-0.209	0.048	0.051	0.049	-2.520	0.649
Defensin	-0.022	-0.005	-0.014	0.028	0.030	0.029	-0.169	0.384
Dermaseptin	0.271	0.261	0.266	0.932	1.138	1.035	3.216	13.712
BSA	-0.41	0.010	-0.065	0.032	0.057	0.045	-7.857	0.596
Triton X-100	7.984	8.560	8.272	7.840	1.887	7.548	100	100

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่า %hemolysis โดยกำหนดความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ 25 และ 50 μM defensin, cecropin, magainin, BSA และ 1% triton X-100

จากตารางการทดลองด้วยวิธี hemolysis assay โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm เมื่อทำการคำนวณค่าจากสมการพบว่าค่า %hemolysis ของเปปไทด์ HS-1 analogs (defensin&cecropin) ใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์เป็น 25 μM ค่าการดูดกลืนแสงยังเป็นค่าติดลบ สำหรับ %hemolysis ที่ความ

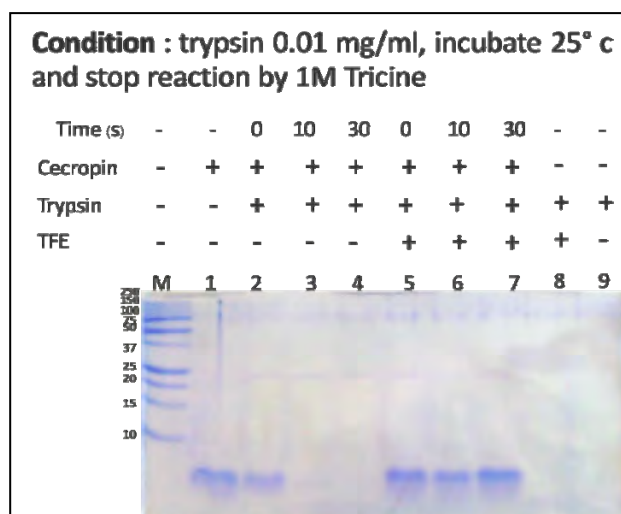
เข้มข้นของเปปไทด์เป็น 50 μ M พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง และไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เมื่อเปรียบเทียบกับ positive controls triton X-100

11. Limited proteolysis

ผู้วิจัยต้องการทดสอบความสามารถในการม้วนพับของเปปไทด์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เอื้ออำนวยต่อการม้วนพับของโครงรูป (induced-folding) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของ antimicrobial peptide เมื่อไปจับอยู่บนผนังเซลล์หรือเยื่อเซลล์ โดยผู้วิจัยนำเปปไทด์ไปบ่มกับ TFE ซึ่งเป็นสารเคมีที่ช่วยในการสร้างโครงสร้างระดับทุติยภูมิ เป็นการจำลองสภาวะที่คล้ายกับเยื่อเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด และจากนั้นนำเปปไทด์ที่คาดว่าจะมีการม้วนพับไปทดสอบความแข็งแรงของโครงสร้างโดยใช้เอ็นไซม์ทริปซินมาตัด หากโครงสร้างมีความเสถียร ทริปซินจะตัดได้ยาก แต่หากโครงสร้างไม่มีความเสถียรจะถูกทริปซินทำลายได้ง่าย ซึ่งสามารถการเข้าตัดของทริปซินในช่วงระยะเวลาต่างๆ ด้วย SDS-PAGE และเรียกเทคนิคดังกล่าวนี้ว่า Limited proteolysis การทดสอบ Limited Proteolysis วิเคราะห์ผลด้วย 16.5% Tris-Tricine SDS PAGE แสดงผลที่ทำการทดลองดังต่อไปนี้



ภาพที่ 11.1 Limited proteolysis ของ Defensin like domain



ภาพที่ 11.2 Limited proteolysis ของ Cecropin like domain

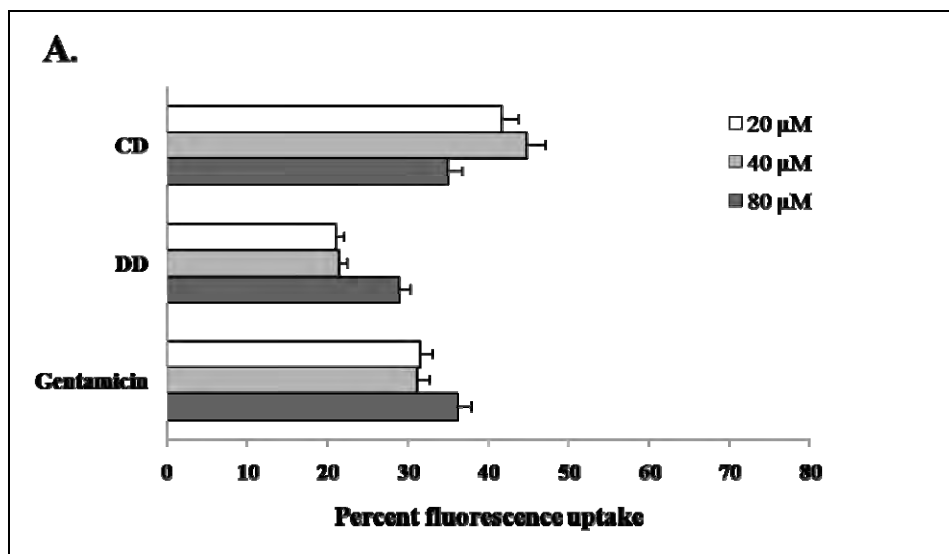
จากภาพแสดงผลของโครงสร้าง defensin และ cecropin like domain เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็น TFE และมี 0.01 mg/ml trypsin ในปฏิกิริยา พบว่าในเลนที่ 2, 3, 4 defensin และ cecropin ไม่ได้อยู่ในสภาวะที่เป็น TFE เมื่อเวลาผ่านไปจะถูก degrade โดย trypsin ได้ แต่ในเลนที่ 5, 6, 7 ที่ defensin และ cecropin อยู่ในสภาวะที่มี TFE นั้น trypsin จะไม่สามารถเข้าทำลายโครงสร้างของ defensin และ cecropin ได้

จากการทดสอบด้วยเทคนิค limited proteolysis สามารถสรุปได้ว่า cecropin like domain มีโครงสร้างที่เสถียรมากกว่า defensin like domain เมื่ออยู่ในสภาวะที่มี TFE เนื่องจากจะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป Trypsin ไม่สามารถเข้าไปรบกวนโครงสร้างของเปปไทด์ดังกล่าวได้ จึงสามารถเห็นแบนของเปปไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับ control (เลนที่ 1) กล่าวได้ว่า TFE มีผลต่อการม้วนพับของโครงรูป (induced-folding) ของเปปไทด์

12. NPN uptake assay

จากนั้นผู้วิจัยทำการทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์สังเคราะห์โดยใช้เทคนิค NPN uptake assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไป และไม่ยุ่งยากมากนัก จึงได้เพิ่มเข้ามาในการทดลอง ใช้ในการทดสอบการเกิด permeability ของผนังเซลล์แบคทีเรีย อาศัยคุณสมบัติของสารเรืองแสง NPN ซึ่ง NPN จัดเป็นสารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้หากอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็น Hydrophobic หมายความว่า หากเยื่อเซลล์ หรือผนังเซลล์ของของแบคทีเรียนั้นถูกทำลายหรือเกิดการถูกรบกวนโดยเปปไทด์ สารเรืองแสง NPN จะสามารถเข้าไปแทรกในบริเวณ outer membrane ของเยื่อเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น Hydrophobic สาร NPN จะให้ค่าการ

เรืองแสงได้นั้นเอง ผลการทดลองโดยใช้ antibiotic Gentamycin เป็นตัวควบคุม โดยในการทดลองเพื่อวัดค่า intensity ของสารเรืองแสงนั้น ได้ใช้ antibiotic ทดสอบกับเชื้อ *B.subtilis* แสดงดังกราฟ



ภาพที่ 12 กราฟแสดงผลการทดสอบ NPN uptake ของเปปไทด์ cecropin (CD) และ defensin -like domain (DD) กับเชื้อ *B.subtilis* ATCC 6633

กราฟแสดงผลการทดสอบ NPN uptake ของเปปไทด์ cecropin (CD) และ defensin -like domain (DD) กับเชื้อ *B.subtilis* ATCC 6633 ซึ่งใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์เป็น 20, 40 และ 80 μM โดยเปรียบเทียบกับ antibiotic positive control Gentamycin พบว่า ที่ความเข้มข้นเท่ากันค่าเปอร์เซ็นต์ NPN uptake เมื่อทดสอบกับ CD มีค่ามากที่สุด เนื่องจาก CD สามารถทำให้เกิด permeabilization ต่อเยื่อเซลล์ จากนั้น NPN ที่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ในสิ่งแวดล้อมที่เป็น hydrophobic ได้เข้าไปยังบริเวณ outer membrane ของเชื้อ *B.subtilis* และเกิดการเรืองแสงได้ จากการพบพบว่า CD มีความสามารถในการเกิด permeabilization ของเยื่อเซลล์ *B.subtilis* ได้มากกว่า DD

13. Calcein leakage assay

นอกเหนือจากการทดสอบกับ Living cell เชื้อ *B.subtilis* ATCC 6633 แล้ว ผู้วิจัยได้ทดสอบการเกิดการรั่วของสารเรืองแสงจากผลของเปปไทด์ cecropin (CD) และ defensin -like domain (DD) โดยทำการสร้าง liposome ที่มีลักษณะและองค์ประกอบของเยื่อเซลล์คล้ายกับเยื่อเซลล์แบคทีเรียทั่วไป จากการศึกษาข้อมูลเพื่อทำการจำลองเยื่อเซลล์แบคทีเรียผู้วิจัยได้อาศัยคุณสมบัติของไขมัน หรือ phospholipid ในการจับและรวมตัวกัน ให้มีลักษณะเป็นก้อนกลม ขนาด 0.2 μm ~1 μm (LUV: Large Unilamellar Vesicle) และ

