



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย
ในเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*)
**Study of antibacterial peptide
in crocodile (*Crocodylus siamensis*) blood**

โดย รศ.ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ และคณะ

กรกฎาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย
ในเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*)

**Study of antibacterial peptide
in crocodile (*Crocodylus siamensis*) blood**

รศ. ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ และคณะ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญรูป	ข-ช
สารบัญตาราง	ฅ
กิตติกรรมประกาศ	ณ
บทคัดย่อ	ญ-ท
บทนำ	1-20
วิธีดำเนินการวิจัย	21-28
ผลการทดลอง	2-78
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	79-81
เอกสารอ้างอิง	82-84
ภาคผนวก	85-87

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะการดำรงชีวิตในธรรมชาติของจระเข้
รูปที่ 2	โครงสร้างลำดับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของไลโซไซม์
รูปที่ 3	โครงสร้างของเปปไทด์แบบ α -helix
รูปที่ 4	เปรียบเทียบโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (ซ้าย) และแบคทีเรียแกรมลบ(ขวา)
รูปที่ 5	เปรียบเทียบระหว่างส่วนประกอบของฟอสโฟไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i> และ Human erythrocyte ที่ประกอบด้วย Cardiolipin (CL; effectively a dimer of PG), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylcholine (PC), Sphingomyelin (SM) และ Sterols (cholesterol ergosterol,ST) ของ เยื่อหุ้มแต่ละชนิด
รูปที่ 6	แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel -stave (ซ้าย) และแบบจำลอง Carpet (ขวา)
รูปที่ 7	แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel-stave (ซ้าย) และแบบจำลอง toroidal pore (ขวา)
รูปที่ 8	ผลการ screen หาฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของซีรัม และพลาสมา เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นๆจากจระเข้
รูปที่ 9	Elution profile ของการแยกบริสุทธิ์โปรตีน จาก Crude serum ด้วย Q sepharose fast flow anion exchange column (UNO Q1 column, Bio-rad), flow rate 60 ml /hr
รูปที่ 10	Tricine SDS-PAGE ของโปรตีนที่มาจาก Crude serum จากการแยกโดย FPLC
รูปที่ 11	โครมาโตแกรมการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ของ P1 ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ Apollo C18 5u column ขนาด 250 x 4.6 mm บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.1 %TFA และ 60%Acetonitrile ใน 0.1 %TFA flow rate 60 ml/hr
รูปที่ 12	โครมาโตแกรมการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ของ P2 ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ Apollo C18 5u column ขนาด 250 x4.6 mm บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.1 %TFA และ 60% Acetonitrile ใน 0.1 %TFA flow rate 60 ml/hr

	หน้า
รูปที่ 13 โครมาโตแกรมการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ของพลาสมาจระเข้ ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) (A) และการ rechromatogram โดยใช้ Apollo C18 5u column ขนาด 250x4.6 mm บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.1%TFA และ 60% Acetonitrile ใน 0.1%TFA flow rate 60 ml/hr (B)	34
รูปที่ 14 ผลการทำ (A) hydrolyzed peptide no. 2 เปรียบเทียบกับ (B) nonhydrolysis	35
รูปที่ 15 การแยกบริสุทธิ์ active compound จากพลาสมาจระเข้ (a) เปปไทด์ ที่แยกโดย C18-RP-HPLC (b) เปปไทด์ ที่แยกโดย C18-RP-HPLC โดย การ rechromatogram (c) เปปไทด์ที่แยกได้โดย hypercarb™ column HPLC โดยเครื่องหมาย * บอกถึง พิกที่มี antibacterial activity	36
รูปที่ 16 mass spectrum profile ของ peak 6 ลูกศรสีแดง คือ mass ที่จำเพาะที่เลือกไปศึกษาต่อด้วย ESI-MS-MS	37
รูปที่ 17 ESI-MS-MS mass profile ของ แต่ละ precursor mass ที่มาจาก peak 6	38-39
รูปที่ 18 mass spectrum profile ของ peak 10	40
รูปที่ 19 ตัวอย่างการเกิด Clear zone ของเชื้อ <i>Candida albican</i> กับสารสกัดจากเม็ดเลือดขาวจระเข้สาย พันธุ์ไทย	41
รูปที่ 20 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2785, <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Candida albican</i> ของสารสกัดเม็ดเลือดขาว ของจระเข้ (Crude white blood cell extracted)	42
รูปที่ 21 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella typhi</i> B, <i>Salmonella typhi</i> ATCC 5784, <i>Vibrio cholerae</i> ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ (Crude white blood cell extracted) ด้วยเทคนิค Dise diffusion assay	43
รูปที่ 22 ตัวอย่างการเกิด clear zone ในเชื้อ <i>Vibrio cholerae</i> (clinical) ที่ทดสอบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ผ่านความร้อน	44
รูปที่ 23 กราฟแสดง Inhibition zone (mm) ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ (Leukocyte extracts) ที่ผ่าน การให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เปรียบเทียบกับ ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน	44

	หน้า
รูปที่ 24 ตัวอย่างการเกิด clear zone ในเชื้อ <i>Vibrio cholerae</i> (clinical) ที่ทดสอบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรเนส เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ถูกย่อย	45
รูปที่ 25 Elution profile ของการแยกบริสุทธิ์โปรตีน จาก สารสกัดเม็ดเลือดขาว ด้วย Q sepharose fast flow anion exchange column (UNO Q1 column,Bio-rad) flow rate 60 ml /hr	46
รูปที่ 26 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2785, <i>Staphylococcus epidermidis</i> ของ Pooled fraction ที่แยกบริสุทธิ์ได้โดย FPLC จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวจะเข้	47
รูปที่ 27 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella typhi</i> B, <i>Salmonella typhi</i> ATCC 5784 ของ Pooled fraction ที่แยกบริสุทธิ์ได้โดย FPLC จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวจะเข้	47
รูปที่ 28 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Candida albican</i> ของ Pooled fraction ที่แยกบริสุทธิ์ได้โดย FPLC จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวจะเข้	48
รูปที่ 29 ผลการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของสารละลายโปรตีน P1 (lane2), P2 (lane3), P3 (lane4), P4 (lane5) และ Crude white blood cell extracted (lane6) เปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐาน (MK: molecular weight marker protein) (lane1)	49
รูปที่ 30 (A) zymogram refolding gel (15% SDS PAGE+ 0.01 g <i>Micrococcus lisodietikus</i>) (B) 15% SDS PAGE ย้อมด้วย Coomassie brillian Blue	50
รูปที่ 31 Sequence tag (MS/MS) ของแถบโปรตีนหมายเลข 1	51
รูปที่ 32 Sequence tag (MS/MS) ของแถบโปรตีนหมายเลข 2	52
รูปที่ 33 การแยก P1 โดยใช้ Superdex 30 prepสารละลาย	53
รูปที่ 34 การตรวจสอบกิจกรรมการทำลายจุลชีพของสารละลายส่วน B โดยวิธี growth inhibition assay A. เชื้อ <i>S. typhi</i> B. เชื้อ <i>C. albicans</i>	54
รูปที่ 35 แสดงผลการตรวจสอบขนาดของโปรตีนหรือเปปไทด์ ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวหลังแยกผ่าน YM-10 ด้วยเทคนิค Tris-tricine-SDS-PAGE	55

	หน้า
รูปที่ 36 แสดงตัวอย่าง การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ <i>V. cholerae</i> ของสารละลายส่วนล่าง ที่ได้จาก การแยกสารสกัดเม็ดเลือดขาวผ่าน YM-10	56
รูปที่ 37 แสดงตัวอย่าง การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ <i>B. subtilis</i> ของสารละลายส่วนล่าง ที่ได้จาก การแยกสารสกัดเม็ดเลือดขาวผ่าน YM-10	57
รูปที่ 38 แสดงโครมาโตแกรมการแยกบริสุทธิ์ สารสกัดเม็ดเลือดขาว ส่วนล่างหลังผ่าน YM-10 ด้วยใช้เทคนิค RP-HPLC โดยใช้ Apollo C18 column โดยใช้ 0.1% TFA และ 60% Acetonitrile ใน 0.1% TFA อัตราเร็ว 60 ml/hr	57
รูปที่ 39 แสดงค่า Inhibition clear zone ของเปปไทด์ ที่แยกบริสุทธิ์ ได้จาก HPLC ต่อเชื้อ <i>B. subtilis</i> และ <i>V. cholerae</i>	58
รูปที่ 40 แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ <i>V. cholerae</i> ของสารละลายส่วนล่าง ที่ถูกแยกบริสุทธิ์ด้วย เทคนิค RP-HPLC	59
รูปที่ 41 แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ <i>B. subtilis</i> ของสารละลายส่วนล่าง ที่ถูกแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC	59
รูปที่ 42 การแยกสารละลายส่วน B โดยใช้คอลัมน์รีเวอร์เฟสชนิดซี 18 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ A: 0.1% Trifluoro acetic acid (0.1% TFA) สารละลายเฟสเคลื่อนที่ B: 60% Acetonitrile ใน 0.1% TFA	60
รูปที่ 43 จำนวนโคโลนีและ % การรอดของ <i>S. epidermidis</i> เมื่อป่มกับ Leucrocine I และ Leucrocine II <i>S. epidermidis</i> ป่มกับ Leucrocine I และ Leucrocine II โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร, ตัวควบคุมเชิงบวกใช้ 70% เอทานอล ตัวควบคุมเชิงลบใช้ บัฟเฟอร์ฟอสเฟส pH 7.4 ที่มี 5% กลูโคส	62
รูปที่ 44 จำนวนโคโลนีและ % การรอดของ <i>S. typhi</i> เมื่อป่มกับ Leucrocine I และ Leucrocine II , <i>S. typhi</i> ป่มกับ Leucrocine I และ Leucrocine II โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร, ตัวควบคุมเชิงบวกใช้ 70% เอทานอล ตัวควบคุมเชิงลบใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟส pH 7.4 ที่มี 5% กลูโคส	63
รูปที่ 45 จำนวนโคโลนีและ % การรอดของ <i>V. cholerae</i> เมื่อป่มกับ Leucrocine III และ Leucrocine IV <i>V. cholerae</i> ป่มกับ Leucrocine III และ Leucrocine IV โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 19.7 ไมโครกรัม/มิลลิตร และ 12.34 ไมโครกรัม/มิลลิตร ตามลำดับ, ตัวควบคุมเชิงบวกใช้ 70% เอทานอล ตัวควบคุมเชิงลบใช้ บัฟเฟอร์ฟอสเฟส pH 7.4 ที่มี 5% กลูโคส	64

	หน้า
รูปที่ 46 ความเป็นพิษของ Leucrocine I และ Leucrocine II ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ ชุดควบคุมเชิงบวก: 1% Triton X-100; ชุดควบคุมเชิงลบ: ฟอสเฟสบัฟเฟอร์	65
รูปที่ 47 ความเป็นพิษของ Leucrocine III และ Leucrocine IV ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ ชุดควบคุมเชิงบวก: 1% Triton X-100; ชุดควบคุมเชิงลบ: บัฟเฟอร์ฟอสเฟส	65
รูปที่ 48 ผลของเซลล์ <i>S. epidermidis</i> เมื่อป้อนกับ Leucrocine I และ Leucrocine II แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้ป้อนกับ Leucrocines ที่เวลา 1 ชั่วโมง (A); แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้ป้อนกับ Leucrocines ที่เวลา 2 ชั่วโมง (B); แบคทีเรียปกติที่ป้อนกับ Leucrocine I (40 µg/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (C); แบคทีเรียปกติที่ป้อนกับ Leucrocine I (40 µg/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (D); แบคทีเรียปกติที่ป้อนกับ Leucrocine II (80 µg/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (E); แบคทีเรียปกติที่ป้อนกับ Leucrocine II (80 µg/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (F)	66
รูปที่ 49 ผลของเซลล์ <i>S. typhi</i> เมื่อป้อนกับ Leucrocine I และ Leucrocine II แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้ป้อนกับ Leucrocines ที่เวลา 1 ชั่วโมง (A); แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้ป้อนกับ Leucrocines ที่เวลา 2 ชั่วโมง (B); แบคทีเรียปกติที่ป้อนกับ Leucrocine I (40 µg/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (C); แบคทีเรียปกติที่ป้อนกับ Leucrocine I (40 µg/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (D); แบคทีเรียปกติที่ป้อนกับ Leucrocine II (80 µg/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (E); แบคทีเรียปกติที่ป้อนกับ Leucrocine II (80 µg/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (F)	67
รูปที่ 50 ผลของ antibacterial agent (Crococin) จากพลาสมากระเซ้ ต่อเซลล์แบคทีเรีย <i>S. aureus</i> (a—d) และ <i>S. typhi</i> (e—f); Negative control cell (a, e); ทดสอบกับพลาสมา (b, f); ทดสอบกับส่วน YM-3 (c, g); ทดสอบกับ crococin (d, h) ภายในเวลา 120 นาที	68
รูปที่ 51 ผลของส่วน YM-3 ที่แยกได้จากพลาสมากระเซ้ต่อ <i>S. typhi</i> . ; บ่มรวมกัน 60 นาที (a); บ่มรวมกัน 90 นาที (b); บ่มรวมกัน 120 นาที (c); บ่มรวมกัน 180 นาที (d)	69
รูปที่ 52 ผลของ antibacterial agent จากส่วนของซีรัมต่อ <i>S. aureus</i> (ซ้าย); <i>S. typhi</i> (ขวา); แบคทีเรีย ทดสอบกับ PBS (a และ b); แบคทีเรียทดสอบกับซีรัม (c และ d); แบคทีเรียทดสอบกับ Hp18 (e และ f); แบคทีเรียทดสอบกับ Hp31 (g และ h)	70

	หน้า
รูปที่ 53 การเกิด permeabilization เมมเบรนชั้นนอกของ <i>S. typhi</i> ATCC 5784 Leucrocine I 125 µg/ml, streptomycin 20 µg/ml, Leucrocine II 3.3 µg/ml	71
รูปที่ 54 การเกิด permeabilization เมมเบรนชั้นนอกของ <i>V. cholerae</i> Leucrocine III 82.5 µg/ml, streptomycin 20 µg/ml, Leucrocine IV 105 µg/ml	71
รูปที่ 55 การเกิด permeabilization แบบจำลองเมมเบรนชั้นในของ <i>V. cholerae</i>	72
รูปที่ 56 ปริมาณของ DNA/RNA ของ <i>S. epidermidis</i> เมื่อป้อนกับ Leucrocins ตัวควบคุมเชิงบวก: 70% เอทานอล, ตัวควบคุมเชิงลบ: 10 mM บัฟเฟอร์ฟอสเฟส pH 7.4, Leucrocine I (0.99 µg/ml) Leucrocine II (92.4 µg/ml), Leucrocine III (89.9 µg/ml), Leucrocine IV (87.4 µg/ml)	73
รูปที่ 57 LC/MS/MS ของ Leucrocine I	75
รูปที่ 58 LC/MS/MS ของ precursor mass 806.99 (Leucrocine I)	76
รูปที่ 59 LC/MS/MS ของ Leucrocine II	77
รูปที่ 60 LC/MS/MS ของ precursor mass 956.37 (Leucrocine II)	78

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 โปรตีนและเปปไทด์ต่างๆที่ทดลองทางคลินิก	2
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของเนื้อจระเข้กับเนื้อสัตว์ชนิดต่าง ๆ	7
ตารางที่ 3 เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็น Cationic antimicrobial peptides	11
ตารางที่ 4 เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็น Anionic antimicrobial peptides	12
ตารางที่ 5 แสดง antimicrobial peptide ในกลุ่ม α -helical และ α -sheet	15
ตารางที่ 6 Time program ของเครื่อง FPLC แยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค DEAE Anion exchange column chromatography (UNO Q1)	23
ตารางที่ 7 Time program ของเครื่อง HPLC แยกบริสุทธิ์เปปไทด์ด้วย Apollo C18 5u column ขนาด 250x4.6 mm column	24
ตารางที่ 8 สรุปผลทดสอบความสามารถด้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด ของเปปไทด์ ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)	32
ตารางที่ 9 น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของเปปไทด์ p14.1, p15.9 และ p51.1	33
ตารางที่ 10 ผลการย่อย crocosin และ heat treatment ของ crocosin ต่อเชื้อ S. typhi.	41
ตารางที่ 11 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Mass spectrometry	50
ตารางที่ 12 ผลการตรวจสอบชนิดโปรตีนโดยวิธี sequence tag (MS/MS)	51
ตารางที่ 13 แสดง Antimicrobial activity ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวหลังผ่าน YM-10 ต่อเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion assay	56
ตารางที่ 14 แสดงผลของการทดสอบ Antimicrobial activity ของสารสกัดเม็ดเลือดขาว หลังแยกบริสุทธิ์โดย HPLC ต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้วิธี Disc diffusion assay	58
ตารางที่ 15 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ Leucrocins ในการทำลายจุลชีพ	61
ตารางที่ 16 ค่า % nmol และปริมาณ residues ของกรดอะมิโนแต่ละชนิด ที่มีอยู่ในเส้นเปปไทด์ Leucrocins I และ Leucrocins II	73
ตารางที่ 17 ลำดับกรดอะมิโนของ Leucrocins I and II โดยวิธี De novo sequencing LC MS/MS	78

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กลุ่มวิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น บริษัทศรีราชาโมด้า จำกัด ที่ให้เลือดตัวอย่างในการทดลอง

บทคัดย่อ

การที่แบคทีเรียมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน กำลังเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว นักวิทยาศาสตร์จึงต้องหาสารทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ จะเข้เป็นสัตว์ที่มักจะเกิดบาดเจ็บได้ง่าย แม้ว่าจะเข้จะอาศัยอยู่ในแหล่งที่อุดมด้วยจุลชีพก่อโรค แต่ผลของจะเข้กลับหายได้อย่างรวดเร็วและแทบไม่มีการติดเชื้อ ในการศึกษานี้ได้แยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากเลือดจะเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยแยกสารจากส่วนซีรัม พลาสมา และสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจะเข้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากนั้นศึกษาโครงสร้างหน้าที่และกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้โดยจะแยกกล่าวที่ละส่วน

ในส่วนซีรัมจะเข้ได้ใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบ เจลฟิวเทรชัน และ reverse phase -HPLC แยกสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อได้จำนวนทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ p14.1, p15.9, p17.9, p31.0, p36.1 และ p51.2 ซึ่งมีความสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี mass spectrometry พบว่า p14.1, p15.9 และ p51.1 มีขนาดเล็กกว่า 1 กิโลดาลตัน โดยสารที่แยกได้กลุ่มนี้มีค่า MIC ประมาณ 15.46 µg/ml and 33.97 µg/ml จากการศึกษากลไกการทำลายเชื้อของสารที่แยกโดย SEM พบว่าเมมเบรนของแบคทีเรีน่าจะ target ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย

ในส่วนของพลาสมาได้ทำการแยกบริสุทธิ์สารทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Crococin) ของเลือดจะเข้ โดยวิธีการแยกด้วยเมมเบรนแยกขนาด วิธี reverse phase-HPLC และคอลัมน์ HypercarbTM พบว่า Crococin สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ Crococin โดยการหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายหมู่อะมิโน พบว่า Crococin มีลำดับกรดอะมิโน 2 ตัวแรกเป็น อะลานีน และ โกลซีน และจากการวิเคราะห์โดยวิธี ESI-MS/MS พบลักษณะการซ้ำๆของสเปกตรามวลขนาด 94 และ 136 ดาลตัน ซึ่งมวลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับมวลของกรดอะมิโนตัวใด และ Crococin สามารถทนต่อความร้อนและทนต่อการย่อยของเอนไซม์โปรเนส ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า Crococin อาจไม่ใช่เปปไทด์ แต่อาจเป็นอนุพันธ์ของเปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนรวมอยู่กับสารประกอบที่มีมวลโมเลกุล 94 และ 136 ดาลตัน การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่งกราด พบว่า สารทำลายเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนของซีรัมและพลาสมาของจะเข้ ทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยการเข้าไปในส่วนไฮโดรพาสซึมของแบคทีเรียแล้วทำให้เมมเบรนของแบคทีเรียแตกหรือถูกทำลายในที่สุด

และสำหรับในสารสกัดเม็ดเลือดขาวจะเข้ ในการศึกษาได้แยกบริสุทธิ์เปปไทด์ด้วย HPLC จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 30 ชนิดและกลไกการเข้าทำลายเชื้อของเปปไทด์ที่แยกได้พร้อมกับศึกษาโครงสร้างของเปปไทด์โดยเทคนิค LC-MS-MS ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 8 ชนิด ได้แก่

Staphylococcus. epidermidis, *Bacillus. megaterium*, *B. licheniformis* TISTR 1010, *Pseudomonas. aeruginosa*, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella. typhi*, *S. typhi* ATCC 5784, *Vibrio. cholerae* และเชื้อรา 1 ชนิด ได้แก่ *Candida. albicans* จากนั้นแยกบริสุทธิ์สารสกัดเม็ดเลือดขาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ พบโปรตีน 4 กลุ่มเป็นองค์ประกอบ นั่นคือ P1, P2, P3 และ P4 โดยโปรตีน P1 และ P3 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis*, *S. typhi* และ *C. albicans* ได้ จากการศึกษโดย Zymogram refolding gel และ Western immunoblotting พบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวและ P1 มีโปรตีนขนาด 14 kDa ที่จับกันอย่างอ่อนๆกับ anti hen egg white lysozyme antibody จากนั้นทำการแยกส่วนของเปปไทด์ด้วยคอลัมน์ gel filtration และนำส่วนของเปปไทด์ มาแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ C18 reverse phase HPLC ซึ่งพบเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 10 เส้นแต่มีเฉพาะ Leucrocin I, II, III และ IV ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ โดย Leucrocin I, II, III และ IV มีคุณสมบัติในการฆ่า (Microbicidal activity) เซลล์แบคทีเรียได้แต่ก็มีความแตกต่างกันและมีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (HRBCs) แตกต่างกัน เมื่อศึกษาวิธีการทำลายเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเปปไทด์ Leucrocin I และ II เข้าไปทำลายเซลล์แบคทีเรียในส่วนเมมเบรนชั้นใน ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกเสียหายและ/หรือตายในที่สุด นั้นแสดงว่าเป้าหมายของเปปไทด์อยู่ที่เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย จึงทำการศึกษาวิธีการเข้าทำลายเซลล์เมมเบรนชั้นนอกของเชื้อ *S. typhi* (Leucrocin I และ II) และ *V. cholerae* (Leucrocin III และ IV) โดยการวัดค่าการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นของสาร N-phenylnaphtylamine พบว่าเปปไทด์ ทั้งสองกลุ่มสามารถทำลายส่วนเมมเบรนชั้นนอกของเชื้อที่นำมาทดสอบได้โดยดูจากค่า fluorescence intensity ที่เพิ่มสูงขึ้น และได้ทำการวัดการแตกของเซลล์โดยการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 260 nm พบว่าเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ถูกทำให้แตกด้วยเปปไทด์ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ จากการศึกษโครงสร้างปฏิกิริยาโดยวิธี LC-MS-MS พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ Leucrocin I คือ NGVQPKY และ Leucrocin II คือ NAGS_LSGWG จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดไม่เหมือนกับเปปไทด์ใดๆในฐานข้อมูลจากการศึกษาทั้งส่วนโครงสร้างและกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรีย พบว่างานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่พบว่าในสารสกัดเม็ดเลือดขาวมี antimicrobial peptides ที่มีกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยไปรบกวนการผ่านเข้าออกของสารบริเวณเมมเบรนของแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้เป็นยา

คำสำคัญ : สัตว์เลี้ยงคลาน; จระเข้; สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย; โปรตีนและเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Abstracts

The rapid emergence of antibiotic-resistant bacterial pathogens is a serious problem and extensive efforts have been focused on the development of new classes of antimicrobial agents. Antimicrobial proteins and peptides are one group of antimicrobial agents which are phylogenetically ancient constituents of host defense and are expressed by immune and non-immune cells of invertebrates and vertebrates. These confer considerable potential for their development as novel therapeutic agents to overcome the resistance problem. Crocodilians live in the environment with high risk of bacterial infection but they normally suffer no adverse effects. They are not totally immune to microbial infection, but their resistance thereto is remarkably effective. In this study the blood of freshwater Siamese crocodile was investigated and antimicrobial compound has been identified. The structure and function and their killing mechanism was explored.

Antibacterial agents were purified from Siamese crocodile serum by anion exchange, gel filtration and reversed phase HPLC. Six antibacterial agents designed as p14.1, p15.9, p17.9, p31.0, p36.1 and p51.2 were purified and proved to carry the activity against *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae*. The mass analysis of MALDI-TOF for antibacterial agent of p14.1, p15.9 and p51.1 revealed that they are small molecule with a molecular mass less than 1 kDa. The partially purified agents achieved by gel filtration exhibits the broad activity against seven selected bacterial strains and the geometric means of the minimal inhibitory concentration are 15.46 $\mu\text{g/ml}$ and 33.97 $\mu\text{g/ml}$. The scanning electron microscopy demonstrated that these agents have targeted at the bacterial membrane and they act like as the antimicrobial peptide. The antibacterial agent in the serum may represent the first line of an immune system in a freshwater crocodile.

An antibacterial compound from crocodile plasma was partially purified and functional characterised. The freshwater crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma with antibacterial activity were partially purified by using a centrifugal concentrator and reverse phase HPLC, and designated as crocosin. Crocosin exhibits antibacterial activity towards *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. Crocosin is thermostable and resistant to pronase digestion. The structure of crocosin analysed by mass spectrometry contains repeating units of 94 and 136 m/z and contain Ala and Gly at it N-terminal. Scanning electron microscopy indicates that crocosin probably penetrates

progressively into cytoplasm space, perturbing and damaging bacterial membranes. Crocosin may provide an early defence mechanism toward bacterial infection in fresh water.

In the same manner, the antimicrobial properties of leukocyte extracts of freshwater crocodiles (*Crocodylus siamensis*) were studied. Chromatography technique was used for the purification of the leukocyte extracts. Then, the mechanisms for destroying microorganism of peptides were studied using LC-MS-MS techniques. Results of the study indicated that the leukocyte extracts were able to destroy 8 bacteria; *Staphylococcus. epidermidis*, *Bacillus. megaterium*, *B. licheniformis* TISTR 1010, *Pseudomonas. aeruginosa*, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella. typhi*, *S. typhi* ATCC 5784, *Vibrio. cholerae*, and a kind of fungus; *Candida. albicans*, after testing with 30 species of microorganism. Further more, the leukocyte extracts were purified by using column chromatography. Four protein groups were obtained; P1, P2, P3 and P4. The study found that P1 and P3 proteins were able to inhibit *S. epidermidis*, *S. typhi* and *C. albicans*. Results from zymogram refolding gel and western immunoblotting indicated that the leukocyte extracts contained the proteins size of around 14 kDa that had weak interaction with anti hen egg white lysozyme antibody. Gel filtration was performed to separate the peptides, and Reverse phase high performance liquid column chromatography was done to purify the peptides. Results indicated that 10 peptides could be separated. Four peptides (Leucrocine I-IV) showed antibacterial activity against *S. epidermidis*, *V. cholerae*, *S. typhi* and *C. albicans*. Leucrocine I, II, III and IV exhibited different properties in antimicrobial activity, and different toxicity to human red blood cells. Electron microscopic study indicated that peptides leucrocine I and II destroyed inner membrane of bacterial cells, resulting in lysis or death of bacterial cells. Thus, the target site of peptide action is at the membrane of bacterial cells. Further, the permeabilization of outer membrane of *S. typhi* (Leucrocine I and II) and *V. cholerae* (Leucrocine III and IV) was studied by using detection of the increasing intensity of fluorescence of N-phenyl-1-naphthylamine. Results showed that both peptide present the permeabilization of outer membrane of the bacterial cell tested, measured by the increasing of fluorescence intensity. Measurement of cell lyses performed by measuring DNA concentration at 260 nm showed that *S. epidermidis* could be lysed by the peptides tested. The study of primary structures of peptides using LC-MS-MS showed that amino acid sequence of Leucrocine I contain NGVQPKY; and Leucrocine II contain

NAGS_LSGWG. Sequence alignment analysis showed no homology to any proteins or polypeptides in data base.

This is the first study to report the antimicrobial peptides in the leukocyte of Siamese crocodiles of both the structure and antibacterial mechanism. These peptides are able to destroy bacteria by perturbing the permeabilization of bacterial cell membrane. However, further studies are needed to define the structure of crocosin and leucrocins to examine possibility as a lead compound for development of novel antimicrobials.

keywords : reptile, crocodile, antimicrobial agent, antimicrobial protein, antimicrobial peptide

Project Code : RMU 4980014

(รหัสโครงการ)

Project Title : Study of antibacterial peptide in crocodile (*Crocodylus siamensis*) blood

(ชื่อโครงการ) การศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย

(*Crocodylus siamensis*)

Investigator : รศ. ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ และคณะ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

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

Project Period : 20 ก.ค. 2549 - 19 ก.ค. 2552

(ระยะเวลาโครงการ)

บทนำ

การรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อที่มาจากจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืชนั้นทำการรักษาด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อฆ่าเชื้อโรคนั้นกำลังประสบกับปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งสันนิษฐานว่าสาเหตุสำคัญที่เชื้อก่อโรคในมนุษย์เกิดการดื้อยามาจากพฤติกรรมของมนุษย์กล่าวคือ เมื่อเกิดอาการป่วยมักซื้อยามารับประทานเองโดยไม่มีความรู้เกี่ยวกับเชื้อโรคนั้นอย่างแท้จริง ซึ่งอาจทำให้ใช้ยาไม่ถูกต้องกับโรค ขนาดไม่เหมาะสม ใช้ยาไม่ครบ และรับประทานไม่ต่อเนื่อง ทำให้เชื้อก่อโรคสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อยาชนิดนั้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคลดลง จนกระทั่งไม่สามารถที่จะใช้ยาตัวเดิมในการรักษาได้ และนอกจากนี้บางรายก็เกิดอาการแพ้ยาที่ใช้ในการรักษาด้วย จากที่กล่าวข้างต้นถือได้ว่าการดื้อยาของเชื้อก่อโรคเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งของประเทศไทยและของทั้งโลก นอกจากนี้ในด้านการแพทย์ยังมีแบคทีเรียที่มักจะแสดงอาการซ้ำหลังจากมีการติดเชื้อแบคทีเรียพวกนี้ซึ่งมักก่อให้เกิดการติดเชื้อหลังการผ่าตัด หรือภายหลังการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดปัญหาอย่างมากต่อการรักษาคนไข้ และในทางการเกษตรยังมีแบคทีเรียหรือเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชเช่นกันด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามค้นหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคที่ไม่ก่อให้เกิดการดื้อยาหรือเกิดขึ้นได้ซ้ำ ไม่ว่าจะเป็นการตรวจหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือการสกัดสารที่ได้จากสัตว์ หรือสารชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่เหมือนหรือให้ประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อก่อโรคเช่นเดียวหรือใกล้เคียงกันกับการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อหลีกเลี่ยงหรือลดปัญหาการดื้อยาที่จะเกิดตามมา

มีงานวิจัยมากมายที่มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มโปรตีนและเปปไทด์จากสิ่งมีชีวิตตั้งแต่พวกโปรคาริโอตจนกระทั่งถึงพวกยูคาริโอต พืช สัตว์ และมนุษย์ ในปัจจุบันได้มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพถึงระดับของโครงสร้าง ส่วนประกอบของโมเลกุล กลไกการทำลายหรือการต้านเชื้อ และสารบางกลุ่มก็ได้มีการนำมาใช้ ใน clinical trial ถึงเฟส3 แล้วเช่น Indolicidin, defensin สำหรับความเป็นไปได้ในด้านเชิงพาณิชย์ ในปัจจุบันพบว่าในต่างประเทศมีการศึกษาหรือนำสารโปรตีนและเปปไทด์ต่างๆไปทดลองทางคลินิกเรียบร้อยแล้วดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โพรตีนและเปปไทด์ต่างๆที่ทดลองทางคลินิก

Synthetic compound	Company	AMP type (Species)	Clinical trial outcomes	Planned clinical trials
Pexiganan (MSI-78)	Genaera Plymouth Meeting, PA (formerly Magainin Pharmaceutical Inc.)	Magainin 2 (<i>Xenopus</i> frog)	No advantage over conventional antibiotics in a Phase III trial for topical Rx of diabetic foot ulcers. Failed to gain FDA approval.	None.
Iseiganan (IB-367)	Intrabiotics Pharmaceuticals, Inc. Mountainview, CA	Protegrin (Pig)	Failed two Phase III trials as mouthrinse for stomatitis in highrisk patients. Failed Phase III trial as aerosolized Rx in ventilator-associated pneumonia.	Phase IIa trial as aerosolized Rx for CF patients with chronic respiratory infections.
Omiganan (MBI-226)	Microbiologix Biotech Vancouver, BC	Indolicidin (Bovine)	Failed Phase III trial as topical Rx to prevent or reduce venous catheter-related bloodstream infections.	Repeat Phase III trial to confirm reduction in catheter colonization and local infections under consideration.
MBI 594AN	Microbiologix Biotech Vancouver, BC, Canada	Indolicidin (Bovine)	Phase IIb trial showed efficacy as topical Rx for acne.	Phase III trial.
P113 P113D	Demegen, Pittsburgh, PA Dow Pharmaceutical Sciences, Patuloma, CA	Histatins (Human)	Completed Phase II trial as mouthrinse for oral candidiasis in HIV patients.	Inhalation Rx for <i>Pseudomonas</i> infections in CF patients under consideration.
XMP.629	Xoma (US) Berkeley, CA	BPI (Human)	Failed Phase III trial as topical Rx for acne.	None at present time.
Neuprex (rBPI21)	Xoma (US) Berkeley, CA	BPI (Human)	Failed Phase III trial as adjunctive parenteral Rx to reduce mortality in pediatric meningococemia.	Planned Phase I/II trial to reduce inflammatory complications in pediatric open heart-surgery patients.

ที่มา: Y, Gerold Gardon, Eric G. Romonoski and Alison M macdermot, 2005 Eye Current Research.

แต่ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน เช่น จระเข้ มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยมาก ทั้งที่จระเข้เป็นสัตว์ที่มีความทนทานอย่างมากต่อการติดเชื้อโดยจะเห็นได้จากการที่จระเข้สามารถอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีเชื้อโรคจำนวนมาก หรือเมื่อจระเข้เกิดบาดแผลจากการต่อสู้กันเอง แผลที่เกิดขึ้นก็สามารถหายสนิทได้เองโดยไม่มีการติดเชื้อ ทำให้ไม่มีปัญหาของการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราเช่น เชื้อรา ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจระเข้มีการสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์ หรือมีระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติชนิดพิเศษที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง จระเข้เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ถึงแม้ว่าจะยังไม่ได้อยู่ในอันดับต้นๆ ของสัตว์เศรษฐกิจส่งออกอย่างเช่น กุ้งกุลาดำหรือสัตว์น้ำอื่นๆ แต่ก็สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยได้ไม่น้อย ในปัจจุบันประเทศไทยถือว่าค่อนข้างประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงจระเข้ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ อย่างไรก็ตาม ในตลาดอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้นั้น การส่งออกผลิตภัณฑ์หนังจระเข้มีตลาดทางยุโรปและอเมริกาเป็นหลักแต่ในปัจจุบันก็มีปัญหาด้านการแข่งขันและการกีดกันทางการค้าค่อนข้างสูง พบว่าประเทศจีนเป็นตลาดหลักการส่งออกผลิตภัณฑ์หนังและเนื้อจระเข้ ซึ่งถือได้ว่าเป็นการแปรรูปหลักแต่ส่วนอื่นที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะในเลือดหรือส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำเลือดของจระเข้ ซึ่งถือว่าเป็นผลผลิตที่มาจากการแปรรูปอีกอย่างหนึ่งที่มีมากเกินพอ และยังมีการศึกษาหรือนำประโยชน์ไปใช้น้อยมาก

โดยพบว่าแพทย์แผนโบราณมีการนำซีรัมโปรตีนจากเลือดจระเข้ไปใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆได้

จระเข้ (Crocodile) เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งยังคงดำรงชีวิตอยู่ในโลกปัจจุบันอยู่ในอันดับ โคร โคดีเลีย (Crocodylia) มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ซึ่งส่วนมากจะพิจารณาจากรูปร่างลักษณะทั้งจากลักษณะทั้งตัว และความแตกต่างของบางส่วนโดยเฉพาะ เช่น จากรูปร่างของปาก จากเกล็ดบนหัว และคอ ความแตกต่างของฟัน เป็นต้น ลักษณะทั่วไปของจระเข้ทุกประเภทคือ มีปากและหัวยาว รุงrug และตา ยกสูงอยู่บนหัว คอสั้น ลำตัวยาวกลม มีเกล็ดบนคอและหลัง เกล็ดต้องเป็นแผ่นแบน หางยาวใหญ่และแข็งแรง มีเกล็ดเป็นแผ่นใหญ่ตั้งสูงบนสันหาง หางแบนทางด้านข้าง ขาสั้นทั้งขาหน้าและขาหลัง นิ้วตีนสั้นทั้งตีนหน้าและตีนหลัง ลิ้นไม่สามารถแลบออกจากปากได้ เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่ต้องใช้ชีวิตอยู่ใต้น้ำ



รูปที่ 1 ลักษณะการดำรงชีวิตในธรรมชาติของจระเข้

จระเข้ น้ำจืดหรือจระเข้พันธุ์ไทย (Freshwater or Siamese Crocodile, *Crocodylus siamensis*)

ถิ่นกำเนิด : เวียดนาม เขมร ลาว ไทย กะลิมันตัน ชวา และมีในสุมาตรา

ลักษณะ : เป็นจระเข้ขนาดปานกลาง ค่อนมาทางใหญ่ (3-4 เมตร) มีเกล็ดท้ายทอย

ชีววิทยา : จระเข้ถึงวัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุ 10-12 ปี

- วางไข่ครั้งละ 20-48 ฟอง

- ระยะเวลาฟักไข่นาน 68-85 วัน เกล็ดยาว 80 วัน

การสืบพันธุ์ของจระเข้

จระเข้เพศเมีย อวัยวะสืบพันธุ์ แบ่งได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ

1. รังไข่

รังไข่จะมีจำนวน 2 อัน รูปร่างรีและแบนสีขาว เนื้อค่อนข้างแน่นแข็ง ติดอยู่กับไตทั้ง 2 ข้าง โดยแขวนลอยใต้กระดูกสันหลังส่วนเอว เมื่ออยู่ในฤดูผสมพันธุ์ รังไข่จะขยายตัวและมีถุงไข่อ่อนอยู่บนผิวเป็นจำนวนมาก

2. ท่อนำไข่

ท่อนำไข่ของจระเข้ ได้แก่ ส่วนที่เห็นเป็นท่อแบนๆ รูปตัววาย (Y) แยกเป็น 2 ปีกถัดจากรังไข่ทั้งสองข้าง ท่อนำไข่จะเปิดออกสู่บริเวณช่องขับถ่ายร่วม ด้านล่างของลำตัวตรงตำแหน่งโคนหางของจระเข้

จระเข้เพศผู้ อวัยวะสืบพันธุ์ แบ่งได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ คือ

1. อัณฑะ

อัณฑะของจระเข้มีจำนวน 2 อัน อยู่ในช่องท้องบริเวณใกล้กับไตซึ่งติดอยู่ด้านหลัง มีหน้าที่ผลิตน้ำเชื้อ (อสุจิ)

2. ท่อนำน้ำเชื้อ

เป็นท่อที่ต่อจากอัณฑะมายังอวัยวะเพศในช่องขับถ่ายร่วม ทำหน้าที่เป็นทางขนส่งน้ำเชื้อจากอัณฑะเพื่อออกผ่านทางอวัยวะเพศขณะผสมพันธุ์

3. อวัยวะเพศผู้

มีลักษณะเป็นแท่งยาวปลายแหลมขยายออกเล็กน้อย โดยมีรอยคอดก่อนถึงส่วนขยาย มีร่องเปิดด้านบน เพื่อให้ น้ำเชื้อซึ่งผ่านมาจากท่อนำน้ำเชื้อไหลออกขณะทำการผสมพันธุ์ โดยปกติแล้วอวัยวะเพศผู้จะพับซ่อนตัวอยู่ในช่องขับถ่ายร่วม และจะโผล่ออกมาเมื่อถึงเวลาผสมพันธุ์เท่านั้น

สรีรวิทยาการสืบพันธุ์

จระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย มีฤดูผสมพันธุ์ราวเดือนพฤศจิกายน โดยจระเข้เพศเมียจะถึงวัยเจริญพันธุ์ที่อายุระหว่าง 7 ถึง 11 ปี (เฉลี่ยราว 9-10 ปี) ทั้งนี้มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์คือ รังไข่ก่อนถึงฤดูผสมพันธุ์จะมีการสร้างไข่ซึ่งอยู่ภายในถุงไข่ ขึ้นเป็นเม็ดกลมๆ จำนวนมากบนรังไข่ทำให้ดูว่ารังไข่เหมือนพวงองุ่น เริ่มขยายตัวและมีไข่เกิดขึ้นประมาณ 8-12 ฟองต่อหนึ่งข้าง เมื่อจระเข้ทำการผสมพันธุ์กันแล้วไข่ที่ตกจากรังไข่ลงมาอยู่ในท่อนำไข่ซึ่ง ณ จุดนี้ เชื้อจากจระเข้เพศผู้ที่เข้ามาผ่านทางอวัยวะเพศของตัวเมียเคลื่อนเข้าสู่ท่อนำไข่ทั้งสองข้าง ทันทีที่ไข่สุกตกมาพบตัวเชื้อก็จะเกิดการปฏิสนธิขึ้น ซึ่งไข่ที่ผสมแล้วเหล่านี้จะคงอยู่ในท่อนำไข่ทั้งซ้ายขวาตลอดไปจนถึงระยะเวลาวางไข่ จากนั้นจะมีการพัฒนาไข่ขาวออกมาห่อหุ้มไข่และในระยะสุดท้ายจึงมีการพัฒนาเปลือกไข่ห่อหุ้มชั้นนอกสุด ขณะเดียวกันตัวอ่อนของจระเข้ก็เริ่มมีการพัฒนาตัวโดยการแบ่งเซลล์ขึ้นมา จากการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อของจระเข้เพศผู้สามารถเข้าไปรอกการตกไข่ของตัวเมียในรังไข่ได้นานตั้งแต่ 1 เดือน ถึง 1 เดือนครึ่ง แม่จระเข้ที่ดั่งท้องแล้วจะเริ่มหาและทำการพูนดินตลอดจนวัสดุต่างๆ เป็นรัง โดยจะวางไข่ประมาณเดือนมีนาคม และเดือนเมษายน ทันทีที่ไข่