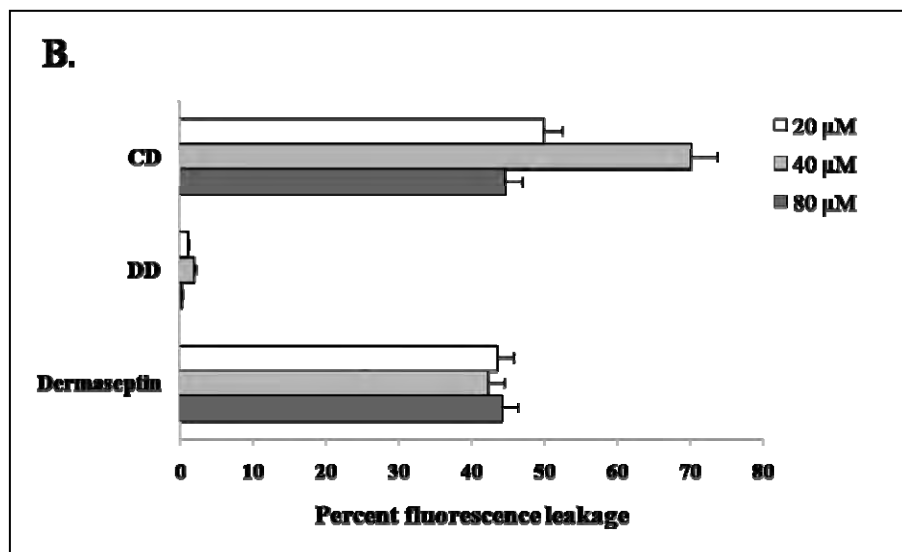
trap สารเรืองแสง (calcein) ไว้ภายใน โดยกระบวนการของการเตรียมถูกประยุกต์มาจาก Christoph Gelhaus และคณะ ปี 2008 ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้ เพื่อเป็นการเปรียบเทียบที่เห็นได้ชัดเจน ผู้วิจัยได้ทำการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ calcein leakage โดยเปรียบเทียบผลของ CLD, DLD และ Dermaeptin โดยใช้ TritonX100 เป็น 100% positive control จากสูตร

$$\% \text{ calcein leakage} = 100 \times \frac{F - F_0}{F_t - F_0}$$

F = Average Intensity of peptides treat with liposome

F_0 = Average Intensity of liposome before treated by peptides

F_t = Average Intensity of liposome treat with TTX



ภาพที่ 13 กราฟแสดงผลการทดสอบ calcein leakage ของเปปไทด์ cecropin (CD) และ defensin-like domain (DD) กับ liposome

จากกราฟพบว่า CD มีผลต่อการเกิด Permeabilization ได้มากกว่า DD เป็นไปตามที่สมมุติฐานที่ตั้งไว้ทางด้านโครงสร้างของทั้ง CD และ DD สัมพันธ์กับหน้าที่และการทำงานของเปปไทด์ทั้งสองกล่าวคือ จากผลงานวิจัยของ ดร. รินา ภัทรมานนท์และคณะ ปี 2010 พบว่า CD มีโครงสร้างที่เป็น α -helix ที่เหมาะสมต่อการม้วนพับของโครงสร้างเพื่อการเข้าทำลายเยื่อเซลล์ของเชื้อจุลชีพ ตรงข้ามกับ DD ที่มีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็น β -sheet และมีความเป็น α -helix น้อยกว่า CD มาก จึงส่งผลให้ทำลายเชื้อจุลชีพได้น้อยกว่า ทั้งใน living cell bacteria และในแบบจำลองเยื่อเซลล์ของเชื้อจุลชีพ

14. Tryptophan Fluorescence Blue Shift

Domain	HEPES buffer (nm)	Concentration of peptides in DOPG:DOPC		
		5 mM	10 mM	20 mM
CD	350	333 (17)	334 (16)	330 (20)
DD	350	338 (12)	344 (6)	352 (2)

ตารางที่ 4 ค่า Emission สูงสุดของกรดอะมิโนทริปโตเฟนที่ความเข้มข้นเปปไทด์ 5 μ M ในสภาวะที่มี DOPG: DOPC (2:3 w/w) LUVs

การวิเคราะห์ด้วยการทดสอบการเกิด Blue Shift ของกรดอะมิโนทริปโตเฟน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ CD และ DD โดยกำหนดสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการแทรกผ่านเยื่อเซลล์จำลอง ซึ่งถ้าหากเปปไทด์ CD และ DD สามารถแทรกผ่านเยื่อเซลล์จำลองได้นั้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงค่า Emission สูงสุด หรือที่เรียกว่า เกิด blue shift จากการทดลองและจากผลการทดลอง พบว่า ในกรณีที่เปปไทด์อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็น buffer ค่า Emission สูงสุดที่วัดได้ อยู่ที่ประมาณ 350 nm ทั้งเปปไทด์ CD และ DD และในกรณีที่เปปไทด์อยู่ในสภาวะที่เป็นลิโปโซมจำลองเยื่อเซลล์แบคทีเรีย ค่า Emission สูงสุดที่วัดได้ จะเกิดการ shift ไปประมาณ 16-20 nm ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ทั้งเปปไทด์ CD และ DD สามารถแทรกผ่านจากสิ่งแวดล้อมที่เป็น hydrophilic (buffer) เข้าไปยังบริเวณผิวของเยื่อเซลล์จำลองที่เป็น hydrophobic (liposome) ได้ และจากผลการทดลองพบว่า ค่าของการเกิดการ shift ของ CD มากกว่า DD นั้นแสดงให้เห็นว่า CD มีความสามารถที่จะแทรกซึมผ่านเข้าไปยังเยื่อเซลล์ได้มากกว่า DD

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การโคลนยีนของโปรตีนที่สนใจเพื่อให้เกิดการแสดงออกในแบคทีเรียเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้มากเพื่อแก้ปัญหาด้านปริมาณของตัวอย่าง โดยมีกระบวนการทั่วไปคือการตัดและเชื่อมยีนที่สนใจใส่พาหะ จากนั้นทำการส่งถ่ายพาหะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วนำมาเพิ่มจำนวนเพื่อให้เกิดการแสดงออกในปริมาณมาก ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนของ HS-1 จากพลาสมิดเดิมคือ pGEX-6P-3-HS-1 ไปยังพลาสมิด pET-32a ซึ่งมีความพิเศษเนื่องจากมีส่วนของ Thioredoxin (TrxA) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ออกซิโดรีดักเตส ช่วยในการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งน่าจะมีส่วนให้การมันพับของเปปไทด์ HS-1 หลังจากการแปลรหัสมีโอกาสเกิดขึ้นได้อย่างถูกต้องขึ้น โดยการสกัดพลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 จากแบคทีเรียแล้ว

นำมาวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพด้วยค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง spectrophotometer แล้วตรวจสอบว่าในพลาสมิดที่สกัดได้นั้นมียีนของ HS-1 อยู่จริงด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะคือ HSF7 และ HSR6 ก่อนทำการโคลนยีน

สำหรับกระบวนการโคลนนี้นักวิจัยนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณยีนของ HS-1 ด้วยการใช้พลาสมิด pGEX-6P-3-HS-1 เป็นเทมเพลตในปฏิกิริยา PCR แล้วตัดต่อยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Bam*H1 และ *Xho*1 และการที่ปลายทั้งสองข้างมีลำดับดีเอ็นเอที่ต่างกันนี้จะทำให้สามารถกำหนดทิศทางในการเชื่อมต่อได้ด้วย ซึ่งจะได้ปลายของชิ้นดีเอ็นเอแบบปลายเยื้อง (sticky end) แต่การใช้เอนไซม์ *Bam*H1 นั้นจะทำให้เมื่อเกิดการแสดงออกของโปรตีนแล้วจะมีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นมาหน้าโปรตีน rHS-1 อีก 7 กรดอะมิโน ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยนี้ยังพบว่า rHS-1 มีการออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับ native HS-1 โดยออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดเดียวกันได้ นั่นคือ *B. subtilis*, *Ps. Aeruginosa* และ *K. pneumonie* แต่มีความสามารถต่ำกว่าเล็กน้อย

ในส่วนของการศึกษากลไกของอนุพันธ์ของ HS-1 ทั้งส่วนของ cecropin like domain (CD) และ defensin like domain (DD) พบว่า ส่วนของ CD มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่า DD ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองกลไกการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพได้จากการทดสอบ NPN uptake ตัวแทนของการทดสอบ living cell และ Calcein leakage ตัวแทนของการทดสอบกับเยื่อเซลล์จำลองของเชื้อจุลชีพ จากเหตุผลทางด้านโครงสร้าง ที่ใช้เป็นตัวกำหนดการทำงานของเปปไทด์ DD ที่มีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็น β -sheet และมีความเป็น α -helix น้อยกว่า CD มาก จึงส่งผลให้ทำลายเชื้อจุลชีพได้น้อยกว่า ทั้งใน living cell bacteria และในแบบจำลองเยื่อเซลล์ของเชื้อจุลชีพ

เอกสารอ้างอิง

- ทิมมพร นารี. 2551. การเพิ่มปริมาณ การทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ Heteroscorpine-1. โครงการวิจัย ระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นันทวัน เอื้อวงศ์กุล และศักดา ดาดวง. 2547. แมงป่องช้าง สัตว์พิษผู้ลึกลับ. นิตยสารสารคดี จ.227.
- นันทวัน เอื้อวงศ์กุล และศักดา ดาดวง. 2552. พิษแมงป่อง: นากลิ้วหรือน่าใช้. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 37(2): 157-162.
- นิรันดร์ สัตยาชัย. 2551. หลักการของพันธุวิศวกรรมในโปรแคริโอต. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

- สินีนานู ศรี. ม.ป.ป. ปฏิบัติการเมแทบอลิซึม เรื่องเทคนิคทางอณูชีววิทยา. เอกสารประกอบการสอน
รายวิชา 318404 ปฏิบัติการเมแทบอลิซึม เรื่องเทคนิคทางอณูชีววิทยา. ภาควิชา
ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพมหานคร.
- Banerjee, S., *et al.* 2005. Expression of functional scorpion neurotoxin lqq-V in *E. coli*.
Peptides 27:49-54.
- Carneiro, A.M.D. 2003. Expression of a functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin
active on K⁺ channels. **Toxicon** 41: 305-313.
- Diniz, M.R.V., *et al.* 2006. Functional expression and purification of recombinant Tx1, a sodium
channel blocker neurotoxin from the venom of the Brazilian “armed” spider,
Phoneutria nigriventer. **Protein expression and purification**, 50:18-24.
- Uawonggul, Nunthawan. 2006. *Heterometrus laoticus* scorpine venom antidote screening and
study of the target protein, Heteroscorpine-1 (HS-1). **Thesis for the degree of
doctor of philosophy**. Khonkaen university.
- Uawonggul Nunthawan, *et al.* 2007. Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-
1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. **Toxicon**, 49(1):19-29.
- Whitford, D. 2005. **Protein structure and function**, John Wiley&Son Ltd., England
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory
Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Yuan, S.L., *et al.* 2004. The role of thioredoxin and disulfide isomerase in the expression of the
snake venom thrombin-like enzyme calobin in *Escherichia coli* BL21(DE3). **Protein
Expression and Purification** 38: 51-60.

Running head: **FUNCTIONAL EXPRESSION AND PURIFICATION OF A NOVEL
ANTIMICROBIAL PEPTIDE, RECOMBINANT HETEROSCORPINE-1**

Supannika Klangphukhiew, Bhorntip Plangkhuntod, Paroonkorn Incomnoi, Sakda Daduang, Rina

Patramanon*

Protein and Proteomics Research Group

Department of Biochemistry, Faculty of Science

Khon Kaen University

l

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*.

This study demonstrates successful recombinant system in expressing recombinant antimicrobial peptide.

Keywords: scorpine, Thai giant scorpion toxin, antimicrobial peptide, thioredoxin fusion

Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are important strategy protecting organism from pathogen such as bacteria, fungi, virus and parasites. Most of these diseases are treated by antibiotics. In case of using for long time, some pathogens can develop resistance to antibiotics which cause more trouble to treatment. Antimicrobial peptide is an alternative way as new effective resource which can be developed for antibiotic replacement, or useful for agriculture and industry. In nature, toxin is a rich resource of bioactive compounds that have many functions such as antimicrobial activity and ion channel blocker. Scorpine is a scorpion peptide group, composed of two parts, cecropin-like N-terminus and defensin-like C-terminus (Hadjicha-ralam-bous, Sheynis et al. 2008; Kouno, Mizuguchi et al. 2009). They contain many functions of toxins that act ion channel by specific interaction on Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} . For microbe, scorpine can inhibit many species of bacterial growth and spores of *Plasmodium spp.* (Possani, Corona et al. 2002), which is a pathogen of malarial disease.

The venom of Thai giant scorpion (*Heterometrus laoticus*), mostly found in the northeastern area of Thailand, contains many bioactive molecules. One of these molecules is small polypeptide with neurotoxic activity, Heteroscorpine-1 (HS-1). It was purified from scorpion crude venom by two steps of ion exchange chromatography. HS-1 has molecular weight of 8293 Da and pI of 8.79. HS-1 has 95 amino acids including 6 cysteine residues. The sequence also composes of signal region and mature region with cecropin-defensin hybrid. HS-1 has multi-function, for examples it is a neurotoxin as a potassium channel blocker, and inhibited three bacterial species (Uawonggul *et al*, 2007). It is not clearly understood about the structure-function relationship of HS-1. For understanding of mechanism in both activities, structure of HS-1 should be analyzed.

The main problem in using scorpion neurotoxic polypeptide as research tool has been the difficulty in obtaining enough toxins. As a result, the study about structure and function, which need a large amount of peptide, would be difficult and laborious. This problem has been solved by a molecular cloning in bacterial system. Molecular cloning is a process of insertion a novel gene coding in the vector, when the bacterial cells divide, the vector containing inserted gene are amplified simultaneously. The gene will be induced to express the adequate production of recombinant proteins.

However, most recombinant toxins have been produced as inclusion bodies in prokaryotic cells. This problem indicates importance of using correct folding conditions, especially for correct

disulfide bond formation, for enough of bioactive rHS-1. In this study, attempt has been made to seek for compatible cloning and expression system for HS-1 by using pET-32a plasmid. This vector provides Histidine tag and thioredoxin nucleotide sequence fused with the gene of interest.

For example HS-1 gene. The purpose of having His-tag is for single-step purification by metal-ion affinity chromatography. In addition, for having Thioredoxins (TrxA), which contains thiol groups, it will help arranging disulfide bonds of rHS-1. The heterogous expressed fusion HS-1 will be assisted to fold correctly that reducing other proteins by cysteine thiol disulfide exchange. By coproduction of TrxA and low temperature expression, the amount of active rHS-1 increased.

Methods

Primer design and polymerase chain reaction (PCR)

In previous study, HS-1 gene was cloned into pGEX-6P-3 to construct pGEX-6P-3-HS-1. The recombinant plasmid was isolated by illustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit (Qiagen) and sequenced for DNA arrangement confirmation and design primers. Forward primer containing *Bam*H1 complementary site forward GGA, the initiator codon of first mature HS-1 amino acid (5'-GGA TCC GGA TGG ATT AAT GAA GAG AAG ATA -3'; *Bam*H1 restriction site underlined) and reverse primer provides *Xho*1 site downstream region 3' to the terminator TAA of the toxin (5'-CTC GAG GTC CCC CTT TGG CTG CAA-3'; *Xho*1 site underlined). PCR reactions are 94°C, 5 min as initial denaturation, next step 35 cycles with denaturation 94°C 30 sec, annealing 55 °C 30 min and elongation 72 °C 1 min. Final elongation as 72 °C 10 min.

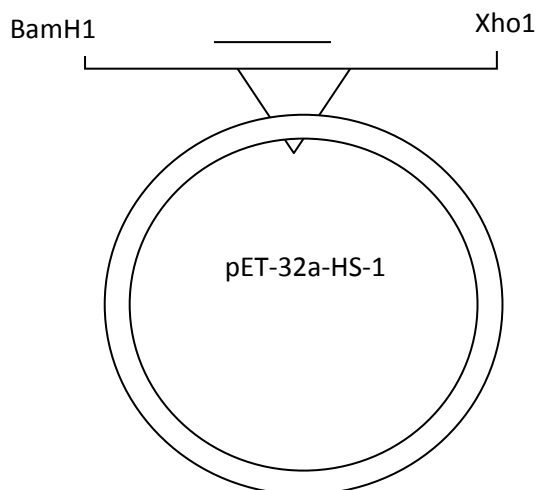


Fig. 1 Map of the recombinant expression plasmid pET-32a-HS-1

Construction of the fusion expression plasmid pET-32a-HS-1

Plasmid pET-32a (Novagen) was used to reconstructed from pGEX-6P-3-HS-1. The 228 bp of *HS-1* gene coding was prepared by PCR with both primers. The *HS-1* gene and plasmid pET-32a was digested by *Bam*H1 and *Xho*1 (Fermentas) 37°C overnight to provided compatible ligation sites, following these were gel-purified and concentration before ligation by T4 DNA ligase (fermentas) to generate recombinant plasmid pET-32a-HS-1(fig. 2). The expression host, *E. coli* OrigamiTM competent cells were transfected with the ligated products during 1 min at 42 °C following on ice 5 min and 37°C in SOC medium 1 hrs. Positive clones were selected on 0.1 mg/ml ampicillin containing agar plates and verified by PCR and restriction enzyme analysis.

Expression of rHS-1

E. coli OrigamiTM harboring plasmid pET-32a-HS-1 was grown in 2XYT medium until A600 about 0.6 (a cell density of 6×10^8 cells/mL). The bacterial culture was then induce by 0.1 mM final concentration of Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 8-10 hrs at low temperature (30°C) and the pellets were then frozen at 70 °C. The recombinant protein expression was analysis by SDS-PAGE.

Purification of rHS-1

Pellet cells were resuspended in binding buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) and froze in -70°C overnight, followed by sonication to lyze bacterial cells. The supernatant fraction was recovered by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4°C. The soluble protein was added to His GraviTrapTM column (GE Healthcare) then unbound proteins were washed by binding buffer. The bound protein was eluted by elution buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4). The fusion protein of Thioredoxin (Trx)-polyhistidine (6His)-HS-1 was analyzed by SDS-PAGE. Imidazole was taken away by dialysis. The fusion protein was cleavaged by Enterokinase, the restriction protease, following it was separated by His GraviTrapTM column to remove fusion tag from rHS-1.

Disc Diffusion assay

Inoculums preparation by bacterial culture such as *Bacillus subtilis*, *Straphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* were growth in Nutrient Broth (NB) medium until A₆₀₀ about 0.5. Nutrient agar (NA) plates were prepared with 6-mm filter paper discs. Then

inoculums were swop on NA plates and treatment compounds were added to paper disc absorption before incubated 6-8 hrs at 37°C. The clear zone was observed to relate bacterial inhibition.

Microplate assay

B. subtilis, *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *Ps. aeruginosa* were growth in Nutrient Broth (NB) medium until A_{600} about 0.5 for prepared inoculums followed by add medium until the suspension was light before add 100 μ l bacterial suspension and 25 μ l treatment compounds to 96 well plate. The tray was incubated at 37°C 16 hrs and bacterial growth, detecting by A_{655} cans indicate antimicrobial activity of rHS-1.

Results

Characterization of rHS-1

Plasmid pET-32a contains antibiotic coding gene, which expressed ampicillin resistant protein. After bacterial culture was spread on agar medium and overnight incubation at 37°C, two colonies of *E. coli* OrigamiTM harboring plasmid pET-32a-HS-1 was grown in 0.1 mg/ml ampicillin containing agar medium (fig. 2B). These compared between *E. coli* OrigamiTM no insert (fig. 2A) and *E. coli* OrigamiTM containing plasmid pET-32a (fig. 2C) as control.

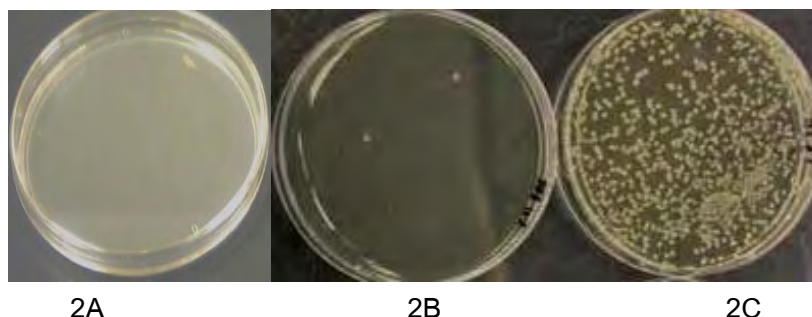


Fig. 2. *E. Coli* OrigamiTM grown on ampicillin agar plate after transformation and incubation overnight at 37°C. Bacterial culture with no plasmid (negative control; 2A), insertion with pET-32a-Hs-1 (2B) and insertion of pET-32a (positive control; 2C)

Two colonies of *E. coli* OrigamiTM harboring plasmid pET-32a-HS-1 were picked for large scale preparation for plasmid isolation. Plasmid was used as template in PCR reaction, that is characterized by 258 bp of PCR product (fig.3A). After plasmids were restrictly digested with *EcoR*1, *Xho*1 and both of *Bam*H1 and *Xho*1, they were run in 0.7% agarose gel for cleavage analysis. Naturally, plasmid is always in circular form, when it is digested by restriction enzymes, it will be linear form that presents real size of plasmid. Restriction enzyme analysis shows that lane 2

and 3 are plasmids after single enzyme digestion giving expected size of pET-32a-HS-1 (6134 bp). On the other hand, lane 4 shows failure of digestion of pET- 32a-HS-1 when compare with control (lane 1). This is because *EcoR1* site was removed from recombinant plasmid in cloning process. Lane 5 is double digestion of recombinant plasmid with smaller size than that in lane 6 because the 252- bp fragment was removed (fig.3B).