ออกมาจากตัวแม่จะแข็งแล้ว ตัวอ่อนภายในไข่จะขยับตำแหน่งมาอยู่บริเวณที่สูงสุดหรือเหนือสุดของไข่แดง ไม่จมอยู่ด้านล่างหรือทางต่ำ ซึ่งจะคงอยู่ ณ ตำแหน่งนี้ตลอดไป ขณะที่ฟักไข่นั้นจะไม่มีการขยับตัวเลย ไข่จะแข็งที่ออกมาใหม่ๆ จะมีเปลือกที่ค่อนข้างโปร่งแสง แต่ภายในวันเดียวจะพบว่ามีการเคลือบผิวที่ทึบแสงผ่านบริเวณเหนือตำแหน่งที่ตัวอ่อนอยู่แล้วค่อยๆ ขยายวงกว้างออกเป็นแนวโอบลงมา 2 ข้างของไข่ ระยะก่อนฟักออกเป็นตัวเปลือกจะค่อนข้างบางลงกว่าเดิม ทั้งนี้เนื่องจากการดึงแคลเซียมจากเปลือกไข่ไปใช้พัฒนาโครงสร้างของจะไข่ ด้วยสาเหตุนี้ลูกจะไข่จึงสามารถเจาะเปลือกไข่ออกมาได้ง่ายขึ้น และก็ยังมียาช่วยเจาะเปลือกอีกอันหนึ่งซึ่งเรียกว่า "ฟีนเจาไข่" เป็นยาช่วยที่ออกออกมาจากผิวหนังบริเวณเหนือปาก ใช้เจาะเปลือกไข่ให้เบรจ จากนั้นยาก็จะหายไปภายในภายหลัง

การกำหนดเพศของจะไข่

จะไข่เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีการกำหนดเพศในระยะเป็นตัวอ่อนด้วยอุณหภูมิ จากการทดลองและวิจัยพบว่า ถ้าอุณหภูมิฟักไข่ที่ 30 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า ลูกจะไข่ที่ออกมาส่วนใหญ่จะเป็นเพศเมีย หากอยู่ระหว่าง 32 ถึง 33 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่จะเป็นเพศผู้ แต่ถ้าประมาณ 31 องศาเซลเซียสแล้ว ปริมาณลูกจะไข่ที่ออกมาจะมีสัดส่วนเพศผู้และเพศเมียเท่าๆ กัน

โรคของจะไข่

โรคในจะไข่พอจะแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ โรคไม่ติดเชื้อ และโรคติดเชื้อ โรคไม่ติดเชื้อเกิดได้จากสาเหตุดังต่อไปนี้

สิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม

1.1 อุณหภูมิ จะไข่จำเป็นต้องใช้แหล่งพลังงานความร้อนจากภายนอก คือ แสงแดด ในการเพิ่มอุณหภูมิให้แก่ร่างกาย เช่น นอนอาบแดด ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมสบายตัวกับจะไข่จะอยู่ระหว่าง 32 องศาเซลเซียส สำหรับจะไข่ขนาดเล็ก และ 30 องศาเซลเซียส สำหรับจะไข่ขนาดใหญ่

1.2 คุณภาพของน้ำ น้ำที่เหมาะสมสำหรับจะไข่ที่สุดคือ น้ำสะอาด มีปริมาณแอมโมเนียต่ำ สิ่งปนื้อ สารพิษ หรือสิ่งปลอมปนอื่น ๆ ต้องมีน้อยที่สุด แหล่งน้ำเสียจะเป็นแหล่งสะสมของเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายซึ่งทำให้มีแอมโมเนียสูงขึ้น จะเกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและตาจะไข่เป็นอย่างมาก โอกาสติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนที่มีอยู่อย่างมากในแหล่งน้ำจึงมีสูง การจะให้น้ำสะอาดอยู่เสมอมิควรจะต้องมีการถ่ายน้ำให้บ่อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ ทั้งนี้จำเป็นต้องได้รับการตรวจคุณภาพน้ำอยู่เป็นระยะ ๆ บางแห่งเปลี่ยนน้ำทุกวัน จึงพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของจะไข่เป็นไปอย่างรวดเร็ว แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงการเปลี่ยนน้ำด้วยว่า ต้องทำอย่างค่อยเป็นค่อยไปไม่เอะอะโครมครามจนเกิดความตื่นตกใจแก่จะไข่และเพิ่มความเครียดขึ้นได้

1.3 จำนวนจะไข่ในบ่อเลี้ยง จำนวนจะไข่หรือประชากรจะไข่ที่เลี้ยงในแต่ละบ่อ จำเป็นต้องมีสัดส่วนที่พอเหมาะกับขนาดบ่อเลี้ยงหากจะไข่แออัดเกินย้อมที่ให้เกิดการต่อสู้แย่งอาหารกัน อาจเกิด

แผลและเกิดโรคติดเชื้อบนผิวหนังได้ง่าย นอกจากนี้อาจทำให้ดูแลไม่ทั่วถึง มีอัตราการผสมติดต่ำ เพราะเกิดการแย่งขันในการผสมพันธุ์และการกดขี่ตามลำดับชั้นรวมถึงการจับหรือการขนย้ายจะทำให้ลำบากขึ้น

1.4 สถานที่เลี้ยง อาจมีแตกต่างกันไป เช่น บ่อน้ำธรรมชาติ บ่อดิน บ่อซีเมนต์ จนถึงอ่างไฟเบอร์กลาส ฯลฯ แตกต่างกันไปตามฐานะทางเศรษฐกิจ วัตถุประสงค์ของการเลี้ยง และเทคโนโลยีของแต่ละฟาร์ม แต่สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงคือ

ก. ขนาด ความต้องการพื้นที่ของจระเข้หนึ่งตัวคือ ขนาดของจระเข้ คุณ 3 เท่า ของความยาวของจระเข้ มีอัตราส่วนพื้นที่บกเท่ากับพื้นน้ำ หรืออย่างน้อย 2 ใน 3 ของพื้นที่น้ำ ส่วนความลึกของน้ำอย่างต่ำ 60 เซนติเมตร

ข. พื้นผิว เนื่องจากจระเข้เป็นสัตว์ที่คลานบนดินและได้น้ำ โอกาสสัมผัสกับพื้นผิวจึงมีเกือบตลอดเวลา ฉะนั้นความเรียบหรือหยาบของพื้นผิวจึงมีความสำคัญ เพราะสามารถทำให้หนังท้องจระเข้เกิดรอยขีดข่วนจนถึงบาดเจ็บ และมีการติดเชื้อเกิดขึ้นได้ ราคาหนังจระเข้จะตกลงการมีตำหนิดังกล่าวเกิดขึ้นพื้นผิวซีเมนต์ขัดเรียบจึงเหมาะกว่าพื้นผิวอย่างอื่น

ค. ร่มเงา แม้จระเข้ชอบใช้แสงแดดเป็นแหล่งพลังงานความร้อนแก่ร่างกาย แต่ถ้าความร้อนสูงเกินไป จระเข้ก็ต้องการที่หลบแดด โดยอาศัยร่มเงาซึ่งอาจเป็นต้นไม้, หลังคา หรือวัสดุกรองแสงต่าง ๆ อีกทั้งยังเป็นเงาให้เกิดความเย็นบนพื้นผิวที่จระเข้ซ่อนตัว

อาหารไม่เหมาะสม

อาหารที่ให้อาจจะมีความสมดุลในทุก ๆ อย่างทั้งปริมาณและคุณภาพ หากสองสิ่งนี้มีมากหรือน้อยเกินไปจะขาดความสมดุลในสารอาหารและองค์ประกอบต่าง ๆ ทำให้เกิดปัญหาและโรคต่าง ๆ

อาการแคระแกรน

เกิดได้กับลูกจระเข้อายุ 6 - 8 อาทิตย์ ลูกจระเข้จะมีอาการเจริญเติบโตเมื่อดูจากน้ำหนักและความยาวลำตัวต่ำกว่าลูกจระเข้ตัวอื่น ๆ ที่เลี้ยงในรุ่นเดียวกัน ลูกจระเข้จะไม่กินอาหารเชื่องซึม ผอมลง มีบางตัวที่ยังกินอาหารตามปกติ แต่ขนาดคงเดิม สาเหตุของการแคระแกรนยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่อาจพอสันนิษฐานได้ว่า เป็นผลสืบเนื่องมาจากพันธุกรรม ความผิดปกติแต่กำเนิด สภาพแวดล้อม อาหาร และเชื้อโรค ซึ่งมักมีความเกี่ยวข้องซึ่งกันและกัน การป้องกันโรคนี้ยังไม่ประสบผลสำเร็จนัก เท่าที่พอช่วยลูกจระเข้ได้โดยการป้อนอาหารสำเร็จรูปผ่านท่อลงไปยังกระเพาะอาหาร ส่วนผสมของอาหารได้แก่ ปลาบดละเอียดทั้งตัว 250 กรัม ผสมน้ำสะอาด 250 มิลลิลิตร และเติมวิตามินรวมชนิดเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ป้อนอาหารเหล่านี้ด้วยขนาด 250 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัวจระเข้ 1 กิโลกรัม อาทิตย์ละ 2 วัน พร้อมทั้งฉีดวิตามินอีและซีลีเนียมให้เดือนละครั้ง

ความพิการแต่กำเนิด

ลักษณะความพิการที่เป็นมาแต่กำเนิด เช่น ปากแหว่ง เพดานโหว่ หลังคด หางค้วน ขี้แดงไม่เข้าท้อง ผงงหน้าท้องไม่ปิด ไม่มีลูกตา ฯลฯ เหล่านี้มักเกิดจากการจัดการไม่ดี มี 3 กรณี คือ

ก. พันธุกรรม หมายถึงการผสมพันธุ์ในสายเลือดชิด เช่น พ่อผสมลูก ลูกผสมแม่ ฯลฯ ไม่มีการจัดการเรื่องสายพันธุ์ที่แน่นชัด เนื่องจากปล่อยเลี้ยงบ่อรวมกันจำนวนมากทำให้ไม่สามารถควบคุมการผสมพันธุ์ได้ จึงเกิดปัญหาตามมา

ข. การจัดการฟักไข่ที่ไม่เหมาะสม ไม่ถูกวิธี ความชื้นไม่พอหรือความร้อนสูงเกินไป มีผลทำให้ไข่แดงไม่เข้าท้องเกิดความพิการต่าง ๆ นานาได้เสมอ

ค. สารพิษบางชนิดตกค้างมากับอาหารที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์จระเข้ และถ่ายทอดมาถึงลูกทำให้เกิดความผิดปกติการพัฒนาร่างกายของตัวอ่อน เช่น พิษของโลหะหนักต่างๆ พวกปรอท สังกะสี และตะกั่ว ซึ่งบางครั้งก็ปนเปื้อนมากับน้ำที่ใช้เลี้ยงจระเข้ได้เช่นกัน

การบาดเจ็บกระทบกระเทือน

จระเข้เป็นสัตว์ที่มีความต้องการดินแดนหรืออาณาเขตเป็นของตัวเอง โดยจะมีการปกป้องหวงแหนมากน้อยขึ้นอยู่กับพันธุ์ ฉะนั้นปัญหาการกัดกัน แ่งแย่งกันจึงมักเกิดขึ้นและรุนแรงถึงตายเสมอ ยิ่งถ้าเลี้ยงกันในที่คับแคบและมีประชากรหนาแน่นมากเกินไป ทางแก้ไข จะต้องให้มีสัดส่วนจำนวนจระเข้ต่อพื้นที่ ลักษณะบ่อ การตกแต่ง แบ่งสันปันส่วนในบ่อเลี้ยง ฯลฯ

การใช้ประโยชน์จากจระเข้

1. หนัง ราคาซื้อขายหนังจระเข้จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของหนัง โดยหนังแผ่นท้องจะแพงกว่าหนังแผ่นหลัง เพราะหนังแผ่นท้องนำมาใช้สะดวกกว่าเนื่องจากหนังแผ่นหลังต้องถากให้ได้ความหนาตามกำหนดเสียก่อน ซึ่งก็นับว่ายากอยู่พอสมควร และหนังส่วนนี้มีสีสันสวยงามสู้ส่วนท้องไม่ได้ อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างเรื่องสีสันของหนังจระเข้ก็ไม่ได้เป็นการแสดงว่าเป็นหนังที่ด้อยคุณภาพแต่ประการใด

2. เนื้อ สามารถขายได้ในรูปเนื้อสดและเนื้อแห้ง ซึ่งเป็นที่นิยมของชาวเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งชาวจีน เนื่องจากถือว่ามีคุณสมบัติในการเป็นยารักษาโรคได้ ตลาดในไทยนั้นนิยมเนื้อสดเพื่อใช้ปรุงอาหาร เช่น ผัด ต้ม ทอด เนื่องจากรสชาติดีมาก คล้ายกับหมูปนไก่ อีกทั้งยังมีไขมันต่ำอีกด้วย ชาวจีนใช้เนื้อจระเข้เป็นส่วนประกอบเข้ากับตัวยาสมุนไพรเพื่อใช้รักษาโรคหอบหืด ดังนั้นมูลค่าเนื้อแดงจึงเกือบจะเท่าหนัง ปัจจุบันมีการทำเป็นเนื้อกระป๋องในรูปเนื้อจระเข้ตุ๋น และเนื้อจระเข้รสต่าง ๆ อีกด้วย

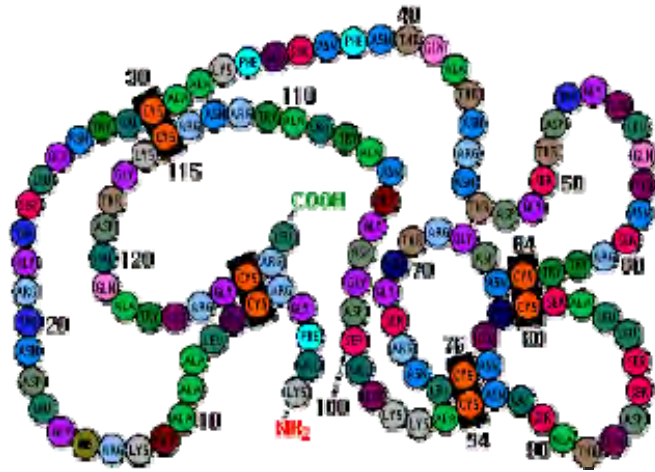
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของเนื้อจระเข้กับเนื้อสัตว์ชนิดต่าง ๆ

	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	พลังงาน (แคลอรี)
เนื้อจระเข้	21.1	1.9	102
เนื้อวัว	19.3	16.0	221
เนื้อหมู	20.8	18.5	250
เนื้อไก่	20.2	10.2	173

3. กระดุกและฟัน ใช้เป็นส่วนผสมของยากวาดคอเด็กอ่อนและยังทำเป็นเครื่องประดับได้อีกด้วย
4. อู้งมืออู้งเท้าของจระเข้ เมื่อถลกหนังออกแล้วนำมาทำเป็นพวงกุญแจได้อย่างสวยงาม หรือนำมาทำเป็นที่เกาหลังก็ได้
5. ไขมัน ในต่างประเทศมีการนำไขมันจระเข้ไปใช้ในหลายรูปแบบ เช่น จีนและสิงคโปร์ นิยมนำไปใช้เป็นน้ำมันทาผิวสำหรับรอยฟกช้ำ น้ำร้อนลวก ไฟลวก ใช้ทำยารักษาโรคผิวหนังและแผลสด ที่ออสเตรเลียนำไขมันจระเข้เข้าไปใช้เป็นส่วนผสมหลักของน้ำมันและครีมบำรุงผิวกันแดด ฯลฯ ซึ่งเป็นที่นิยมมาก
6. เครื่องใน เดิมทีเครื่องในจระเข้มันถูกทอดทิ้ง โดยใช้เป็นอาหารแก่จระเข้หมุนเวียนกลับไปอีก แต่ปัจจุบันสามารถนำมาขายได้ทั้งหมด (หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต ดี ต่ำไส้ ฯลฯ) เนื่องจากมีผู้นำไปใช้เป็นยาแผนโบราณและยาจีนตลอดจนกระดุกและเลือดก็เช่นเดียวกัน
7. ลูกจระเข้ตัวเล็ก ๆ ที่ตาย ก็ยังสามารถนำมาสตัฟฟายเป็นเครื่องประดับบ้านที่มีราคาสูงและเป็นที่นิยมมาก โดยสรุปจะเห็นว่าร่างกายจระเข้ทุกส่วนสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ทั้งสิ้น ด้วยมูลค่าที่น่าพอใจแก่การลงทุน ดังนั้นธุรกิจการเลี้ยงจระเข้เพื่อเป็นสัตว์เศรษฐกิจ จึงมีการตื่นตัวและขยายวงกว้างขวางขึ้นกว่าแต่เดิมมาก อนาคตของธุรกิจนี้จึงมีู่ทางที่สดใสลงทุนชนิดหนึ่ง

การศึกษาเกี่ยวกับ Antimicrobial protein หรือ peptides Antimicrobial proteins

โปรตีนที่มีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หรือ Antimicrobial protein นั้นเป็นกลุ่มโปรตีนของไลโซไซม์ (lysozyme or muramidase; EC3.2.1.17) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกค้นพบโดยบังเอิญโดย Alexander Fleming ในปี ค.ศ.1922 โดยที่ Lysozyme มาจากคำว่า “lyso” หมายถึงมีสมบัติเป็นเอนไซม์ ซึ่งเขาสังเกตว่าเมื่อหยดน้ำมูก (Nasal mucus) ลงไปในสารละลายแบคทีเรีย พบว่าความขุ่นของสารละลายลดลงอย่างรวดเร็ว จึงได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าอาจมีสารที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้และจากการทำบริสุทธิ์ Fleming ก็ทราบว่าเอนไซม์ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์แบคทีเรียแตก (lysis) จึงได้ตั้งชื่อตามสมบัติของเอนไซม์คือ “Lysozyme”



รูปที่ 2 โครงสร้างลำดับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของไลโซไซม์

ไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางทั้งทางโครงสร้าง กลไกการทำงาน สมบัติทางเคมี หรืออื่นๆ ซึ่งปัจจุบันสามารถจำแนกไลโซไซม์ออกเป็น 3 type ด้วยกัน ตามจำนวนและองค์ประกอบ คือ

1. Chicken type lysozyme (C-type) ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 129 – 130 โมเลกุล พบมากไข่ขาวของไข่ไก่ ซึ่งมีลักษณะเป็นสายเดี่ยว (Single chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14 kDa ขนาดโมเลกุล $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ ประกอบด้วยโดเมน(Domain) สองโดเมนที่เป็น α -helix และตามด้วย β -sheet และในโมเลกุลประกอบด้วย 4 Disulfide bond ระหว่าง Cystein ตำแหน่งที่ 64 และ 80, 76 และ 94, 6 และ 127, 30 และ 15

2. Goose type lysozyme (G-type) ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 185 โมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa และประกอบด้วย 2 Disulfide bond

3. Phage type lysozyme (T4-type) ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 165 โมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18 kDa

Antimicrobial peptides

เปปไทด์ที่มีความสามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือ Antimicrobial peptides นั้นเริ่มมีการศึกษาดังแต่ในศตวรรษที่ 19 โดย Ehrlich, Metchnikov และ Petterson ซึ่งเป็นการศึกษาด้วยเทคนิคง่ายๆ โดยในปี 1879 Ehrlich ได้ทำการศึกษา Cytoplasmic granules ของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเทคนิคการย้อมสีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์พบว่าโปรตีนที่เป็นเบสและเป็นกรดอยู่จำนวนมาก ในปี 1883 Metchnikov ได้ทำการศึกษาและพบว่าการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์ฟาโกไซต์ในปี 1895 Kanthack และ Hardy พบการทำลายเชื้อแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า Phagocytosis และในปีต่อมา Petterson ได้ทำการศึกษาและพบว่าสารสกัดจากหนองของคนมีความสามารถในการ

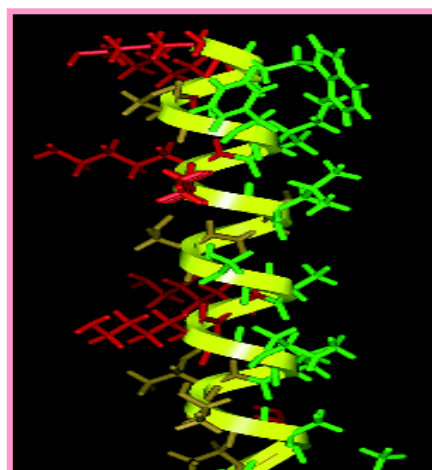
ทำลายเชื้อแบคทีเรียซึ่งพบว่าเป็นการทำงานของโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเบสโดยการศึกษาเปรียบเทียบกับ Protamines ในสเปิร์มของ ปลาแซลมอนซึ่งในระยะเริ่มแรกของการศึกษา Antibacterial proteins หรือ peptides นั้นได้มีสมมติฐานว่า ในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเป็นการทำงานของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีความเป็นบวกจากกรานูลของเม็ดเลือดขาว ในปี 1956 Sharnes และ Watson พบว่าสารสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายมีเปปไทด์ที่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เปปไทด์ที่พบนี้ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่คล้ายกับ ฮิสโตนซึ่งจะมีคุณสมบัติเป็นบวกและสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา

Defensin เป็นเปปไทด์ที่พบว่ามีการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียตัวแรกที่ทราบคุณสมบัติต่างๆ โดยพบว่าประกอบด้วยอาร์จินีน 25% และซิสเทอีน 3.5 % สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบคือ *E.coli* ซึ่งการทำงานของ Defensin จะเป็นการเข้าไปทำลายเซลล์แบคทีเรียให้สูญเสียสมดุลการเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการตายในที่สุด ปัจจุบันพบว่ามีรายงานการศึกษา Antimicrobial peptides เป็นจำนวนมากโดยมีการค้นพบ Antimicrobial peptides ในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ในพืช แมลงและสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ซึ่งสามารถจำแนก Antimicrobial peptides ได้หลายชนิดและแต่ละชนิด ก็สามารถแบ่งย่อยออกไปได้อีก Jacopo Vizioli, 2002 แบ่ง Antimicrobial peptides ออกเป็น 2 ประเภทคือ Cation antimicrobial peptides และ Non- cationic antimicrobial peptides

1. Cationic antimicrobial peptides

เป็นเปปไทด์กลุ่มใหญ่ที่สุดพบได้ทั้งในพืชและสัตว์จากการค้นพบและศึกษาลักษณะโครงสร้างมีมากกว่า 400 ชนิด และประมาณครึ่งหนึ่งในจำนวนนี้พบในพวกแมลงซึ่งสามารถจำแนกย่อยออกเป็น 3 ประเภท ได้

1.1 เปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบ แอลฟา- เฮลิค (α -helix structure) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครงสร้างของเปปไทด์แบบ α -helix

1.2 เปปไทด์ปลายเปิดที่ประกอบด้วยซิสเทอีนและพันธะไดซัลไฟด์ 1 พันธะหรือมากกว่า (Cysteine-rich open- ended peptides contain single or several disulfide bridges)

1.3 เปปไทด์ที่มีโมเลกุลมีหมู่อะมิโนที่จำเพาะ เช่น โพรลีน ไกลซีน และฮิสทีดีน (Molecular rich in spech in specific amino acid such as Proline, Glysine, Histidine) ซึ่งตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็น Cationic antimicrobial peptides

Structure and representative peptides	Organism	Antimicrobial activity
Linear α-helix peptides		
Cecropins	Insects, pig	Bacteria, fungi, virus, protozoa, metazoa
Clavanin, styelin	Tunicates	Bacteria
Magainin, dermaseptin	Amphibians	Bacteria, protozoa
Bufoxins	Amphibians	Bacteria, fungi
Linear peptides rich in certain amino acids		
Pro-rich:		
drosocin, metchnikowins,	Fruit fly	Bacteria
pyrrhocoricin, metalnikowin	Hemipteran	Bacteria, fungi
Gly-rich:		
diptericins, attacins	Dipterans	Bacteria
His-rich:		
histatin	Human	Bacteria, fungi
Tyr-rich:		
indolicidin	Cattle	Bacteria
Single disulfide bridge		
Thanatin	Hemipteran	Bacteria, fungi
Brevinins	Frog	Bacteria
Two disulfide bridges		
Tachyplesin II	Horseshoe crab	Bacteria, fungi, virus
Androctonin	Scorpion	Bacteria, fungi
Protegrin I	Pig	Bacteria, fungi, virus
Three disulfide bridges		
α -Defensins	Mammals	Bacteria, fungi
β -Defensins	Mammals	Bacteria, fungi
Defensins	Insects	Bacteria, fungi, protozoa
Penaeidins	Shrimp	Bacteria, fungi
More than three disulfide bridges		
Tachycin	Horseshoe crab	Bacteria, fungi
Drosemycin	Fruit fly	Fungi
Gambicin	Mosquito	Bacteria, fungi, protozoa
Helioimicin	Lepidopteran	Bacteria, fungi
Defensins	Plants	Fungi

2. Non - Cationic antimicrobial peptides

Anionic antimicrobial peptides เป็นเปปไทด์กลุ่มใหม่ ที่ส่วนใหญ่ศึกษาและค้นพบใน Mammalian epithelia ซึ่งอาจแยกออกได้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ พวก Phosphorylate compounds (Peptide B และ Enkelytin), พวก Neuropeptide precursors (Enkephalin A) ซึ่งสามารถพบได้ในมนุษย์และสัตว์ทำกิบ เช่น วัว ควาย แกะ เป็นต้น สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกลุ่ม gram positive ตัวอย่างเปปไทด์ในกลุ่มนี้ แสดงได้ดัง ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็น Anionic antimicrobial peptides

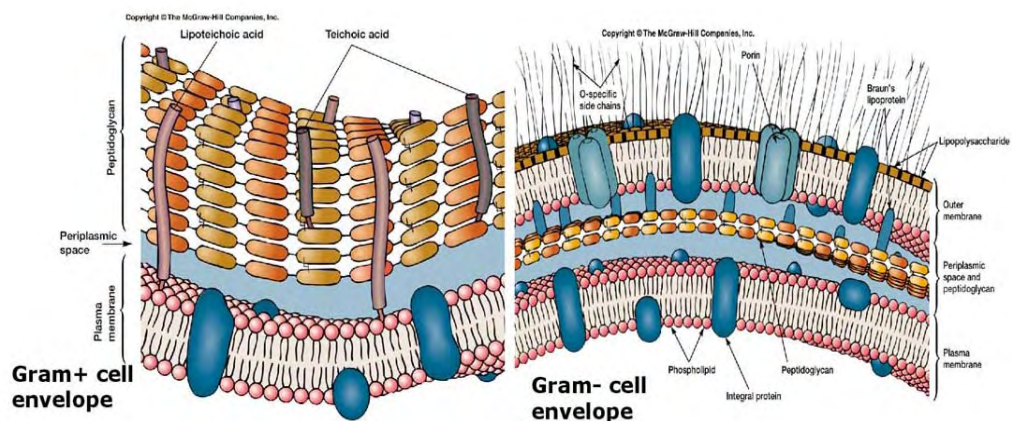
Structure and representative peptides	Organism	Antimicrobial activity
Anionic peptides		
Neuropeptide derived:		
Enkelytin	Bovine, human,	Bacteria
Peptide B	Bovine, human, leech, mussel	Bacteria
Aspartic acid rich:		
H-GDDDDDD-OH	Ovine	Bacteria
Dermcidin	Human	Bacteria
Aromatic dipeptides		
N-β-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine	Flesh fly	Bacteria, fungi
P-Hydroxycinnamaldehyde	Saw fly	Bacteria, fungi
Peptides derived from oxygen-binding proteins		
Hemocyanin derived	Shrimp	Bacteria
Hemoglobin derived	Tick	Bacteria
Lactoferrin	Human	Bacteria, virus

ประสิทธิภาพการทำลายหรือด้านการเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียของ Antimicrobial peptides ได้อย่างจำเพาะนั้น สามารถพิจารณาได้จากส่วนที่สำคัญ 2 ส่วน ได้แก่ โครงสร้าง องค์ประกอบพื้นฐานเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย โครงสร้างและสมบัติพื้นฐานของ Antimicrobial peptides

โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนประกอบที่ใกล้เคียงกัน นั่นคือ ชั้น Phospholipid bilayer ที่ประกอบไปด้วยฟอสโฟไลปิดหลายชนิด ได้แก่ Phosphatidylglycerol (PG), Cardiolipin (CL; effectively a dimer of PG), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylcholine (PC) , Phosphatidylethanolamine (PE) เป็นต้น มีโปรตีน lipoprotein lipopolysaccharides แทรกอยู่หรือเกาะอยู่ที่

ผิวนอก และชั้นของเพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycans) อาจจะมี Teichoic acid ที่มีความเป็นลบค่อนข้างสูงเป็นตัวเชื่อม Peptidoglycans monomer อยู่ในรูปของ Ribitol Teichoic acid และ Glycerol Teichoic acid ข้อแตกต่างระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบโดยทั่วไป คือแบคทีเรียแกรมบวกจะมีชั้นของ เพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycans) ที่หนากว่าอยู่ที่เยื่อหุ้มชั้นนอก เยื่อหุ้มด้านในเป็นชั้นของ Phospholipid bilayer ส่วนในแกรมลบจะประกอบด้วยเยื่อหุ้มทั้งด้านนอกและด้านในประกอบด้วย Phospholipid bilayer ที่มี Lipopolysaccharides เป็นองค์ประกอบสำคัญ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 เปรียบเทียบโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (ซ้าย) และแบคทีเรียแกรมลบ(ขวา)

ส่วนที่ทำให้ Antimicrobial peptides มีประสิทธิภาพการต้านหรือทำลายที่ความจำเพาะ (Specificity and Selective toxicity) ต่อแบคทีเรีย ได้แก่

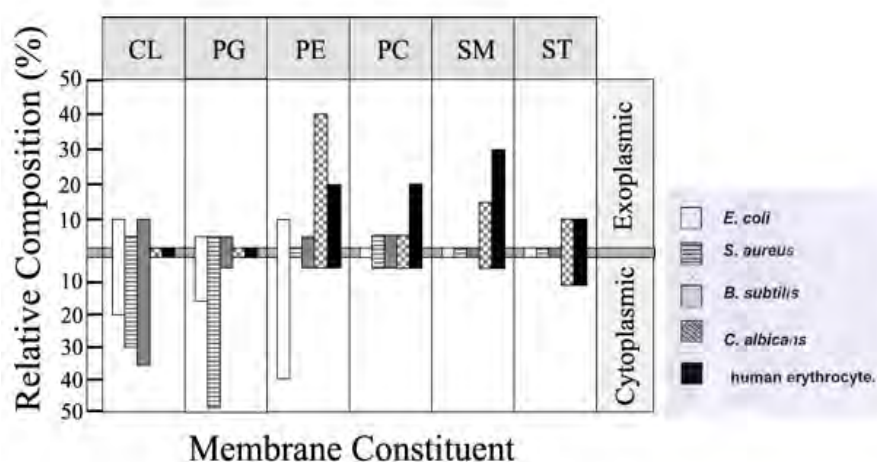
1. ส่วนประกอบของส่วนฟอสโฟไลปิด (Phospholipid) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ส่วนประกอบของฟอสโฟไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* และ Human erythrocyte เปรียบเทียบระหว่าง Cardiolipin (CL; effectively a dimer of PG), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylcholine (PC), Sphingomyelin (SM) และ Sterols (cholesterol or ergosterol, ST) ทั้งในเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นใน แบคทีเรียหรือพวกโพรคาริโอตจะมีส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในที่เป็น Cardiolipin (CL) Phosphatidylglycerol (PG) และ Phosphatidylcholine (PC) แสดงประจุเป็นลบ (Negative charge) ซึ่งจะส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีประจุเป็นลบด้วยเช่นกัน มากกว่าในเยื่อหุ้มเซลล์พวกยูคาริโอต เช่น *C. albicans* และ เซลล์ Erythrocyte ของมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญ และพบส่วนที่เป็น Phosphatidylcholine (PC) Phosphatidylethanolamine (PE) และ Sphingomyelin (SM) แสดงประจุ

สุทธิเป็นกลาง (Neutral charge) น้อยกว่าโพสิทีฟ ดังรูปที่ 5 เหตุผลดังกล่าวทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของพวกเขาเชื่อมต่อกันได้ดีกว่า มีความจำเพาะต่อ Antimicrobial peptides

2. ส่วนประกอบที่เป็น Lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งมีมากในชั้น Lipid bilayer ของเยื่อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E.coli* ส่วนประกอบที่เป็นหมู่ฟอสเฟตจะช่วยให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างเปปไทด์กับเยื่อหุ้มเซลล์ในระยะเริ่มต้น (Initial peptide Interactions)

3. เพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycans) ซึ่งมีส่วนประกอบที่เป็น Teichoic acid เป็นตัวเชื่อมระหว่าง Peptidoglycans monomer มีความเป็นลบค่อนข้างสูงมากช่วยสร้างแรงยึดเหนี่ยวระหว่างเปปไทด์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของพวกเขาแบคทีเรียแกรมบวก

4. คุณสมบัติจำเพาะอื่นๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้ Antimicrobial peptides มีความจำเพาะต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น ลักษณะสมมาตรระหว่างผนังด้านในและผนังด้านนอกของส่วนประกอบต่างๆ ลิแกนด์ (ligand) ที่จำเพาะ หรือค่า Transmembrane potential ($\Delta\psi$) ซึ่งปกติเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian) มีค่าระหว่าง -90 ถึง -110 mV ส่วนในพวกแบคทีเรียมีค่าระหว่าง -130 ถึง -150 mV



รูปที่ 5 เปรียบเทียบระหว่างส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* และ Human erythrocyte ที่ประกอบด้วย Cardiolipin (CL; effectively a dimer of PG), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylcholine (PC), Sphingomyelin (SM) และ Sterols (cholesterol or ergosterol, ST) ของ เยื่อหุ้มแต่ละชนิด

การศึกษา antimicrobial peptide ในอดีตเริ่มมีการศึกษาในสัตว์กลุ่มแมลง และในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมามีการศึกษา antimicrobial peptide เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการศึกษาในสัตว์ชั้นสูง เช่น ในสุกร หรือ แม้แต่ในมนุษย์ ปัจจุบันมีการจัดแบ่ง antimicrobial peptide ออกได้เป็นประเภทต่างๆ เช่น amphipathic and hydrophobic α -helices, α -Sheet peptides and small proteins, peptides with irregular amino acid

composition, peptides with thio-ether rings, peptaibols และ microcyclic cystine knot peptides ตัวอย่างของ antimicrobial peptide บางกลุ่มที่กล่าวมาแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดง antimicrobial peptide ในกลุ่ม α -helical และ α -sheet (จาก Katsumi M, 1999)

peptide	source	primary structure ^a
α-helical		
magainin 1	<i>Xenopus laevis</i>	H ₂ N-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-COOH
magainin 2		H ₂ N-GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-COOH
PGLa		H ₂ N-GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
cecropin P1	porcine small intestines	H ₂ N-SWLSKTAKKLENSAKKRISGEIAIAIQGGPR-COOH
β-sheet		
tachyplesin I ^b	<i>Tachyplesus tridentatus</i>	H ₂ N-KWCFRVCYRGICYRRCR-NH ₂
tachyplesin II		H ₂ N-RWCFRVCYRGICYRKCR-NH ₂
tachyplesin III	<i>Tachyplesus gigas</i>	H ₂ N-RWCFRVCYRGICYRKCR-NH ₂
polyphemusin I	<i>Limulus polyphemus</i>	H ₂ N-RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH ₂
polyphemusin II		H ₂ N-RRWCFRVCYKGFYRKCR-NH ₂
protegrin-1	porcine leukocytes	H ₂ N-RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH ₂

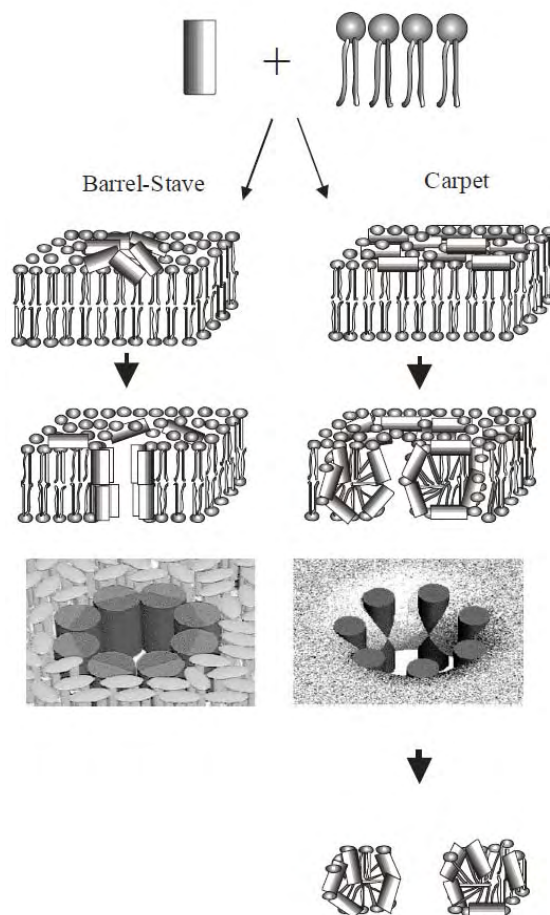
Antimicrobial peptide ที่กล่าวถึงทั้งหมดนี้ทำหน้าที่ฆ่าเซลล์แบคทีเรียโดยอาจจะใช้กลไกการเข้าทำลายเซลล์ที่และมีการใช้เวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า มีขั้นตอนกลไกดังนี้

1. Attraction การเข้าจับของ antimicrobial peptide กับเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งพบว่าน่าจะเกิดจากแรง electrostatic ระหว่างประจุของเปปไทด์กับเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งพบว่า antimicrobial peptide ที่เป็นประจุบวก จะเข้าจับกับผิวด้านนอกของแบคทีเรียที่มีประจุลบ (LPS ของ Gram-negative) และ teichoic acid ที่อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย
2. ขั้น Attachment เป็นขั้นตอนที่สำคัญของ antimicrobial peptide ที่จะผ่านเข้าไปหาเซลล์เมมเบรน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า น่าจะเกี่ยวกับการ concentration ของ เปปไทด์ โครงสร้าง 2 มิติ ที่จะถูกฝังลงไปใน lipid head group ในสภาพที่ไม่ทำงานแล้วทำให้เมมเบรนยืดออก ซึ่งจะทำให้ เมมเบรนบางตัว ซึ่งมีความจำเพาะกับเปปไทด์และ concentration ของ เปปไทด์ ด้วย
3. ขั้นการสอด antimicrobial peptide แล้วทำให้เกิด membrane permeability จากการทดลองจะพบว่า ถ้าความเข้มข้นของ antimicrobial peptide/ lipid น้อย เปปไทด์จะจับแบบขนานกับ lipid bilayer แต่ถ้ามีความเข้มข้นของเปปไทด์สูงขึ้น เปปไทด์จะถูกสอดเข้าไปในเมมเบรน และ

เมื่อความเข้มข้นของเปปไทด์สูงขึ้นมาก เปปไทด์จะสอดเข้าไปในเมมเบรนและสร้างเป็นรูขึ้น ซึ่งจะมีหลายแบบจำลองของการเกิดขึ้น ดังนี้คือ

แบบจำลอง barrel-stave ซึ่งมัดของเปปไทด์ที่อยู่ในโครงสร้างที่เป็น helix จะเป็นมัดที่อยู่ในเมมเบรน และมีรูตรงกลางซึ่งจะเป็นท่อหรือลำกล้อง และมี helix peptide เป็นตัวแบ่งที่เมมเบรนและทำให้เกิดการทะลุเข้าไปได้ การสร้างรูปแบบนี้จะมีลักษณะที่พิเศษ โดยการกระตุ้นของ Alamethicin ซึ่งจากการศึกษาหลายเทคนิคพบว่า Alamethicin จะเกิดเป็น α -helix จับกับเมมเบรน และรวมกลุ่มกันสอดเข้าไปใน lipid bilayer โดยส่วนที่เป็น hydrophobic ของเปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับ lipid bilayer และส่วนที่เป็น hydrophilic จะทำปฏิกิริยากันเองทำให้เกิดรูขึ้นมา Alamethicin ที่ทำให้เกิด pore ได้ จะประกอบด้วย 3-11 α -helix ดังรูปที่ 6

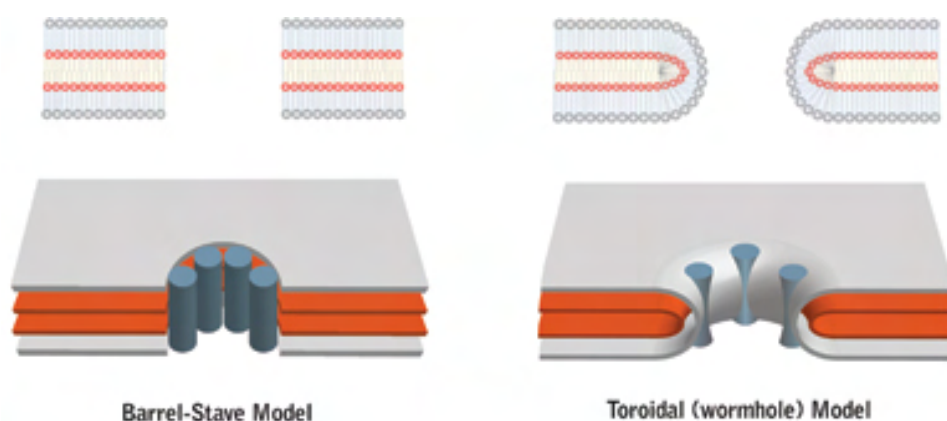
แบบจำลอง Carpet ก็จะมีการสะสมของเปปไทด์ที่ผิวของ lipid bilayer เช่น ovispirin ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของเปปไทด์สูงจะทำให้เกิดการขัดขวาง bilayer เหมือนกับการทำงานของ detergent และในบางจุดจะทำให้ เปปไทด์สร้างรูชั่วคราวขึ้นในเมมเบรน ทำให้เปปไทด์อื่นๆเข้าสู่เมมเบรนได้มากขึ้น ซึ่งสุดท้ายจะทำให้เมมเบรนหลุดออกจากกันเกิดเป็น micelles ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel -stave (ซ้าย) และแบบจำลอง Carpet (ขวา)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Zhao H., 2003

แบบจำลอง **toroidal pore** ตัวอย่างของ antimicrobial peptide คือ margainins , protegrins และ melittin ซึ่งเปปไทด์ที่เป็น α -helix นี้จะสอดเข้าไปในเมมเบรนแล้วกระตุ้น lipid monolayer ให้โค้งงอจนทำให้เกิดรู ซึ่งทำให้เกิดน้ำที่เป็นแกนกลางถูกเปปไทด์ที่ถูกสอด และที่ lipid head group โดยส่วนที่ขอบน้ำของเปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับ polar head group ของ lipid ข้อแตกต่างของ barrel-stave model กับ toroidal pore คือ เปปไทด์ของ toroidal pore จะมี interaction กับ lipid head group ถึงแม้จะสอดเข้าไปใน lipid bilayer แล้วก็ตาม ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel-stave (ซ้าย) และแบบจำลอง toroidal pore (ขวา)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Qian S. *et.al.*, 2008.