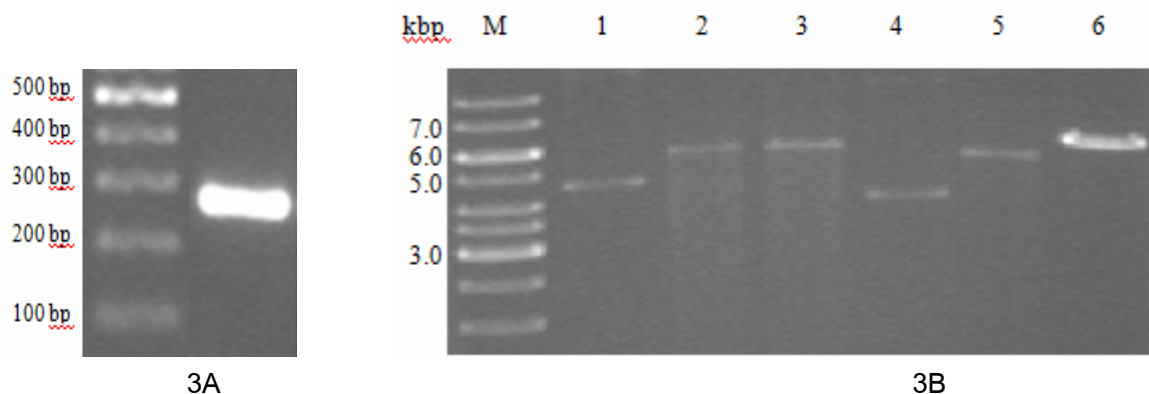


Fig. 3. 252 bp PCR product of HS-1 gene was present by 1.2% agarose gel electrophoresis (3A). Restriction enzyme analysis was present by 0.7% agarose gel elctrophoresis. M, 1 kD DNA ladder; lane 1, pET-32a no digest; lane 2, 3 and 4, pET-32a-HS-1 single digested with BamH1, Xho1 and EcoR1 respectively; lane 5, pET-32a-HS-1 double digested with BamH1 and Xho1; lane 6, pET-32a double digested.

Expression and purification of rHS-1

E. coli OrigamiTM harboring plasmid pET-32a-HS-1 was grown in 2XYT medium until bacterial growth during log phase (A600 about 0.6- 0.7) and then incubated with 0.1 mM IPTG final concentration at low temperature overnight. After centrifugation, pellet cells were harvested and analyzed by 13% SDS-PAGE gel (fig. 4). IPTG-induced fusion protein appears at 28 kDa, which is the expected size from sequence including Trx, 6His tag Enterokinase (EK) cleavage site linked with rHS-1 (lane 4). Histidine residues in fusion HS-1 can generate coordinated covalent bond with Ni ion so polyhistidine-tag was used for single-step purification by nickel-nitriloacetic acid (Ni-NTA) affinity chromatography. The fusion protein with polyhistidine-tag, rHs-1 was added to Ni chelating column and then other contaminating proteins were washed by 3 times washing buffer. The fraction proteins of rHs-1 were eluted from column by using a stepwise by 100 to 250 mM imidazole concentration (fig. 5A). The purified rHS-1 was dialyzed to remove imidazole and through PD-10 column (fig 5B).

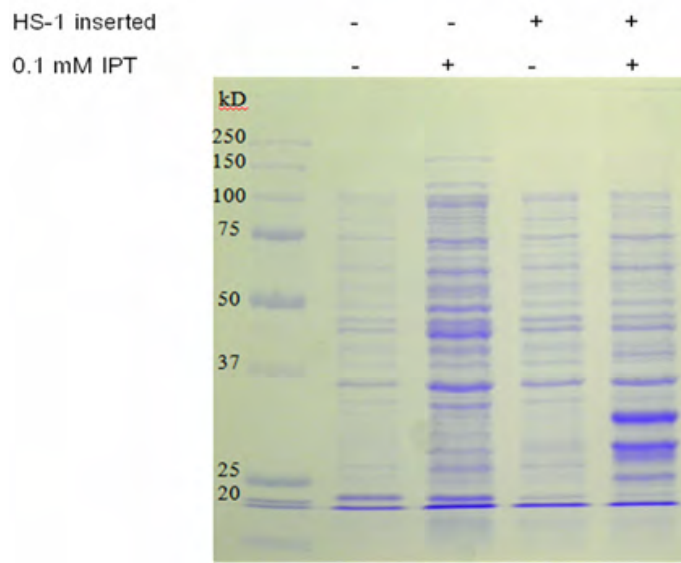


Fig. 4 13% Tris-glycine SDS-PAGE of un-induced and IPTG-induced *E. coli* cells harboring pET 32a-HS-1 constructs. lane 1, Precision protein marker; lane 2, *E. coli* extracts of uninduced cultures; lane 3 and 4, *E. coli* lysate of induced culture in the pET32 a with no insert; lane 4, *E. coli* lysate of un-induced cultures and induced culture respectively in the vector pET 32 a with HS-1 DNA insert.

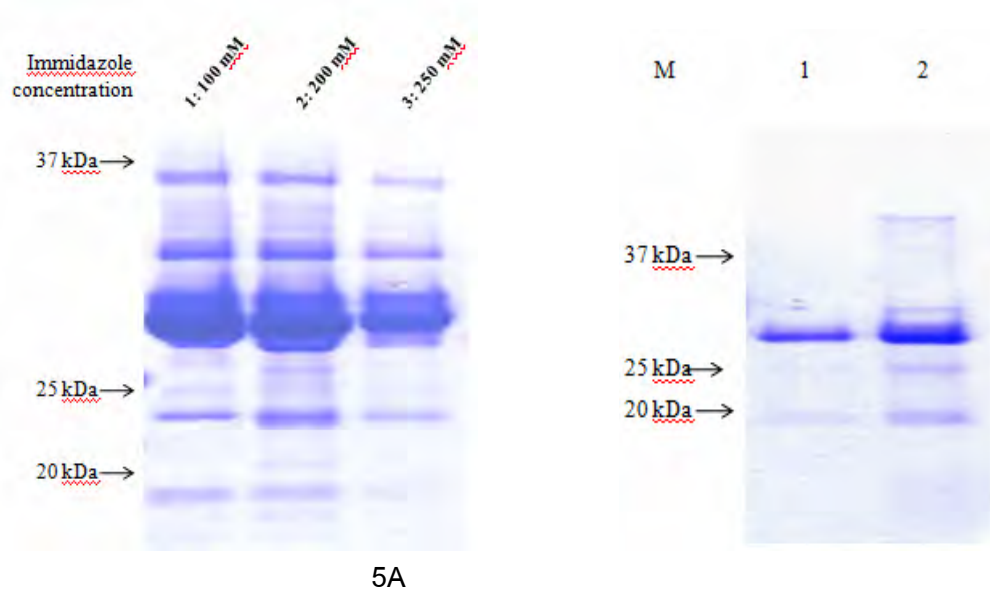


Fig. 5. 13% SDS-PAGE analysis of the eluent fractions of rHS-1 by stepwise 100 mM (lane 1), 200 mM (lane 2) and 250 mM (lane 3) imidazole concentrations (fig. 5A). SDS-PAGE analysis of the fusion protein after dialysis in lane1 and concentrated by PD-10 column in lane 2 (fig. 5B).

rHS-1 Cleavage by Enterokinase

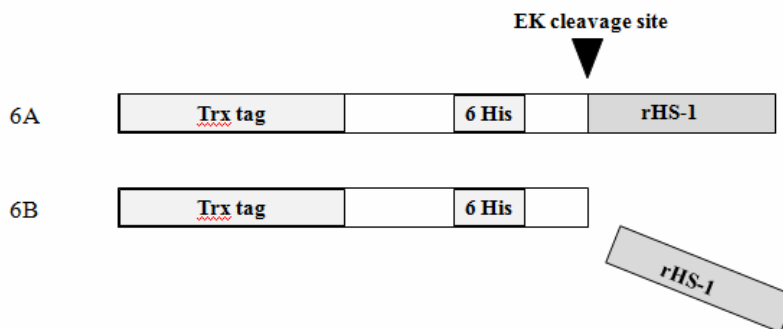


Fig. 6. Specific region of fusion protein cleavage by Enterokinase. Before cleavage (fig. 6A) and after cleavage (fig. 6B).

In part of protein structure and function study, we must remove other tags from rHS-1. So fusion protein will be cleaved by specific protease. EK is an endonuclease having cleavage site between rHS-1 and other tags (fig. 6A). After cleavage 0-18 hrs incubation with 0.3 mg/ml of EK, rHS-1 was analyzed by 15% tris glycine SDS-PAGE gel, result shows two fragments of EK-cleavage fusion proteins, about 20 kDa and 10 kDa (fig. 7). The cleavage process was monitored for 18 hrs and was complete within 12 hrs. Then we separated rHS-1 from other proteins by using Ni-NTA affinity chromatography. The other proteins containing polyhistidine tag will bind Ni^{2+} column, while free rHS-1 went through.

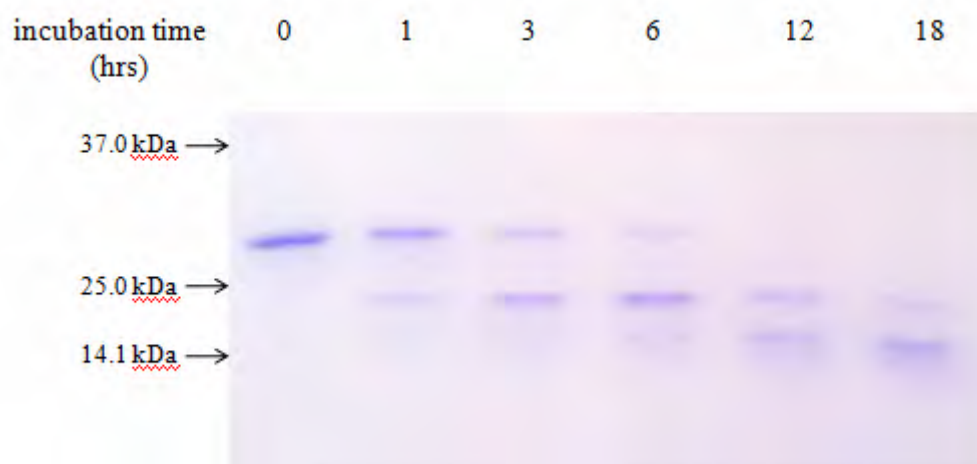


Fig. 7 15% Tris-glycine SDS-PAGE of the fusion protein cleavage with EK at incubation times 0, 1, 3, 6, 12, and 18 hrs respectively.

Antimicrobial activity of rHS-1

rHS-1 was tested for antimicrobial activity by disc diffusion assay and broth microdilution assay with four bacterial species: *B. subtilis*, *S. aureus* (gram positive bacteria), *K. pneumoniae* and *Ps. Aeruginosa* (gram negative bacteria). This experiment has two negative controls as sterile distilled water (DW) and tris buffer. Positive controls are 0.20 mg/ml gentamycin and 0.1 mg/ml antimicrobial peptide dermaseptin. After bacterial cells were grown on NA plate 6-8 hrs at 37°C, the clear zone of inhibition was measured (showed as table 1). Gentamycin, strong antibiotic could inhibit all four pathogens. On the other hand, only *B. subtilis* could be inhibited by rHS-1 and dermaseptin.

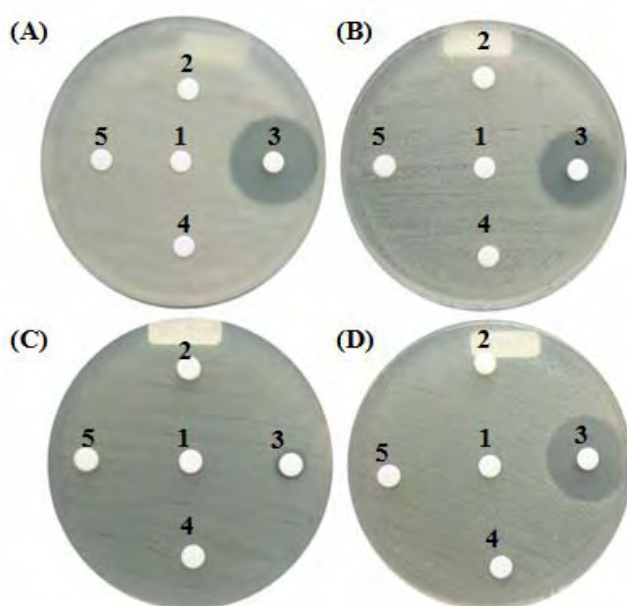


Fig.8 The microbial inhibition of *B. subtilis* (A), *S. aureus* (B), *Ps. Aeruginosa* (C) and *K. pneumonia* (D). The number indicate 1, DW; 2, Tris buffer pH 7.4; 3, gentamycin; 4, dermaseptin and 5 rHS-1.

Table 1. The inhibitory activity against bacteria using disc diffusion assay

Treatment	concentration	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>K. pneumonie</i>
Gentamycin	0.20 mg/ml	27.75±0.75	24.75±0.25	8.35±0.1	23.0±0
Dermaseptin	0.75 mg/ml	8.50±0.25	-	-	-
6.5±0.15					
rHS-1	0.75 mg/ml	7.25±0.10	-	-	-

- - is No inhibition, measurement area of inhibition in mm.

Antimicrobial activity of rHS-1 was determined by broth microdilution assay and presented by percentage of inhibition. The calculation was based on studies by Casey *et al.* (2004) and Patton *et al.* (2006). The result shows that positive control, 0.2 mg/ml gentamycin can inhibit 4 species of bacteria from 75.8 to 97 %. Dermaseptin inhibited *B. subtilis* as well at 62.5%, *K. pneumoniae* and *Ps. Aeruginosa* are 21.5 and 17.8 %. rHS-1 inhibited *B. subtilis* as well at 42.0%, *K. pneumoniae* and *Ps. Aeruginosa* 19.8 and 6.5% but it could not inhibit *S. aureus* . When compare this result with disc diffusion assay, we found antimicrobial activity in the same fasion. In disc diffusion method that bacterial cell was grown on nutrient agar, seeing larger clear zone might need peptide concentration more than 0.75 mg/ml. In spite of broth microdilution assay, bacterial cells were contacted with antimicrobial agents directly and use absorbance of bacterial suspension to detect so this method is more sensitive than disc diffusion assay.

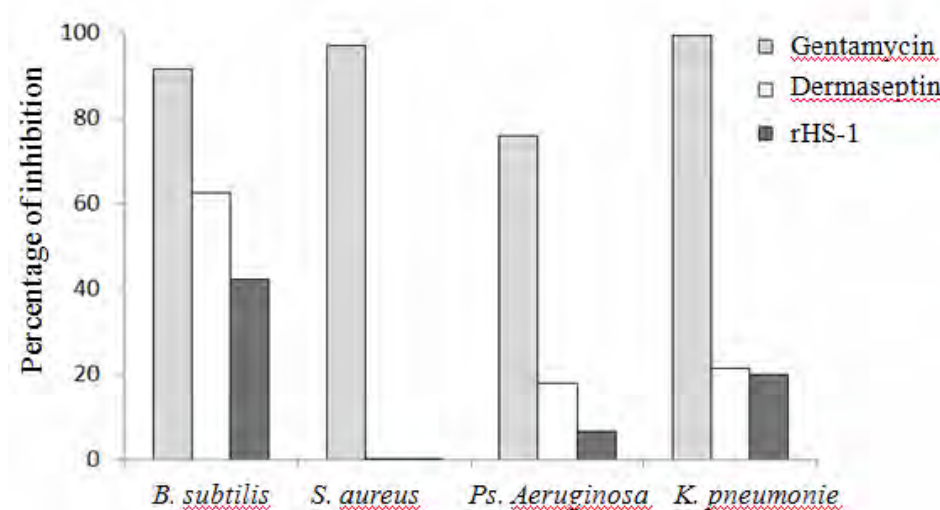


Fig. 9. Antimicrobial activity determined by microplate assay

Discussion

Recombinant expression in bacterial system is important tool for generating adequate antimicrobial peptides to study mechanism of action, structure and functions. However, environment in prokaryotic cell is not suitable for small peptides. Furthermore, lacking of post-translational modification effects in bacterial system cause increase peptide degradation and misfolding as inclusion bodies. This happens especially to toxin peptides containing many disulfide bridges. Therefore coexpression with soluble helper proteins is an alternative approach in cloning strategy. In this case, we attempted to overexpress the bioactive rHS-1 so we selected plasmid pET-32a. Above easy purification by single step, it produces TrxA to the protein fusion partners,

TrxA can support correct form in two ways: the first way is blocking the contact between two peptides molecules, protecting aggregation. The second way, TrxA contains thiol group, it will help arranging disulfide bonds of small toxic peptides (Yuan *et al.*, 2004). In addition, we use *E. coli* OrigamiTM as bacterial host to provide an oxidative environment that optimize for correct formation of disulfide bond. rHS-1 was folded slowly by low temperature incubation. Altogether, this strategy produces soluble expression proteins (Walker *et al.*, 2001).

Acknowledgement

This research was mainly funded by Khon Kaen University General Support Fund 2010 and Protein and Proteomics Research Group. It was partially funded by Thailand Research Fund, under young investigator research grant number MRG5280019. The authors would like to thank Miss Kanjana Madhongsas and Mr. Santi Janmanee in assisting with some experiments.

Manuscript 2

Thai giant scorpion toxin Heteroscorpine-1 N- and C-terminal domains separately possess bactericidal activity, with more membrane disruption at the N-terminus

Rina Patramanon*,^{1, 2} Supaluk Pasan,^{1, 2} Bhorntip Plankhantod,^{1, 2} Thikambhorn Naree,³ and Sakda Daduang,^{1, 2}

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

²*Protein and Proteomics Research Group, Khon Kaen University, 40002 Khon Kaen, Thailand*

³*Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 10330 Bangkok, Thailand*

*Correspondence should be addressed to Rina Patramanon, narin@kku.ac.th

Heteroscorpine-1 is a 76-amino-acid novel peptide with high homology to members of Scorpine family and many K⁺ channel blockers. Previous study in “Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from Heterometrus laoticus scorpion venom” by Uawonggul N et al (2007) reported antibacterial activity of HS-1. In this present study, structure-bactericidal relationship of chemically synthesized HS-1 N- and C-termini

will be investigated in-depth. Sequence similarity search indicates that HS-1 is a hybrid of two classes of small cationic antimicrobial peptides (SCAMPs): cecropin and defensin, the N- and C-terminal domains are then called CD and DD, respectively. Amino acid sequence analysis and helical wheel projection reveal that CD has more major helical content and amphipaticity than DD. 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.

Keywords: scorpion toxin, SCAMPs, hybrid, bactericidal activity, membrane disruption, membrane permeabilization

1. Introduction

Heteroscorpine-1 (HS-1) is a neurotoxin isolated from the venom of Thai giant scorpion *Heterometrus laoticus* (Uawonggul et al., 2006, 2007). Its sequence suggests that it belongs to the group of scorpine family peptides with characteristics of ion-channel blockers (Juhng et al., 2002; Legros et al., 1998; Possani et al., 2000; Srairi-Abid et al., 2005; Tong et al., 2000; Zhu et al., 1999) and antimicrobial activity (Carballar-Lejarazu et al., 2008; Kuhn-Nentwig et al., 2003; Moerman et al., 2002). Heteroscorpine-1 and other scorpines such as Panscorpine (Conde et al., 2000) from south American scorpion and Opiscorpine (Zhu and Tytgat, 2004) from south African scorpion contains amino acid sequence similar to an insect antimicrobial peptide, cecropin, at their N-terminus and innate immunity defense peptide, defensin, at their C-terminus (Uawonggul et al., 2006; Zhu et al., 2002). This sequence combination as hybrid peptide of two different types of defense peptides suggests an evolutionary relationship between cecropin and

defensin (Kokoza et al., 2010). In addition, it suggests why scorpines have various biological activities (Conde et al., 2000; Luplertlop et al., 2011; Moerman et al., 2002; Silva et al., 2009). Generally, search for new antimicrobial peptides with outstanding activities requires extensive structure-function characterization. Peptides currently used in therapeutics are usually short, varying from few amino acids to no more than thirty amino acids. These short peptides are easy to synthesize by machine and are believed to easily elicit their action toward microbial pathogens (Dai et al., 2003; Lucchese et al., 2007; Mitsuyama et al., 2011; Zhu et al., 2009). Moreover, short peptides are cheaper, and easier in handling or delivering to body circulation. More importantly, the smaller the peptides, the less immunogenic they are (Benkirane et al., 1993).

Previous report indicated moderate antimicrobial activity of full-length HS-1, in both native purified form from scorpion venom and recombinant form (Uawonggul et al., 2007). Since HS-1 is a hybrid peptide, it would be of interest to investigate antimicrobial activity and mode of action of each domain. In addition, perhaps multi-function of HS-1 as a member of scorpine toxin roots from such hybrid nature. Therefore, in this study we characterize the hybrid nature of Heteroscorpine-1 using combination of bioinformatics and biochemical methods. Major characteristics of HS-1 sequence were determined using bioinformatics tools. Cecropin-like domain (CD) and defensin-like domain (DD) of HS-1 were chemically synthesized and determined for following properties: antibacterial activity, action on bacterial cell wall, and tryptic sensitivity. Structural and activity analysis suggest both domains can perform antimicrobial activity separately, with cecropin-like domain (CD) more efficient due to higher amphipaticity and helical content.