จะเห็นได้ว่า กลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียอาจจะเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการสร้าง ion channel การสร้างรูที่เมมเบรน หรือการเกิดการเสียหายกับเมมเบรน แต่ก็ไม่ได้หมายความว่ากลไกต่างๆเหล่านี้จะเกี่ยวข้องสัมพันธ์ในทุกเปปไทด์

Selsted *et al.*, 1992 ค้นพบว่า indolicidin ซึ่งแยกได้จากไซโตพลาสซึมของ neutrophils ของวัว (bovine) ในความเข้มข้น 10 mg/ml สามารถทำลายเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ indolicidin นี้เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน tryptophan อยู่ในอัตราส่วนที่สูงมาก ซึ่งโดยปกติ โปรตีนหรือเปปไทด์จะมีปริมาณของกรดอะมิโนชนิดนี้อยู่ในสัดส่วนที่น้อยมาก

จากการศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิของ fragment ส่วนหนึ่งของ histatin-5 จากน้ำลายพบว่า histatin ใช้โครงสร้างที่เป็น α -helical เข้าจับกับ membrane ของ *Candida albicans* ด้วยแรงระหว่างประจุ และพันธะไฮโดรเจนระหว่างส่วนที่เป็นประจุบวกกับประจุลบของ plasma membraen (Raj PA., Soni SD. and Leine MJ., 1994)

Yan L. and Adams ME., 1998 แยก lycotoxin I และ lycotoxin II จากพิษของแมงป่อง *Lycosa carolinensis* โดยใช้เทคนิค reversed-phase HPLC และทดสอบการยับยั้งและต้านแบคทีเรียพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Candida glabrata* ได้ โดยใช้ในปริมาณเป็นไมโครโมลาร์เท่านั้น

Benincasa *et al.*, 2003 ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ α -helical cathelicidin peptides 2 ชนิด คือ BMAP-27 และ BMAP-28 พบว่า BMAP-27 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี ส่วน BMAP-28 นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ อีกทั้งยังพบว่า BMAP-28 นั้นมีความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อไวรัส human herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ได้ในการทดลองแบบ *in vitro*

Genco *et al.*, (2003) ศึกษา antimicrobial cationic peptide Magainins ที่แยกได้จากผิวหนัง (African clawed frog) 2 ชนิด คือ MSI-751 และ MSI-774 ในการต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคในช่องปาก และกลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรีย พบว่า เชื้อก่อโรคในช่องปาก *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella loescheii* และ *Prevotella intermedia*. *P. gingivalis* จะมีความไวต่อ MSI-751 มากกว่า MSI-774 และจากการศึกษากลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopy) พบว่า Magainins มีเป้าหมายในการทำลายเซลล์ที่เซลล์เมมเบรน โดยจะทำให้เมมเบรนเกิดความเสียหาย ทำให้เชื้อแบคทีเรียตายในที่สุด

Feng-Sheng Wang, 2003 ทำการศึกษาผลของ antimicrobial proteins ที่แยกได้จากเม็ดเลือดขาวของหนู ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* ในเนื้องอก พบว่า มีโปรตีนขนาด 6 และ 7.5 kDa สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดในเนื้องอกได้ โดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและตายในที่สุด ซึ่งจะเห็นได้จากการวัดค่า OD₂₆₀ nm ที่เพิ่มมากขึ้นหลังจากบ่มเชื้อทดสอบกับ antimicrobial proteins ที่ได้จากเม็ดเลือดขาวของหนู

Benincasa *et al.*, 2004 ทำการสังเคราะห์ Pro-rich peptide Bac7 ซึ่งเป็น cathelicidin-derived peptide ที่แยกได้จาก bovine neutrophils โดยสังเคราะห์เป็น fragment peptides ที่มีความยาวตั้งแต่ 13-35 residues แล้วทำการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นชนิด drug-resistant clinical isolates พบว่า fragment Bac7(1-16) และ fragment Bac7(1-35) ซึ่งมีส่วนของ highly cationic N-terminal sequence อยู่ นั้น มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย แกรมลบได้ดี และพบว่า fragment Bac7(1-35) ยังสามารถต้านการเจริญของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans*

Podda *et al.*, 2006 ได้ศึกษาต่อเนื่องจากกลุ่มของ Benincasa *et al.* พบว่า antimicrobial peptide Bac7 และ Bac7 derivatives สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้สองกลไกทั้งอาศัยความเข้มข้นและโครงสร้าง

Carlo *et al.*, 2006 ทำการสังเคราะห์ ubiquicidin ซึ่งเป็น antimicrobial peptide ที่แยกได้จากคน โดยทำการสังเคราะห์ในรูปแบบที่เป็น full sequence คือ ubiquicidin (UBI 1-59) และที่เป็นเปปไทด์สาย

สั้นๆ ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนลำดับที่ 31-38 residues (UBI 31-38) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นชนิด methicillin resistant เรียกว่า MRSA พบว่า เปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำ UBI 31-38 ซึ่งเป็นเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีขนาดสั้นมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์ได้

Liu *et al.*, 2008 ทำการศึกษาผลของ rabbit sacculus rotundus antimicrobial peptides (RSRP) ต่อระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในลำไส้ของไก่ พบว่า ในลำไส้ไก่ (duodenum และ jejunum) ที่ได้รับ RSRP นั้นมีการเพิ่มขึ้นของ villus และ intraepithelial lymphocytes เมื่อเทียบกับไก่ที่ไม่ได้รับ RSRP และพบว่า RSRP ยังกระตุ้นให้มีการเพิ่มพื้นที่ของ IgA-secreting cells ใน 3 จุด ของลำไส้เล็กอีกด้วย

สำหรับการศึกษาในจระเข้ของประเทศพบว่าซีรัมของจระเข้สายพันธุ์ในออสเตรเลียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 17 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมมนุษย์ซึ่งยับยั้งได้เพียง 6 ชนิด ล่าสุดจากการศึกษาของ Merchant *et al.*, 2003 รายงานว่า ซีรัมจระเข้สายพันธุ์อเมริกา (*Alligator mississippiensis*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าซีรัมมนุษย์และยืนยันคุณสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียจากการทำงานของระบบ complement (2005a) นอกจากนี้ Merchant *et al.*, 2005b ยังพบว่า ซีรัมจระเข้จากอเมริกาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ HIV-1, WNV และ HSV-1 และในปัจจุบัน Merchant *et al.*, 2005c ได้แยก leukocyte extract จากเลือดจระเข้และพบเปปไทด์ที่สามารถทำลายแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด ส่วนในประเทศไทย จากการศึกษาประสิทธิภาพของซีรัมของจระเข้แม่น้ำจืดพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยการนำซีรัมจระเข้ความเข้มข้น 100,75,50,25% ทดสอบกับ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* บ่มที่ 37 °C และนำแบคทีเรียที่บ่มในช่วงเวลา 0, 1, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น พบว่า *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* มีปริมาณลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1, 3 และ 6 ของการบ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และไม่พบเลยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ของการบ่ม ส่วน *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* พบในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละชั่วโมงของการบ่มและทุกความเข้มข้นของซีรัม และนอกจากนี้ พบว่าในจระเข้แม่น้ำจืด complement มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (วิน เชยสมศรี และคณะ, ไม่ปรากฏปีพิมพ์)

จากรายงานการศึกษามาแล้วในพวกสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น คน (Zaslloff M., 2002) หมู (Lee J.Y.*et al.*, 1989) โค (Michael E.S.*et al.*, 1992) และกบ (Thomas H.*et al.*, 2000) พบว่าสัตว์เหล่านี้สามารถสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ทำลายแบคทีเรียและเชื้อราได้ และสารสกัดจากสัตว์เหล่านี้มีอยู่ในระหว่างการพัฒนาใช้เป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาที่แน่นอนว่ามีโปรตีนหรือเปปไทด์ประเภทใดหรือสารกลุ่มใดที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในจระเข้สายพันธุ์ที่มีในประเทศไทย ซึ่งถ้าสามารถทราบถึงโปรตีนหรือสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการติดเชื้อในจระเข้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการนำไปสู่การพัฒนา ใช้เพื่อผลิตเป็นวัคซีนหรือการพัฒนาจากผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่มากเกินพอจากอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงจระเข้ อีกทั้งเป็นการเพิ่ม

มูลค่าในด้านการตลาดของวงการอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้และเพิ่มรายได้ให้แก่ประเทศไทยมากยิ่งขึ้น ที่สำคัญปัจจุบันนี้ประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งก่อให้เกิดแบคทีเรียที่มีการดื้อยามากขึ้น ดังนั้น การศึกษาหาโปรตีนเปปไทด์หรือสารกลุ่มออกฤทธิ์ที่มีสมบัติด้านแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีอยู่ในธรรมชาติน่าจะเป็นอีกทางหนึ่งที่มีประโยชน์อย่างมากต่อการต่อสู้กับโรคติดเชื้อแบคทีเรียและโรคเชื้อรา โดยเฉพาะในจระเข้ซึ่งมีการศึกษาว่าเป็นสัตว์ที่มีความทนทานอย่างมากต่อการติดเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ชีรัมของจระเข้สายพันธุ์ในออสเตรเลียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 17 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับชีรัมมนุษย์ซึ่งยับยั้งได้เพียง 6 ชนิด ล่าสุดจากการศึกษาของ Merchant *et al.*, 2003 รายงานว่า ชีรัมจระเข้ (*Alligator mississippiensis*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าชีรัมมนุษย์ และยืนยันคุณสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียอาจจะมาจากการทำงานของระบบ complement (2005a) นอกจากนี้ Merchant *et al.*, 2005b ยังพบว่า ชีรัมจระเข้สายพันธุ์อเมริกาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ HIV-1, WNV และ HSV-1 และในปัจจุบัน Merchant *et al.*, 2005c ได้แยก leukocyte extract จากเลือดจระเข้และพบเปปไทด์ที่สามารถทำลายแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด

ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเปปไทด์ที่มีสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย (antimicrobial peptide) ในเลือดของจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยใช้เทคนิค reversed-phase HPLC ในการแยกบริสุทธิ์และการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของเปปไทด์โดยวิธี Edman degradation และ Mass spectrometry และศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ที่แยกได้ ซึ่งการทราบกลไกการทำลายแบคทีเรียและทราบโครงสร้างของเปปไทด์ดังกล่าว จะนำไปสู่การพัฒนาใช้เป็นยาหรือสารที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรีย งานวิจัยนี้ถือว่าเป็นทางเลือกใหม่ในวงการแพทย์ เพราะการใช้ antimicrobial peptide จะช่วยลดปัญหาการดื้อยาจากแบคทีเรียช่วยลดการนำเข้ายาปฏิชีวนะซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อแบคทีเรีย และนอกจากนี้ จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้ โดยสามารถนำเลือดจระเข้ไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น เป็นการเพิ่มมูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ในประเทศไทย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วิธีการเตรียมตัวอย่างซีรัม พลาสมา และสารสกัดเม็ดเลือดขาวจระเข้

1.1 เก็บตัวอย่างเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) จากศรีราชา โมด้า ฟาร์ม จ. ชลบุรี โดยใช้เข็มขนาด 18 มิลลิเมตร กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดเลือดจากส่วน Supravertebral branch ของ internal jugular vein ปล่อยเลือดลงในหลอดเข็นดีฟิวส์ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย 0.5 โมลาร์ EDTA ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้วเพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว ผสมเลือดให้เข้ากับสารละลาย EDTA โดยการคว่ำหลอดไปมาเบาๆ ซึ่งจะทำให้ได้พลาสมาและเม็ดเลือดขาวส่วนซีรัมสามารถเตรียมได้โดยดูดเลือดจระเข้ใส่ในหลอดที่ไม่มีสารละลาย EDTA จากนั้นเก็บหลอดเลือดใส่ในถังน้ำแข็ง เก็บจนกระทั่งได้ปริมาณตามที่ต้องการ

1.2 เมื่อเลือดที่ผสม EDTA เกิดการแยกชั้นชัดเจนระหว่างพลาสมา เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดง โดยพลาสมาจะอยู่ชั้นบนสุด ชั้น interphase จะเป็นเม็ดเลือดขาว และชั้นล่างสุดจะเป็นเม็ดเลือดแดง ให้ใช้ sterile pasture pipette ดูดเอาพลาสมาส่วนบน และเม็ดเลือดขาวเก็บแยกกันไว้สำหรับซีรัมเมื่อเลือดที่ไม่ได้ผสมกับ EDTA นำไปปั่นจะมีส่วนใสอยู่ด้านบนสุดของหลอด เก็บซีรัมโดยใช้ sterile pasture pipette ดูดเอาเฉพาะส่วนใสเก็บไว้

1.3 การเตรียมสารสกัดเม็ดเลือดขาว ทำได้โดยนำเม็ดเลือดขาวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800xg (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที เก็บ pellet ของเม็ดเลือดขาวแล้วนำมาล้างด้วย normal saline จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 800xg เวลา 15 นาที เก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C จากนั้นนำ pellet มาละลายกลับในสารละลาย 10 % acetic acid (v/v) vortexed อย่างแรง 5 นาที แล้ว homogenized 15 นาที เพื่อให้เซลล์ leukocyte แตก ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg (40 °C) เป็นเวลา 15 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสเก็บในหลอด จากนั้นนำสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง SpeedVac ละลายโปรตีนกลับด้วย 0.01% Acetic acid

2. การทดสอบเบื้องต้น (screen) คุณสมบัติของการยับยั้งการเจริญเติบโตจาก ซีรัม พลาสมา และสารสกัดจากเม็ดเลือดขาวของเลือดจระเข้ โดยวิธี disc diffusion method

2.1 การทดสอบเบื้องต้น (screen) คุณสมบัติของการยับยั้งการเจริญเติบโตจาก ซีรัม พลาสมา และสารสกัดจากเม็ดเลือดขาว ของเลือดจระเข้

โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบเป็นตัวแทนของแกรมบวกและแกรมลบอย่างน้อย 7 ชนิด คือ *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Vibrio cholerae*

2.1.1 เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว NB โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5

- 2.1.2 นำ cotton swab ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จุ่มเชื้อแล้วกดสัมผัสกับข้างหลอดบรรจุเชื้อเพื่อไม่ให้ชุ่มเกินไป ป้ายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร ในแนวระนาบ 3 ระนาบ
- 2.1.3 ใช้ปากกิบจุ่มแอลกอฮอล์แล้วฉีกไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น คีบแผ่น disc วางบนผิวหน้าอาหารให้ตรงกับตำแหน่งที่กำหนดไว้ ใช้ปากกิบกดเบาๆ ให้แนบกับผิวหน้าอาหาร
- 2.1.4 ปิเปิดสารละลายที่ต้องการทดสอบลงบน disc ปริมาตร 30 μ l
- 2.1.5 ทดสอบ positive control คือ streptomycin และ negative control คือ น้ำกลั่นร่วมด้วย
- 2.1.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง
- 2.1.7 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone
- 2.2 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดเมล็ดเลือดขาว
 - 2.2.1 คุณสมบัติความทนร้อน (Thermal stability)

ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดเลือดขาวของจระเข้ โดยนำสารสกัดเมล็ดเลือดขาวที่ได้บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันคือ อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และต้มในน้ำเดือด 10 นาที
 - 2.2.2 ผลของ EDTA ต่อคุณสมบัติในการทำลายเชื้อ

นำสารสกัดเมล็ดเลือดขาวมาเติมสารละลาย 0.5 mM EDTA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
 - 2.2.3 การย่อยด้วยเอนไซม์โปรเทนส (Protease degradation)

ใช้เอนไซม์โปรเทนส 0.01 ยูนิตต่อ 10 ไมโครกรัมโปรตีนของสารสกัดเมล็ดเลือดขาว เดิม 500 mM CaCl_2 1 μ l จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับสารสกัดเมล็ดเลือดขาวที่เติม 500 mM CaCl_2 1 μ l เมื่อครบ 24 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเอนไซม์โปรเทนส ด้วยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที

จากนั้นนำสารสกัดเมล็ดเลือดขาวทั้งหมดที่ผ่านการ treated ด้วยสภาวะต่างๆ มาทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เทียบกับสารสกัดเมล็ดเลือดขาวที่ไม่ได้ผ่านการ treated ใดๆ ด้วยวิธี Disc diffusion assay

3. การแยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptides จากซีรัม และสารสกัดเมล็ดเลือดขาว ด้วยเทคนิค Anion exchange chromatography โดยใช้เครื่อง Fast protein liquid chromatography (FPLC)

- 3.1 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ A (25 mM Tris – HCl pH 8.1) และ บัฟเฟอร์ B (25 mM Tris – HCl pH 8.1 + 0.5 M NaCl)
- 3.2 นำตัวอย่างที่ต้องการแยกมาเจือจาง 3 เท่า ด้วย buffer A
- 3.3 กรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 μ m และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C
- 3.4 เปิดเครื่องเข้าสู่โปรแกรมควบคุม คัดตั้ง reservoir buffer, sample loop ปริมาตร 50 μ l จากนั้น purge ไล่ฟองอากาศออกจาก line แล้วต่อ Anion exchange column ให้เรียบร้อย ทำการล้างเรซิน

ด้วยบัฟเฟอร์ B ประมาณ 20 นาที และ equilibrate column ด้วย บัฟเฟอร์ A จนกระทั่ง base line คงที่

3.5 load และฉีดสารละลายโปรตีนหรือเปปไทด์โดยใช้ Time programe ดังนี้

ตารางที่ 6 Time program ของเครื่อง FPLC แยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค DEAE Anion exchange column chromatography (UNO Q1)

step	(ml)start	Step
1	0	isocratic flow with 100% 25 mM Tris – HCl pH 8.1 at 1 ml/min, 1 min
2	1	set base line to 0.00
3	1	inject 1.00 ml
4	2	isocratic flow with 100% 25 mM Tris – HCl pH 8.1 at 1 ml/min, 1 min
5	3	linear gradient flow with 0% to 50% 25 mM Tris – HCl pH 8.1 + 0.5 M NaCl at 1 ml/min, 13 min
6	16	isocratic flow with 100% 25 mM Tris – HCl pH 8.1 + 0.5 M NaCl at 1 ml/min, 3 min
7	19	isocratic flow with 100% 25 mM Tris – HCl pH 8.1 at 1 ml/min, 8 min
8	27	end of protocol

3.6 pooled fraction ที่มี peak โปรตีนหรือเปปไทด์ เพื่อนำไปตรวจสอบหาความสามารถในการทำลายเชื้อโดยเทคนิค Disc diffusion assay ทดสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค Tricine SDS - PAGE ในลำดับต่อไป

4. การแยกส่วนของสารสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาวของจระเข้ โดยวิธีเจลฟิวเทรชัน

นำสารละลายสารสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาวมาแยกที่แยกโดย anion exchange column chromatography ที่เป็นส่วนที่มีฤทธิ์ในการดักจับโปรตีนที่เรขาคณิตมาแยกต่อโดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ Superdex 30 prep (เจลฟิวเทรชัน) เพื่อแยกโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 kDa

5. การตรวจสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดเม็ดเลือดขาว จาก anion exchange column ด้วย เจล zymogram refolding

5.1 เตรียม 15% polyacrylamide gel ซึ่งผสมเชื้อ *Micrococcus lisodietikus* 0.01 กรัม

5.2 ผสมเปปไทด์ที่แยกได้จาก anion exchange chromatography กับ solubilizing dye ซึ่งไม่มี β - mercaptoethanol อัตราส่วน 1:1

- 5.3 ทำการแยกขนาดโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที และ marker ที่ใช้คือ rain blow marker
- 5.4 ทำการล้างเอา SDS ออกด้วย 1% Triton X 100 ใน 10 mM phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 ปลอกเชื้อ 3-5 ชั่วโมง ตรวจดู inhibition clear zone ที่เกิดขึ้น
6. การหาความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหรือเปปไทด์ด้วย Tricine SDS-PAGE
- 6.1 นำสารละลายโปรตีนหรือเปปไทด์จากที่ต้องการตรวจสอบมาผสมกับสารละลายโปรตีน (Solutions) ในอัตราส่วน 1: 1 แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที
- 6.2 load marker และสารละลายโปรตีนหรือเปปไทด์ตัวอย่างละ 1 well ตามความเหมาะสม
- 6.3 ทำการแยกโปรตีนด้วย 16.5%T separating gel, 10%T spacer gel, 4%T stacking gel จนกระทั่งการแยกสมบูรณ์
- 6.4 ย้อมโปรตีนด้วย silver staining Kit (amersham bioscience)
- 6.5 ถ่ายรูปเจลและทำให้แห้งด้วยเครื่อง Gel dryer
7. การแยกบริสุทธิ์เปปไทด์จากซีรัม และสารสกัดเม็ดเลือดขาว ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)
- 7.1 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ A (0.1%TFA) และ บัฟเฟอร์ B (60% acetonitril (ACN) ใน 0.1%TFA)
- 7.2 กรองสารละลายเปปไทด์ด้วย filter membrane ขนาด 0.45 μm และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C
- 7.3 เปิดเครื่องเข้าสู่โปรแกรมควบคุม ติดตั้ง Reservoir buffer, Sample loop ปริมาตร 50 μl จากนั้น purge ไหลฟองอากาศออกจาก line แล้วต่อ Apollo C18 5u ขนาด 250x4.6 mm column ให้เรียบร้อย
- ทำการล้าง Stationary phase ด้วย บัฟเฟอร์ B ประมาณ 30 นาที equilibrate column ด้วย บัฟเฟอร์ A จนกระทั่ง base line คงที่
- 7.4 load และฉีดสารละลายเปปไทด์โดยใช้ Time program ดังนี้

ตารางที่ 7 Time program ของเครื่อง HPLC แยกบริสุทธิ์เปปไทด์ด้วย

Apollo C18 5u column ขนาด 250x4.6 mm column			
Step	time	% solvent A	% solvent B
0	0	100	0
1	20	80	20
2	50	0	100
3	60	100	0
stop	61	100	0

7.5 เก็บ peak เปปไทด์ เพื่อนำไปตรวจสอบหาความสามารถในการทำลายเชื้อโดยเทคนิค Disc diffusion assay และทดสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค Tricine SDS - PAGE ในลำดับต่อไป

8. แยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptides จากพลาสมาจะเข้าสู่โดยอาศัยเทคนิค centricon membrane filter และ HPLC-C18 และ hypercarbTM column HPLC

8.1 นำ plasma ของจะเข้มาเจือจาง 10 เท่า ด้วย 10 % Acetic acid แล้ว centrifuge ที่ 12000 rpm เป็นเวลา 60 นาที ที่ 4°C

8.2 หลังจากนั้นผ่าน Centrifugal membrane YM-3 ที่ 4°C 8500 rpm เพื่อแยกเอาเฉพาะเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa

8.3 นำส่วนที่แยกได้นี้ไปทำให้แห้งโดยใช้ speed vac concentrator แล้วนำมาละลายโดยใช้น้ำ

8.4 แยกต่อโดยใช้ C18 reversed phase HPLC

8.5 ใช้ hypercarbTM column HPLC ที่เหมาะสมต่อการแยกสาร hydrophilic แล้วทำการทดสอบการมีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียอีกครั้ง

9. ตรวจสอบคุณสมบัติของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากพลาสมาโดยย้อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

9.1 เตรียมสารละลายเอนไซม์โปรเนสเป็น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร โดยละลายเอนไซม์ใน 30 mM sodium-phosphate buffer pH 7.0

9.2 ใช้เอนไซม์โปรเนส 0.01 หน่วยต่อ 10 ไมโครกรัม โปรตีน เดิม 500 mM CaCl₂ 1 µl จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับโปรตีนที่เดิม 500 mM CaCl₂ 1 µl

9.3 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเอนไซม์โปรเนสด้วยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที

9.4 นำสารละลายเปปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยโปรเนส มาทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียเทียบกับสารเปปไทด์ที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยโปรเนส ด้วยวิธี Disc diffusion assay

10. การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ที่สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal inhibitory concentrations, MICs) (Thomas H., et al. 2000)

10.1 เดิม Mueller-hinton broth 50 µl ลงใน 96-well microtiter cell-culture plates

10.2 เดิมสารละลายเปปไทด์ 50 µl (เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน) ลงใน 96-well microtiter cell-culture plates (ชุดควบคุมใช้ antibiotic แทนสารละลายเปปไทด์)

10.3 เดิมสารละลายแบคทีเรีย 10⁴ CFU/ml ปริมาณ 50 µl ลงใน 96-well microtiter cell-culture plates

10.4 เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

10.5 วัดค่า A₅₅₀ ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่น้อยที่สุดที่สามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียได้เรียกว่า Minimal inhibitory concentrations (MICs)

11. การศึกษากิจกรรมการทำลายจุลินทรีย์โดยวิธี Total plate count

11.1 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวให้อยู่ในช่วง log phase (OD₆₀₀ = 0.5-0.6)

- 11.2 ปั่นเก็บเซลล์ที่ 800 xg นาน 5 นาที
- 11.3 ล้างเซลล์ด้วย 5 mM glucose ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 เป็นจำนวน 3 ครั้ง
- 11.4 ละลายเซลล์แบคทีเรียกลับในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5-0.6 จากนั้นเติมเปปไทด์ใส่สารละลายเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้ 70 % แอลกอฮอล์ เป็น positive control และใช้บัฟเฟอร์เป็น negative control
- 11.5 นำสารละลายผสมบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
- 11.6 เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำสารละลายผสมมาทำการเจือจาง แล้วตรวจสอบการทำลายเชื้อโดยวิธี spread plate
- 11.7 บ่มเชื้อทดสอบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate รายงานจำนวนเชื้อเป็น CFU/ml
- 12. ทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ โดยการทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดงของคน**
 - 12.1 เตรียม 2% Human red blood cell (HRBCs)
 - 12.2 ล้าง HRBCs ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง
 - 12.3 ผสม 2% HRBCs ปริมาตร 1 ml กับเปปไทด์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
 - 12.4 นำสารผสม (reaction mixture) ไปปั่นเหวี่ยง แล้วเก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร
 - 12.5 คำนวณเปอร์เซ็นต์ Hemolysis
- 13. การศึกษาผลของ antimicrobial peptides ต่อเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscopy)**
 - 13.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง
 - 13.1.1 เตรียม cell starter ของเชื้อแบคทีเรีย
 - 13.1.2 ปิเปิด cell starter ปริมาตร 1 ml ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีอาหาร NB อยู่ 100ml
 - 13.1.3 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสามารถวัดค่า OD₆₀₀ 0.5
 - 13.1.4 ทำการ centrifuge ที่ 1,500 g เป็นเวลาประมาณ 10 นาที ในขั้นตอนนี้อาจทำการ centrifuge หลายรอบ จนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียตามต้องการ
 - 13.1.5 ทำการล้างเซลล์ด้วย 10 mM phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 ประมาณ 2 ครั้ง
 - 13.1.6 จากนั้นทำการละลายเซลล์ด้วย 10 mM PBS ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1

- 13.1.7 ปิเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร และสารละลายเปปไทด์ 100 ไมโครลิตร (1:1) ลงใน microtube ขนาด 1.5 ml จากนั้นทำการ incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง
- 13.1.8 ทำการ fix เซลล์ด้วย 2.5% glutaraldehyde (w/v) ประมาณ 1 ชั่วโมง วางบน polycarbonate membrane
- 13.1.9 ล้างด้วย 10 mM PBS
- 13.1.10 ขั้นตอนการส่องด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- 13.1.11 นำเซลล์บน membrane มาทำการ dehydrate ด้วย 30% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol และ 90% ethanol อย่างละ 1 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วย 100% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาทีเช่นกัน
- 13.1.12 นำ membrane เข้าเครื่อง CPD จากนั้นทำการเคลือบทองลงบนผิวเซลล์
- 13.1.13 นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

14. การศึกษาการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรีย (Outer Membrane

Permeabilization Assay)

ในการทดลองจะใช้ 1-N-phenyl naphthylamine (NPN) เป็นตัวตรวจสอบ ซึ่ง NPN เป็นสาร fluorescent โดยจะเกิดการเรืองแสงได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็น hydrophobic โดยหาก เปปไทด์ สามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกเกิด permeabilization สาร NPN จะเข้าไปจับกับบริเวณ hydrophobic ของ lipid bilayer ซึ่งจะทำให้ค่าการเรืองแสงของ NPN เพิ่มขึ้น

- 14.1 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวให้อยู่ในช่วง log phase ($OD_{600} = 0.5-0.6$)
- 14.2 ปั่นเก็บเซลล์ แล้วล้างเซลล์ด้วย HEPES buffer pH 7.2 แล้ว re-suspended เซลล์ใน 50 mM KCN ใน HEPES buffer pH 7.2 ($OD_{600} = 0.5-0.6$)
- 14.3 ปิเปต 500 mM NPN ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใส่ในเซลล์แบคทีเรียที่จะทดสอบปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วเติมเปปไทด์ที่ต้องการทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรีย
- 14.4 บ่มสารละลายผสมนาน 14 นาที แล้ววัดฟลูออเรสเซนส์ที่เพิ่มขึ้นของสาร NPN ด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer โดยใช้ streptomycin sulphate เป็น positive control

15. การศึกษาการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรีย (Inner Membrane

Permeabilization Assay)

- 15.1 การเตรียม Liposome Encapsulate Enzyme β -galactosidase
 - 15.1.1 ละลาย lecithin จากถั่วเหลือง 1.2 กรัม ใน PBS pH 7.4
 - 15.1.2 นำสารละลาย lecithin ผสมกับสารละลายเอนไซม์ β -galactosidase ที่ละลายอยู่ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- 15.1.3 นำสารละลายผสม sonicated ด้วยเครื่อง ultrasonic นาน 10 นาที เพื่อให้ได้ vesicles แล้วนำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน
- 15.1.4 ย้าย liposome ใส่ในหลอดทดลองที่สะอาด แล้วละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้สำหรับการทดลอง

15.2 Inner Membrane Permeabilization Assay

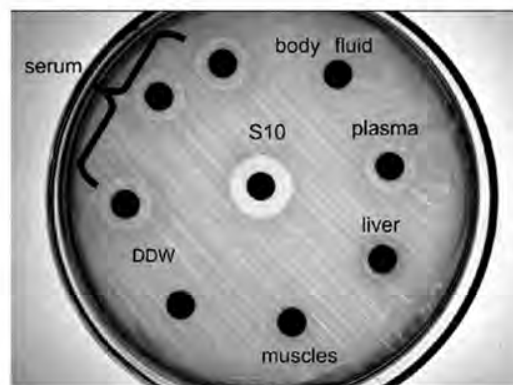
- 15.2.1 เติม Liposome Encapsulate Enzyme β -galactosidase 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate แล้วเติม ONPG 100 ไมโครลิตร
- 15.2.2 เติมเปปไทด์ที่ต้องการทดสอบใส่ในสารละลายที่อยู่ใน 96-well plate
- 15.2.3 วัดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm

16. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ antimicrobial peptides โดยวิธี *de-novo* LC-MS-MS

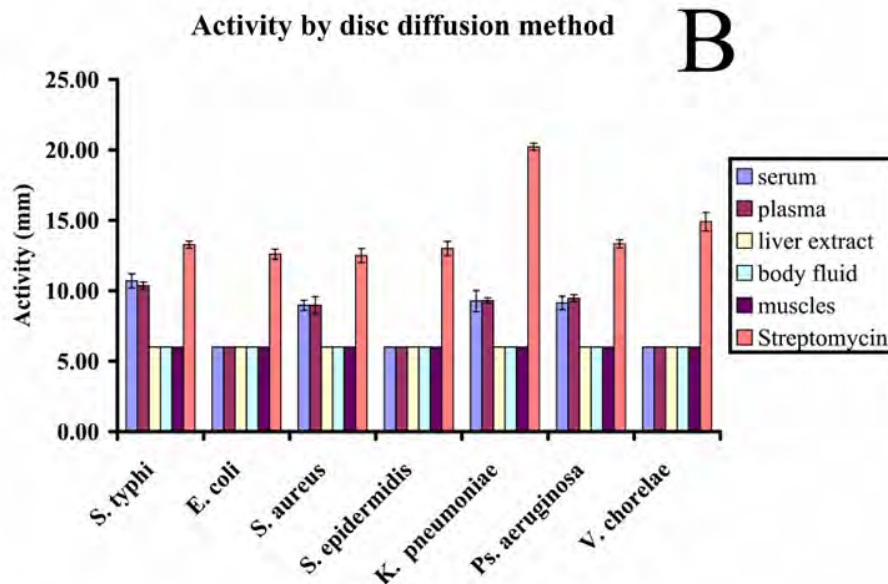
- 16.1 ย่อยตัวอย่างเปปไทด์ด้วย 6 N HCl ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
- 16.2 นำ hydrolysate ไปทำให้แห้ง แล้วละลายกลับด้วย 0.02 N HCl 100 μ l
- 16.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง L-8500 amino acid analyzer (Hitachi, Japan)
- 16.4 หาลำดับกรดอะมิโนโดยเครื่อง Automated ProciseTM 492 protein sequencer (Applied Biosystems, Japan)
- 16.5 มวลโมเลกุลของเปปไทด์ด้วยเครื่อง Mass spectrometry (API QSTAR Pulsar I LC/MS/MS system และ 4700 proteomics analyzer MALDITOF/TOF system, Applied Biosystems)
- 16.6 สำหรับ *de-novo* sequencing วิเคราะห์โดย ESI-Q-TOF

ผลการทดลอง

การทดสอบเบื้องต้น (screen) สมบัติของการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจาก ซีรัมและพลาสมา และสารสกัดจากเม็ดเลือดขาว โดยวิธี disc diffusion method พบว่า ทั้งซีรัม พลาสมา และสารสกัดจากเม็ดเลือดขาวของเลือดจระเข้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกได้แตกต่างกัน นอกจากนี้ในสารสกัดของเม็ดเลือดขาวยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา คือ *Candida albican* ซึ่งได้เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นด้วยได้ผลการทดลองดังรูปที่ 8



A

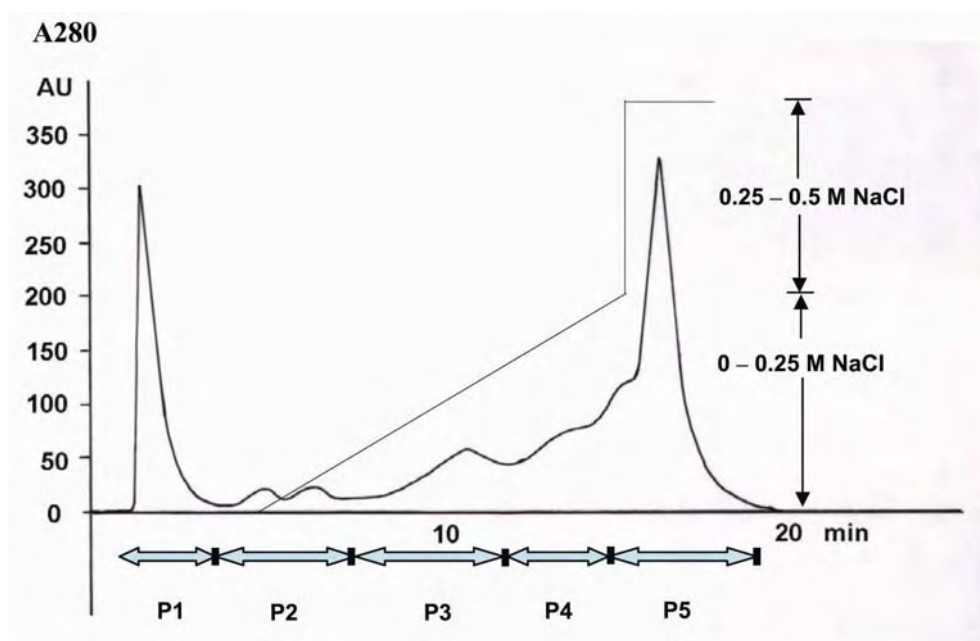


B

รูปที่ 8 ผลการ screen หาฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของซีรัม และพลาสมาเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นๆจากจระเข้

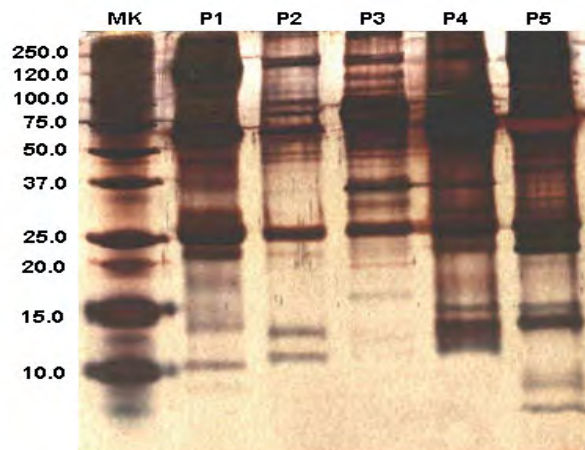
การแยกบริสุทธิ์โปรตีนเปปไทด์จากซีรัมของกระชัง

ผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนหรือเปปไทด์ด้วย Anion exchange column chromatography โดยใช้เครื่อง Fast protein liquid chromatography (FPLC) โดยนำ Crude serum มาเจือจาง 3 เท่า ด้วยน้ำกลั่น โดยผ่านคอลัมน์ Q sepharose fast flow anion exchange column chromatography จะได้ chromatogram ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} ซึ่งมี peak โปรตีนต่างๆ ดังรูปที่ 9



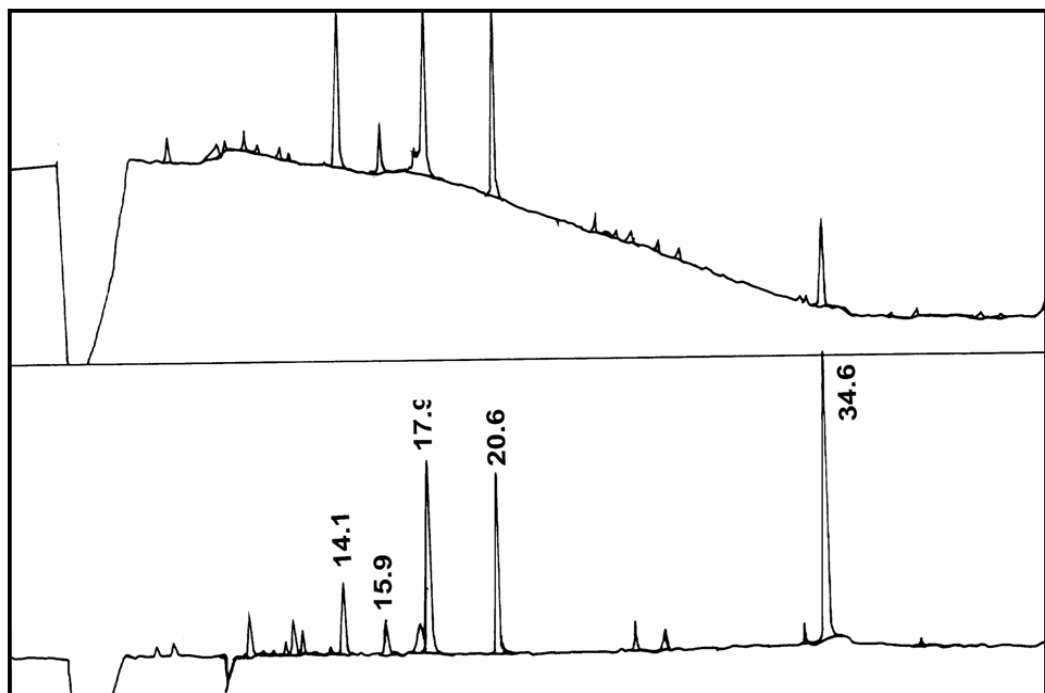
รูปที่ 9 Elution profile ของการแยกบริสุทธิ์โปรตีน จาก Crude serum ด้วย Q sepharose fast flow anion exchange column (UNO Q1 column, Bio-rad), flow rate 60 ml /hr (Preecharram *et al.*, 2008)

จากการแยกบริสุทธิ์โปรตีนจาก Crude serum ด้วย Q sepharose fast flow anion exchange column พบว่ามีการจับของโปรตีนในคอลัมน์และเมื่อชะแบบ Linear gradient ด้วย 0-0.5 M NaCl ใน 25 mM Tris-HCl pH 8.1 แล้วเกิดการแยกออกเป็น peak โปรตีนได้ 5 peak คือ P1, P2, P3, P4 และ P5 ทำ Pooled fraction ตรวจสอบขนาดของโปรตีนจากทุก fraction ด้วย tricine SDS-PAGE ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 10 จากนั้นนำทุก Fraction ไปทดสอบการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และพบว่า P1, P2 มีประสิทธิภาพดีในการทำลายเชื้อราจึงนำ P1, P2 แยกต่อด้วย HPLC ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 11 และ รูปที่ 12

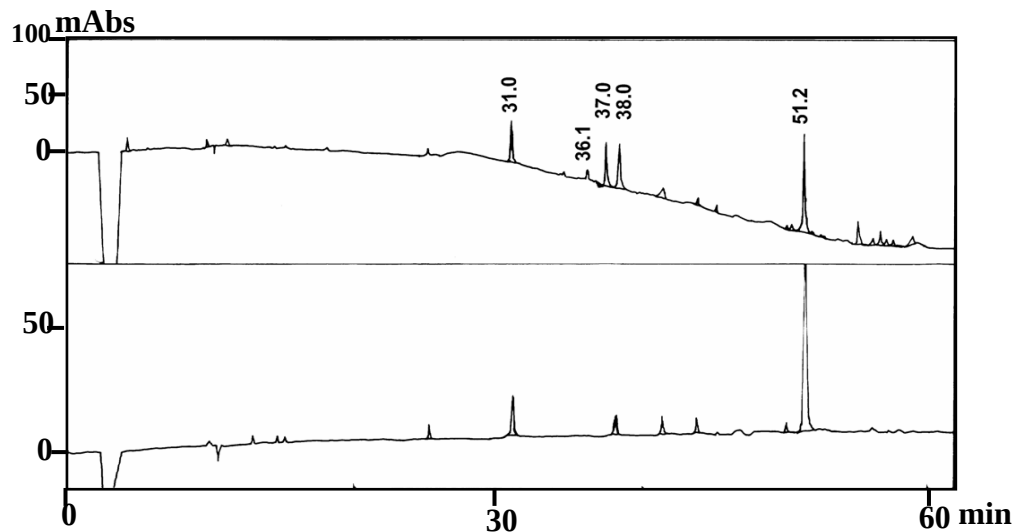


รูปที่ 10 Tricine SDS-PAGE ของโปรตีนที่มาจาก Crude serum จากการแยกโดย FPLC

จากรูปจะเห็นได้ว่า Fraction P1 และ P2 มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบจำนวนมากจากน้ำหนักโมเลกุลที่สูงไปหาน้อยและพบโปรตีนขนาดโมเลกุลเล็กประมาณ 10 kDa มองเห็นได้อย่างชัดเจนใน PAGE



รูปที่ 11 โครมาโตแกรมการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ของ P1 ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ Apollo C18 5u column ขนาด 250 x 4.6 mm บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.1 %TFA และ 60%Acetonitrile ใน 0.1 %TFA flow rate 60 ml/hr (Preecharram *et al.*, 2008)



รูปที่ 12 โครมาโตแกรมการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ของ P2 ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ Apollo C18 5u column ขนาด 250 x4.6 mm บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.1 %TFA และ 60% Acetonitrile ใน 0.1 %TFA flow rate 60 ml/hr (Preecharram *et al.*, 2008)

จากนั้นทำการเก็บ Peak ต่างๆ ที่แยกได้นำไปทดสอบสมบัติด้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากในการแยกเบื้องต้นมีข้อจำกัดของปริมาณเปปไทด์ จึงสามารถทดสอบได้เฉพาะกับเชื้อ *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งให้ผลการทดลองสรุป ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 สรุปผลทดสอบความสามารถด้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด ของเปปไทด์ ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วย เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

Retention time	แยกได้จาก	สามารถด้านการเจริญของเชื้อ	
		<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
14.1 (p14.1)	P1/2	✓	✓
15.9 (p15.9)	P1/2	✓	✓
17.9 (p17.9)	P1/2	✓	✓
20.6 (p20.6)	P1/2	-	-
34.6 (p34.6)	P1/2	-	-
31.0 (p31.0)	P2/2	✓	✓
36.1 (p36.1)	P2/2	✓	✓
37.0 (p37.0)	P2/2	-	-
38.0 (p38.0)	P2/2	-	-
51.2 (p51.2)	P2/2	✓	✓

จากนั้นนำ active fraction p14.1, p15.9, p17.9, p31.0, p36.1 และ p51.2 ไปตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF mass spectrometry พบว่า ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของเปปไทด์ p14.1, p15.9 และ p51.1 ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Mass spectrometry

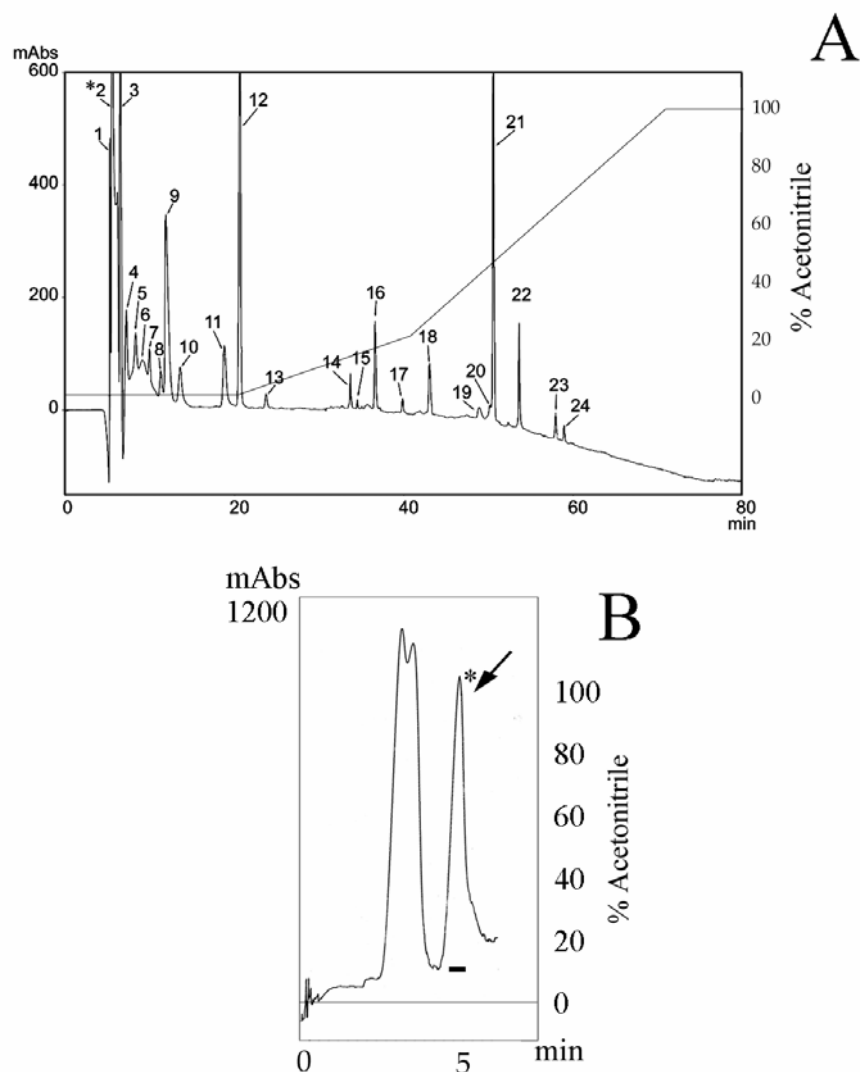
เปปไทด์	น้ำหนักโมเลกุล (Da)
p14.1	994
p15.9	893
p17.9	-
p31.0	-
P36.1	-
p51.1	927

โดยสรุปสำหรับการแยก antimicrobial peptide จากซีรัมจะพบว่าน่าจะพบ antimicrobial peptide อย่างน้อย 6 peptides ซึ่งภายใน 6 peptide นี้มีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 1000 kDa ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเปปไทด์โมเลกุลเล็กกลุ่มนี้อาจมีหน้าที่ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยตัวของเปปไทด์เองหรือเป็นการทำงานร่วมกับตัวอื่นๆ

การแยกบริสุทธิ์เปปไทด์จากพลาสมาของจระเข้

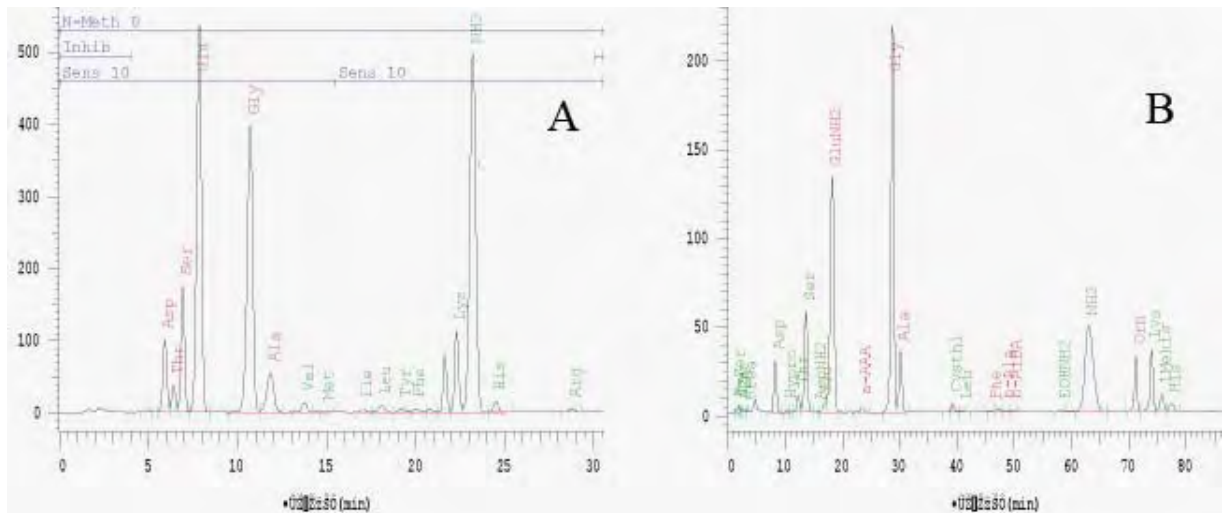
นำพลาสมาของจระเข้มาเจือจาง 10 เท่า ด้วย 10 % Acetic acid แล้ว centrifuge ที่ 12000 rpm เป็นเวลา 60 นาที ที่ 4°C หลังจากนั้นผ่าน Centrifugal membrane YM-3 ที่ 4°C 8500 rpm เพื่อแยกเอาเฉพาะเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa นำส่วนที่แยกได้นี้ไปทำให้แห้งโดยใช้ speed vac concentrator แล้วนำมาละลายโดยใช้น้ำ และแยกโดยใช้ C18 reversed phase HPLC ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 13

จากนั้นทำการเก็บ Peak ต่างๆที่แยกได้นำไปทดสอบสมบัติด้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีเพียงเปปไทด์ใน Peak ที่ 2 (รูป star หลังจากทำ rechromatography) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus*



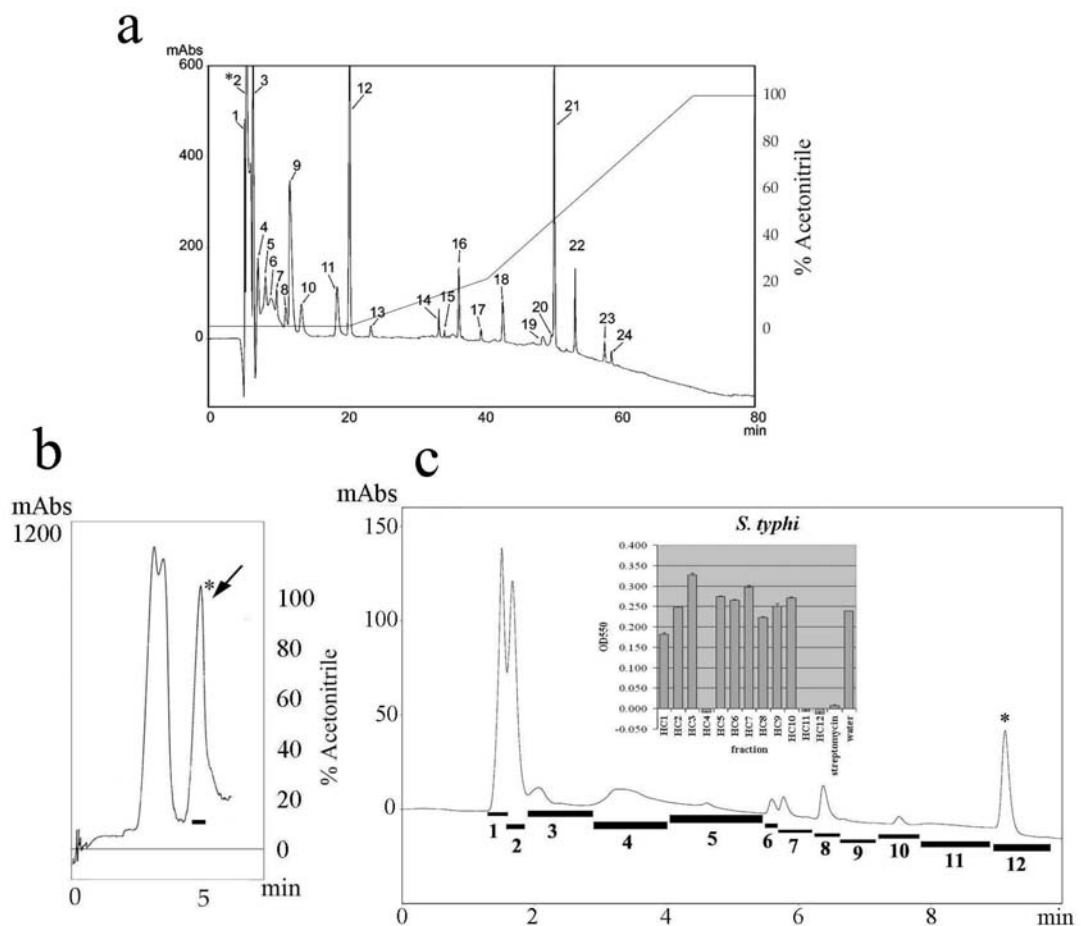
รูปที่ 13 โครมาโตแกรมการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ของพลาสมาจะเข้าด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) (A) และการ rechromatogram โดยใช้ Apollo C18 5u column ขนาด 250 x4.6 mm บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.1 %TFA และ 60%Acetonitrile ใน 0.1 %TFA flow rate 60 ml/hr (B)

จากลักษณะของเปปไทด์ที่ 2 พบว่าจะถูกชะออกมาเร็วมากเหมือนไม่มีปฏิสัมพันธ์กับเรซินในคอลัมน์ซึ่งเป็นไปได้ว่าเปปไทด์เส้นนี้น่าจะมีความเป็นไฮโดรฟิลิกที่สูงมาก จึงนำ peak ที่ 2 ไปศึกษา amino acid composition โดยวิธี post column derivatization with Ninhydrin ทั้งมีการไฮโดรไลซิสและไม่ไฮโดรไลซิสได้ผลการทดลองดังรูปที่ 14



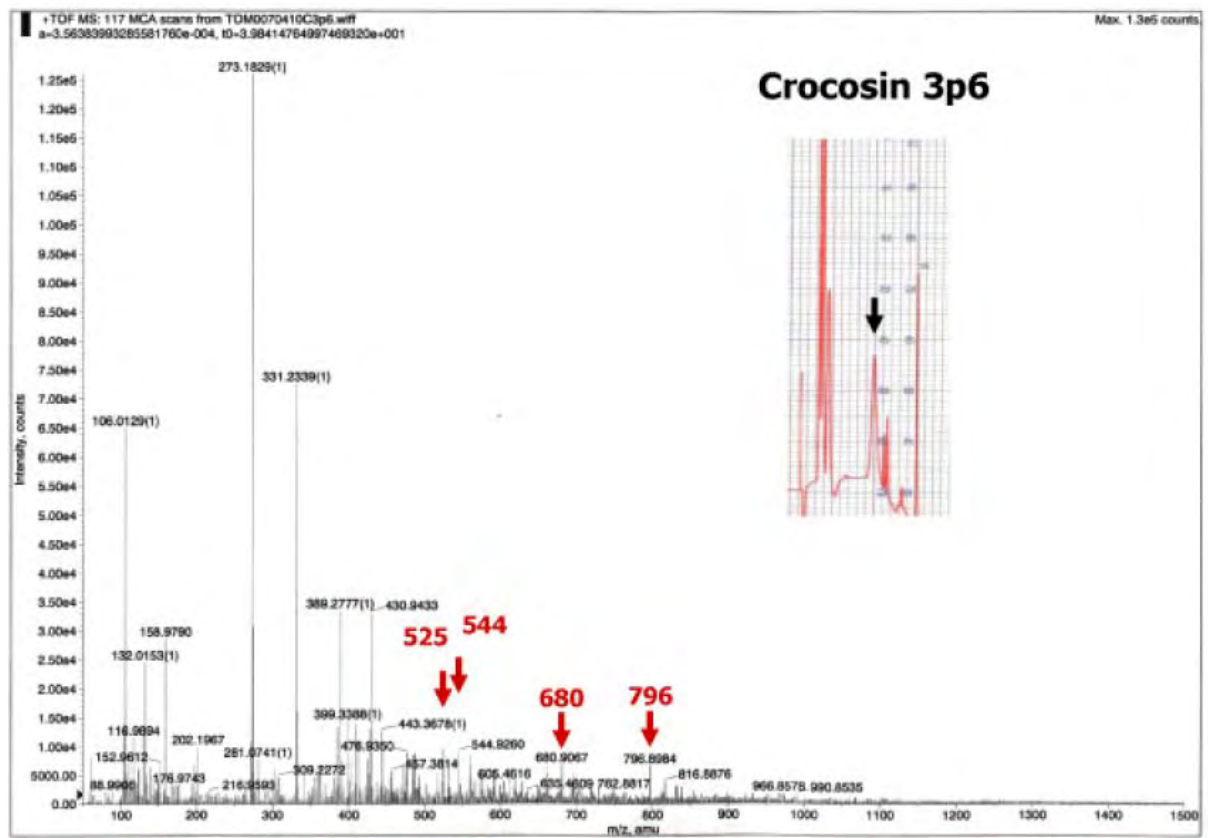
รูปที่ 14 ผลการทำ (A) hydrolyzed peptide no. 2 เปรียบเทียบกับ (B) nonhydrolysis

ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าทั้งจากส่วน hydrolyzed และ nonhydrolyzed จะมีปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่ไม่แตกต่างกันโดยในส่วนของไฮโดรไลซิสจะมีปริมาณของ กลูตาเมต และ โกลซีนมากกว่าเล็กน้อยซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า active fraction no. 2 (crocosin 3) เป็น compound ที่มีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ หรือเป็น compound ที่ไม่มีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ ผู้ทำการการวิจัยจึงทำการ แยกบริสุทธิ์ active fraction no. 2 ด้วย hypercarb HPLC column (Thermo electrocorporation, Japan) ที่มีคุณสมบัติในการแยกเปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกได้ดี ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 15 C



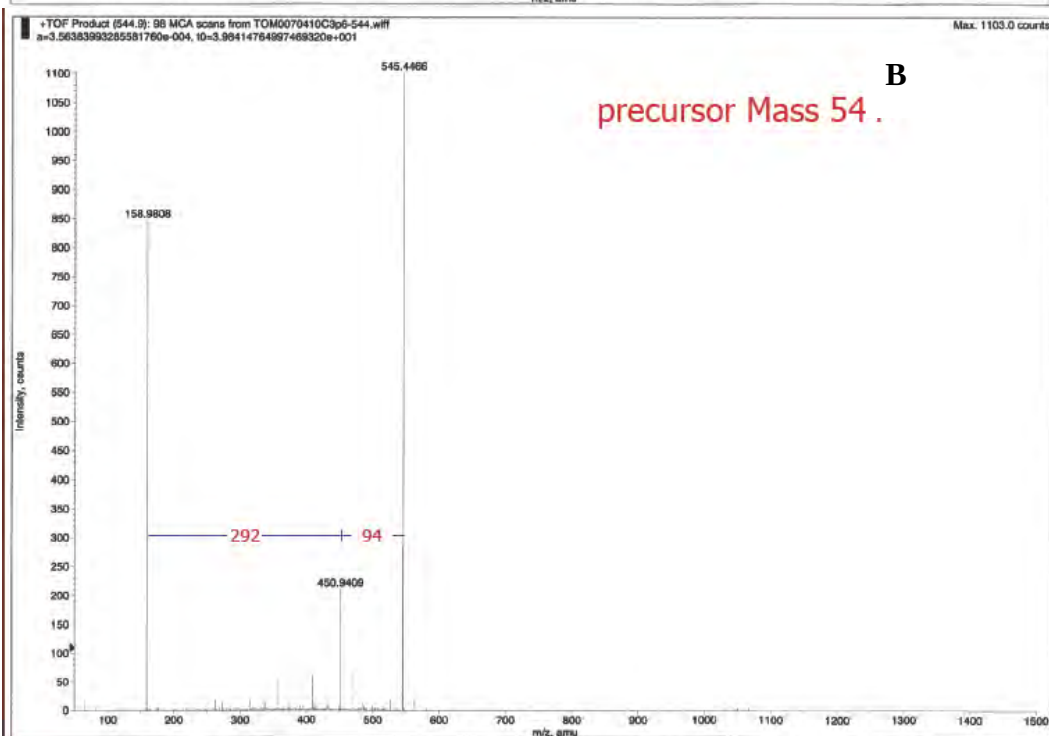
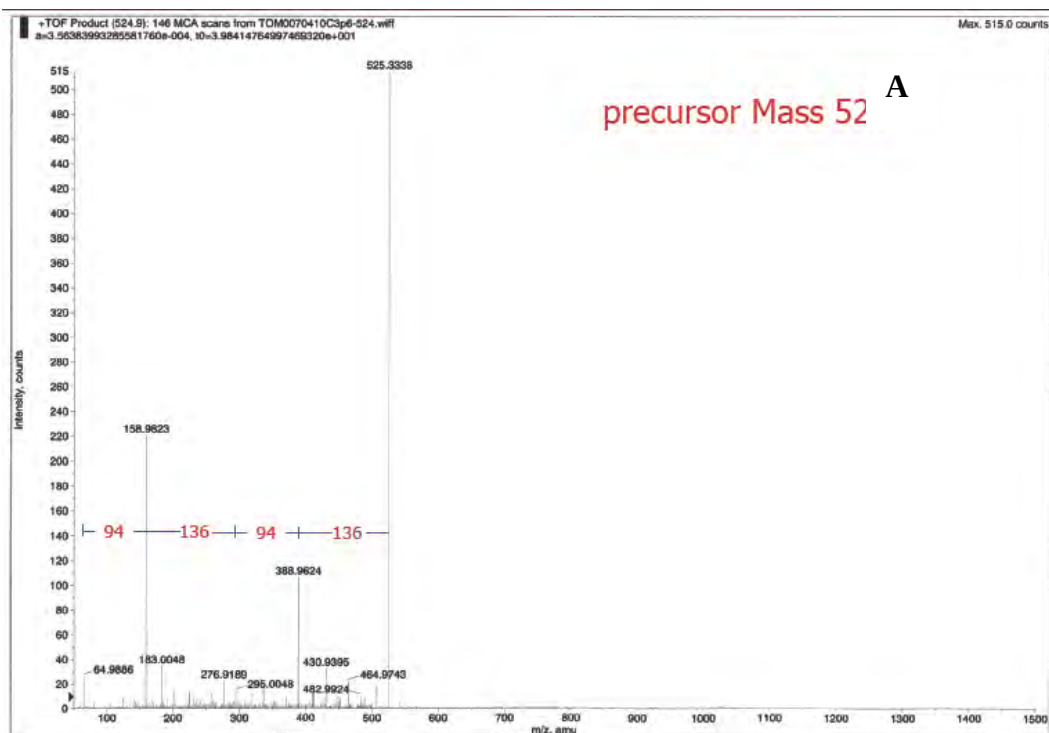
รูปที่ 15 การแยกบริสุทธิ์ active compound จากพลาสมาจระเข้ (a) เปปไทด์ ที่แยกโดย C18-RP-HPLC (b) เปปไทด์ ที่แยกโดย C18-RP-HPLC โดยการ rechromatogram (c) เปปไทด์ที่แยกได้โดย hypercarbTM column HPLC โดยเครื่องหมาย * บอกถึง พิกที่มี antibacterial activity

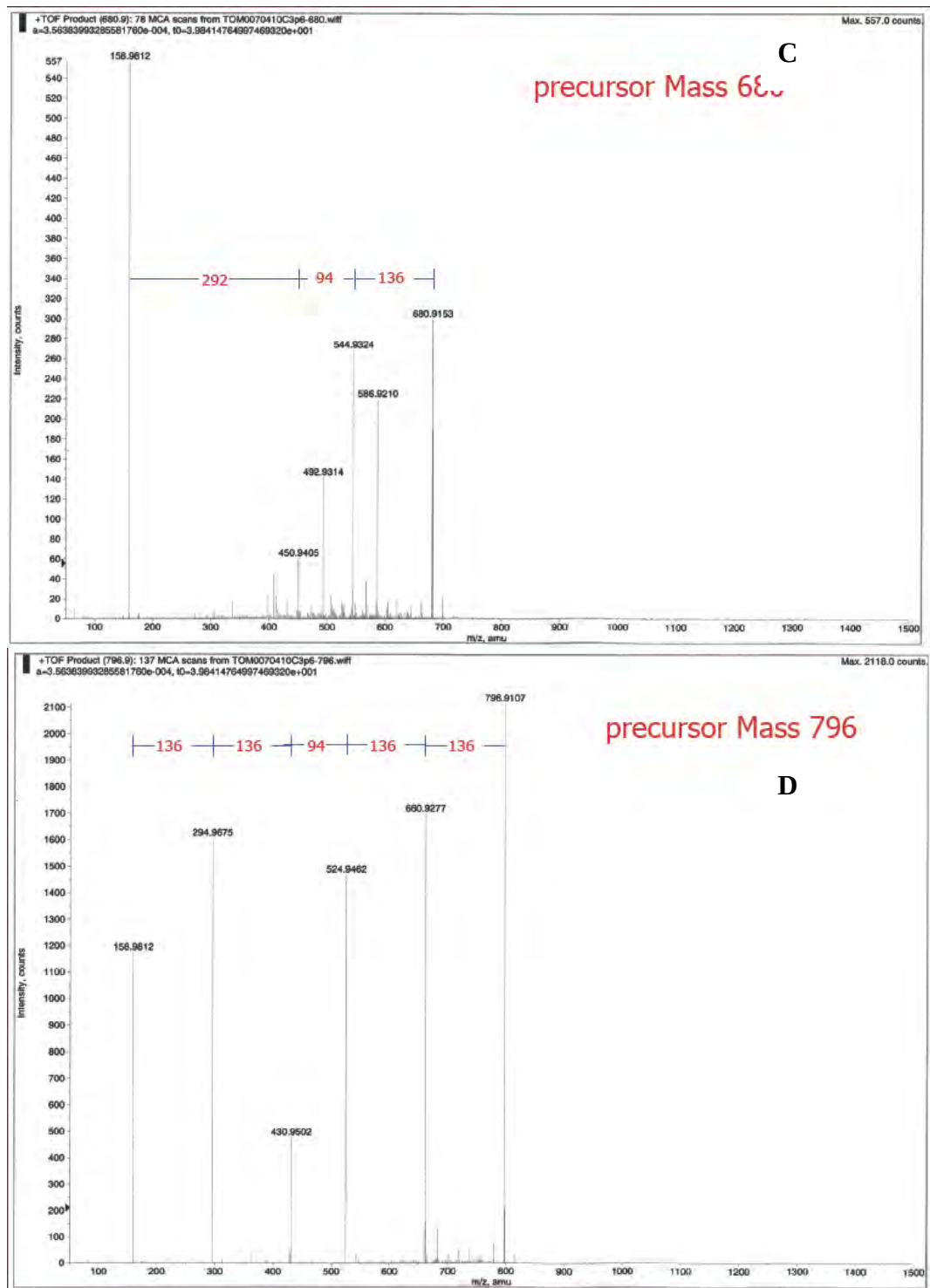
จากผลการทดลองพบว่ามีเปปไทด์แยกออกมาได้หลาย peak โดยในเบื้องต้นทำการเลือก peak ที่ 6 และ peak ที่ 10 และ 12 ไปศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิของ compound นี้ด้วย ESI-MS และ ESI-MS-MS เนื่องจาก peak ที่ 6 และ peak ที่ 10 เป็น peak ที่มีความเข้มข้นที่สูงและมีลักษณะเป็นพิกของเปปไทด์ จากผลการศึกษาโดย ESI-MS และ ESI-MS-MS ของ peak 6 ได้ผลดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 mass spectrum profile ของ peak 6 ลูกศรสีแดง คือ mass ที่จำเพาะที่เลือกไปศึกษาต่อกับ ESI-MS-MS

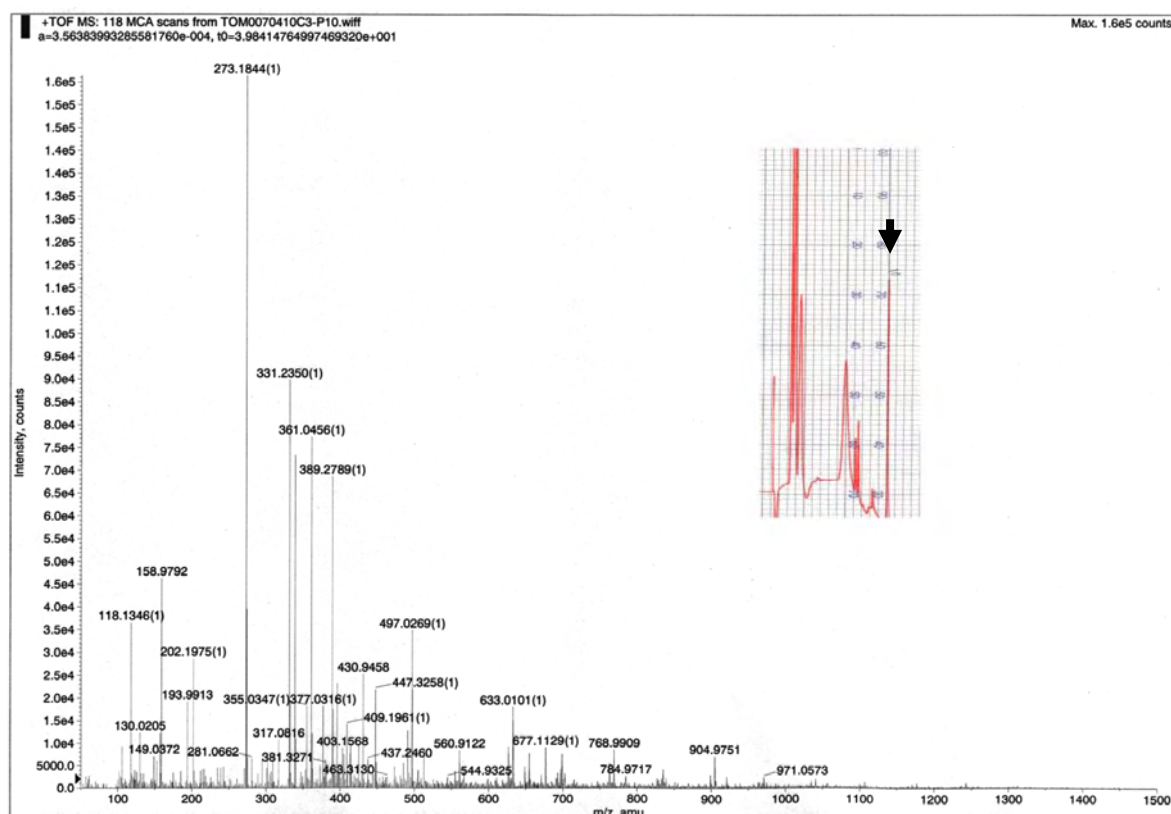
จากรูปนำโมเลกุลที่มีมวลขนาด 525, 544, 680 และ 796 Da ไปทำให้แตกหักโดย ESI-MS-MS เพื่อจะศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 17 A-D





รูปที่ 17 ESI-MS-MS mass profile ของ แต่ละ precursor mass ที่มาจาก peak 6

จากข้อมูลของ ESI-MS-MS จะพบว่าสารนี้จะมีลักษณะโครงสร้างเป็น repeating unit ของ น้ำหนักโมเลกุลที่ไม่ correspond กับกรดอะมิโนใดๆ ส่วน peak ที่ 10 ก็ทำการศึกษามวลโมเลกุลโดย MALDI-TOF เช่นกันได้ผลการทดลองดังรูป 18



รูปที่ 18 mass spectrum profile ของ peak 10

ซึ่งในส่วนของเปปไทด์นี้ก็เช่นกันก็อยู่ในขบวนการที่ต้องตรวจสอบ antimicrobial activity ของเปปไทด์ใหม่อีกครั้งและจะทำการ confirm โครงสร้างอีกครั้งด้วย LC-MS-MS และทำการแยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptides จากพลาสมาจะขึ้นอยู่กับ เพราะจากที่แยกไว้ไม่สามารถบอกโครงสร้างของ active compound ได้ โดยอาศัยเทคนิค centricon membrane filter หลังจากนั้นแยกด้วย HPLC-C18 ซึ่งพบว่ามีเพียงพีคที่ 2 ที่มี antibacterial activity แต่จากการตรวจสอบด้วย mass spectrometry พบว่า ยังไม่สามารถบอกโครงสร้างของ active compound ได้เพราะว่ายังไม่บริสุทธิ์เพียงพอ และจากสมบัติของเปปไทด์ที่น่าจะเป็น hydrophilic compound จึงได้ใช้ hypercarbTM column HPLC ที่เหมาะสมต่อการแยกสาร hydrophilic แล้วทำการทดสอบการมีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียอีกครั้ง

จากผลการทดลองพบว่า hypercarbTM column สามารถแยกสารออกมาได้หลายพีคและเมื่อตรวจสอบ antibacterial activity พบว่าพีคที่ 12 สามารถทำลายเชื้อ *S. typhi*. ได้ดีที่สุด จึงตั้งชื่อเป็น crocosin และจากการวิเคราะห์โครงสร้างของ Crocosin โดยการหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายหมู่อะมิโน พบว่า Crocosin มีลำดับกรดอะมิโน 2 ตัวแรกเป็น อะลานีน และไกลซีน และจากการวิเคราะห์โดยวิธี ESI-MS/MS พบลักษณะการซ้ำๆของสเปกตร้าของมวลขนาด 94 และ 136 ดาลตัน ซึ่งมวลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับมวลของกรดอะมิโนตัวใด และเมื่อนำ crocosin ไปตรวจสอบคุณสมบัติโดยการทำ heat treatment และย่อยด้วย เอนไซม์ pronase ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการย่อย crocosin และ heat treatment ของ crocosin ต่อเชื้อ *S. typhi*.

Treatment *	Antimicrobial activity
Crocosin ** + CaCl ₂	+
Crocosin ** (100 °C, 20 min) + CaCl ₂	+
Crocosin ** + pronase + CaCl ₂	+
Crocosin ** (100 °C, 20 min) + pronase + CaCl ₂	+
Sodium-phosphate buffer (pH 7.0) + pronase + CaCl ₂	-

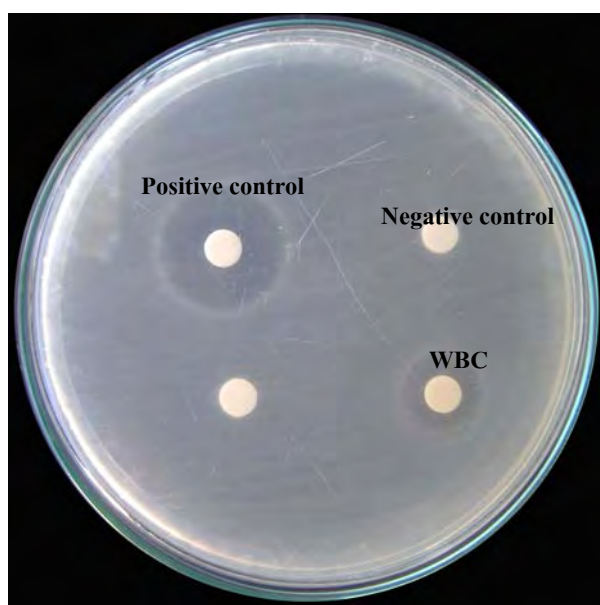
* The treatment was done by incubated at 37 °C for 24 h.