2. Materials and Methods

Materials. N-terminal and C-terminal domains of HS-1 (CD, DD), synthesized by Fmoc method, were purchased from Bio Basic Inc. (Ontario, Canada). In tryptophan blue shift experiment, tyrosine residue (Y) at the end of DD was replaced with tryptophan (W) in order to follow fluorescence phenomena. W replacement had no effect on bactericidal activity when compared with original DD sequence. Dermaseptin, Trypsin, DMSO, yeast extract, bacto tryptone, agar were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, USA). DOPG, DOPC, PG and PC were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and Avanti polar lipids (Alabama, USA). Blood

was donated from Central Blood Bank, Sinakarindha Hospital, Khon Kaen University.

Pathogenic microorganisms were kind gifts from Thammasirirak Laboratory, Protein and proteomics research group, Khon Kaen University.

2.1 *Bioinformatics.* Primary sequences of Heteroscorpine-1, cecropin and defensin are aligned using alignment program containing pools of sequence database (Blast, Tcoffee, etc.). Major characteristics of the three peptides are analyzed, including molecular weight, isoelectric point, charge, hydrophobicity and posttranslational modifications (PTM). The databases used to obtain these characteristics are: scansite pI/Mw, SAPS, compute, ProParam, ProScale and netPhos. Secondary structures of the three peptides were predicted using GOR and SOPMA secondary structure prediction program. Helical wheel projections were drawn via program from <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>

2.2 *Broth microdilution assay.* A two-fold serial dilution of synthetic peptides was prepared in buffer to give a concentration range of 20 - 160 μ M. To each well of sterile microtiter plates (96-well cell culture cluster), 20- μ l portions of synthetic peptides dilutions were added. The inocula were prepared by suspending colonies from a 18-24 h agar plate directly into NB broth incubate at 37 °C 160 rpm until OD₆₀₀ approximately 0.5-0.6. After further dilution in NB broth, 100- μ l portions were then added to each well, giving a final inoculum of 10⁷ CFU/well The microtiter plates were incubated anaerobically at 37°C for 24 h, and each concentration was run in duplicate. Growth controls without an antimicrobial peptide were included in each run. Percentage of inhibition was defined as the lowest concentration of the peptide that produced the most significant reduction of growth compared to that of the growth control.

2.3 *Scanning electron microscope.* The inocula was prepared by swapping 1 colony from a 18- 20 h agar plate directly into NB broth and furthered incubated at 37 °C 160 rpm until OD₆₀₀ reached approximately 0.5-0.6 (starter). After further dilution starter 500 μ l in 100 ml NB broth into flask 125 ml, incubate at 37 °C 160 rpm until OD₆₀₀ approximately 0.5-0.6 and then collect cell by spinning at 2000 rpm 5 min. Resuspended pellet in PBS buffer and wash threes time. Dilute cell suspension with PBS buffer approximately 0.01-0.1%. treat cell by synthetic peptide: cecropin link domain, defensin like domain and magainin in ependop ratio sample : bacteria cell (50:100). Incubate at 37 °C 0, 1, 2 h. transfer cell onto polycarbonate membrane (pore size 2

μM) and then fixed the cell by glutaraldehyde for 1 h. Then dehydration the cell with ethanol series at the concentration from 30%, 50%, 70%, 90%, 5 min each and then dehydration with absolute ethanol (100%) 2 time 15 min each. Follow with the coat the dried cell with gold. Visualize the cell morphology with SEM.

2.4 *Limited proteolysis.* Limited proteolysis with trypsin performed by adding 0.01 mg trypsin to a 5 μl of 2 and 4 mM peptide cecropin and defensin like domain respectively in cleavage buffer with 30% TFE. Incubate reaction at 25 °c for 0 ,10 and 30 min. The cleavage reaction was stopped by adding 1M Tris pH8. The cleavage products were analyzed by Tricine SDS-PAGE 16.5% gel.

2.5 *NPN-uptake assay.* Fluorescent measurement was performed according to previously published methods Loh et al. (1984). Fluorescence of NPN before and after CD, DD and gentamicin treatment on bacterial cells was determined by Shimadzu RF-5301PC Spectrofluorometer. In summary, *B.subtilis* ATCC 6633 cells (3 ml) were prepared in KCN-PBS (suspended to an optical density at 600 nm of 0.5) and 10 μM NPN. Cell were incubated with NPN in the presence of various concentrations of peptides, 20, 40 and 80 μM of CD, DD and 0.1, 0.5 and 1 mg/ml gentamicin. The uptake of NPN was measured by the increase of fluorescence recorded at excitation and emission wavelengths of 350 and 410 nm, respectively. Control experiments without added cells or CD, DD and gentamicin were also performed. The maximum level of fluorescence (100%) was determined by complete lysis of cell with Triton X-100. The zero level corresponded to cell fluorescence in the absence of peptide. Bars represented the standard errors of the means

2.6 *Calcein leakage assay.* The experiment was modified from previously described method in Gelhaus et al. (2008). Briefly, pure synthetic phospholipids, PC:PG (1:1) (both from Sigma) were dissolved in chloroform-methanol (2:1, by volume). The solvent was removed by a stream of nitrogen, and the resulting lipid film was dried under vacuum overnight. Subsequently, the lipid film was hydrated in buffer (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing 70 mM calcein (Invitrogen- Molecular Probes, CA, USA). The suspension was applied to four freeze-thaw cycles using liquid nitrogen and a water bath of 37°C and passed 20 times through a 100-nm-pore-size membrane by using a Mini-extruder (Avestin, Inc., Ottawa, Canada). After extrusion, the liposomes were passed through a PD-10 column (Sigma) to remove untrapped

calcein. Elution was performed with 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4. Lipid concentration was determined by using a phosphorous assay (Bartlett, 1959). Liposomes (2.5 μ M of phospholipids) were treated with various concentration of 20, 40 and 80 μ M of CLD, DLD and Dermaseptin peptide standard at 20°C. Fluorescent intensity of the leakage dye was recorded at excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. The maximum level of fluorescence (100%) was determined by complete lysis of LUVs with Triton X-100. The zero level corresponded to LUVs fluorescence in the absence of peptide. Bars represented the standard errors of the means from 3 independent experiments

2.7 Tryptophan Blue Shift Fluorescence. All fluorescence measurements were performed in quartz cuvettes with 0.5-cm path length. In Tryptophan fluorescence residues of the peptide CD and DD in aqueous buffer measured blue shift according to published methods Zhu et al. (2009). The peptide was monitored in buffer (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4) and presence of liposome vesicle compose of DOPG: DOPC (2:3 w/w) LUVs. Tryptophan fluorescence blue shift measurements were taken with a model RF-5301PC spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Peptides was added 500 μ l of buffer containing 0.6 M liposomes at pH 7.4 which peptid/liposome vesicle 1:200 and incubate at 20°C for 10 min. The tryptophan fluorescence was excited at 280 nm, and the emission was scanned from 300 to 420 nm.

Acknowledgement

The authors would like to thank Miss Kanjana Madhongsra in assisting with some experiments. This research is mainly funded by Thailand Research Fund, under young investigator research grant number MRG5280019. In addition, the research is partially funded by Faculty of Science, Khon Kaen University and Protein and Proteomics Research Group and General Support Fund 2010, Khon Kaen University

3. Results and Discussion

HS-1 belongs to a family of hybrid peptide

Amino acid sequence analysis of full-length Heroscorpine-1 (HS-1) in Figure 1 illustrates the nature of this peptide as a hybrid between host-defense peptides cecropins and defensins. The N-terminus of HS-1 is about 50% identical and 80% similar to cecropins, as from now on we will call this end cecropin-like domain or CD. The other end of HS-1, the C-terminus, is about 40% identical and 70% to defensins, and we will call defensin-like domain or DD. It is notable that identical amino acids between cecropin and CD are mainly basic and hydrophobic. This sequence pattern, when drawn as helical wheel, shows amphipathic structure that is very essential in membrane disruption (Figure 2). Similar pattern of resemblance also applies to defensins and DD, where reserved cysteine residues are on exact same locations. In addition, amino acids locating near conserved cysteines are identical or similar. These neighboring amino acids may help stabilize peptide structure in defensin and DD.

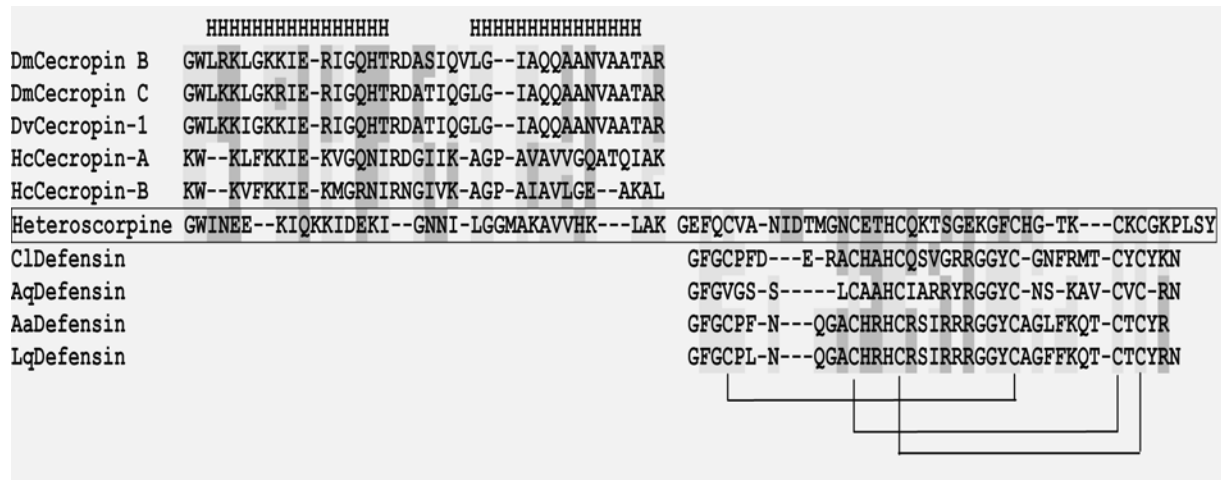


FIGURE. 1 Comparison of amino- and carboxyl- terminal sequence of Heteroscorpine-1 with cecropins and invertebrate defensins. Identical residues are shaded in dark grey, conservative replacement in light grey. H, α -helix by secondary structure prediction. Disulfide bridges between Cys residues are shown at the bottom. Insects: Dm, *Drosophila melanogaster*; Dv, *Drosophila virilis*; Hc, *Hyalophora cecropia*; Cl, *Centruroides limpidus*; Scorpions: Aq, *Anopheles quadriannulatus*; Aa, *Androctonus australis*; Lq, *Leiurus quinquestriatus*

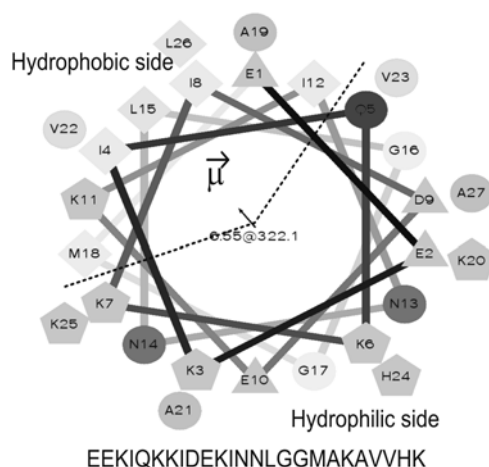


FIGURE 2. The helical wheel projection showing amphipathicity of Heteroscorpine-1 N-terminal sequence. (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>) indicates the presence of hydrophobicity at one side of the helix and hydrophilicity at another side. The hydrophobic moment (μ), calculated as the vector sum of the hydrophobicities of all residues, assuming an ideal α -helix, is 6.55 at angle 322.1. Symbols: hydrophilic residues, circles; hydrophobic residues, diamonds; potentially negatively charged, triangles; and potentially positively charged, pentagons.