** Sample was reconstituted in Sodium-phosphate buffer pH 7.0.

จากผลการทดลองพบว่า crocosin มีความสามารถทนต่อความร้อนและทนต่อการย่อยด้วย pronase ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า crocosin เป็นสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนเป็นส่วนประกอบทั้งหมดหรือเป็นกลุ่ม cyclic protein หรือ cyclic peptide เพราะสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทั้งทนร้อนและ pronase

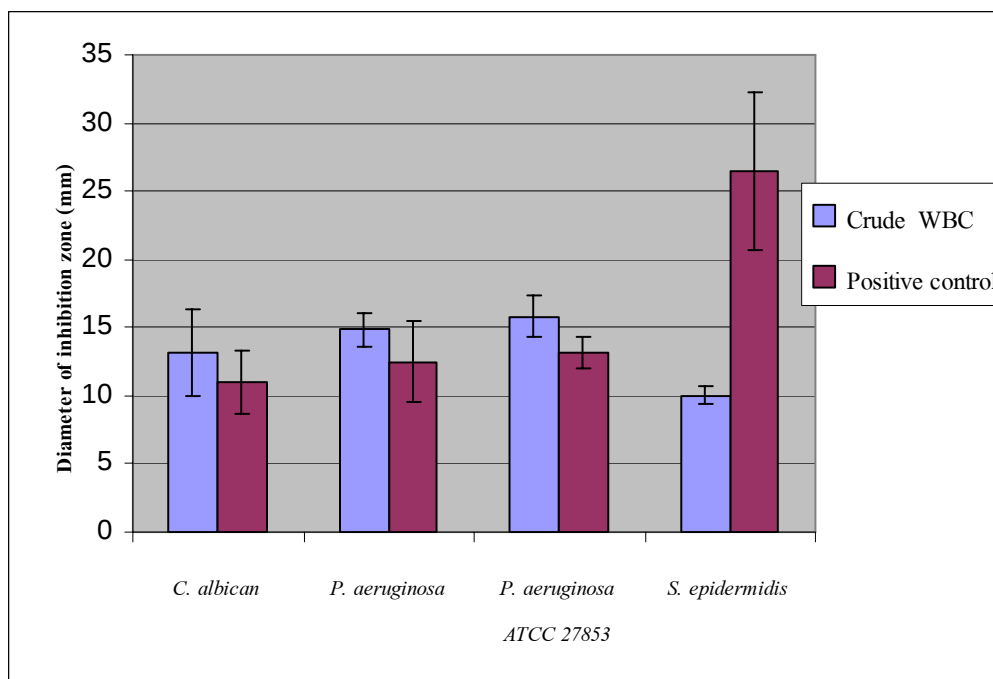
การแยกบริสุทธิ์เปปไทด์จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้

ในการทำนองเดียวกันกับซีรัมและพลาสมาโดยทำการแยกเม็ดเลือดขาวจากเม็ดเลือดแดงโดย dextran หลังจากนั้นสกัดเม็ดเลือดขาวโดยใช้ Homogenizer และตรวจสอบเบื้องต้นกับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา 16 ชนิด โดยวิธี disc diffusion method ได้ผลดังรูปที่ 19

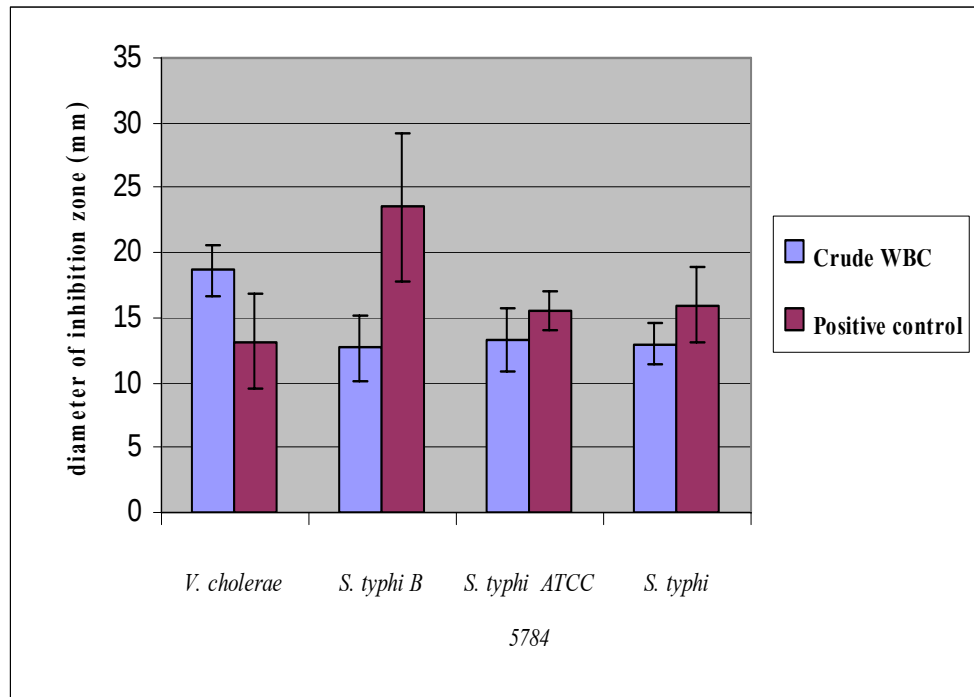


รูปที่ 19 ตัวอย่างการเกิด Clear zone ของเชื้อ *Candida albican* กับสารสกัดจากเม็ดเลือดขาวจระเข้สายพันธุ์ไทย

จากการ screen เชื้อทั้งหมด 16 ชนิดพบว่า สารสกัดเม็ดเลือดขาวทำลายเชื้อราและแบคทีเรียได้ สารสกัดจากเม็ดเลือดขาวจะเข้าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi* B, *Salmonella typhi* ATCC 5784 , *Vibrio cholerae* และเชื้อรา 1 ชนิด คือ *Candida albican* ซึ่งได้ทำซ้ำ 6 รอบโดยแบ่งบาร์ตรงผลการทดลองเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 20 และ 21



รูปที่ 20 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ (Crude white blood cell extracted) (Pata *et al.*, 2007)



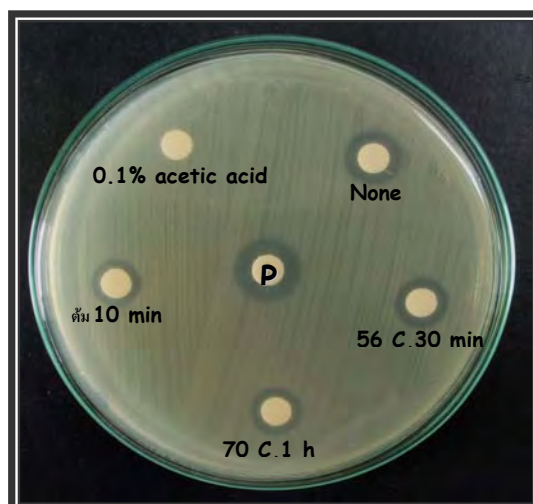
รูปที่ 21 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi* B, *Salmonella typhi* ATCC 5784, *Vibrio cholerae* ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ (Crude white blood cell extracted) ด้วยเทคนิค Disc diffusion assay (Pata *et al.*, 2007)

การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย

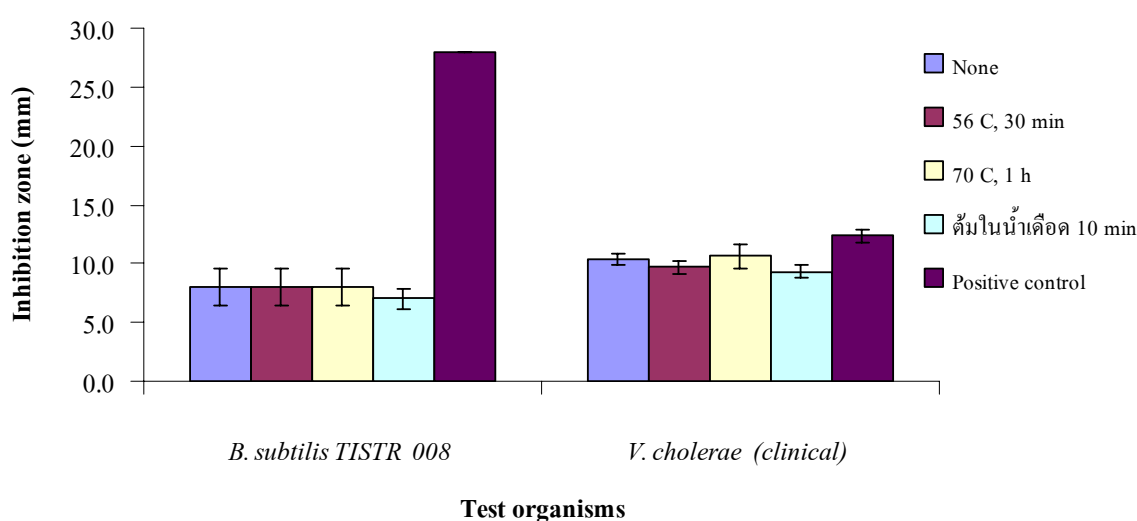
ทำการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดเม็ดเลือดขาว ในด้านคุณสมบัติการทนความร้อน คุณสมบัติการทนต่อ proteolytic enzyme และผลของ EDTA ต่อคุณสมบัติในการทำลายเชื้อ เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียในสารสกัดเม็ดเลือดขาวเป็นสารชนิดใด

1. คุณสมบัติความทนร้อน (Thermal stability)

ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ โดยนำสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ได้บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันคือ อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นนำสารสกัดเม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ มาทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียเทียบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้ผ่านการ treated ด้วยวิธี Disc diffusion assay ซึ่งผลพบว่า สารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆนั้น ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ แสดงให้เห็นว่าสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเม็ดเลือดขาวนั้นมีความทนต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งสามารถทนได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ได้ ไม่ใช่สารที่อยู่ในระบบคอมพลิเมนต์ เนื่องจาก สารในระบบคอมพลิเมนต์จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 ตัวอย่างการเกิด clear zone ในเชื้อ *Vibrio cholerae* (clinical) ที่ทดสอบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

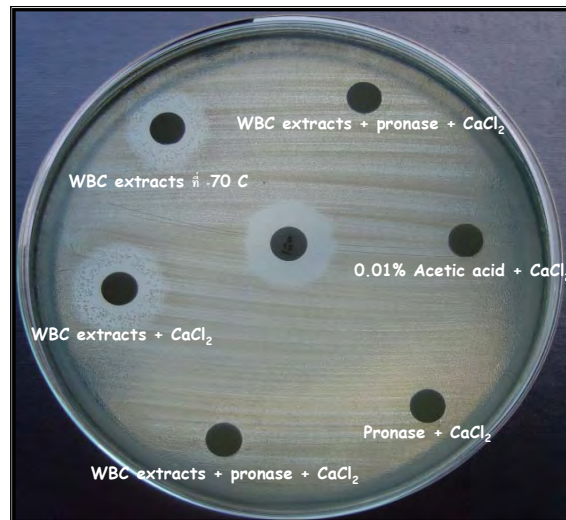


รูปที่ 23 กราฟแสดง Inhibition zone (mm) ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ (Leukocyte extracts) ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

1. คุณสมบัติการทนต่อ proteolytic enzyme

เมื่อย่อยสารสกัดเม็ดเลือดขาวด้วยเอนไซม์โปรเนสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อเทียบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่เดิม 500 mM CaCl_2 1 μl ด้วยวิธี Disc diffusion assay พบว่า สารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรเนส ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เมื่อเทียบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้ถูกย่อย

ด้วยเอนไซม์ รูปที่ 25 แสดงว่า สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อในสารสกัดเม็ดเลือดขาวนั้นน่าจะเป็น โปรตีนหรือเปปไทด์ เนื่องจากไม่ทนต่อเอนไซม์โปรเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนให้ได้กรดอะมิโนอิสระ ทำให้สารสกัดเม็ดเลือดขาวไม่เหลือฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

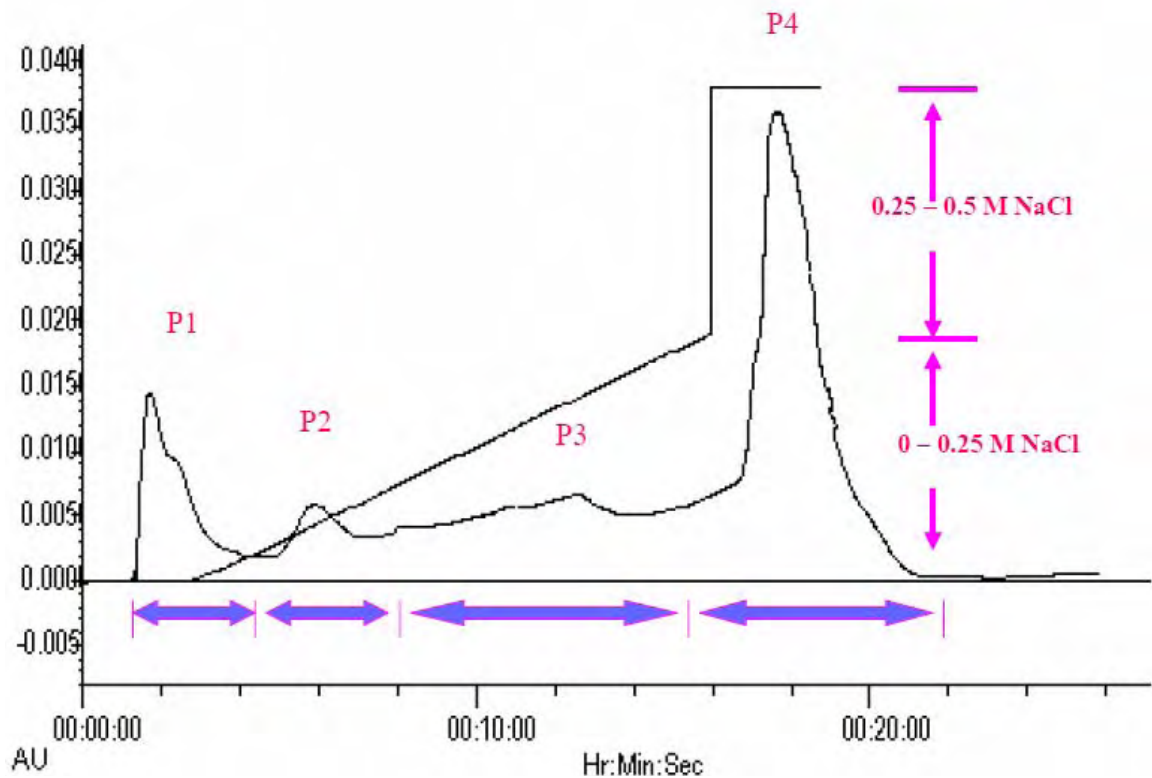


รูปที่ 24 ตัวอย่างการเกิด clear zone ในเชื้อ *Vibrio cholerae* (clinical) ที่ทดสอบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรเนส เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ถูกย่อย

2. ผลของ EDTA ต่อคุณสมบัติในการทำลายเชื้อของสารสกัดเม็ดเลือดขาว

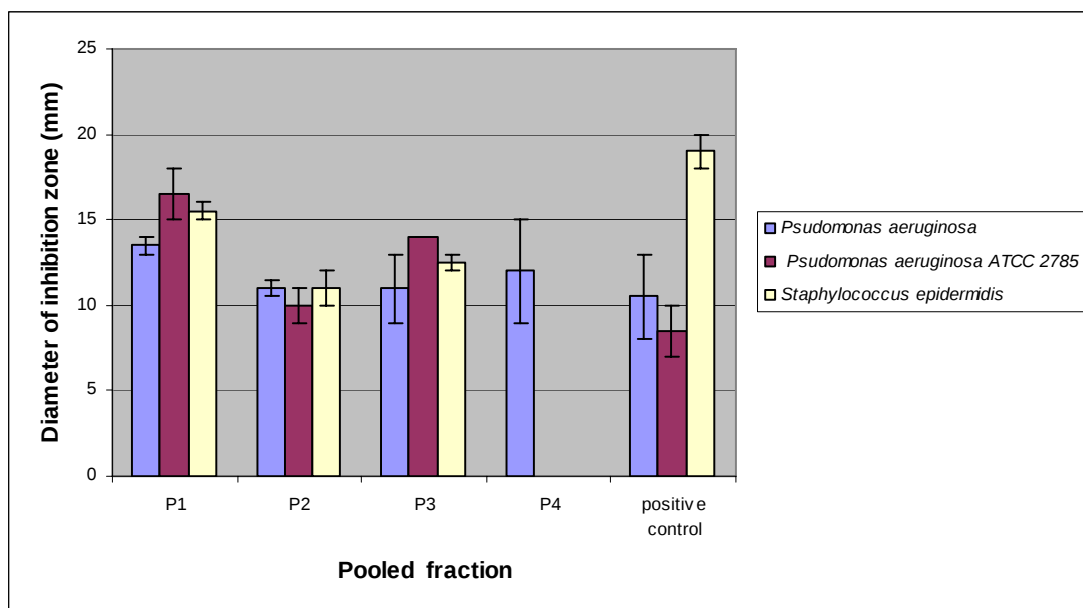
เมื่อบ่มสารสกัดเม็ดเลือดขาวกับ 0.5 mM EDTA ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เปรียบเทียบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้บ่มร่วมกับ 0.5 mM EDTA พบว่า สารสกัดเม็ดเลือดขาวที่บ่มร่วมกับ EDTA ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเช่นเดียวกับที่ไม่ได้เติม EDTA แสดงว่า สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อในสารสกัดเม็ดเลือดขาวนั้น ไม่ต้องการ valent metal ions ในการทำงาน

จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาแยกบริสุทธิ์โดย Anion exchange column chromatography โดยใช้เครื่อง FPLC ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 25

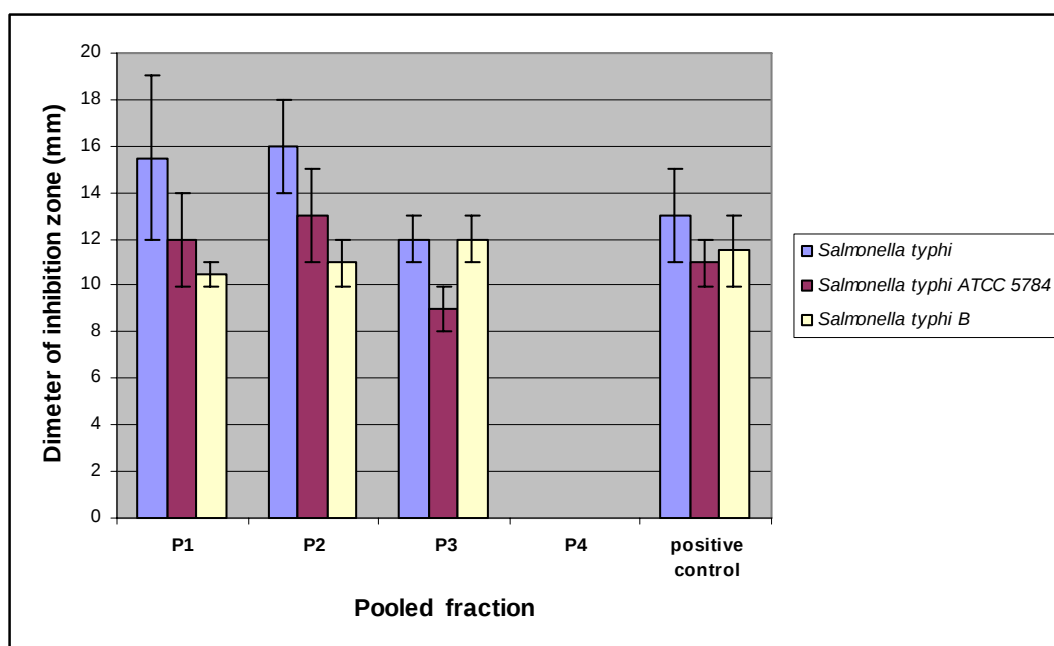


รูปที่ 25 Elution profile ของการแยกบริสุทธิ์โปรตีน จาก สารสกัดเม็ดเลือดขาว ด้วย Q sepharose fast flow anion exchange column (UNO Q1 column,Bio-rad) flow rate 60 ml /hr

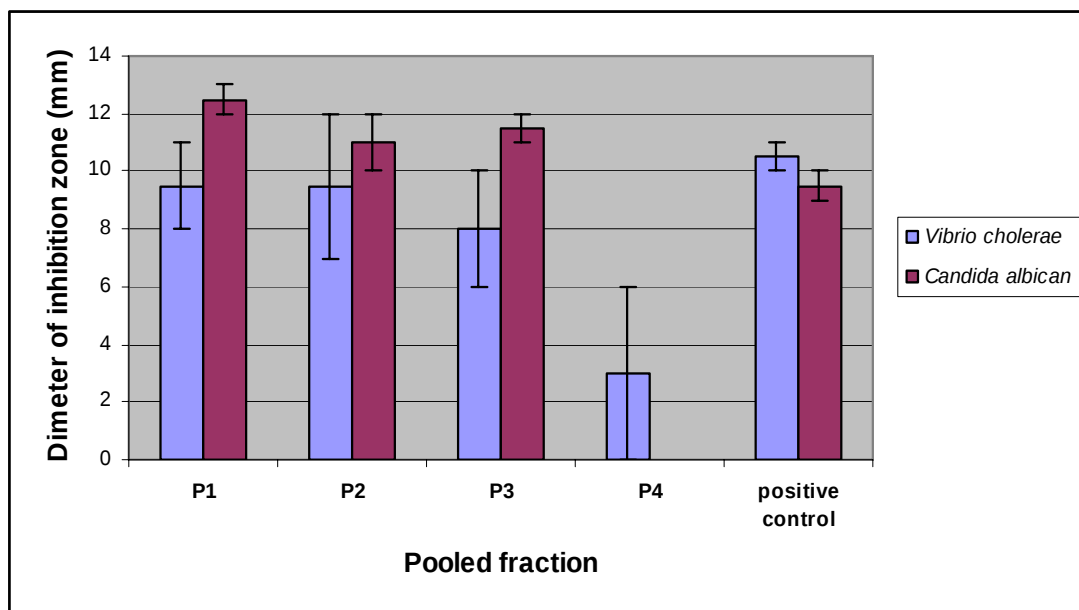
จากการแยกบริสุทธิ์โปรตีนจาก Crude white blood cell extracted ด้วย Q sepharose fast flow anion exchange column พบว่ามีการจับของโปรตีนในคอลัมน์และเมื่อชะแบบ Linear gradient ด้วย 0 – 0.5 M NaCl ใน 25 mM Tris-HCl pH 8.1 แล้วเกิดการแยกออกเป็น peak โปรตีนได้ 4 peak คือ P1, P2, P3, P4 ทำการ Pooled fraction จากนั้นนำทุก Fraction ไปทดสอบการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนของ Pooled fraction (P1 – P4) เท่ากับ 2.50, 2.42, 2.40 และ 3.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับและ Positive control คือ 10 μg ของ Streptomycin ส่วน Negative Control ที่ใช้คือหยดสารละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่แยกบริสุทธิ์ได้ ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 26-28



รูปที่ 26 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Staphylococcus epidermidis* ของ Pooled fraction ที่แยกบริสุทธิ์ได้โดย FPLC จากสารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวจระเข้ (Pata *et al.*, 2007)

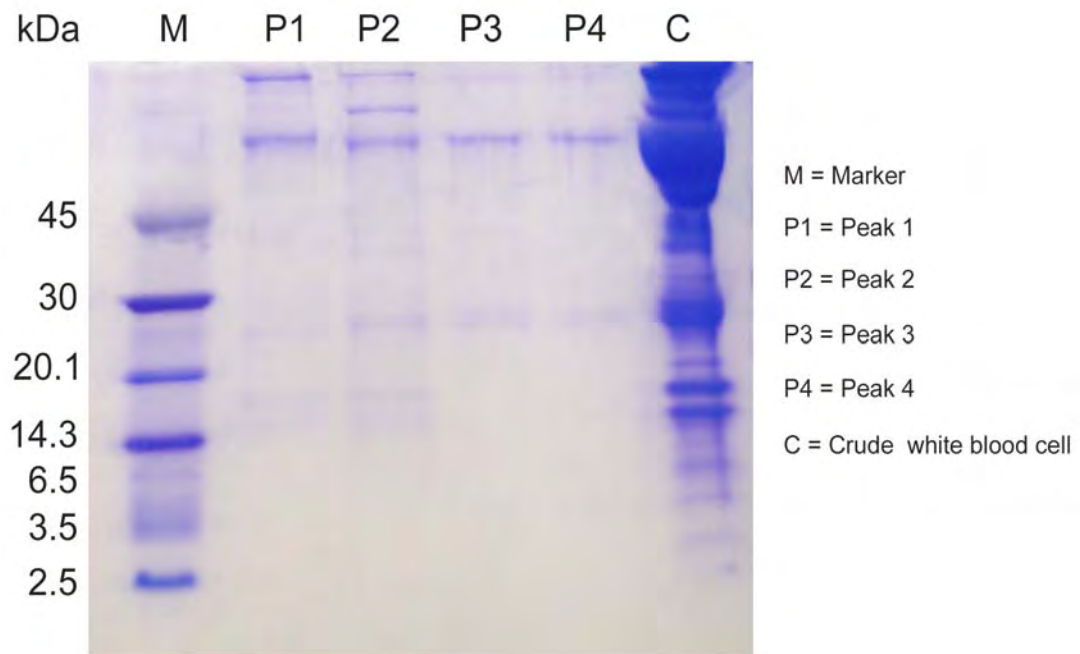


รูปที่ 27 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi* B, *Salmonella typhi* ATCC 5784 ของ Pooled fraction ที่แยกบริสุทธิ์ได้โดย FPLC จากสารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวจระเข้ (Pata *et al.*, 2007)



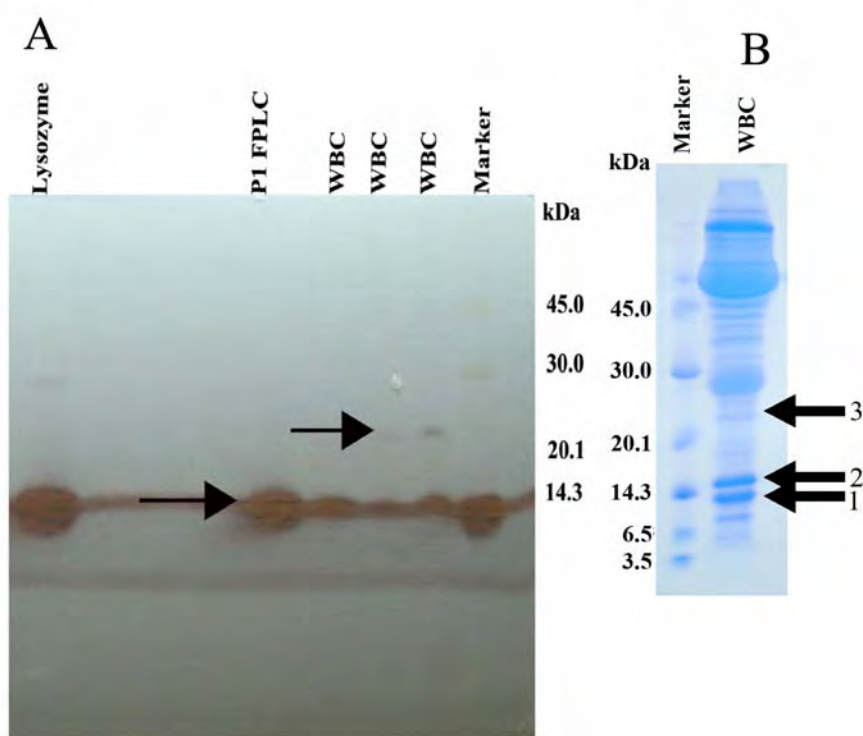
รูปที่ 28 กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae*, *Candida albican* ของ Pooled fraction ที่แยกบริสุทธิ์ได้โดย FPLC จากสารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวจระเข้

โปรตีนทั้ง 4 peaks คือ P1, P2, P3 และ P4 ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย ตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์โปรตีนของ P1, P2, P3, P4 ที่ได้จาก Q sepharose fast flow anion exchange column โดยเทคนิค tricine SDS – PAGE เมื่อทดสอบการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราแล้ว พบว่าสารละลายโปรตีนทั้ง 4 กลุ่มสามารถต้านทานการเจริญของเชื้อได้ แต่พบว่า P1 มีความสามารถในการต้านเชื้อมากที่สุด จึงนำฟีด P1 ไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค HPLC ส่วนความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีน ด้วย Tricine SDS-PAGE ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 ผลการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของสารละลายโปรตีน P1 (lane2), P2 (lane3), P3 (lane4), P4 (lane5) และ Crude white blood cell extracted (lane6) เปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐาน (MK :molecular weight marker protein) (lane1)

จากผลการทดลองพบว่า ใน Fraction P1 ประกอบด้วยโปรตีนที่ชัดเจนที่สุดขนาดโมเลกุลประมาณ 14-15 กิโลดาลตัน ดังนั้น จึงนำ fraction P1 มาทดสอบ antimicrobial activity บนเจล ด้วยวิธี zymogram refolding gel ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 (A) zymogram refolding gel (15% SDS PAGE+ 0.01 g *Micrococcus lisodietikus*)
(B) 15% SDS PAGE ย้อมด้วย Coomassie brilliant Blue (Pata *et al.*, 2007)

จากผลการทดลอง พบว่า ในสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ มีโปรตีนที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus lisodietikus* ได้ ที่ตำแหน่งของโปรตีน ขนาดโมเลกุล ประมาณ 15 กิโลดาลตัน และ 23 กิโลดาลตัน ซึ่งที่ตำแหน่ง 15 กิโลดาลตัน ถูกพบใน fraction P1 ด้วย โดยจะพบ clear zone เกิดขึ้นรอบๆตำแหน่งโปรตีนดังกล่าวหลังจากได้นำแถบโปรตีนทั้ง 3 แถบ (รูปที่ 30B) ไปหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโน (N-terminal sequence) ด้วย Edman-degradation technique แล้วพบว่าแถบโปรตีน 1 และ 2 เป็น hemoglobin α -chain ส่วน แถบโปรตีน 3 เป็นโปรตีนที่ยังไม่พบในฐานข้อมูล ดังตารางที่ 11

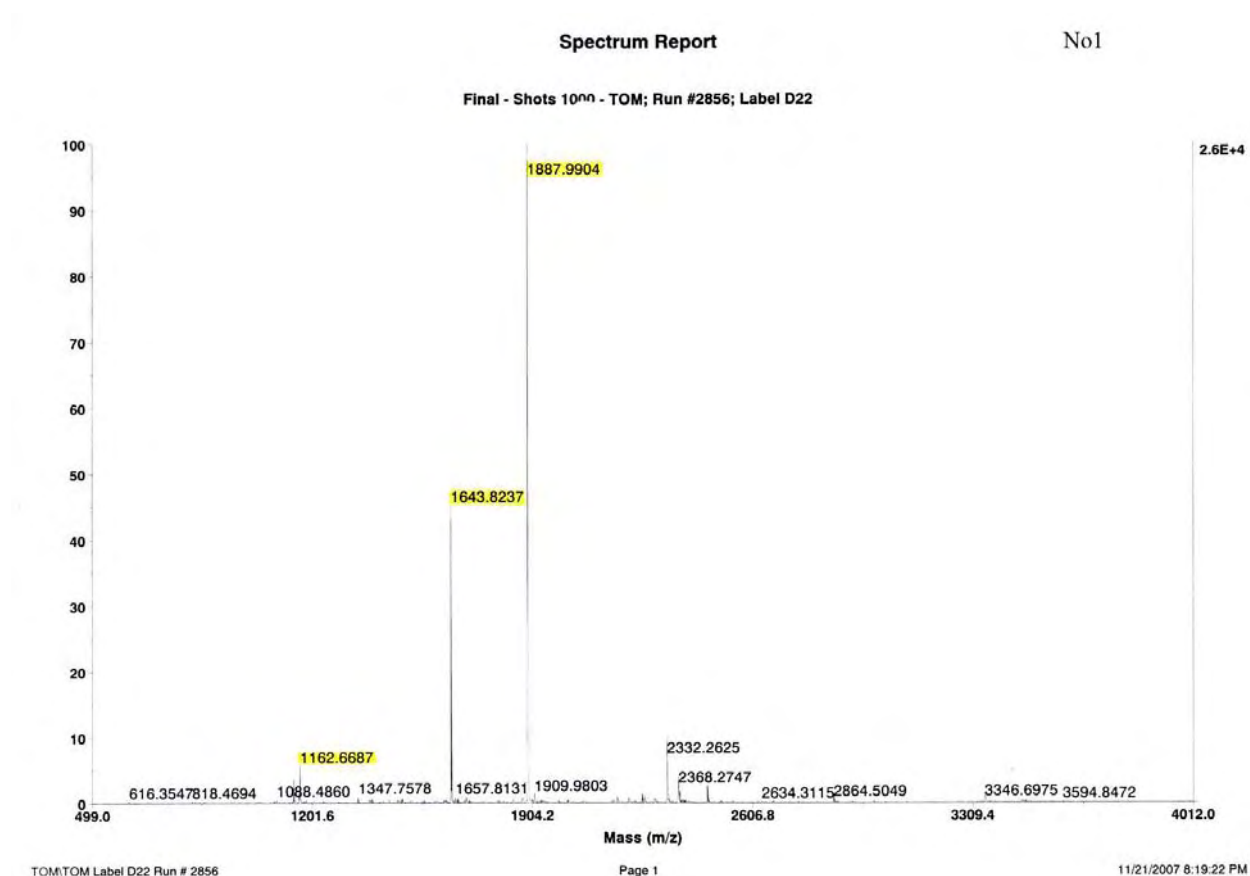
ตารางที่ 11 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้

แถบโปรตีน	ลำดับกรดอะมิโนด้าน N	ชนิดโปรตีนในฐานข้อมูลสืบค้น
1	VLSGDDKINV-	hemoglobin α -chain
2	VLSNDDKNNV-	hemoglobin α -chain
3	KLAVEMDPSP-	-

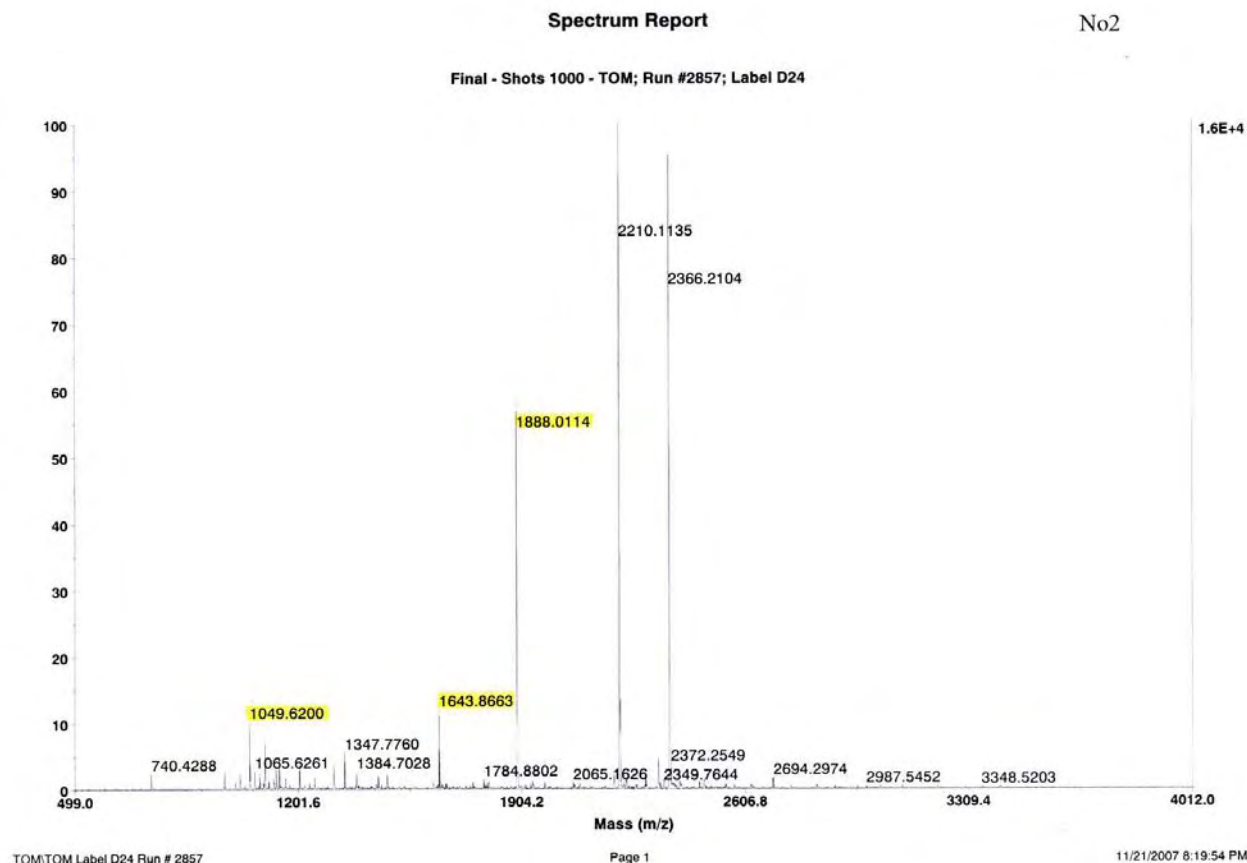
จากนั้นได้ทำการ ตรวจสอบโครงสร้างของโปรตีนทั้งสามชนิดอีกครั้ง ด้วย mass spectrometry โดยการนำ peptide mass finger print พบว่า โปรตีนทั้งสามชนิดไม่สามารถ match กับโปรตีนใด แต่เมื่อเปลี่ยนเทคนิคเป็น sequence tag (MS/MS) พบว่าสามารถระบุชนิดได้ดังตารางที่ 12 และรูปที่ 31 และ 32

ตารางที่ 12 ผลการตรวจสอบชนิดโปรตีน โดยวิธี sequence tag (MS/MS)

แถบโปรตีน	จำนวนของ TOF signals ที่นำไปทำวิเคราะห์	ชนิดโปรตีน
1	3	Hemoglobin alpha chain ของ Nile crocodile
2	3	Hemoglobin alpha chain ของ Nile crocodile
3	ไม่พบมวลของที่พอจะระบุชนิดโปรตีนได้	มวลของเปปไทด์ที่ขนาด 2021 m/z ได้ลำดับกรดอะมิโนคือ QVEDPHTHTSPDK ซึ่งจากการทำ blast พบว่ามีความคล้าย MHC class II

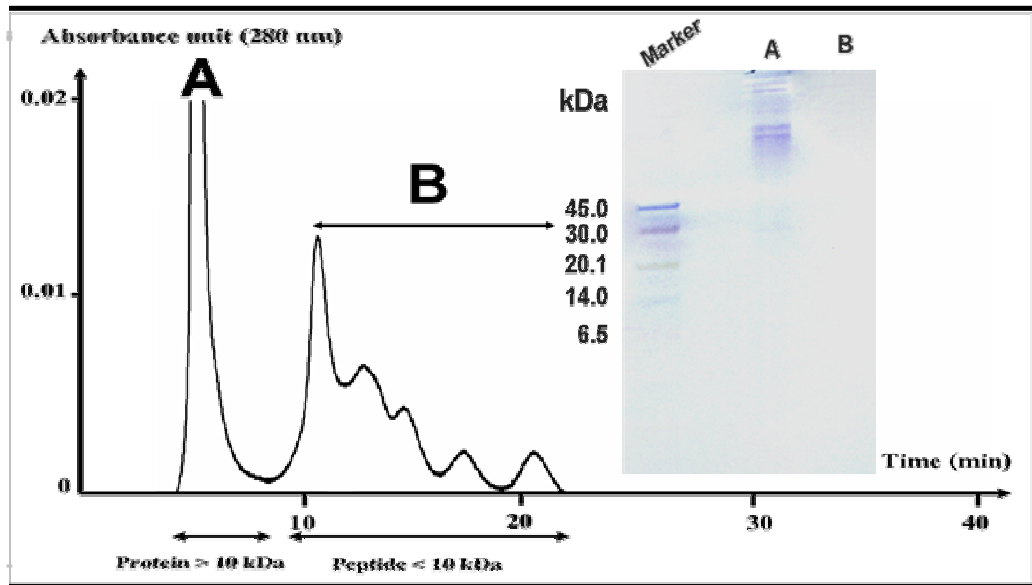


รูปที่ 31 Sequence tag (MS/MS) ของแถบโปรตีนหมายเลข 1



รูปที่ 32 Sequence tag (MS/MS) ของแถบโปรตีนหมายเลข 2

จากผลการทดลองนี้เป็นรายงานแรกที่พบว่าในระบบเลือดของจะเข้จะมี innate immunity ที่ประกอบไปด้วย โปรตีน เช่น ฮีโมโกลบิน เปปไทด์สายสั้นๆ ที่ต้องมีการตรวจสอบโครงสร้างต่อไป และอาจจะประกอบด้วยสารพวก glycoconjugate ที่พบในส่วนของพลาสมา และจากรูปที่ 27 พบว่าใน P1 fraction มีโปรตีนขนาดมากกว่า 10 kDa จำนวนมากในขณะที่เปปไทด์ที่แยกบริสุทธิ์ได้มีขนาดต่ำกว่า 10 kDa ดังนั้นเพื่อกำจัดโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ออกไปจึงทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีนจาก P1 fraction อีกครั้งด้วย column superdex 30 prep ซึ่งจะแยกโปรตีนตามขนาด โดยโปรตีนที่มีขนาดมากกว่า 10 kDa จะไม่เข้าไปในรูพรุนของเจลจึงถูกชะออกมาก่อน ส่วนโปรตีนขนาดต่ำกว่า 10 kDa จะเข้าไปในรูพรุนของเจลและถูกชะออกมาตามลำดับ chromatogram แสดงในรูปที่ 33

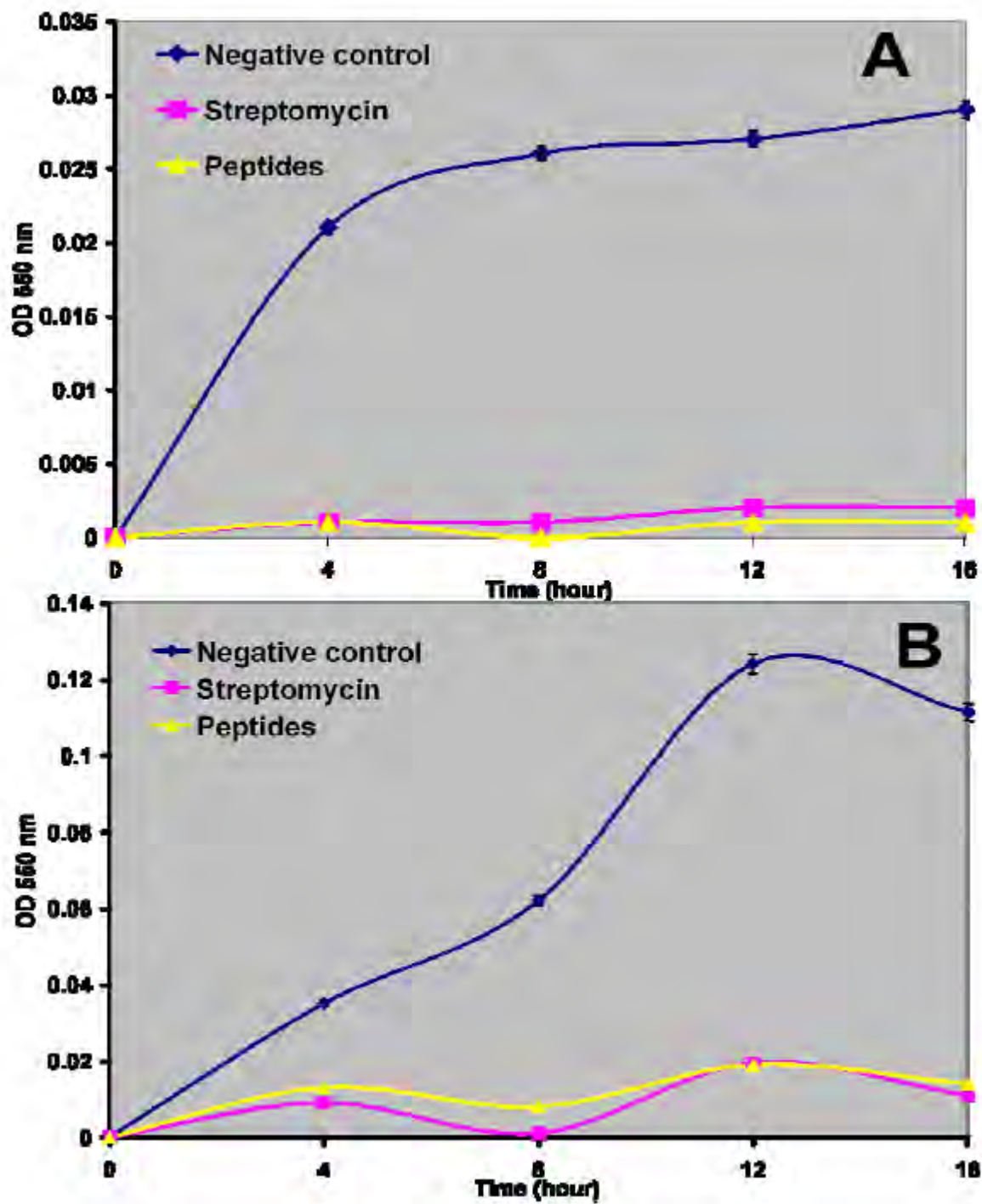


รูปที่ 33 การแยก P1 โดยใช้ Superdex 30 prep

สารละลายส่วน B เป็นส่วนของเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก จึงไม่สามารถตรวจพบใน SDS-PAGE (เลน B)