Table 1 shows major characteristics of HS-1 and its N- and C-termini, comparing with the original cecropin and defensin sequence. Full-length HS-1 contains 76 amino acids, of these, 34 and 42 amino acids are called CD and DD, respectively. When comparing theoretical pI, we found that both pI of CD and DD are lower than those of cecropin and defensin (pI of CD is 9.6, cecropin is 11.57, DD is 7.78, defensin is 9.69). As for net charge, both domains have smaller positive charges than cecropin and defensin, with DD appears to have much smaller net charge. The charge difference from cecropin and defensin are 2 and 6 in CD and DD, respectively. It has been well established that positive charge in antimicrobial peptides is important for interacting with bacterial cell walls (Jang et al., 2002; Koprivnjak et al., 2002). Higher charge difference from original peptides in DD suggests lower antimicrobial activity. The experimental support is shown in later Figures.

In addition to pI and net charge, CD and DD sequences were analyzed by GOR and SOPMA program for theoretical helix content. The result shows that CD contains similar helical

content to that of cecropin, while DD has no helical content at all. Defensin, on the other hand, contain some helical structure when analyzed with SOPMA program (13.51%).

TABLE 1. Major characteristics of Heteroscorpine-1

Characteristics of Heteroscorpine-1 (HS-1) as a hybrid of cecropin and defensin

peptide	length	<i>Mr</i> (Da)	pI	net	mean	% α -helix		
	(aa)			charge	hydrophobicity	GOR	SOPMA	phosphorylation
Full length HS-1	76	8298.6	8.79	4	-0.553	28.95	35.53	T22, S23
CD	34	3774.4	9.6	3	-0.447	52.44	82.35	none
Cecropin	39	4226.9	11.57	5	-0.3	48.72	61.54	none
DD	42	4542.1	7.78	1	-0.638	0	0	T22, S23
Defensin	37	4211.8	9.69	7	-0.576	0	13.51	none

TABLE 2. Antibacterial activity of HS-1 cecropin- and defensin-like domains. Broth microdilution assay was performed with *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *B.subtilis* 6633 and *Ps.aeruginosa* using 0.1g gentamycin as positive control. The values are the average of three experiments.

Microbes	% Inhibition				
	0.1mg/ml	CD			
	Gentamicin	20	40	80	160
<i>S.aureus</i>	92.4	N/A	N/A	N/A	30.53 $\pm$ 7.21
<i>K.pneumoniae</i>	86.47	N/A	N/A	N/A	20.8 $\pm$ 1.56
<i>B.subtilis</i>	59.62	55.9 $\pm$ 3.35	37.84 $\pm$ 11.98	38.54 $\pm$ 8.53	N/A
<i>Ps.aeruginosa</i>	45.08	N/A	N/A	N/A	N/A
	DD				
	<i>S.aureus</i>	N/A	N/A	11.93 $\pm$ 1.50	15.71 $\pm$ 5.75
	<i>K.pneumoniae</i>	N/A	N/A	N/A	15.22 $\pm$ 4.75
	<i>B.subtilis</i>	33.35 $\pm$ 13.13	49.16 $\pm$ 7.09	22.89 $\pm$ 17.42	40.4 $\pm$ 11.47
	<i>Ps.aeruginosa</i>	N/A	N/A	N/A	N/A

Differential bactericidal activity of HS-1 CD and DD

HS-1 could inhibit growth of bacteria in its full-length. Nevertheless, the length of peptides that can exert antimicrobial activity could be as small as 10-20 amino acids. In this light, HS-1 might therefore have smaller region(s) that can act on bacteria. Since it is a hybrid peptide of cecropin and defensin, we expect that only half of HS-1 could still exhibit antimicrobial activity. We therefore tested both domains, CD and DD, and used gentamycin as positive control. The results in Table 2 show that at lower concentration both CD and DD could inhibit only *B.subtilis*. At higher concentration, both CD and DD could inhibit *S.aureus* and *K.pneumoniae*, whereas *Ps.aeruginosa* could not be inhibited at all. It can be seen that higher concentration of peptides did not give higher inhibition. In contrast, as for *B. subtilis*, 20 μ M peptides has best activity. CD activity was almost equal to that of gentamycin, whereas DD had about 20% lower inhibition. The concentration-independence of both peptides is in contradicted with the general rule of thumps where higher concentration of peptides can give higher activity. Our results might concern with peptide aggregation during testing experiments, leaving just small portion of active peptides to act on bacterial cell walls. The higher concentration of peptide used might lead to more aggregation and less active peptides, therefore, leading to lower bactericidal effect.

The results from Table 2 also indicate that CD showed better inhibition than DD. Different activity might arise from different structure organization in CD and DD. As compared with cecropin and defensin parent peptide structure, CD has major helical content and DD has major beta-strand content. The amphipathicity of helix in CD structure might be the responsible determinant in better inhibitory effect of CD.

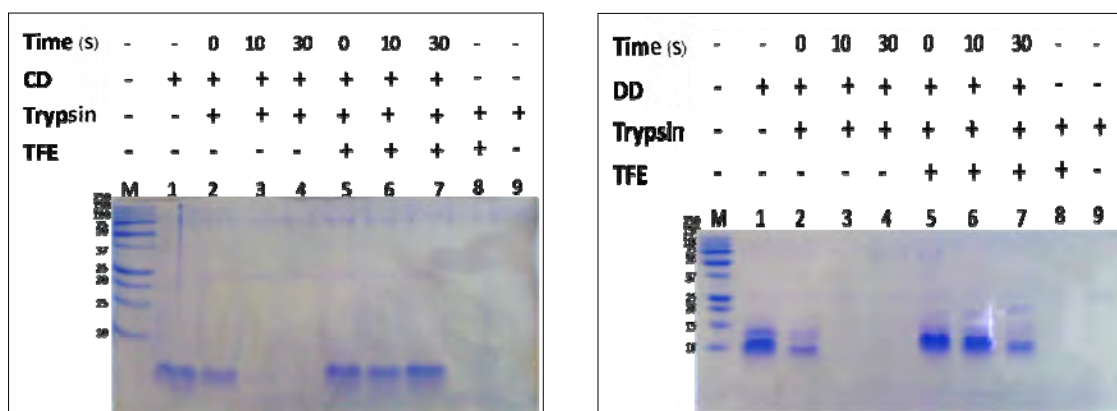


FIGURE 3. Limited proteolysis of HS-1 cecropin- and defensin-like domains (CD and DD). Peptides were incubated in buffer with or without 30% TFE, a chemical that can promote secondary structure formation, then hydrolyzed with trypsin at indicated time point at RT. The reaction mixture was stopped with 1 M Tris pH 8, and resolved in 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE

CD is more capable of being induced-folded than DD

Normally antimicrobial peptides stay unstructured in the solution, but once docking on bacterial cell walls and membrane they start to fold and their function begins. Therefore, the ability of peptide of being induced to fold in hydrophobic environment is essential in antimicrobial activity. In this study, we tested the induced-folding ability of CD and DD for membrane-mimicking environment, 30% TFE. Induced-folding will allow peptides to have more compact structure and able to resist tryptic digest. As shown in Figure 3, under normal condition both CD and DD was completely digested in 10 minutes (lane 3 left and right panels). However, when under membrane-mimicking environment both domains could resist tryptic digest. The result indicates that both peptides could fold under right condition, which reflects the nature of antimicrobial peptides. When comparing CD and DD in resisting trypsin after 30 minutes, we found undigested CD left in solution more than undigested DD (lane 7 left and right panels). This finding demonstrates that CD might have more compact structure than DD under membrane-mimicking environment. The compact structure of CD could lead to better membrane penetration and therefore more bacterial growth inhibition as seen in Table 2.

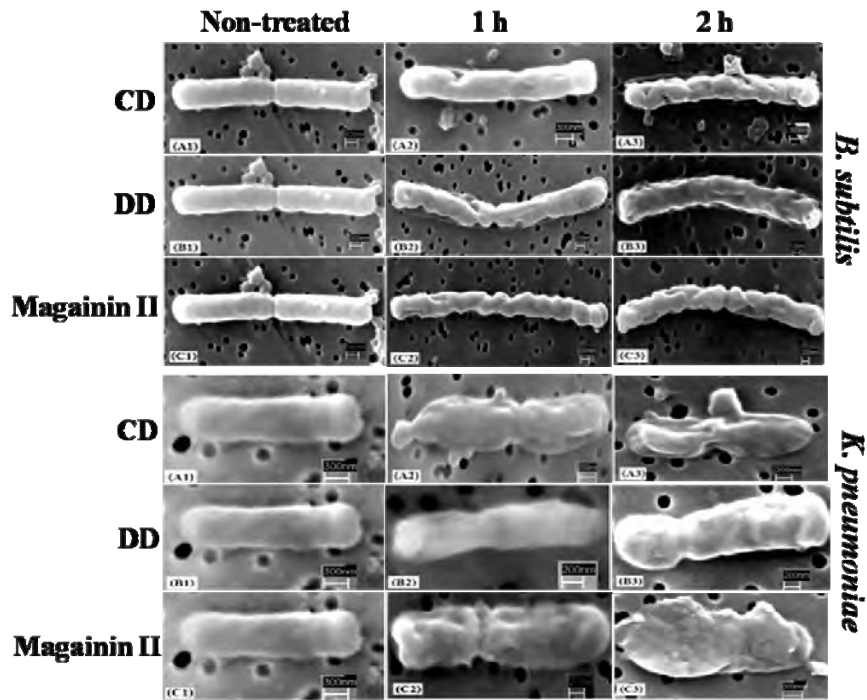


FIGURE 4. Scanning electron microscopy of *B. subtilis* 6633 and *K. pneumoniae* under different conditions: treated with CD (A), DD (B), and magainin II (C). Those without any treatments (panel 1), treated with peptides for 1 h (panel 2), and treated with peptides for 2 h (panel 3). The samples were prepared for examination under scanning electron microscope. Bars indicate size in nm.

CD caused more cell blebbing and deformation than DD

The effect of CD and DD on bacterial cell walls was visualized by scanning electron microscope, using magainin II as positive control and the gram positive *B. subtilis* 6633 and the gram negative *K. pneumoniae* (Figure 4). All peptides caused cell death in slightly different overall cell deformation, i.e. cell shrinkage, rugged cell wall, and cell burst. The effect of CD is comparable with potent antimicrobial peptide magainin II in both gram negative and positive bacteria. The effect was more pronounced in gram negative bacteria, showing ragged cell wall of *K. pneumoniae* (panel 3, 2 hr). On the other hand, DD could cause only moderate cell shrinkage. Altogether, SEM result demonstrates stronger effect of CD than DD in destroying cell wall.

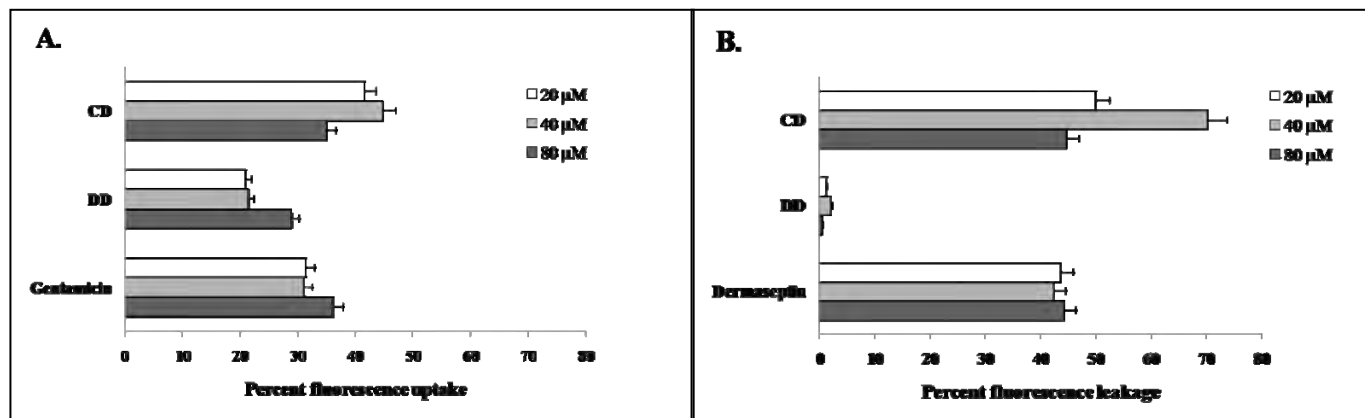


FIGURE 5. Peptide-induced membrane permeability in bacterial (a) and model (b) membrane. (a) Peptide-induced outer membrane permeabilization assessed by the NPN uptake in *B. subtilis* (ATCC 6633). Mid-log phase *B. subtilis* were collected and incubated with NPN in the presence of various concentrations of CD, DD and Gentamicin . NPN was taken up into cells when the outer membrane was disrupted by the peptides. The uptake of NPN was measured by the increase of fluorescence and showed as percentage of maximum fluorescence of complete lysis in Triton X-100. (b) Permeabilization of LUV was determined by measuring fluorescence release of calcein when membrane was disrupted by CD, DD and Dermaseptin . The maximum level of fluorescence (100%) was determined by complete lysis of LUVs with Triton X-100.

CD has stronger membrane permeability than DD

To observe peptide action on bacterial membrane at molecular level, outer membrane penetration and calcein leakage on modeled membrane were performed. NPN uptake was used as indicator of outer membrane penetration of peptides. This fluorescent probe emits no fluorescence under aqueous solution, but it emits high fluorescence intensity in hydrophobic environment like in bacterial membrane. Peptide-disrupted outer membrane have exposed hydrophobic patch that could attract NPN molecule, calling NPN uptake of outer membrane. More disruption of membrane by peptides would therefore result in more NPN fluorescence. Figure 5 (a) displays percentage of NPN uptake under CD, DD and gentamycin treatment using

triton-X 100 as positive control (100% NPN uptake). CD had strongest membrane disruption effect, following by gentamycin and, DD i.e. CD in all concentrations caused about 50% NPN uptake, while gentamycin caused 30% and DD 20%, respectively. The result is in agreement with higher growth inhibitory effect of CD (Table 2 and Figure 4). Lower effect of gentamycin in outer membrane disruption indicates different mechanism of cell killing from antimicrobial peptides.

Membrane permeability of CD and DD was compared in calcein leakage assay using large unilamellar vesicles composing of phospholipids mimicking bacterial membrane. The result shows that CD could caused calcein leakage to about 50 % while DD had almost no effect on the leakage even when increasing peptide concentration up to 80 μ M. The result suggests that DD, while being able to interact with outer membrane, fails to penetrate into the membrane. In contrast, CD can cause both outer and inner membrane permeability.

In our experiment, we also included demaseptin, a well-studied antimicrobial peptide, in the study as internal control. Effect of dermaseptin is marginally less pronounced than that of CD in causing the leakage, as the effect was saturated at 40 % with 20 μ M peptide concentration (Figure 5 (b)).

TABLE 3. Tryptophan emission maxima of 5 μ M peptides in HEPES buffer (pH 7.4), in the presence of 0.6 mM DOPG:DOPC (2 : 3, w/w) LUVs. Number in bracelets indicate wavelength shift

Domain	HEPES buffer (nm)	Concentration of Peptide in DOPG:DOPC		
		5 μ M	10 μ M	20 μ M
CD	350	333 (17)	334 (16)	330 (20)
DD	350	338 (12)	344 (6)	352 (2)

To monitor local environment of tryptophan residue as the peptide penetrates the membrane, tryptophan blue shift fluorescence was followed. When peptide was in buffer,

tryptophan maximum emission fluorescence is at 350 nm in both CD and DD (Table 3). Addition of liposome to peptide solution induced peptide binding to membrane. The binding and penetration of peptide into lipid bilayer change tryptophan's local environment from hydrophilic to hydrophobic, causing shift of emission maximum toward shorter wavelength as due to higher quantum yield of tryptophan. As can be seen in Table 3, CD at all three concentrations had blue shift vary from 16-20 nm, indicating deeper penetration of peptide into hydrophobic membrane bilayer. In contrast, DD at low concentration had 12-nm blue shift, while at higher concentrations less blue shift was found (6 nm at 10 μ M and 2 nm at 20 μ M). This indicates that DD at higher concentration seemed to be in solution rather than docking and penetrating into membrane. This result might come from prone of aggregation of DD as it has more β structure than CD. Taken together from NPN assay, calcein leakage assay, and tryptophan blue shift, CD appears to have stronger membrane disruption ability than DD. The structure determinant for activity might be helical content and amphipaticity that are found in CD but not DD.

Conclusion

HS-1 N- and C-terminal domains (CD and DD) were tested for antimicrobial activity to seek for shorter sequence in taking action on bacterial killing. Both domains possess bactericidal activity, with higher action in CD. CD also caused more membrane disruption than DD, implying amphipaticity and helical content in CD is structural determinant for peptide action. Shorter active sequence of HS-1 found in this study might provide as the beginning to design for therapeutic use of scorpine family toxin.

References

1. Bartlett, G. R. (1959). Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 234(3), 466–8
2. Benkirane, N., M. Friede, et al. (1993). Antibodies to a D-enantiomer do recognize the parent L-hexapeptide and reciprocally. *J Biol Chem*, 268(35), 26279-85.

3. Carballar-Lejarazu, R., M. H. Rodriguez, et al. (2008). Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell Mol Life Sci*, 65(19), 3081-92.
4. Conde, R., F. Z. Zamudio, et al. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett*, 471(2-3), 165-8.
5. Dai, L., G. Corzo, et al. (2002). Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(5), 1514-22.
6. Gelhaus, C., T. Jacobs., J. Andra., M. Leippe, et al. (2008). The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(5): 1713-20
7. Jang, W. S., K. N. Kim, et al. (2002). Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Lett*, 521(1-3): 81-6.
8. Juhng, K. N., T. G. Kokate, et al. (1999). Induction of seizures by the potent K⁺ channel-blocking scorpion venom peptide toxins tityustoxin-K (alpha) and pandinustoxin-K (alpha). *Epilepsy Res*, 34(2-3), 177-86.
9. Kokoza, V., A. Ahmed, et al. (2010). Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(18), 8111-6.
10. Koprivnjak, T., A. Peschel, et al. (2002). Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 277(49), 47636-44.
11. Kuhn-Nentwig, L. (2003). Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci*, 60(12), 2651-68.
12. Legros, C., B. Ceard, et al. (1998). Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett*, 431(3), 375-80.
13. Loh, B., C. Grant., R. E. Hancock. (1984). Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 26(4), 546-51

14. Lucchese, G., A. Stufano, et al. (2007). Peptidology: short amino acid modules in cell biology and immunology. *Amino Acids*, 33(4), 703-7.
15. Luplertlop, N., P. Surasombatpattana, et al. (2011). Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following Infection with Dengue Virus. *PLoS Pathog*, 7(1), e1001252.
16. Mitsuyama, K., M. Niwa, et al. (2011). Isolation and characterization of a novel short peptide associated with Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*.
17. Moerman, L., S. Bosteels, et al. (2002). Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur J Biochem*, 269(19), 4799-810.
18. Possani, L. D., E. Merino, et al. (2000). Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*, 82(9-10), 861-8.
19. Silva, E. C., T. S. Camargos, et al. (2009). Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*, 54(3), 252-6.
20. Srairi-Abid, N., J. I. Guijarro, et al. (2005). A new type of scorpion Na⁺-channel-toxin-like polypeptide active on K⁺ channels. *Biochem J*, 388(Pt 2), 455-64.
21. Tong, Q. C., Y. Zhang, et al. (2000). The blocking effect of BmP02, one novel short-chain scorpion peptide on transient outward K (+) channel of adult rat ventricular myocyte. *Regul Pept*, 90(1-3), 85-92.
22. Travis, S. M., N. N. Anderson, et al. (2000). Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun*, 68(5), 2748-55
23. Uawonggul, N., A. Chaveerach, et al. (2006). Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. *J Ethnopharmacol*, 103(2), 201-7.
24. Uawonggul, N., S. Thammasirirak, et al. (2007). Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon*, 49(1), 19-29.
25. Zhu, S., W. Li, et al. (1999). Molecular cloning and sequencing of two 'short chain' and two 'long chain' K(+) channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *FEBS Lett*, 457(3), 509-14.

26. Zhu, S. and J. Tytgat (2004). The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell Mol Life Sci*, 61(14), 1751-63.
27. Zhu, W. L., K. S. Hahm, et al. (2009). Cell selectivity and mechanism of action of short antimicrobial peptides designed from the cell-penetrating peptide Pep-1. *J Pept Sci*, 15(9), 569-75.