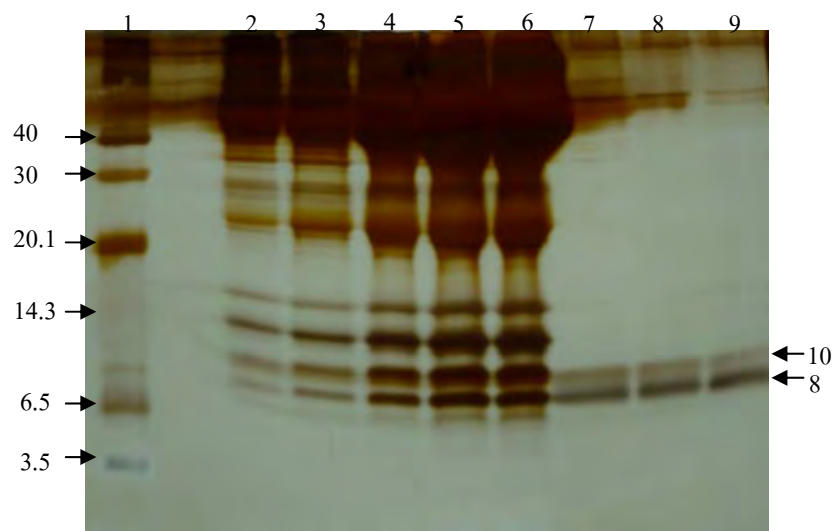
ผลจากการแยกโปรตีนใน fraction A และ B โดย SDS-PAGE พบว่า ใน fraction B ไม่สามารถตรวจพบ band ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 6.5 kDa โดยการย้อมด้วย Commassie blue

เมื่อนำส่วนของสารละลายส่วน B ที่ได้จากการแยกด้วย Superdex 30 prep ไปตรวจสอบกิจกรรมการทำลายเซลล์จุลชีพ *S. typhi* และ *C. albicans* โดยวิธี growth inhibition assay พบว่า สารละลายส่วน B นี้สามารถทำลายจุลชีพดังกล่าวได้ เนื่องจากไม่มีการเจริญของจุลชีพ (รูปที่ 34)



รูปที่ 34 การตรวจสอบกิจกรรมการทำลายจุลชีพของสารละลายส่วน B โดยวิธี growth inhibition assay
 A. เชื้อ *S. typhi*
 B. เชื้อ *C. albicans*

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเปปไทด์ขนาดเล็กในเม็ดเลือดขาวจะมีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันและการเตรียมแยกเปปไทด์โดยผ่าน superdex 30 prep อาจจะทำให้เปปไทด์จำนวนน้อยผู้วิจัยจึงได้พยายามที่ทำเปปไทด์ขนาดเล็กให้เข้มข้นขึ้น จึงได้มีการทดลองแยกเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวโดยใช้ centricon YM-10 ผลการทดลองพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถที่จะแยกบริสุทธิ์โปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 กิโลดาลตัน ออกจากโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน ได้แสดงผลดังรูปที่ 35



รูปที่ 35 แสดงผลการตรวจสอบขนาดของโปรตีนหรือเปปไทด์ ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวหลังแยกผ่าน YM-10 ด้วยเทคนิค Tris-tricine-SDS-PAGE โดย

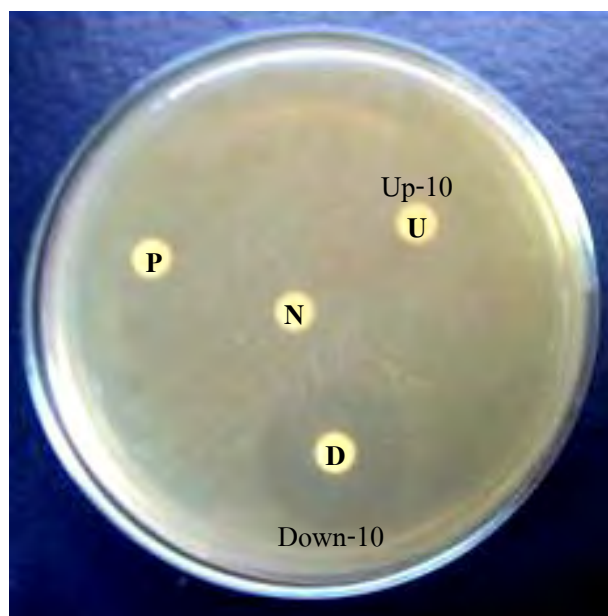
- Lane 1 Rain brow marker
- Lane 2-3 สารสกัดเม็ดเลือดขาว
- Lane 4-6 สารสกัดเม็ดเลือดขาวส่วนบนหลังผ่าน YM-10
- Lane 7-9 สารสกัดเม็ดเลือดขาวส่วนล่างหลังผ่าน YM-10

จากนั้นทดสอบฤทธิ์ของสารละลายส่วนล่างและส่วนบนหลังผ่าน YM-10 ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย จากผลของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทย ต่อเชื้อทั้งหมด 4 ชนิด แสดงผลดังตารางที่ 3 หลังผ่านการแยกโดยใช้ YM-10 พบว่าสารละลายส่วนล่างที่ขนาดของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 กิโลดาลตัน พบว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ที่แยกได้มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิด คือ *Vibrio cholerae* และ *Bacillus subtilis* ดังรูปที่ 36 และรูปที่ 37 ตามลำดับ

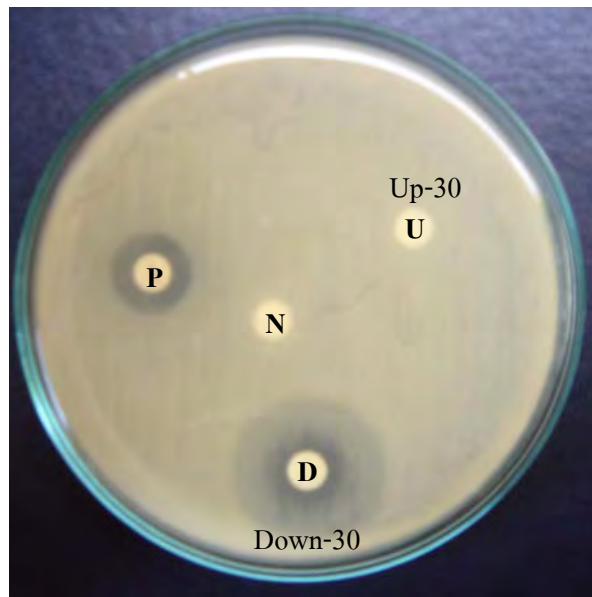
ตารางที่ 13 แสดง Antimicrobial activity ของสารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวหลังผ่าน YM-10 ต่อเชื้อแบคทีเรีย
โดยวิธี Disc diffusion assay

ชนิดของเชื้อ	Antimicrobial activity
<i>B. subtilis</i>	+
<i>P. aeruginosa</i>	-
<i>E. coli</i>	-
<i>V. cholerae</i>	+

หมายเหตุ : + คือ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ
- คือ ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ

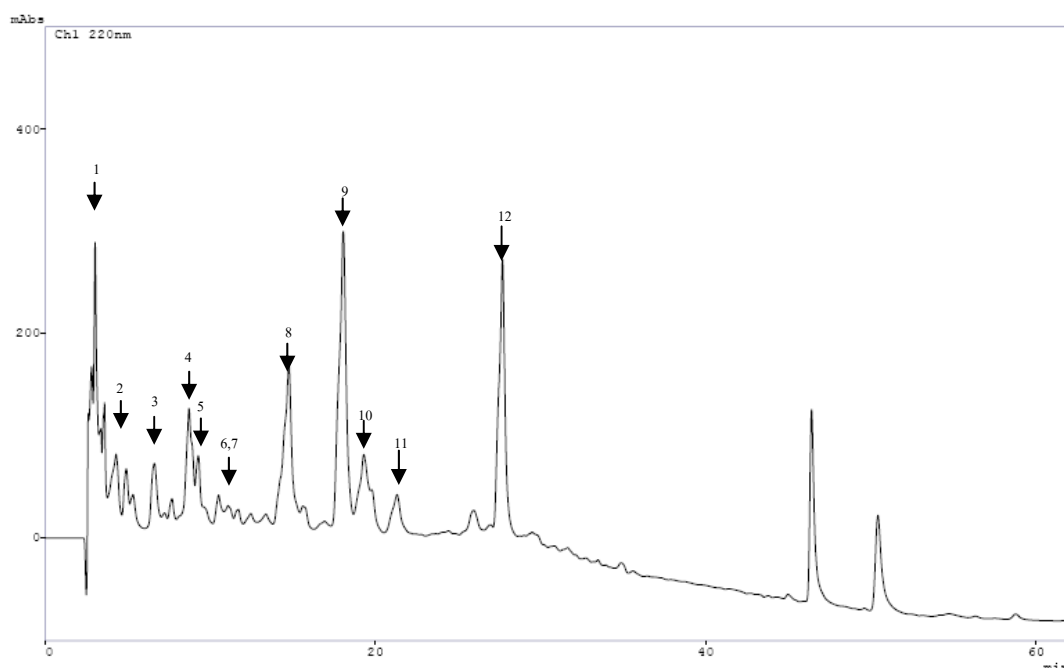


รูปที่ 36 แสดงตัวอย่าง การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ *V. cholerae* ของสารละลายส่วนล่าง ที่ได้
จากการแยกสารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวผ่าน YM-10



รูปที่ 37 แสดงตัวอย่าง การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ *B. subtilis* ของสารละลายส่วนล่าง ที่ได้จากการแยกสารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวผ่าน YM-10

จากนั้นแยกบริสุทธิ์สารละลายหลังผ่าน YM-10 ส่วนล่างที่มี activity โดยใช้ RP-HPLC เมื่อนำสารละลายส่วนล่างหลังผ่าน YM-10 มาทำการแยกบริสุทธิ์ต่อโดยใช้ Apollo C18 column โดยใช้ 0.1% TFA และ 60% acetonitrile ใน 0.1% TFA เป็น mobile phase อัตราเร็ว 60 ml/hr ได้ผลดังรูปที่ 38



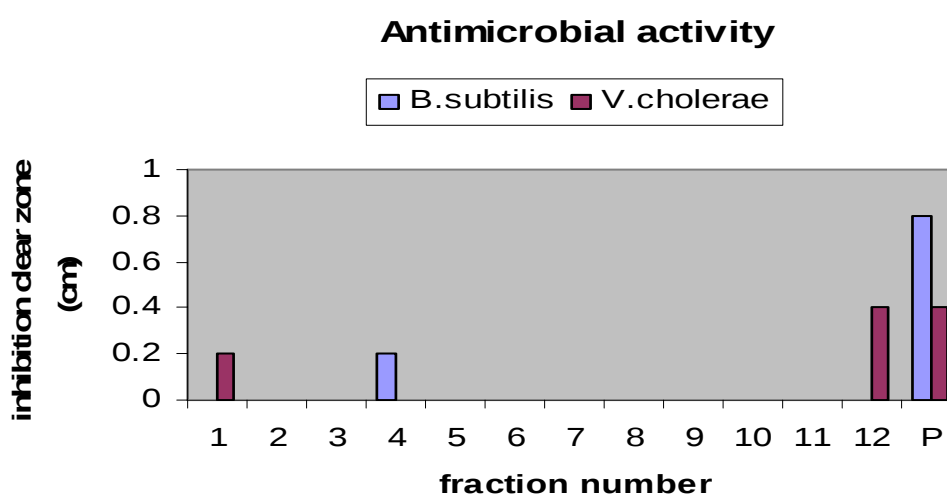
รูปที่ 38 แสดงโครมาโตแกรมการแยกบริสุทธิ์ สารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวส่วนล่างหลังผ่าน YM-10 ด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้ Apollo C18 column โดยใช้ 0.1% TFA และ 60% Acetonitrile ใน 0.1% TFA อัตราเร็ว 60 ml/hr

จากผลของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทยหลังผ่านการแยกโดยใช้ YM-10 พบว่าสารละลายส่วนล่างที่ขนาดของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 กิโลดาลตันมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้นจึงนำสารละลายดังกล่าวไปทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC พบว่าสารละลายดังกล่าวสามารถแยกบริสุทธิ์ออกได้ไม่น้อยกว่า 12 พีค ดังนั้นจึงได้ทำการเก็บแต่ละพีคตั้งแต่ 1-12 ไปทดสอบหาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 4 ชนิดได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 14 และได้ค่า inhibition clear zone แสดงดังรูปที่ 39 จากผลการทดสอบพบว่าพีคที่ 1 และ 12 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *V. cholerae* และพีคที่ 4 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *B. subtilis* แสดงผลดังรูปที่ 40 และรูปที่ 41 ตามลำดับ

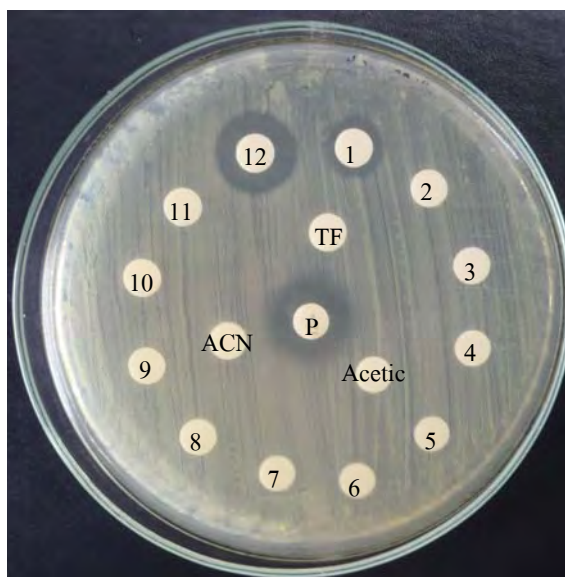
ตารางที่ 14 แสดงผลของการทดสอบ Antimicrobial activity ของสารสกัดเมล็ดเลื้อยขาวหลังแยกบริสุทธิ์โดย HPLC ต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้วิธี Disc diffusion assay

ชนิดของเชื้อ	Antimicrobial activity
<i>B. subtilis</i>	+
<i>P. aeruginosa</i>	-
<i>E. coli</i>	-
<i>V. cholerae</i>	+

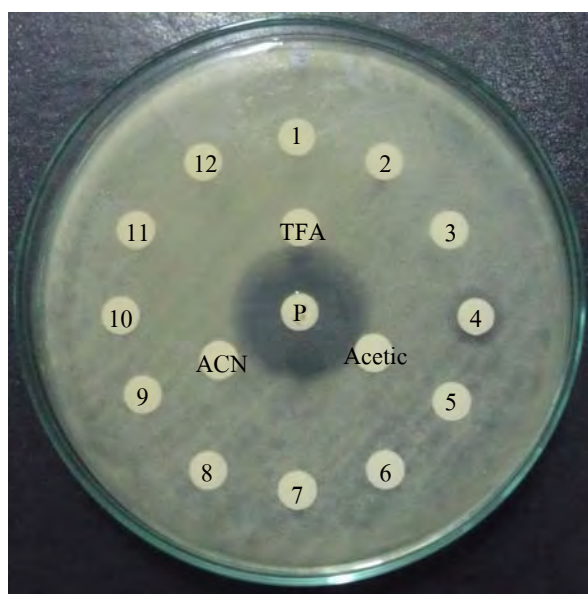
หมายเหตุ : + คือ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ
- คือ ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ



รูปที่ 39 แสดงค่า Inhibition zone ของเปปไทด์ ที่แยกบริสุทธิ์ได้จาก HPLC ต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *V. cholerae*



รูปที่ 40 แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *V. cholerae* ของสารละลายส่วนล่างที่ถูกแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC



รูปที่ 41 แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *B. subtilis* ของสารละลายส่วนล่างที่ถูกแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC

จากนั้นนำสารละลายส่วน B ที่ได้จากการแยกด้วยเจลฟิวเรชั่น (รูปที่ 38) ไปแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์รีเวอร์เฟส ชนิด C18 (C18 reverse phase HPLC) หลังจากการนำสารละลาย (ฟีก) ต่างๆ ไป

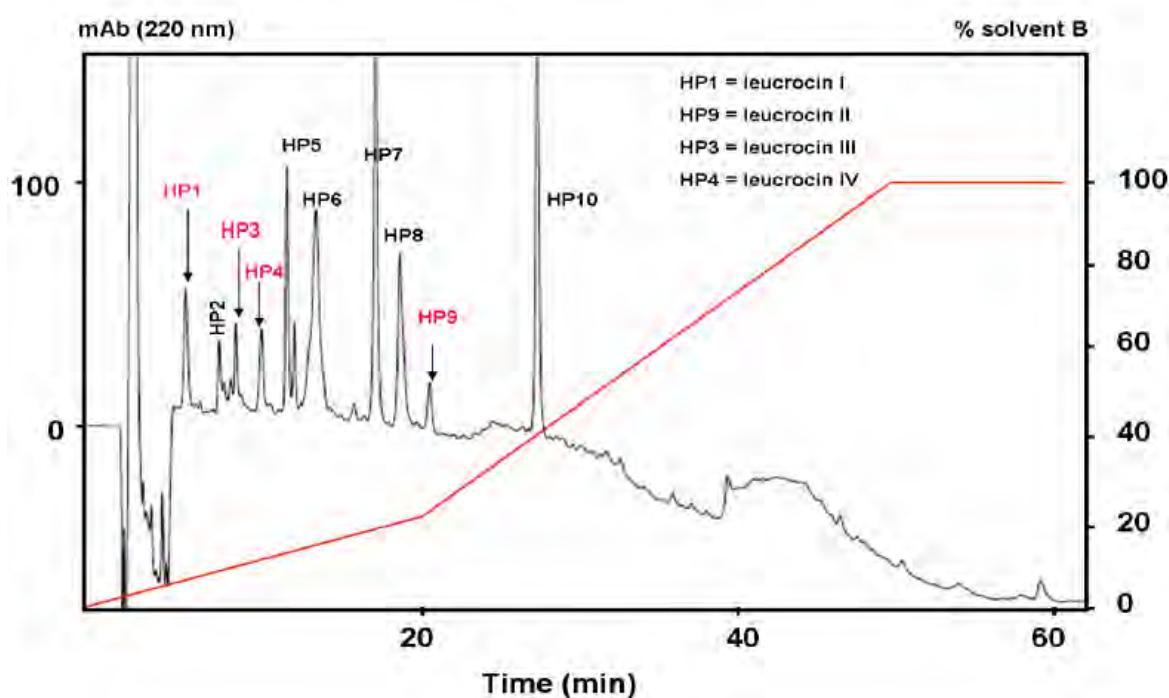
วิเคราะห์หากิจกรรมการทำลายจุลชีพแล้ว ได้ไปพบ 4 พิกัดด้วยกัน ที่มีฤทธิ์ในการทำลายจุลชีพ (รูปที่ 42) โดยให้ชื่อไว้ดังนี้

HP1= Leucrocine I

HP9= Leucrocine II

HP3= Leucrocine III

HP4= Leucrocine IV



รูปที่ 42 การแยกสารละลายส่วน B โดยใช้คอลัมน์รีเวอร์เฟสชนิดซี 18

สารละลายเฟสเคลื่อนที่ A: 0.1% Trifluoro acetic acid (0.1% TFA)

สารละลายเฟสเคลื่อนที่ B: 60% Acetonitrile ใน 0.1% TFA

จากนั้นนำ Leucrocine I- Leucrocine IV ไปหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibition concentration; MIC)ในการทำลายจุลชีพ *S. epidermidis*, *S. typhi* และ *V. cholerae* ซึ่งได้ค่าดังตารางที่ 15

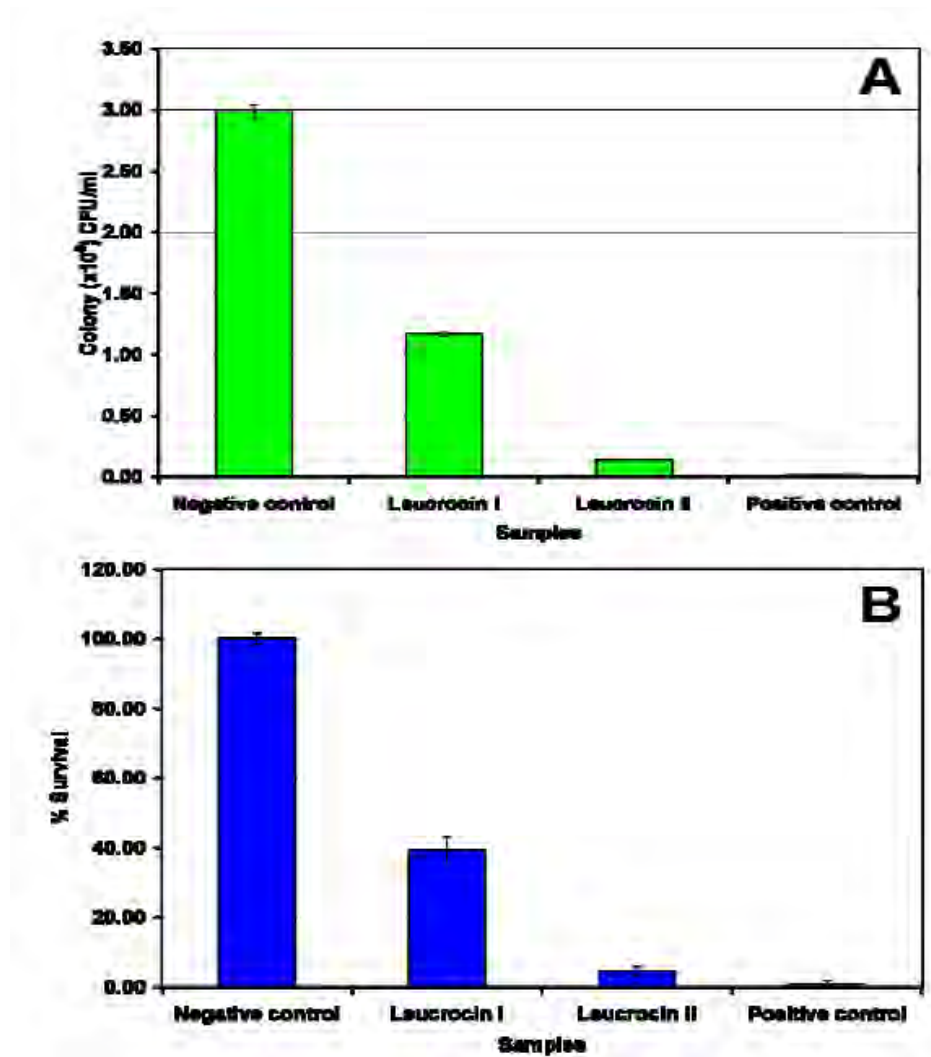
ตารางที่ 15 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ Leucrocins ในการทำลายจุลชีพ

Peptide samples	MIC (µg/ml)		
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>V. cholerae</i>
Leucrocine I	25.00	25.00	0.156
Leucrocine II	0.66	0.66	2.88
Leucrocine III	5.31	>156	16.56
Leucrocine IV	5.31	>43.7	10.50

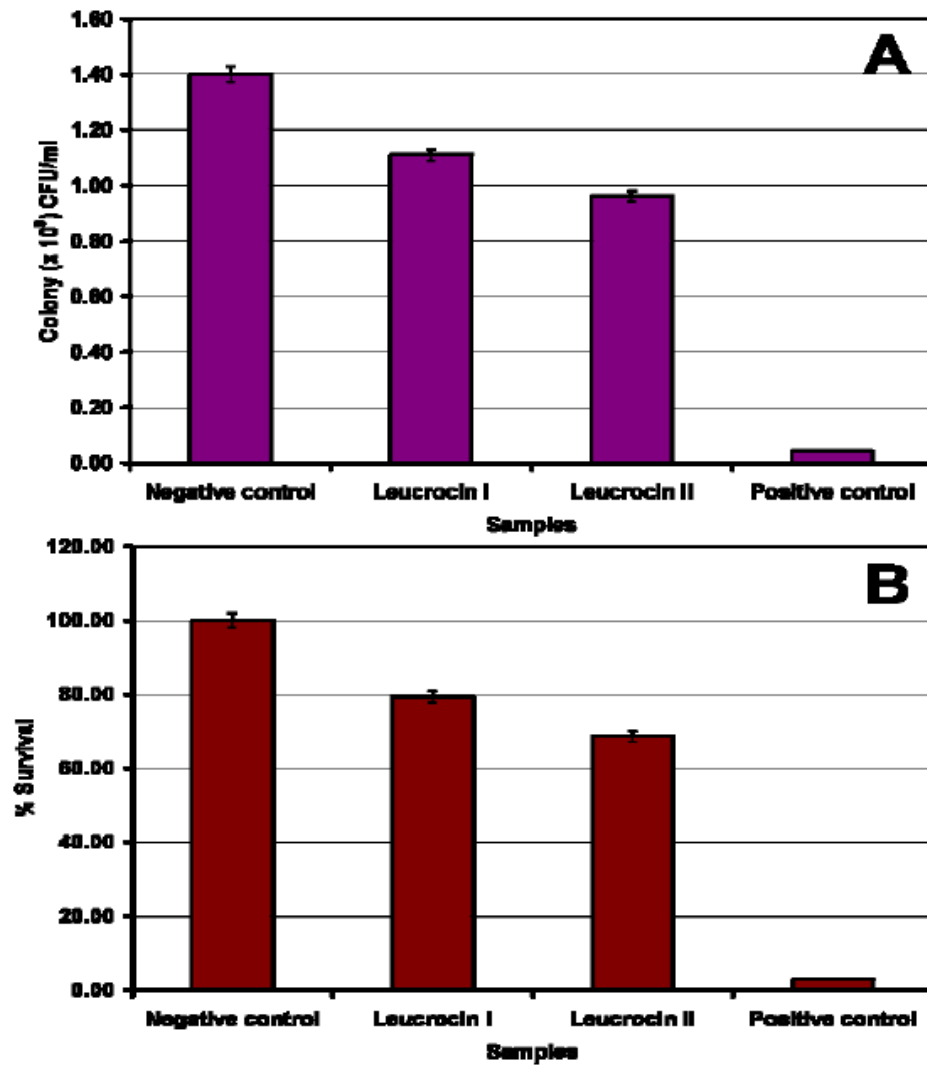
จากตารางที่ 15 จะเห็นว่า Leucrocine I จะมีกิจกรรมการทำลาย *V. cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.156 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Leucrocine II มีกิจกรรมการทำลายได้ดีทั้งต่อ *S. epidermidis* , *S. typhi* และ *V. cholerae* โดยมีกิจกรรมการทำลายดีที่สุดต่อ *S. epidermidis* และ *S. typhi* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.65 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Leucrocine III มีกิจกรรมการทำลาย *S. epidermidis* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 5.31 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Leucrocine IV มีกิจกรรมการทำลาย *S. epidermidis* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 5.31 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การศึกษากิจกรรมการทำลายจุลชีพโดยวิธี Total plate count

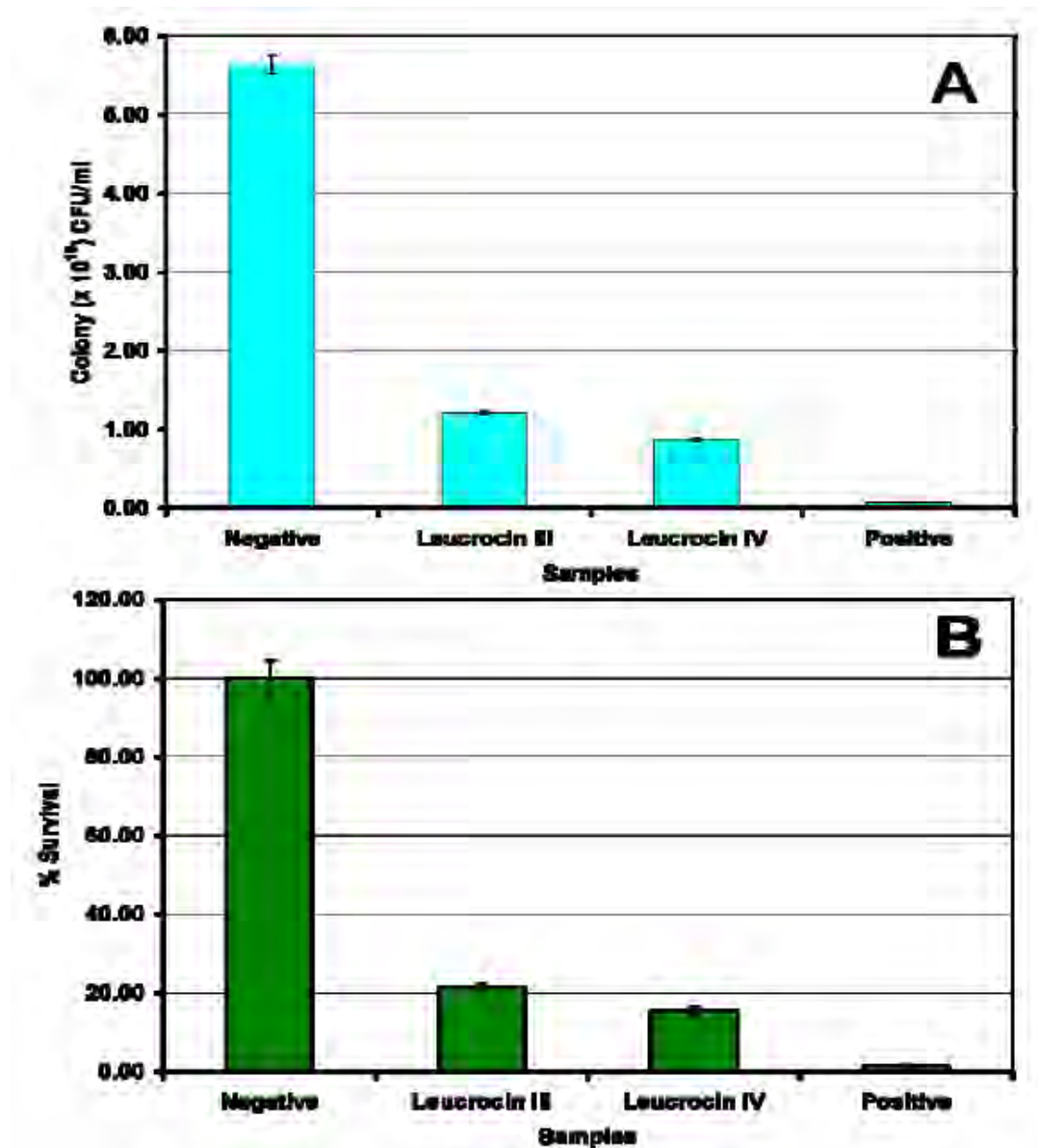
เมื่อนำ Leucrocine I- Leucrocine IV ไปวิเคราะห์หากิจกรรมในการทำลายจุลชีพโดยวิธีการนับจำนวนโคโลนีโดยวิธี Total plate count ซึ่งผลที่ได้คือ Leucrocine I- Leucrocine IV สามารถลดจำนวนโคโลนีของจุลชีพได้ ดังแสดงดังรูปที่ 43-45



รูปที่ 43 จำนวนโคโลนีและ % การรอดของ *S. epidermidis* เมื่อบ่มกับ Leucrocins I และ Leucrocins II
S. epidermidis บ่มกับ Leucrocins I และ Leucrocins II โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร, ตัวควบคุมเชิงบวกใช้ 70% เอทานอล ตัวควบคุมเชิงลบใช้ บัฟเฟอร์ฟอสเฟส pH 7.4 ที่มี 5% กลูโคส



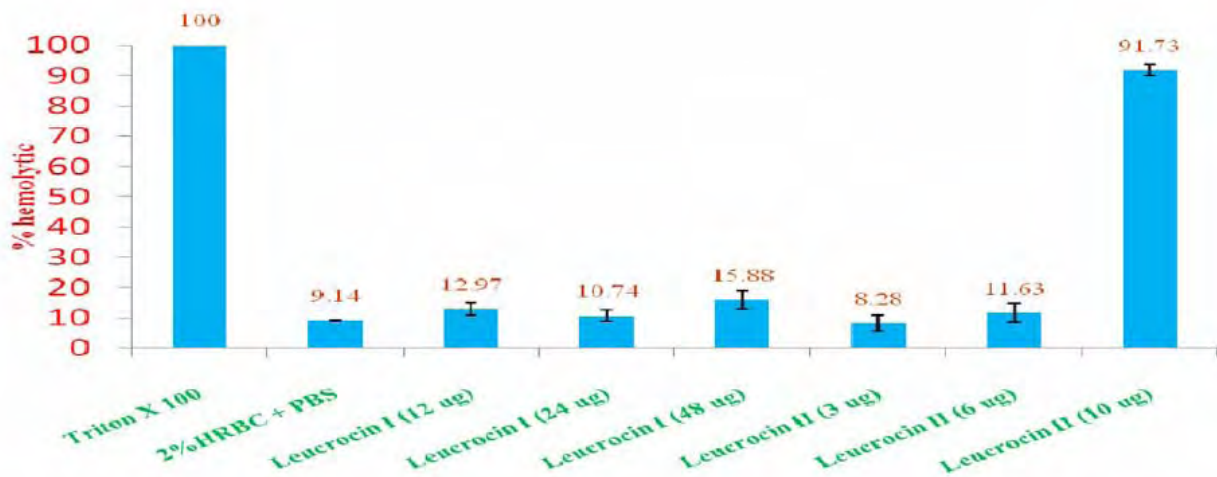
รูปที่ 44 จำนวนโคโลนีและ % การรอดของ *S. typhi* เมื่อบ่มกับ Leucrocins I และ Leucrocins II ,*S. typhi* บ่มกับ Leucrocins I และ Leucrocins II โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร, ตัวควบคุมเชิงบวกใช้ 70% เอทานอล ตัวควบคุมเชิงลบใช้ บัฟเฟอร์ฟอสเฟส pH 7.4 ที่มี 5% กลูโคส



รูปที่ 45 จำนวนโคโลนีและ % การรอดของ *V. cholerae* เมื่อบ่มกับ Leucrocins III และ Leucrocins IV, *V. cholerae* บ่มกับ Leucrocins III และ Leucrocins IV โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 19.7 ไมโครกรัม/มิลลิตร และ 12.34 ไมโครกรัม/มิลลิตร ตามลำดับ, ตัวควบคุมเชิงบวกใช้ 70% เอทานอล ตัวควบคุมเชิงลบใช้ บัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 7.4 ที่มี 5% กลูโคส

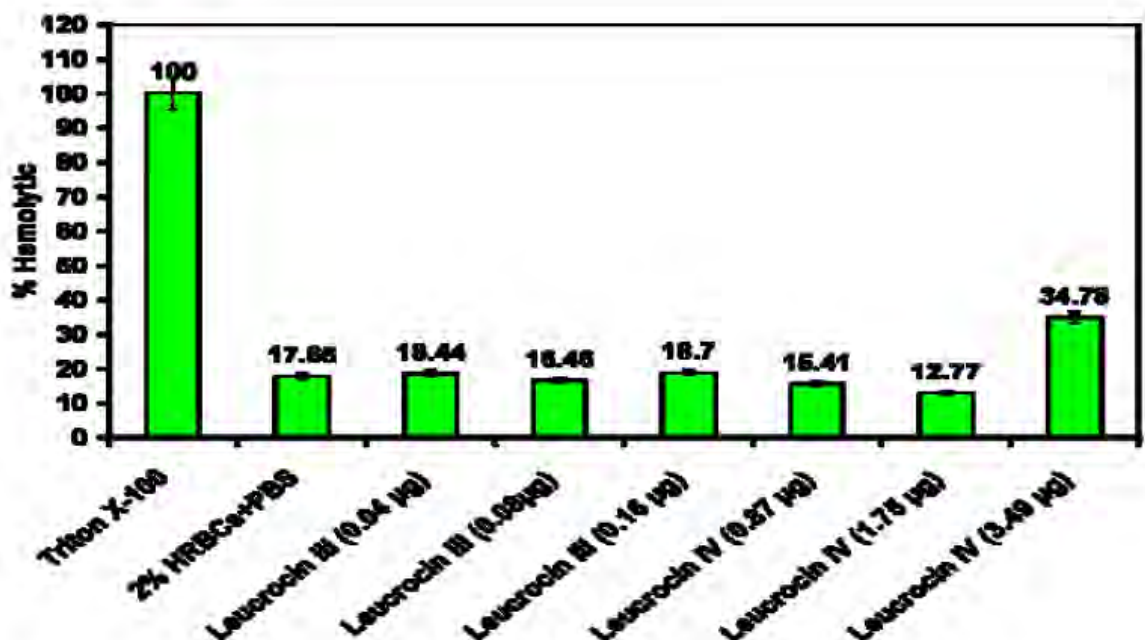
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์

ได้นำ Leucrocine I-Leucrocine IV ไปทำการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ โดยวิธีโมโนโคลนินที่เกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดง พบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. epidermidis*, และ *V. cholerae* นั้น Leucrocine I-Leucrocine IV ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (รูปที่ 46-47)



รูปที่ 46 ความเป็นพิษของ Leucrocine I และ Leucrocine II ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์

ชุดควบคุมเชิงบวก: 1% Triton X-100; ชุดควบคุมเชิงลบ: ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

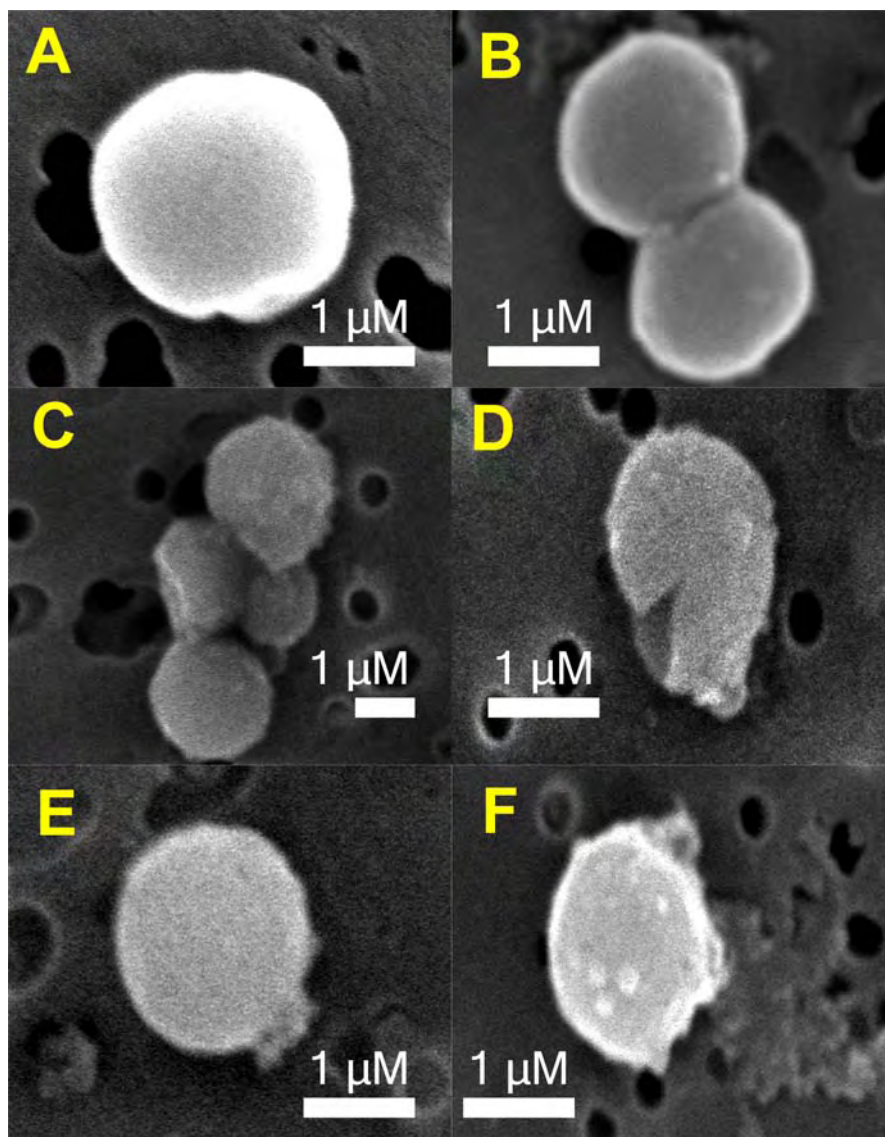


รูปที่ 47 ความเป็นพิษของ Leucrocine III และ Leucrocine IV ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์

ชุดควบคุมเชิงบวก: 1% Triton X-100; ชุดควบคุมเชิงลบ: บัฟเฟอร์ฟอสเฟต

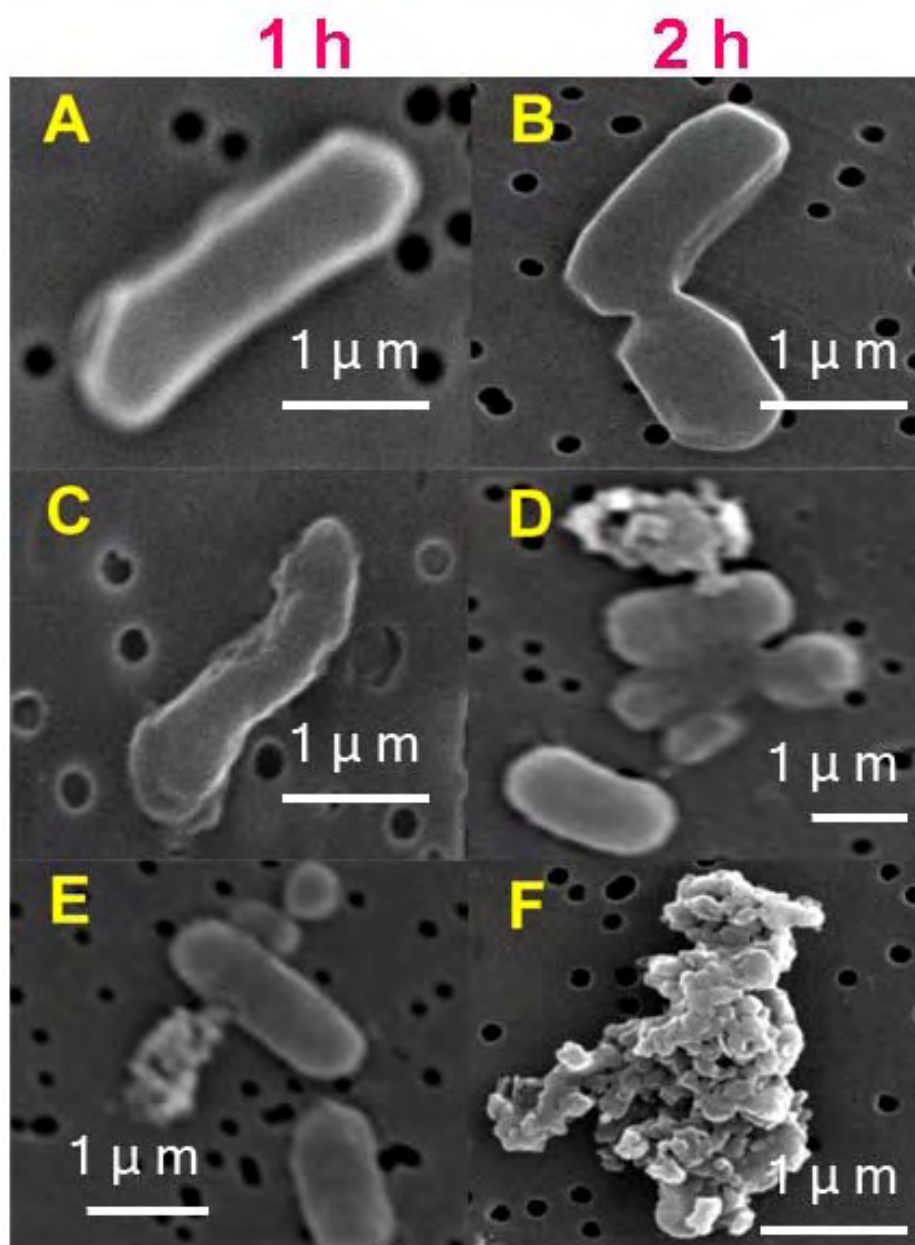
การศึกษาผลของ Leucrocins ต่อเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เมื่อนำ Leucrocins ไปบ่มกับเซลล์ของแบคทีเรียตามเวลาที่กำหนด หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ดูลักษณะหรือการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบคทีเรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM) ซึ่งผลที่ได้คือเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะขรุขระ หรือเกิดการแตกเสียหายเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการบ่มกับเปปไทด์ ซึ่งจากผลการทดลองในเบื้องต้นนี้คาดว่า Leucrocins จะมีตำแหน่งในการเข้าทำลายที่บริเวณเมมเบรนของแบคทีเรียดังเช่นที่เคยมีผู้รายงานแล้วใน antimicrobial peptide ชนิดอื่นๆ (รูปที่ 48-49)



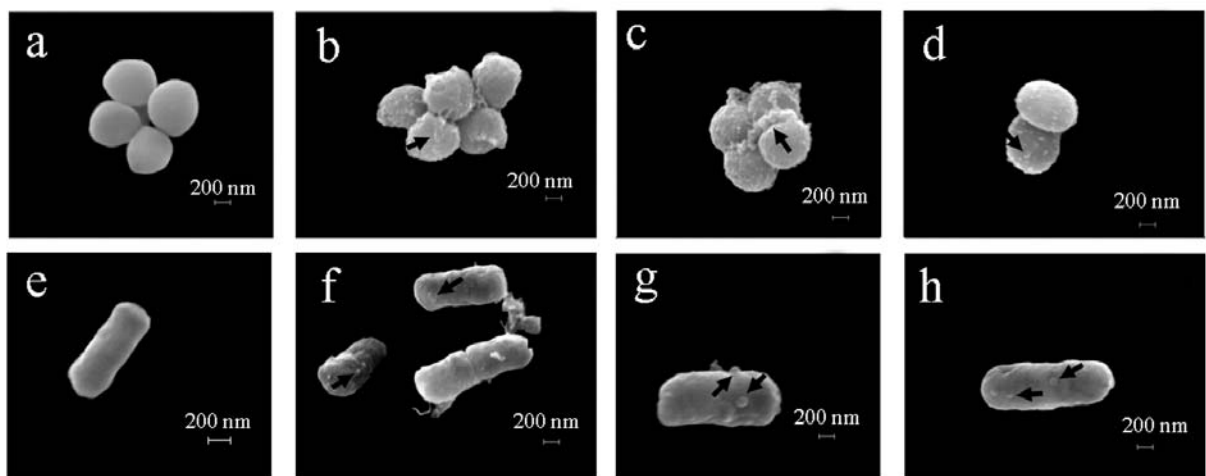
รูปที่ 48 ผลของเซลล์ *S. epidermidis* เมื่อบ่มกับ Leucrocin I และ Leucrocin II

แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้บ่มกับ Leucrocins ที่เวลา 1 ชั่วโมง (A); แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้บ่มกับ Leucrocins ที่เวลา 2 ชั่วโมง (B); แบคทีเรียปกติที่บ่มกับ Leucrocin I (40 µg/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (C); แบคทีเรียปกติที่บ่มกับ Leucrocin I (40 µg/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (D); แบคทีเรียปกติที่บ่มกับ Leucrocin II (80 µg/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (E); แบคทีเรียปกติที่บ่มกับ Leucrocin II (80 µg/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (F)

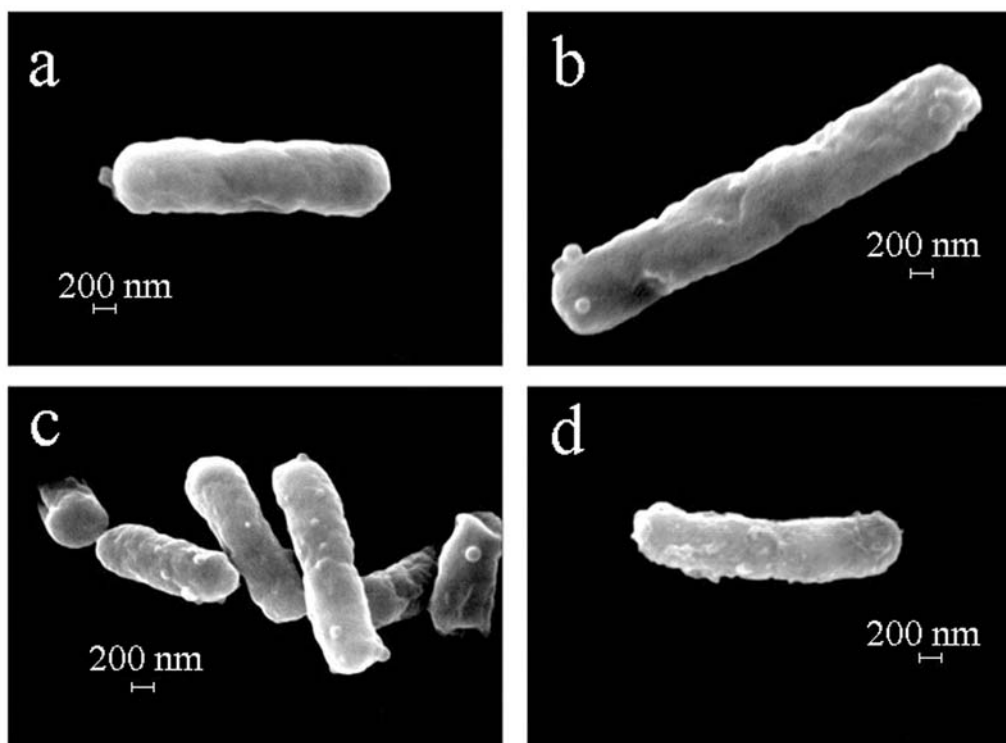


รูปที่ 49 ผลของเซลล์ *S. typhi* เมื่อป่มกับ Leucrocine I และ Leucrocine II
 แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้ป่มกับ Leucrocins ที่เวลา 1 ชั่วโมง (A); แบคทีเรียปกติที่ไม่ได้ป่มกับ Leucrocins ที่เวลา 2 ชั่วโมง (B); แบคทีเรียปกติที่ป่มกับ Leucrocine I (40 μg/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (C); แบคทีเรียปกติที่ป่มกับ Leucrocine I (40 μg/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (D); แบคทีเรียปกติที่ป่มกับ Leucrocine II (80 μg/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (E); แบคทีเรียปกติที่ป่มกับ Leucrocine II (80 μg/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (F)

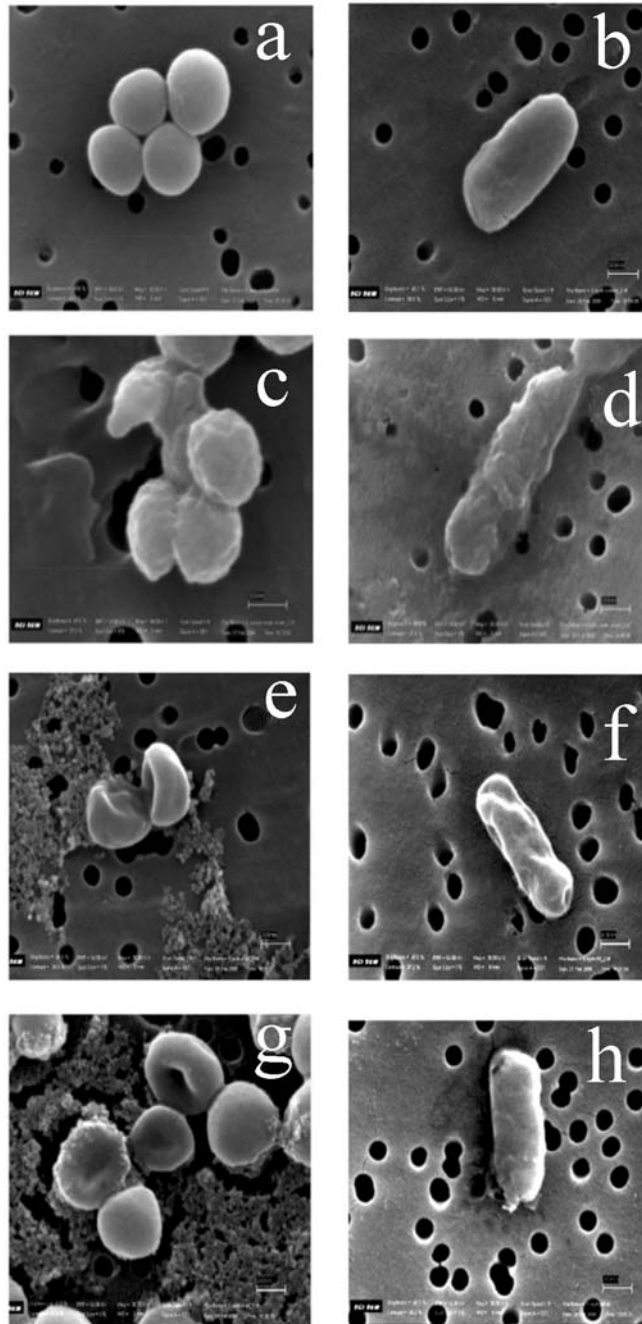
จากผลการทดลอง จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าลักษณะของผิวเซลล์ของ Control ยังเป็นปกติ คือเซลล์ไม่เกิดการเสียหายแต่เมื่อทำการบ่มเซลล์ของ *Staphylococcus epidermidis* กับ Leucrocine I หรือ Leucrocine II พบว่า ลักษณะของเซลล์ผิดปกติ และเกิดความเสียหาย คือ ทำให้เซลล์แบคทีเรียเสียรูปร่าง (deformation) ไปจนถึงทำให้เซลล์แตก ส่วน *Salmonella typhi* จะเห็นได้ชัดเจนว่าเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกว่า คือ ลักษณะของเซลล์จะขาดหรือแห้วไป เมื่อบ่ม ด้วย Leucrocine I และเมื่อ treated ด้วย Leucrocine II เซลล์ของ *Salmonella typhi* แตกสลายเหลือเพียงแค่อะไหล่เซลล์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าความผิดปกติหรือความเสียหายนี้เป็นผลมาจากการทำงานของเปปไทด์ ผลการทดลองนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับ antibacterial agent ที่แยกได้จาก พลาสมาและซีรัมคังรูปที่ 50-52



รูปที่ 50 ผลของ antibacterial agent (Crocosin) จากพลาสมาจะเข้ต่อเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* (a—d) และ *S. typhi* (e—f); Negative control cell (a, e); ทดสอบกับพลาสมา (b, f); ทดสอบกับส่วน YM-3 (c, g); ทดสอบกับ crocosin (d, h) ภายในเวลา 120 นาที



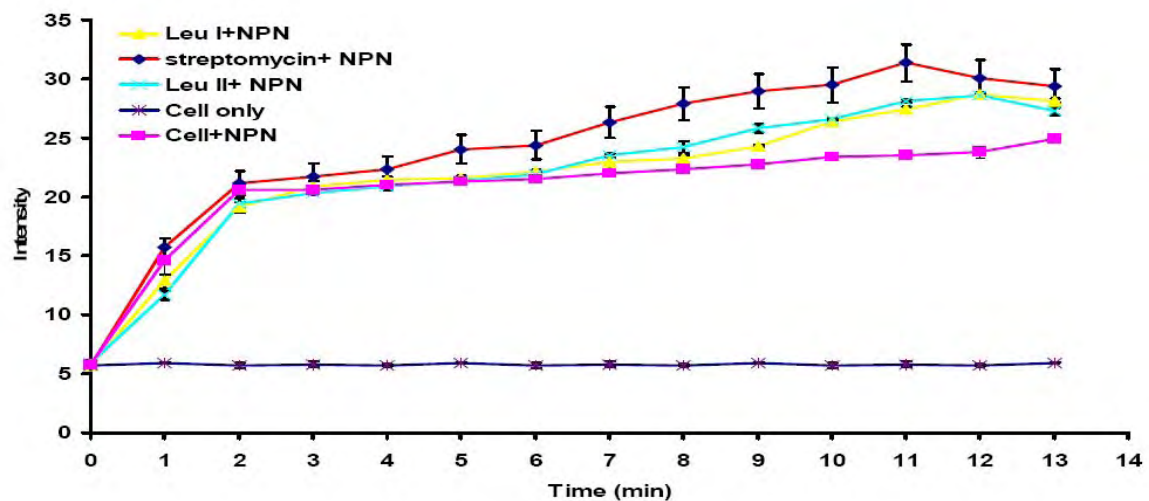
รูปที่ 51 ผลของส่วน YM-3 ที่แยกได้จากพลาสมากระเชื้อต่อ *S. typhi*. ; ปุ่มรวมกัน 60 นาที (a); ปุ่มรวมกัน 90 นาที (b); (c) ปุ่มรวมกัน 120 นาที (c);ปุ่มรวมกัน 180 นาที (d)



รูปที่ 52 ผลของ antibacterial agent จากส่วนของซีรัมต่อ *S. aureus* (ซ้าย); *S. typhi* (ขวา); แบคทีเรียทดสอบกับ PBS (a และ b); แบคทีเรียทดสอบกับซีรัม (c และ d); แบคทีเรียทดสอบกับ Hp18 (e และ f); แบคทีเรียทดสอบกับ Hp31 (g และ h) (Preecharam *et al.*, 2008)

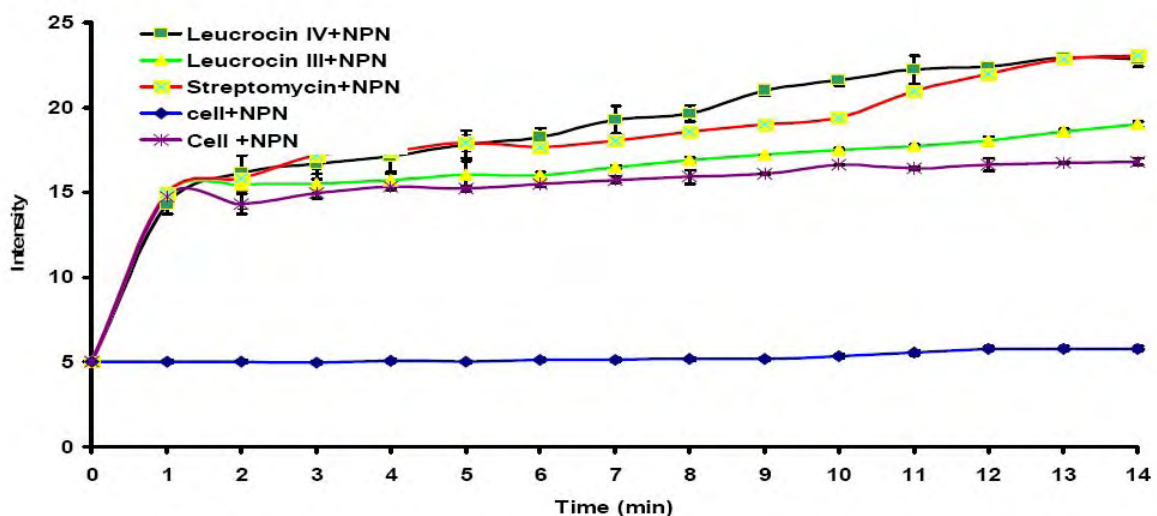
การศึกษาการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรีย

การศึกษานี้เพื่อต้องการระบุว่า Leucrocins นั้นทำให้เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียเกิด permeabilization ซึ่งในกระบวนการทดลองจะใช้ 1-N-phenyl-naphthylamine (NPN) เป็นตัวตรวจสอบ NPN เป็นสาร fluorescent โดยจะเกิดการเรืองแสงได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็น hydrophobic โดยหาก Leucrocins ทำให้เมมเบรนชั้นนอกของเมมเบรนเกิด permeabilization สาร NPN จะเข้าไปจับกับบริเวณ hydrophobic ของ lipid bilayer ซึ่งจะทำให้ค่าการเรืองแสงของ NPN เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองพบว่า Leucrocins ทำให้เมมเบรนชั้นนอกของเมมเบรนเกิด permeabilization ดังแสดงในรูปที่ 53-54 โดยพบว่า Leucrocins I-IV จะใช้เวลาประมาณ 1-2 นาทีในการเข้าสู่เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรีย และเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 12 นาทีจะถึงระยะ steady state



รูปที่ 53 การเกิด permeabilization เมมเบรนชั้นนอกของ *S. typhi* ATCC 5784

Leucrocins I 125 µg/ml, streptomycin 20 µg/ml, Leucrocins II 3.3 µg/ml

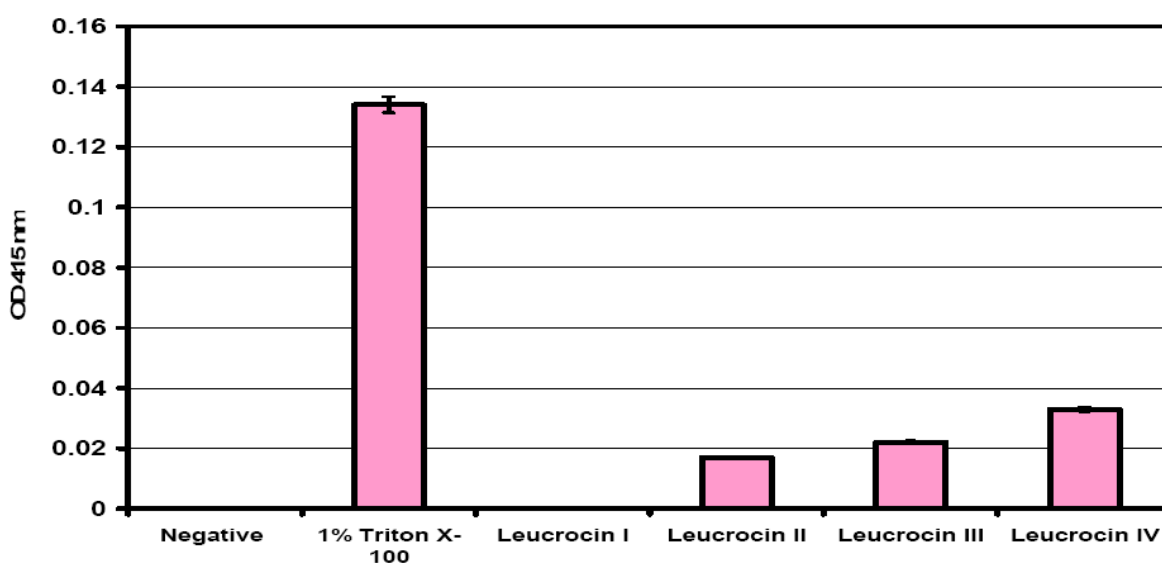


รูปที่ 54 การเกิด permeabilization เมมเบรนชั้นนอกของ *V. cholerae*

Leucrocins III 82.5 µg/ml, streptomycin 20 µg/ml, Leucrocins IV 105 µg/ml

การศึกษาการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรีย

การศึกษานี้เพื่อต้องการระบุว่า Leucrocins นั้นทำให้เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรียเกิด permeabilization ซึ่งในกระบวนการทดลองนี้จะทำการจำลองเมมเบรนชั้นในของแบคทีเรียโดยการสร้างไลโปโซมที่หุ้มเอนไซม์ β -galactosidase ไว้ภายใน ซึ่งหาก Leucrocins ทำให้เมมเบรนไลโปโซมรั่วออกมาจะทำให้ β -galactosidase ออกมาสู่ภายนอกแล้วทำปฏิกิริยากับ สับสเตรท (O-nitrophenyl β -galactopyranoside; ONPG) เกิดการย่อยสลาย substrate ซึ่งจะได้สารละลายสีเหลืองเข้มขึ้นสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ดังแสดงในรูปที่ 55

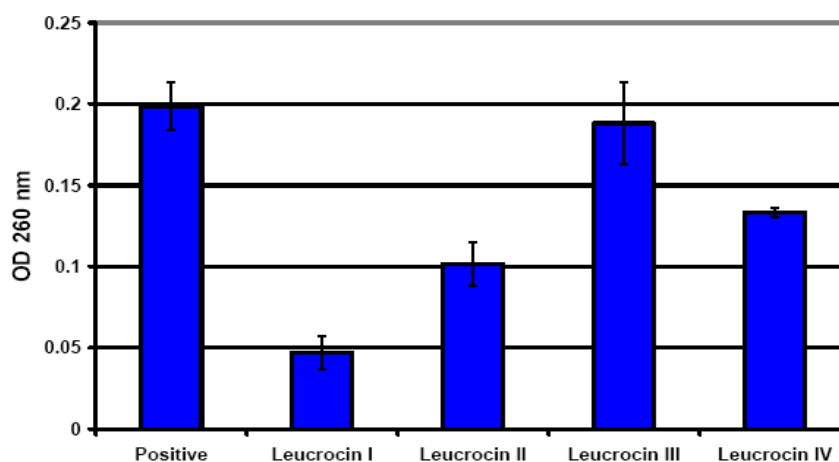


รูปที่ 55 การเกิด permeabilization แบบจำลองเมมเบรนชั้นในของ *V. cholerae*

จากรูปจะเห็นว่า Leucrocins II-IV สามารถทำลายแบบจำลองของเมมเบรนได้โดย Leucrocins IV ทำได้ดีที่สุด แต่ใน Leucrocins I ไม่สามารถตรวจพบ product ของ β -galactosidase ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า concentration ที่เราใช้ยังไม่เหมาะสมเราจึงได้ทำการทดลองเพื่อ ยืนยันอีกครั้งโดยการ ศึกษาการทำลายจุลชีพจริงโดยวิธีวัดปริมาณ DNA/RNA

การศึกษาการทำลายจุลชีพโดยวิธีวัดปริมาณ DNA/RNA

เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียกับเปปไทด์ Leucrocins I-Leucrocins IV ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจวัด กิจกรรมการทำลายจุลชีพโดยการตรวจวัดระดับ DNA/RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ซึ่งเป็นผลจากการที่เซลล์ของจุลชีพแตกเสียหาย โดนทำลายจากเปปไทด์ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า Leucrocins III ทำให้เซลล์แบคทีเรียเสียหายมากที่สุด และ leucrocins I ก็ทำให้เกิดการเสียหายของเซลล์จนเกิดการตรวจวัด DNA/RNA ได้ ดังแสดงในรูปที่ 56



รูปที่ 56 ปริมาณของ DNA/RNA ของ *S. epidermidis* เมื่อป้อนกับ Leucrocins

ตัวควบคุมเชิงบวก: 70% เอทานอล, ตัวควบคุมเชิงลบ: 10 mM บัฟเฟอร์ฟอสเฟส pH 7.4,

Leucrocine I (0.99 µg/ml) Leucrocine II (92.4 µg/ml), Leucrocine III (89.9 µg/ml), Leucrocine IV (87.4 µg/ml)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน Leucrocine I และ Leucrocine II

ทำการศึกษารายละเอียดของกรดอะมิโนของ Leucrocine I-II โดยการศึกษา amino acid composition โดยวิธี post column derivatization with ninhydrin ซึ่งผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ค่า % nmol และปริมาณ residues ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่มีอยู่ในเส้นเปปไทด์

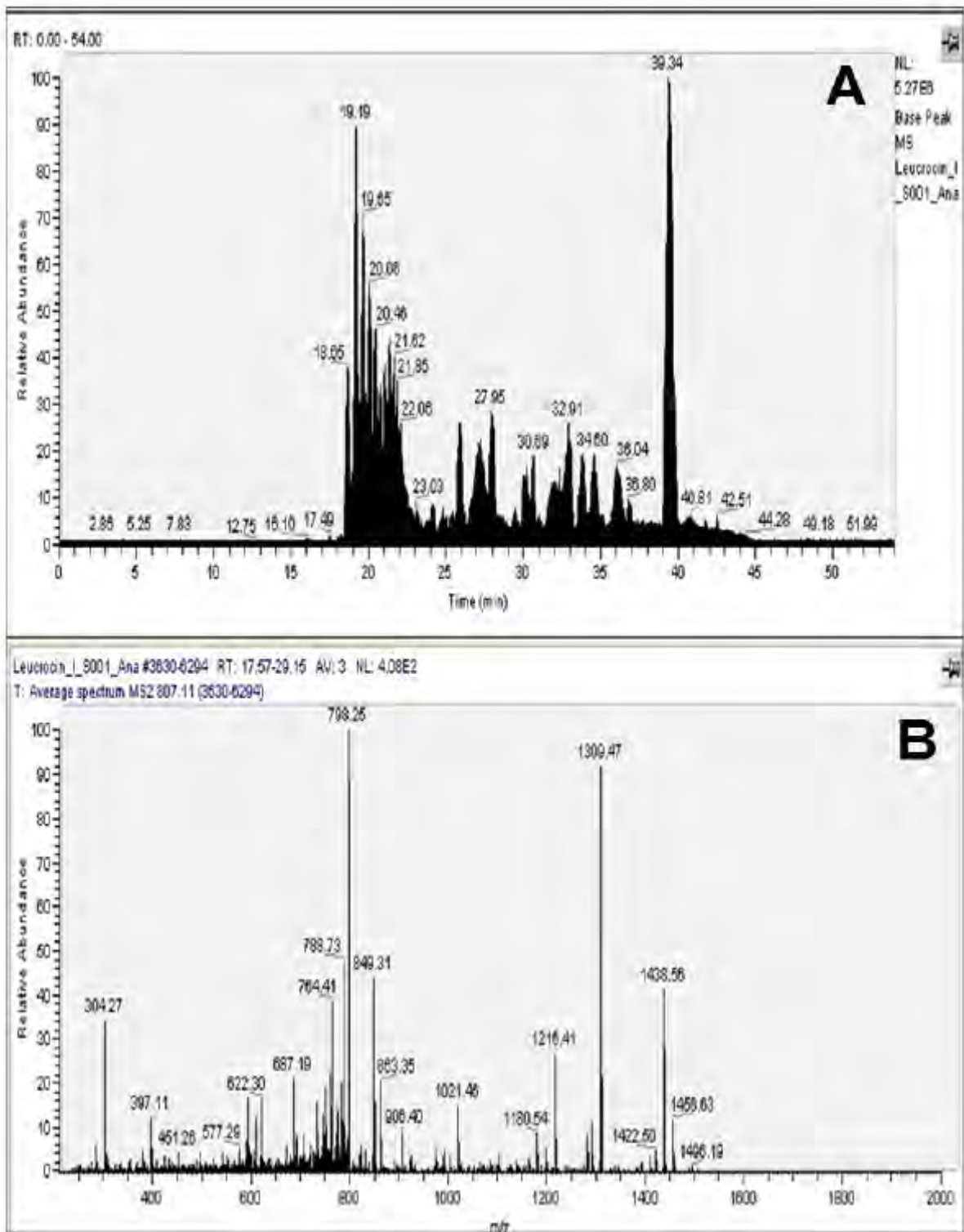
Leucrocine I และ Leucrocine II

Leucrocine I			Leucrocine II		
Amino acid	nmol	Residues No.	Amino acid	nmol	Residues No.
Asx (N)	0.4528	2	Asx (N)	0.1388	1
Ser (S)	0.2495	1	Ser (S)	0.1397	1
Glx (Q, E)	0.3540	2	Glx (Q, E)	0.2457	2
Gly (G)	0.4461	2	Gly (G)	0.2450	3
Ala (A)	0.1889	1	Ala (A)	0.1378	2
Ile (I)	1.7636	4	Lys (K)	0.1089	1
Leu (L)	0.5695	2			
Arg (R)	0.1074	1			
Total		15	Total		10

จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า Leucrocine I เป็นเปปไทด์สายสั้นๆที่ประกอบด้วย กรดอะมิโนประมาณ 15 residues และ Leucrocine II ประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 residues โดยทั้งสองเปปไทด์มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่มีทั้งประจุ และส่วนที่เป็น hydrophobic

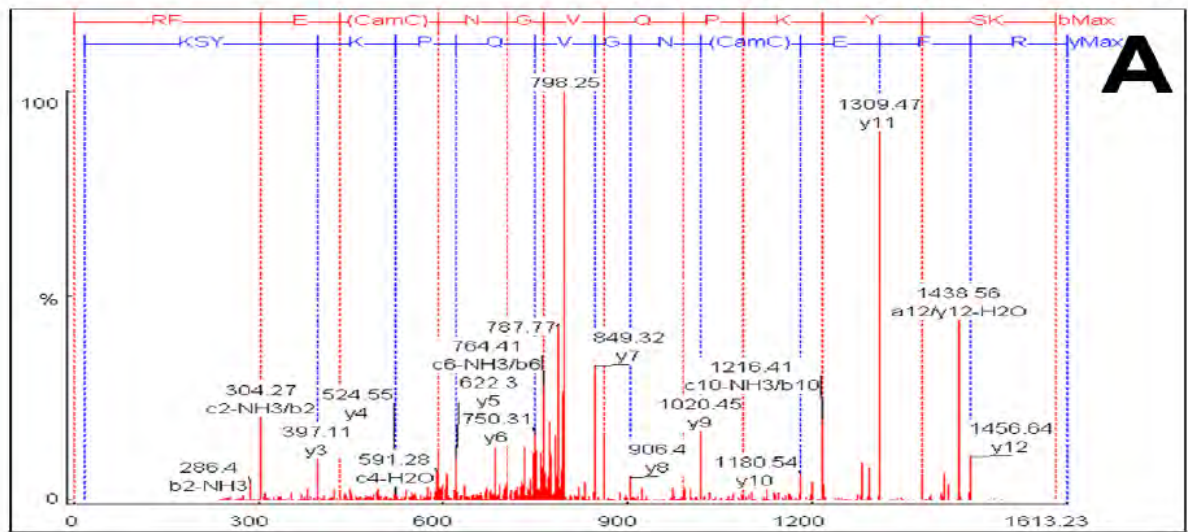
การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ Leucrocine I และ Leucrocine II โดยวิธี de-novo LC-MS-MS

จากการวิเคราะห์ Leucrocine I และ Leucrocine II โดยวิธี mass spectrometry พบว่า Leucrocine I มี precursor mass ประมาณ 806.99 Da (รูปที่ 57 และ 58) ส่วน Leucrocine II มี precursor mass ประมาณ 956.37 Da (รูปที่ 60 และ 61) โดยการวิเคราะห์โดยวิธี De novo LC-MS/MS sequencing พบว่า Leucrocine I มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนเป็น NGVQPKY และลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ Leucrocine II คือ NAGS_LSGWG (ตารางที่ 3). ซึ่งจากการตรวจสอบกับลำดับกรดอะมิโนของ antimicrobial peptide อื่นๆในฐานข้อมูล พบว่าลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวไม่เหมือน antimicrobial peptide ใดๆในฐานข้อมูล แสดงว่า Leucrocine I และ Leucrocine II น่าจะเป็น antimicrobial peptide ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน

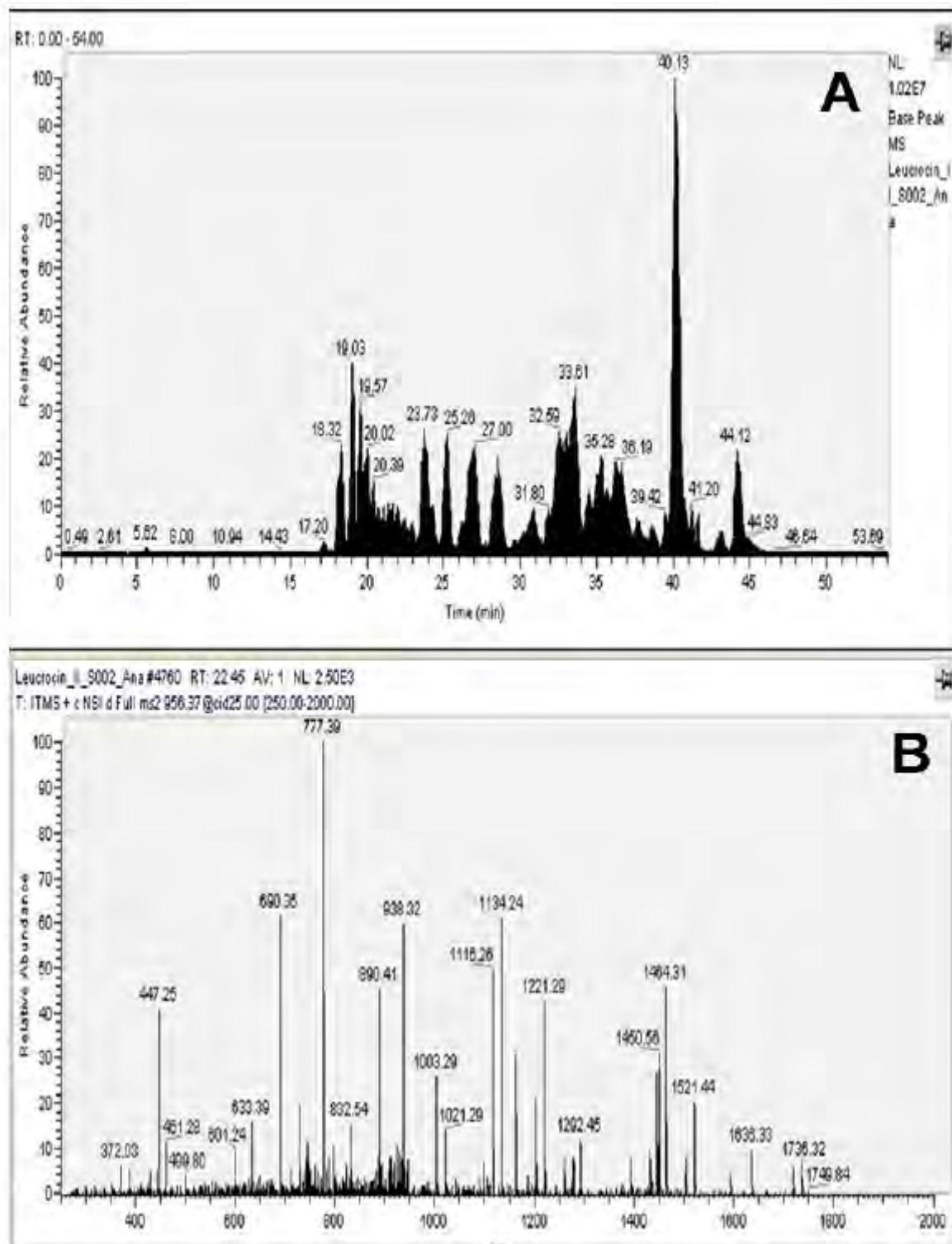


รูปที่ 57 LC/MS/MS ของ Leucrocinn I

Precursor Mass. 806.99

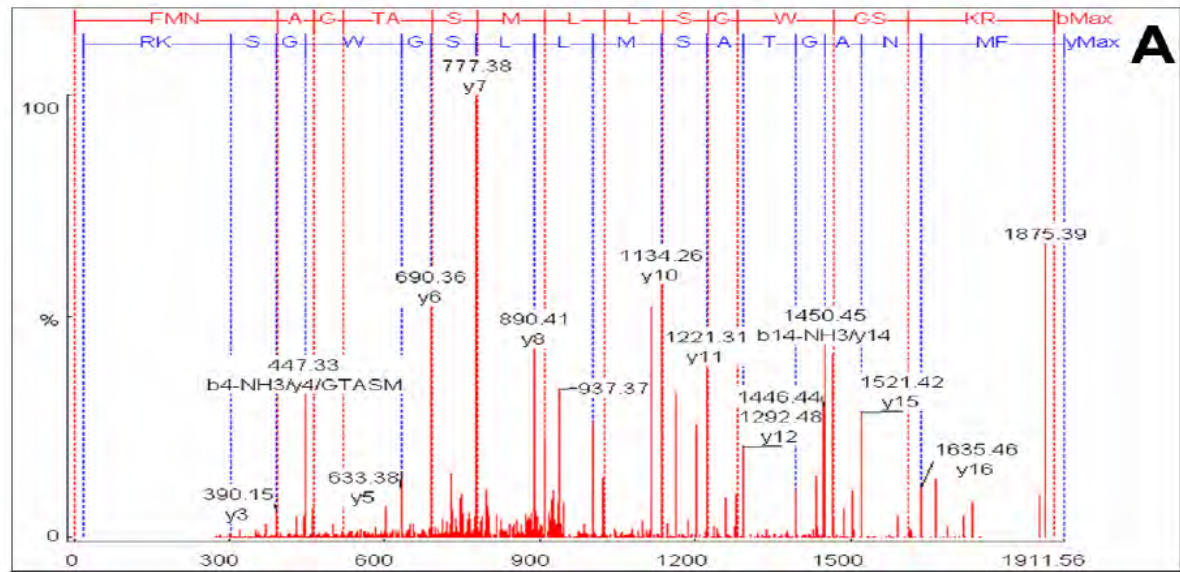


รูปที่ 58 LC/MS/MS ของ precursor mass 806.99 (Leucocin I)



รูปที่ 59 LC/MS/MS ของ Leucrocin II

Precursor Mass. 956.37



รูปที่ 60 LC/MS/MS ของ precursor mass 956.37 (Leucrocine II)

ตารางที่ 17 ลำดับกรดอะมิโนของ Leucrocine I and II โดยวิธี De novo sequencing LC MS/MS

Samples	Precursor Mass	Amino acid sequence	Charge	Mass analysis (Da)	% hydrophobic	Predict of secondary structure
Leucrocine I	806.99	NGVQPKY	+1	804.90	11	28.57% Extended strand 71.43% Random coil
Leucrocine II	956.37	NAGSLLSGWG	0	847.88	40	44.44% Extended strand 55.56% Random coil

สำหรับการหาลำดับกรดอะมิโนของ Leucrocine I-Leucrocine IV ทางด้านปลายหมู่อะมิโนโดย automated Edman degradation นั้นไม่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจจะมี การ blocking หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนทางด้านปลายหมู่อะมิโน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ได้แยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยแยกสารจากส่วนซีรัมและสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ด้วยคอลัมน์ แลกเปลี่ยนประจุลบ เจลฟิวเรชัน และ reverse phase -HPLC ในส่วนซีรัมแยกสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อได้จำนวนทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ p14.1, p15.9, p17.9, p31.0, p36.1 และ p51.2 ซึ่งมีความสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี mass spectrometry พบว่า p14.1, p15.9 และ p51.1 มีขนาดเล็กกว่า 1 กิโลดาลตัน

ทำการแยกบริสุทธิ์สารทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Crococin) จากส่วนพลาสมาของเลือดจระเข้ โดยวิธีการแยกด้วยเมมเบรนแยกขนาด วิธี reverse phase-HPLC และคอลัมน์ HypercarbTM พบว่า Crococin สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ Crococin โดยการหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายหมู่อะมิโน พบว่า Crococin มีลำดับกรดอะมิโน 2 ตัวแรกเป็น อะลานีน และไกลซีน และจากการวิเคราะห์โดยวิธี ESI-MS/MS พบลักษณะการซ้ำๆของสเปกตรามวลขนาด 94 และ 136 ดาลตัน ซึ่งมวลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับมวลของกรดอะมิโนตัวใด และ Crococin สามารถทนต่อความร้อนและทนต่อการย่อยของเอนไซม์โปรเนส ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า Crococin อาจไม่ใช่เปปไทด์ แต่อาจเป็นอนุพันธ์ของเปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนรวมอยู่กับสารประกอบที่มีมวลโมเลกุล 94 และ 136 ดาลตัน การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่งกราด พบว่า สารทำลายเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนของซีรัมและพลาสมาของจระเข้ ทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยการเข้าไปในส่วนไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย แล้วทำให้เมมเบรนของแบคทีเรียแตกหรือถูกทำลายในที่สุด

สำหรับในสารสกัดเม็ดเลือดขาวจระเข้ จากการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ด้วย HPLC และ filter molecular cut off. พบว่า มีอย่างน้อย 5 เปปไทด์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1 kDa-5 kDa ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตั้งชื่อว่า เปปไทด์ leucrocins พบว่า Leucrocine I น่าจะมีลำดับกรดอะมิโน NH_3^+ -KLGPQGAQLLGQP-COO⁻ ส่วน Leucrocine III น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนเป็น NH_3^+ -DAKGEGNPDAKDGDASEK-COO⁻ มีค่า MIC ที่ต่ำ ซึ่งจากผลการศึกษาผลของ Leucrocins ต่อเซลล์แบคทีเรียโดยกล้อง SEM พบว่า Leucrocine I และ Leucrocine II นั้นมีกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่คล้ายคลึงกับ Temporin-L (Mangoni *et al*, 2004) และซีรัมกับพลาสมาของจระเข้สายพันธุ์ไทย (Preecharram *et al*, 2008) โดยเมื่อบ่มเซลล์แบคทีเรียร่วมกับ Leucrocins แล้วเซลล์แบคทีเรียจะเหี่ยว ขาดแห้ว และแตกสลายเหลือเพียงเศษเซลล์เมื่อบ่มเป็นเวลานาน ขณะที่กลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกของ Leucrocine I และ Leucrocine II นั้นจะทำลายเชื้อโดยการทำให้ผิวเซลล์แบคทีเรียเกิดการปวด บวม มีลักษณะขรุขระ และเกิดการแตก

เสียหายของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งกลไกการทำลายเชื้อเช่นนี้จะเหมือนกับ Magainin 2 (Genco *et al*, 2003) และ SMAP29 (Anderson *et al*, 2001) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า Leucrocins มีเป้าหมายในการทำลายเซลล์แบคทีเรียที่เซลล์เมมเบรน โดยจะทำให้เมมเบรนเกิด ความเสียหาย ทำให้เชื้อแบคทีเรียตายในที่สุด ซึ่งได้มีการทดลองยืนยันกลไกการทำลายเชื้อในแบคทีเรียแกรมลบ ด้วยวิธี NPN uptake assay การศึกษานี้จะทำให้ทราบว่า Leucrocins นั้นสามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียเกิด permeabilization โดยจะใช้ 1-N-phenyl naphthylamine (NPN) เป็นตัวตรวจสอบ ซึ่ง NPN เป็นสาร fluorescent ซึ่งจะเกิดการเรืองแสงได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็น hydrophobic โดยหาก Leucrocins ทำให้เมมเบรนชั้นนอกของเมมเบรนเกิด permeabilization สาร NPN จะเข้าไปจับกับบริเวณ hydrophobic ของ lipid bilayer ซึ่งจะทำให้ค่าการเรืองแสงของ NPN เพิ่มขึ้น ผลพบว่า Leucrocins นั้นสามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกของเมมเบรนเกิด permeabilization ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ cationic antimicrobial peptides ; SMAP29 (Kalfa *et al*, 2001), Indolicidin (Falla *et al*, 1996) และ Temporin-L (Mangoni *et al*, 2004) อีกทั้งยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วน การเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรีย โดยการจำลองเมมเบรนชั้นในของแบคทีเรียด้วยการสร้างไลโปโซมที่หุ้มเอนไซม์ β -galactosidase ไว้ภายใน ซึ่งหาก Leucrocins ทำให้เมมเบรนไลโปโซมรั่วออกมาจะทำให้ β -galactosidase ออกมาสู่ภายนอกแล้วทำปฏิกิริยากับ ซับสเตรท (O-nitrophenyl B-galactopyranoside; ONPG) เกิดการย่อยสลาย substrate ซึ่งจะได้ สารละลายสีเหลืองเข้มขึ้นสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ซึ่งผลพบว่า Leucrocins สามารถทำลายแบบจำลองของเมมเบรนได้ และได้ยืนยันผลว่า Leucrocins นั้นเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เมมเบรน โดยวิธีการวัดปริมาณ intracellular nucleotides (DNA/RNA) โดยถ้า Leucrocins สามารถทำลายเซลล์เมมเบรน แล้วทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย intracellular nucleotides ก็จะถูกปลดปล่อยออกมาทำให้สามารถตรวจวัดระดับของ DNA/RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm โดยผลพบว่า เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียบ่มกับเปปไทด์ Leucrocins ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วสามารถตรวจวัดจำนวน DNA/RNA ที่เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งได้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาใน porcine leukocyte ที่ฆ่าเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* โดยการทำให้เซลล์แตกและมีการปลดปล่อย intracellular nucleotides ออกมา (Wang *et al*, 2003) จากการศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของ Leucrocins ด้วยวิธีการต่างๆ อาจทำให้สรุปได้ว่า Leucrocins จะมีตำแหน่งในการเข้าทำลายที่บริเวณเมมเบรนของแบคทีเรีย โดยเริ่มจากที่เมมเบรนชั้นนอกจนถึงชั้นในของแบคทีเรีย และส่งผลทำให้รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียมีลักษณะเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยมีลักษณะขรุขระ บวม และเสียหายขั้นรุนแรงคือ เกิดเซลล์แตก จนทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด ดังเช่นที่เคยมีผู้รายงานแล้วใน antimicrobial peptide ชนิดอื่นๆ และยังพบว่า เปปไทด์ Leucrocins II มีพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน ซึ่งจะต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างก่อนนำไปใช้

จากการศึกษาทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า ในเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยน่าจะมีระบบทำลายเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ โดยระบบดังกล่าวเป็นอิสระในการทำลายเชื้อโรค ซึ่ง antimicrobial peptides ที่พบในเลือดจระเข้นั้นมีคุณสมบัติเป็น broad spectrum มีโครงสร้าง primary structure ที่ช่วยทำให้เกิดการ perturbed permeabilization ของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งผลการศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่พบว่าในระบบ innate immunity ของจระเข้มีเปปไทด์ และสารกลุ่ม glycoconjugate ที่อาจจะรวมกันทำลายเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายจระเข้ จากการศึกษาี้ควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเฉพาะกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของ leucrocins ที่แยกได้ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาใช้เป็นสารทำลายเชื้อแบคทีเรียในอนาคต นอกจากนี้การค้นพบว่า hemoglobin ของจระเข้สายพันธุ์ไทยก็สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี น่าจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในแง่โครงสร้างและหน้าที่เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- วิน เขยชมศรี, จินดาวรรณ สิริันทวิเนติ, บุญเกื้อ วัชรเสถียร, มณี ตันติรุ่งกิจ, สุดาวรรณ เขยชมศรี, ยศพงษ์ เต็มศิริพงศ์ และ เรืองฤทธิ์ สัมปพันธ์. ม.ป.ป. ประสิทธิภาพของซีรัม กระเจ้าน้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. วารสารเทคนิคการแพทย์ และกายภาพบำบัด.
- Anderson, R.C., Hancock, R.E.W. and Yu P-L. (2004) Antimicrobial activity and bacterial-membrane interaction of ovine derived cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 673–676.
- Benincasa, M., Skerlavaj B., Gennaro R., Pellegrini A. and Zanetti M. 2003. In vitro and in vivo antimicrobial activity of two α -helical cathelicidin peptides and of their synthetic analogs. *Peptides* 24 : 1723–1731
- Benincasa, M., Scocchi M., Podda E., Skerlavaj B., Dolzani L. and Gennaro R. 2004. Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides* 25 : 2055–2061
- Brouwer, C. P.J.M., Bogaards S. J.P., Wulferink M., Velders M. P. and Welling M. M. 2006. Synthetic peptides derived from human antimicrobial peptide ubiquicidin accumulate at sites of infections and eradicate (multi-drug resistant) *Staphylococcus aureus* in mice. *peptides* 27 : 2585 – 2591
- Falla, T.J., Karunaratne, D.N. and Hancock, R.E.W. (1996). Mode of action of the antimicrobial peptides Indolicidin. *J Biol Chem*, 271, 19298-19303.
- Feng-Sheng Wang. 2003. Effect of antimicrobial proteins from porcine leukocyte on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in comminuted meats. *Meat Science* 65 : 615-621.
- Genco, C. A., Maloy W. L., Kari U. P. and Motley M. 2003. Antimicrobial activity of magainin analogues against anaerobic oral pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21 : 75-78
- Jacopo V. and Michel S. 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on Invertebrates. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 23(11): 494-496.

- Jui Y.C., Dieter B and Brigitte W.L. 1978. Micro-sequence Analysis of Peptides and Protein using 4-N-Dimethylaminoazobenzene Isothiocyanate/Phenylisothiocyanate Double Coupling Method. *FEBS LETTERS*. 93(2): 205-214.
- Katsumi M. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1462:1-10.
- Raj P.A., Soni S.D. And Levine M.J. 1994. Membrane-induced helical conformation of an active candidacidal fragment of salivary histatins. *J Biol Chem*. 269(13): 9610-9
- Podda, E., Benincasa, M., Pacor, S., Micali, F., Mattiuzzo, M., Gennaro, R. and Scocchi, M. 2006. Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide. *Biochimica et biophysica Acta* 1760:1732-1740
- Lee J.Y., Boman A., Sun C.X., Andersson M, Jornvall H, Mutt V, Boman HG. 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(23):9159-62.
- Liu T., She R., Wang K., Bao H., Zhang Y., Luo D., Hu Y., Ding Y., Wang D. and Peng K. 2008. Effects of rabbit sacculus rotundus antimicrobial peptides on the intestinal mucosal immunity in chickens. *Poultry science* 87(2):250-4.
- Merchant, M., Roche, C., Elsey, R and Prudhomme, J. 2003. Antibacterial properties of blood from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* : 136, 505–513.
- Merchant, M., Leger N., Jerkins E., Mills K., Pallansch B.M., Paulman L.R, Ptak G. R. 2006. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology* :110, 221-228.
- Mangoni, M.L., Papo, N., Barra, D., Simmaco, M.m Bozzi, A. and Rinaldi, A.C. 2004. Effect of antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *E.coli*. *Biochem*, 380 859-865.
- Michael E.S., Michael J.N., Wendy L.M., Yi-Quan T, Wayne S. and James S.C. 1992. Indolicidin, a Novel Bactericidal Tridecapeptide Amide from Neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 267 (7): 4292-4295.

- Pata, S., Daduang, S., Svasti, J. and Thammasirirak, S. 2007. Isolation of lysozyme like protein from crocodile leukocyte extract (*Crocodylus siamensis*) KMITL science and technology journal (7): 70-85.
- Pata, S., Daduang, S., Svasti, J., Tomohiro, A. and Thammasirirak, S. 2009 Leucrosin: antimicrobial peptide from fresh water crocodile. Peptide (Manuscript in preparation)
- Preecharam, S., Daduang, S., Bunyatratchata, W., Araki, T. and Thammasirirak, S. (2008) Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum African Journal of Biotechnology Vol. 7 No 17. (3 Sep.) 3121-3128
- Preecharam, S., Jeranaipreprem, P., Daduang, S. Temsiripong, Y., Somdee, T., Tamo, F., Svasti, J. and Thammasirirak, S. (2009) Antimicrobial peptide: Crocosin from freshwater crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma. (Submitting Manuscript Number: ASJ-2009-0193) Animal Science Journal
- Qian S., Wang W., Yang L and Huang H.W., 2008. Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: Evidence for lipidic pores. Department of Physics and Astronomy, Rice University, Houston
- Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W. and Cullor J.S. 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem.* 267(7): 4292-5.
- Thomas H., Yousef JB., Floyd CK. and J. Michael C. 2000. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the North American green frog *Rana clamitans*. *Peptides.* 21: 469-476.
- Wang, F.S. (2003). Effect of antimicrobial proteins from porcine leukocyte on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in comminuted meats. *Meat Sci.* 65, 616-621.
- Y, Gerold Gardon, Eric G. Romonoski and Alison M macdermot, 2005 Eye Current Research.
- Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389–395.
- Yan L. and Adams ME. 1998. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J Biol Chem.* 273(4): 2059-66.
- Zhao H. 2003. Mode of action of antimicrobial peptides. Faculty of Medicine, University of Helsinki

ภาคผนวก

Out put ที่เกิดจากโครงการ

โครงการวิจัยนี้มีประโยชน์อย่างมาก ทั้งในเชิงพาณิชย์โดยปัจจุบันบริษัท ศรีราชาโมต้า ซึ่งเป็นบริษัทที่ให้การสนับสนุนตัวอย่างเลือดจะใช้ในการทดลองได้นำ product ไปใช้ โดย อย. ได้อนุญาตในการนำเลือดจะเข้ามาใช้รับประทานเป็นอาหารเสริมและทางบริษัทก็จะมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์อีกต่อไป และที่สำคัญอย่างยิ่งในเชิงวิชาการ ได้มีการพัฒนาการเรียนการสอนและสร้างนักวิจัยใหม่จากการทำโครงการนี้โดยมีนักศึกษาปริญญาเอก 1 คน และนักศึกษาปริญญาโท อีก 2 คน ที่จบการศึกษาและมีความเชี่ยวชาญงานวิจัยทางด้านนี้นอกจากนี้ยังมีผลงานอื่นๆ ที่เกิดจากโครงการวิจัยนี้เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ และการตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศดังเอกสาร

1. Poster presentation national and international meeting

- 1.1 **Sompong Thammasirrak**, Chainarong Kutan, Sutthidech Preecharram, Sakda Daduang, Jisnusun Svasti, 2008. ANTIMICROBIAL PEPTIDES, (CROCOSINS) FROM FRESHWATER CROCODILE, (*Crocodylus siamensis*) WHITE BLOOD CELL EXTRACTS. The 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB International Conference. Athens, Greece 28 June -3 July, 2008
- 1.2 **Sompong Thammasirrak**, Sutthidech Preecharram, Pornpimol Jearranaiprepame, Sakda Daduang and Yosapong Tamsiripong 2008. *In vivo* WOUND HEALING-PROMOTING ACTIVITY OF SIAMESE CROCODILE BLOOD. The 2nd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-Region, Hanoi Agricultural University, Vietnam 2-3 October 2008.
- 1.3 Achana Sangwong, Nualyai Yaraksa, Sakda Daduang, and **Sompong Thammasirrak**. 2009. STUDY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM CROCODILE (*Crocodylus siamensis*) LEUKOCYTE EXTRACTS. The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference. 7-8 May 2009 at Khon Kaen University Khon Kaen, Thailand.
- 1.4 Supawadee Pata, Sakda Daduang, Jisnusun Svasti and **Sompong Thammasirrak**. 2008. Purification of antimicrobial peptide which shows activity to *S. typhi* and *S. epidermidis* from *crocodylus siamensis* white blood cell extract 34st Congress on Science and Technology of Thailand. 31 October – 2 November 2008 at Queen Sirikit National Convention Center Bangkok Thailand

- 1.5 Supawadee Pata, Sakda Dadoung, Jisnuson Svasti and **Sompong Thammasirirak**.2007. **Study of antibacterial and antifungal from crocodile leukocytes extract (*Crocodylus siamensis*)** Second Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Chulabhorn Research Institute Research Conference Center Bangkok Thailand 20-21 September 2008.
- 1.6 Preecharram, S., Jeranaipreprem, P., Daduang, S., Tamsiripong, Y., Soomdee, T., Svasti, J., Thammasirirak. Partial purification of crocacin: antimicrobial component from crocodile plasma (*Crocodylus siamensis*) การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7 11-13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี
- 1.7 Sangwong, A., Pata, S., Patramanon, R., Daduang, S., Svasti, J., Araki, T., Tamsiripong, Y., Thammasirirak, S., Leucrocins, The novel antimicrobial peptides from crocodile leukocyte extracts การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8 16-18 ตุลาคม 2551 ณ โรงแรมสอเลจอินน์ รีสอร์ท ริเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

2. Oral presentation national and international meeting

- 2.1 **Sompong Thammasirirak**, Sutthidech Preecharram, Pornpimol Jearranaipreame, Sakda Daduang and Yosapong Tamsiripong 2008. *In vivo* WOUND HEALING-PROMOTING ACTIVITY OF SIAMESE CROCODILE BLOOD. The 2nd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-Region, Hanoi Agricultural University, Vietnam 2-3 October 2008.
- 2.2 Sompong Thammasirirak. 2009. ANTIBACTERIAL ACTIITIES, SECONDARY STRUCTURE, AND KILLING MECHANISM OF CROCOSIN AND LEUCROCINS, THE NOVEL ANTIBACTERIAL AGENTS FROM SIAMESE CROCODILE (*Crocodylus siamensis*) BLOOD. The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference. 7-8 May 2009 at Khon Kaen University Khon Kaen, Thailand.
- 2.3 Achana Sangwong Sakda Dadoung, Rina Patramanon, Jisnuson Svasti and **Sompong Thammasirirak**¹ 2008. Leucrosins, the novel antimicrobial peptides from freshwater crocodile. Third Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Chulabhorn Research Institute Research Conference Center Bangkok Thailand 28-29 August 2008.
- 2.4 Supawadee Pata, Sakda Daduang, Jisnuson Svasti and **Sompong Thammasirirak**. 2007. New antimicrobial protein from crocodile leukocyte extract (*Crocodylus siamensis*). The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand 1-3 November , 2007.

- 2.5 Sutthidech Preecharram, Tinnakorn Theansungnoen, Yosapong Temsiripong, Sakda Daduang **and Sompong Thammasirirak**, (2006). Crocosins, Antimicrobial peptides from crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. The First International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region. 15-16 August Khon Kaen Thailand.

3. Publication

- 3.1 Sutthidech Preecharram, Pornpimon Jeranaipreprem, Sakda Daduang, Yosapong Temsiripong, Teerasak Somdee, Fukamizo Tamo, Jisnuson svasti Tomohiro Araki and **Sompong Thammasirirak**. (2009) Isolation and characterisation of crocosin, an antibacterial compound from crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma. (Submitting Manuscript Number: ASJ-2009-0193, in revised process) *Animal Science Journal*
- 3.2 Sutthidech Preecharram, Sakda Daduang, Wandee Bunyatratchata, Tomohiro Araki and **Sompong Thammasirirak** (2008) Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 No 17. (3 Sep.) 3121-3128
- 3.3 Supawadee Pata, Sakda Daduang, Jisnuson Svasti and **Sompong Thammasirirak** (2007) Isolation of lysozyme like protein from crocodile leukocyte extract (*Crocodylus siamensis*). *KMITL Science and Technology Journal* Vol. 7 No. S1 November, 70-84
- 3.4 Thammasirrak, S., Kutan C, Preecharram S, Daduang S, Svasti J. (2008) Antimicrobial peptides (crocosins) from freshwater crocodile, (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *FEBS JOURNAL* Volume: 275 Pages: 178-178 Supplement: **Suppl. 1**
- 3.5 Sompong Thammasirirak, Supawadee Pata, Nauyai Yaraksa, Sakda Daduang, Jisnuson Svasti, Yosapong Temsiripong, and Tomohiro Araki. 2009 The novel antibacterial peptide, Leucrosins from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts (manuscript in preparation).

Poster Presentation 12.

STUDY OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL FROM CROCODILE LEUKOCYTES EXTRACT (*CROCODYLUS SIAMENSIS*)

Supawadee Pata¹, Sakda Daduang¹, Jisnuson Svasti² and Sompong Thammasirirak¹

¹Faculty of Science, Khonkaen University, Khonkaen, Thailand; Tel: +66-4-3342911; Fax: +66-4-3342911; ² Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand; E-mail: somkly@kku.ac.th

Antimicrobial peptides are important substances functioning as self-defense against infection. This study aims to screen and purify the antimicrobial substances from crocodile leukocyte extracts. The crude leukocytes extract showed antibacterial activity toward *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi* B, *Salmonella typhi* ATCC 5784, *Vibrio cholerae* and *Candida albican*. Then the leukocyte extract was purified by anion exchange column chromatography (FPLC). Four protein peaks (P1-P4) were obtained. Protein peaks (P1-P3) demonstrated antibacterial and antifungal activity the same as crude leukocytes extracts. However protein peak (P4) display lesser extends antibacterial activity. The active fraction P1 from FPLC was further purified by HPLC. Protein P1 yields 12 peptides by HPLC. Peptides P1/1-2(38.980), P1/2(40.983) and P1/4-1(49.048) demonstrated antimicrobial activity. These results strongly suggest that crocodile leukocytes contained the potency antimicrobial peptides against broad spectrum bacteria. However the amino acid sequence and mechanism of killing the bacteria of these peptides remains to be investigated.

Acknowledgment: This work was financial supported by Thailand Research Fund and Agricultural Biotechnology for Sustainable Economy Research Center Khon Kaen University.

Full Length Research Paper

Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum

Sutthidech Preecharram¹, Sakda Daduang², Wandee Bunyatratchata³, Tomohiro Araki⁴ and Sompong Thammasirirak^{2*}

¹Graduate school, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

³Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

⁴Department of Bioscience, School of Agriculture, Kyushu Tokai University, Kumamoto-Aso 869-1404, Japan.

Accepted 28 July, 2008

Antibacterial agents were purified from Siamese crocodile serum by anion exchange, gel filtration and reversed phase HPLC. Six antibacterial agents designed as Hp14, Hp15, Hp17, Hp31, Hp36 and Hp51 were purified and proved to carry activity against *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae*. The mass analysis of MALDI-TOF for antibacterial agent of Hp14, Hp15 and Hp51 revealed that they are small molecule with a molecular mass less than 1 kDa. The scanning electron microscopy demonstrated that these agents targeted the bacterial membrane and they act like as antimicrobial peptides. The antibacterial agent in the serum may represent the first line of an immune system in a freshwater crocodile.

Key words: Antibacterial agent, crocodile, *Crocodylus siamensis*, reptile.

INTRODUCTION

Bacteria and fungi coexist with other living organisms. However, in spite of the fact that such microorganisms are always in contact with other organisms, microbial invasion into hosts hardly takes place, probably because of their unique defense systems. In the insect and animal, one such system is non-specific immunity which comprises a wide variety of antimicrobial peptides (Steiner et al., 1981) and factors (Ourth and Chung, 2004) with potent antimicrobial activities.

Crocodylus siamensis, the Siamese crocodile, is one of the critically endangered species of freshwater crocodile, which are originally distributed throughout much of South

East Asia. Crocodilians are known to live with opportunistic bacterial infection but exhibit no physiological effects. While crocodilians have no complete immunity to microbial infection, these species do exhibit remarkable resistance. This biological activity of crocodilians has not been well characterized. However, some reports have described the efficacy of alligator's serum in fighting against bacteria (Merchant et al., 2003), viruses (Merchant et al., 2005a) and amoeba (Merchant et al., 2004). Recently, Merchant et al. (2005b) proposed that the complement systems of alligator are effective in killing bacteria. More recently, leukocyte extract of American alligator has shown a broad spectrum of antibiotic effects on bacteria, fungi and viruses (Merchant et al., 2005a; Merchant et al., 2006a). The studies by Merchant et al. (2006b) also confirmed the effects of bacterial lipopolysaccharide on peripheral leukocytes in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). However, for freshwater crocodile, antibacterial activities components have not been characterized yet.

In this study, we purified the antibacterial agents from crocodile serum. These antibacterial agents have mole-

*Corresponding author. E-mail: somkly@kku.ac.th Tel: +66-43-342911; Fax: +66-43-342911.

Abbreviations: CFU, Colony forming unit; DDW, sterile distilled water; HCCA, α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; and TFA, Trifluoro acetic acid.

ISSN: 1905-2367



KMITL SCIENCE AND TECHNOLOGY JOURNAL

Vol. 7 No. S1
November 2007

SPECIAL ISSUE

The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology

November 1-3, 2007

Co-organizer: Khon Kaen University, Nong Khai Campus,
Nong Khai, Thailand

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

Isolation and characterisation of crocosin, an antibacterial compound from crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma

Sutthidech PREECHARRAM,¹ Pornpimol JEARRANAIPREPAME,² Sakda DADUANG,¹ Yosapong TEMSIRIPONG,³ Theerasak SOMDEE,⁴ Tamo FUKAMIZO,⁵ Jisnuson SVASTI,⁶ Tomohiro ARAKI⁷ and Sompong THAMMASIRIRAK^{1*}

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand,* ²*Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand,* ³*Sriracha Moda Farm Chon Buri 20110, Thailand,* ⁴*Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand,* ⁵*Department of Advanced Bioscience, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan,* ⁶*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand,* ⁷*Department of Bioscience, School of Agriculture, Kyushu Tokai University, Kumamoto, 869-1404, Japan*

Correspondence: Sompong Thammasirirak, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. (Email: somkly@kku.ac.th)

Running title: Antibacterial Compound from Crocodile Plasma

ABSTRACT

An antibacterial compound from crocodile blood was partially purified and functional characterised. The freshwater crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma with antibacterial activity were partially purified by using a centrifugal concentrator and reverse phase HPLC, and designated as crocosin. Crocosin exhibits antibacterial activity towards *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. Crocosin is thermostable and resistant to pronase digestion. The structure of crocosin analysed by mass spectrometry contains repeating units of 94 and 136 m/z. Scanning electron microscopy indicates that crocosin probably penetrates progressively into cytoplasm space, perturbing and damaging bacterial membranes. Crocosin may provide an early defence mechanism toward bacterial infection in fresh water.

Key words: antibacterial compound, crocodile, *Crocodylus siamensis*; crocosin, reptile



www.febsjournal.org

the FEBS Journal

Volume 275 Supplement 1 June 2008



Biochemistry of Cell Regulation

June 28 - July 3, 2008, Athens, Greece
Megaron Athens International Conference Centre

Biochemistry of Cell Regulation
Athens, Greece
June 28 - July 3, 2008



Under the Auspices of H.E. the President of the Hellenic Republic



Hellenic Society of Biochemistry
and Molecular Biology



Federation of European
Biochemical Societies



International Union of Biochemistry
and Molecular Biology

www.febs-iubmb-2008.org

www.febs2008.org

Abstracts

33rd FEBS Congress
and 11th IUBMB Conference

Biochemistry of Cell Regulation

Athens, Greece
28 June - 3 July 2008



WILEY-
BLACKWELL

PP3A-85**Antimicrobial peptides (crocosins) from freshwater crocodile, (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts**S. Thammasirak¹, C. Kutan¹, S. Preecharam¹, S. Daduang¹ and J. Svasti²¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND, ²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, THAILAND

Introduction: Most researches to date have focused on searching the antimicrobial peptides without bringing resistance. This report describes a new antibacterial peptides (Crocosins) purified from leukocyte extracts of freshwater crocodile, and characterized for their functions.

Methods: Crocosins were purified by RP-HPLC. The primary structure, The MIC of these peptides toward two bacterial strains and their hemolytic activity toward human RBC were determined. The kinetic of bacterial killing were characterized by SEM.

Results and conclusion: The Crocosin II and III exhibit antibacterial activity toward *Salmonella typhi* and *Staphylococcus epidermidis*. The MICs of Crocosins against bacteria were 0.125 and 0.033 µg/µl respectively. Crocosin II shows no significant destroy RBC but Crocosin III displays high toxicity. The N-terminal of both peptides were found to be blocked for sequencing, amino acid composition was used to determine the partial sequence. Crocosin II contains high mole% of Ile and Crocosin III shows high mole% of Glu. The SEM images of bacteria exposed to Crocosins provide the evidence that membrane is the main target of the bactericidal of these peptides. This study shows that freshwater crocodile leukocyte extracts contains broad spectrum antimicrobial peptides and encourage further investigation of the therapeutics potential of these peptides.

PP3A-86**Preparations, properties, and active-site structure of *Escherichia coli* ethanolamine ammonia-lyase**T. Toraya¹, K. Akita¹, N. Hieda¹, N. Baba¹, H. Sakamoto¹, K. Mori¹, N. Shibata², H. Tamagaki² and Y. Higuchi²¹Okayama University, Okayama, JAPAN, ²Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Hyogo, JAPAN

Adenosylcobalamin (AdoCbl)-dependent ethanolamine ammonia-lyase (EAL) catalyzes the conversion of ethanolamine to acetaldehyde and ammonia. The *eutB* (α) and *eutC* (β) genes in the *eut* operon of *E. coli* were cloned and expressed at high levels. The purified apoEAL existed as a $\alpha\beta\beta_6$ complex. At high concentrations, it formed inactive precipitates which were reactivated by a dithiothreitol treatment. Limited proteolysis of the enzyme by trypsin led to the removal of the N-terminal 28 amino acid residues from the β subunit without loss of enzyme activity. Several kinds of EALs that lack the N-terminal 28 residues of β subunit and contain a His₆-tag were expressed and purified by a Ni-chelate affinity column, and their properties studied. When the *eutB* and *eutC* genes were placed under the control of *tac* or T7 promoter in this order, subunit compositions of the purified enzymes were imbalanced, but the imbalanced expression was much improved when the order of genes was reversed. Km values for substrate and AdoCbl as well as inactivation properties in the absence of substrate and in the presence of substrate analog 2-aminopropanol were not affected, while the susceptibility to SH inhibitors was lowered, by the N-terminal truncation and C34S mutation. EALs with truncated β subunit and His₆-tag were not precipitated/inactivated at high concentrations. A truncated

enzyme was crystallized in complex with cyanocobalamin and ethanolamine, and the structure of EAL was analyzed by X-ray crystallography. The mechanism of action of EAL is discussed on the basis of its active-site structure.

PP3A-87**Structural determination of the haloacid permease Deh4p of *Burkholderia* sp. MBA4 with a dual-reporter system**

J. S. H. Tsang, M. Y. M. Tse and M. Yu

School of Biological Sciences, The University of Hong Kong, Hong Kong, CHINA

Introduction: *Burkholderia* sp. MBA4 produces a haloacid permease, Deh4p, which mediated the uptake of haloacid as a growth substrate. Deh4p contains 552 residues with a mass of 59.4 kDa. Structural prediction of Deh4p suggested the presence of 11 or 12 transmembrane helices. Most of these predictions suggested that the N terminus is located in the cytoplasm. In this study we reported the determination of the topology of Deh4p by using a PhoA-LacZ dual-reporter system.

Methods: PhoA is an alkaline phosphatase which only works in the periplasm while beta-galactosidase (LacZ) is an enzyme that works in the cytoplasm. DNA fragments encoding various lengths of deh4p were amplified by PCR and fused in-frame with a phoA-lacZ cassette. These recombinant plasmids were transformed and the fusion proteins expressed in *E. coli* using a weak constitutive promoter. Enzyme activities of PhoA and LacZ were determined to localize the whereabouts of the reporter and thus the authenticity of the transmembrane domains.

Results: The expression of the membrane proteins did not affect the growth of the cells. More than 36 constructs were made and transformed into *E. coli*. The PhoA/LacZ enzyme activity ratios for these clones have been determined using PNPP and ONPG. The results showed that the first two and the last two predicted transmembrane domains were absent.

Conclusions: The current results suggested that there are at most eight transmembrane domains found in Deh4p. The N- and the C-terminals were located in the cytoplasm and a large loop was exposed in the periplasm.

PP3A-88**Evolution of a molecular switch by a single mutation surmounts the chloride ion dependent mechanism of ACE**N. Nawazish¹, J. Gsponer², A. Husain¹, I. P. Gerothanassis³, M. M. Babu² and A. Tzakos³¹Centre for Heart Failure Research, University of Alabama, Birmingham, AL, USA, ²MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, UK, ³Department of Chemistry, Section of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Ioannina, Ioannina, GREECE

Angiotensin Converting Enzymes (ACEs), are a major target for cardiovascular therapies that consist an evolutionary conserved family of zinc metalloproteases. The last years were landmarks for the structure based knowledge of ACEs offering new details at the molecular level. However, important questions concerning the different mechanisms of the chloride ion selectivity among ACEs remain open. On the basis of pK(A) calculations and homology modelling we suggest a model for the ion (in)dependent mechanism of ACEs. We validate our model through site-directed mutagenesis. We suggest that ACEs from different organisms may have evolved unique ionic dependencies to cope with the diverse environments they encounter.

The novel antibacterial peptide, Leucrosins from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts

Sompong Thammasirirak¹, Supawadee Pata¹, Nauyai Yaraksa, Sakda Daduang¹, Yosapong Temsiripong², Jisnusun svasti³, and Tomohiro Araki⁵

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

²*Sriracha Moda Farm Chon Buri 20110, Thailand*

³*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand;*

⁴*Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, 869-1404, Japan*

Running title: Novel Antibacterial peptide from Crocodile white blood cell

Introduction

The rapid emergence of antibiotic-resistant bacterial pathogens is a serious problem and extensive efforts have been focused on the development of new classes of antimicrobial agents (Neu, 1992). Antimicrobial proteins and peptides are one group of antimicrobial agents which are phylogenetically ancient constituents of host defense and are expressed by immune and non-immune cells of invertebrates and vertebrates (Beck & Habicht, 1996). These antimicrobial agents have been isolated from numerous types of organisms, ranging from bacteria to plants and animals (Treffers, Chen, Anderson & Yu, 2005). The biological activity of these showed against broad spectrum microorganism. Many antimicrobial molecules appear to act via specific but not receptor-mediated permeabilization of microbial membranes and selected target specificity of killing (Yeaman & Yount, 2003). Nevertheless, they use many structures and mechanisms for destroying microorganism (Brogden, 2005). These confer considerable potential for their development as novel therapeutic agents to overcome the resistance problem (Tossi, Sandri & Giangaspero, 2000).

Mammalian leukocytes (neutrophils, macrophages, eosinophils, basophils and natural killer cells) are one source of antimicrobial substances (Treffers et al, 2005). They express a variety of proteins and peptides as effectors molecules that are able to kill or to inactivate microbial pathogens. Mammalian leukocytes contribute many different species of antimicrobial substances such as peptidoglycan recognition proteins (Tydell, Yuan, Tran & Selsted, 2006), α -defensin (Lehrer, Lichtenstein, & Ganz, 1993), β -defensin (Selsted et al, 1993), LL-37 (Gudmundsson & Agerberth, 1999), lysozyme (Pellegrini, Waiblinger & Fellenberg, 1991), cathelicidins (Zanetti, 2004), and chemokines (Becerra et al, 2007). Many antimicrobial peptides display activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts and fungi, and even certain enveloped viruses and protozoa. Other peptides are more restricted in their spectrum of activity; even minor variations in peptide structure can influence activity. A systematic understanding of the relationship between peptide structure and activity is an important area for future investigation. Accumulating evidence has shown that many peptides act synergistically with larger polypeptides whose antimicrobial activity is enzymatic (*e.g.*, lysozyme) or is dependent on specific recognition of

bacterial macromolecules (*e.g.*, the bactericidal permeability-inducing protein, BPI) (Levy, Ooi, Weiss, Lehrer & Elsbach, 1994). Synergistic interactions between two antimicrobial peptides in the frog skin, magainin 2 and PGLa (antibiotic peptide in magainin family), have also been reported (Westerhoff et al, 1995). In addition, to their action on microbes, some antimicrobial peptides can function as regulatory molecules in the host. For example, *in vitro* studies suggest that defensins attract phagocytes and lymphocytes to sites of infection, inhibit the release of cortisol from adrenal cells, induce the proliferation of fibroblasts and modify ionic fluxes in epithelial cells (Ganz & Lehrer, 1995). However, most research to date has focused on searching for peptides, which possess antimicrobial activity without causing resistance in targeted microorganisms. Crocodilians are known to live with opportunistic bacteria without overt physiological effects. While crocodilians are not completely immune to microbial infection, these species do exhibit remarkable resistance. The immune system of crocodilians has not been well characterized, but several reports have described the efficacy of alligator serum in fighting bacteria, viruses and amoeba (Merchant, Roche, Elsey & Prudhomme, 2003; Merchant, Ptak, Nalca, Paulman, Wells & Pallansch, 2005a). Recently, Merchant et al. (2005b) proposed that the complement systems of alligator are effective in killing bacteria. In addition, leukocyte extract from the American alligator has been shown to have a broad spectrum of antibiotic effects on bacteria, fungi and viruses (Merchant et al, 2006). More recently, Preecharram et al. (2008) have reported that, the antimicrobial substances were found in serum of Siamese crocodiles (*Crocodylus siamensis*). However, no research has previously been reported on antimicrobial peptides from leukocyte extracts of *Crocodylus siamensis*.

MATERIALS AND METHODS

1.3 Microorganism Gram Positive Bacteria

Aeromonas hydrophilla, *Bacillus amyloliquefaciens* TISTR 1045, *B. cereus* (Clinical isolated), *B. licheniformis* TISTR 1010, *B. megaterium* (Clinical isolated), *B. pumilus* TISTR 90, *B. sphaeriens* TISTR 678, *B. subtilis* TISTR 008, *B. subtilis* (Clinical isolated), *Micrococcus luteus* (Clinical isolated), *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923, *S. aureus* TISTR 5049, *S. aureus* (Clinical isolated), *S. epidermidis* (Clinical isolated), *Xanthomonas* sp.

Gram Negative Bacteria *Escherichia coli* (Clinical isolated), *E. coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Pseudomonas aeruginosa* (Clinical isolated), *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* (Clinical isolated), *S. typhi* ATCC 5784, *S. typhi* B (Clinical isolated), *S. paratyphi* B (Clinical isolated), *S. paratyphi* A (Clinical isolated), *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Vibrio cholerae* (Clinical isolated), **Fungal** *Candida albicans* (Clinical isolated), **Yeast** *Sacharomyces cerevisiae* 5539, *S.cerevisiae* 5596

2. Blood Collection

Adult crocodiles were cabled snare and unconscious with electric spark. Blood samples were drawn from the supravertebral branch of the internal jugular vein (Olson, Hessler & Faith, 1977; Zippel, Lillywhite & Mladnich, 2003) using 2.5 cm 18 hypodermic needle (Nipro, Japan) and 10 ml disposable syringes (Nipro, Japan) and transferred immediately to 15 ml sterile centrifuge tubes containing 1 ml of 0.5 M EDTA. The tubes were kept in ice box. The volume of blood collected from each crocodile depended on the size of the animal.

3. Isolation of Leukocytes

Whole blood was put on ice overnight during which the erythrocytes settles to the bottom of tubes, the interphase layer containing the leukocytes was collected and centrifugation at 800 x g for 20 min (25 °C). The contaminating red blood cells were lysed by addition of 0.83% ammonium chloride solution to the leukocyte suspension at a ratio of 3:1 (Treffers, Chen, Anderson & Yu, 1996). The white blood cells were collected by centrifugation at 800 x g for 20 min (25 °C). The cell pellet was gently re-suspended in normal saline (0.89% NaCl) and centrifuged again at 800 x g for 20 min (25 °C). Pellets of white blood cells were then kept in centrifuge tubes at -70 °C prior to use.

4. Leukocyte Extraction

A crude extract from the white blood cells of crocodile was obtained using a modified method by Treffer et al. (1996). White blood cells were frozen at -70°C overnight for breaking cell after that re-suspended in 0.01 M acetic acid and sonicated to release the antimicrobial substances. The solution containing the antimicrobial substances were collected ($12,000 \times g$, 20 min, 4°C). The supernatant was kept and centrifuged again at $12,000 \times g$ for 20 min (4°C). The crude white blood cell extracts were lyophilized, dissolved in 0.01% acetic acid (Treffer et al, 1996) and stored at -70°C until used.

5. Determination of Protein Concentration

Protein concentrations were determined by the Bradford method (Bradford, 1976). Standard proteins were prepared with concentration of 2, 4, 6, 8 and 10 μg bovine serum albumin (BSA) in 1 ml of Bradford dye reagent. Sample (1-2 μl) was added into 1 ml of dye reagent. The reaction mixture was mixed gently and incubated for 10 min at room temperature. The absorbance of standard protein and protein samples were measured at 595 nm. The calibration curve was plotted and the protein sample concentration was calculated.

6. Antimicrobial Activity Assays

Antibacterial activity was assayed using the disc diffusion technique. The disc diffusion assay was performed using nutrient agar, as described previously by Anderson & Yu (2003). Antibacterial activity was tested with both gram-negative and gram-positive bacteria and yeast, including *C. albicans*. Bacteria (OD_{600} 0.5-0.6) was diluted by nutrient broth (*C. albicans* used YM medium) to final optical density (OD_{600}) around 0.1. After that 200 μl of diluted bacteria was pipetted and swabbed to 20 ml nutrient agar plate. Sterile paper discs (6 mm) were placed on the nutrient agar plate and test sample such as white blood cell extract (28-60 $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$) was added diffusion into each paper disc. Plates were incubated for 12 h at 37°C . Antimicrobial activity was assessed by the clearing zone around the paper disc. The broad-spectrum antibiotic streptomycin disc (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$) and 0.01% sterile acetic acid were used as positive and negative control, respectively.

7. Purification of Antimicrobial Substances from Crocodile Leukocyte Extracts

The crude white blood cell extracts was filtrated using 0.45 μm citrate filter membrane. Then filtrated sulotion (concentration of total protein is 46.25 μg) was subjected into column UNO Q1 (Bio-Rad, U.S.A.) with contained Q sepharose fast flow resin and run by biologic duo flow program (Bio-Rad, U.S.A.) of fast performance liquid chromatography (FPLC). The column was washed by the gradient solution of 25 mM Tris-HCl pH 8.1 and 0.5 M NaCl in solvent A (solvent B). The solutions were pumped through the column at a rate of 60 ml/h and the absorbance at a wavelength of 280 nm was monitored using UV detector. The fractions (3 ml/fraction) corresponding to the peaks were collected, concentrated by freeze dry, dissolved in 0.01% sterile acetic acid and assayed for antimicrobial activity following disc diffusion method. Antimicrobial substances from P1 fraction were further purified by gel filtration using Superdex-30 prep, using 0.5 x 25 cm column. The column was eluted by 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) with flow rate of 1.0 ml/min. The samples of P1 fraction was concentrated by lyophilize after that dissolved by 0.1% TFA and filtrated by 0.45 μm citrate filter membrane. Each proteins and peptides fraction were kept and lyophilized. Both of them were dissolved by 0.01% sterile acetic acid and assayed antimicrobial activity against *S. epidermidis* and *V. cholerae* using disc diffusion assay method. Peptides (MW < 10 kDa) from gel filtration were filtrated by 0.45 μm citrate filter membrane. Samples were loaded onto a 250 x 4.6 mm Apollo C18 5U column RP-HPLC equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (0.1%TFA, solvent A) at a flow rate of 1 ml/min. A linear gradient of 60% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid (solvent B) was applied at 1%min⁻¹ from 0 to 20%, 1.7% min⁻¹ from 20% to 50% and 10% min⁻¹ from 50% to 100%. Fractions of purified peptides were collected, lyophilized and re-suspended in 0.01% sterile acetic acid. The purified peptides were assayed antimicrobial activity using disc diffusion technique.

8. Zymogram Refolding Gel

Micrococcus luteus (SIGMA, USA) whole cells were labeled with the vinyl-sulfone reactive dye, Remazol Brilliant Blue (RBB) as for the synthesis of RBB-labeled starch and the refolding gel was performed according to the procedure of Hardt *et al.* (2003). Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed using

a 4% (w/v) stacking gel and a 15.0% (w/v) resolving gel containing 0.1% (w/v) blue *M. lysodeikticus* cells. Polyacrylamide gels and buffers contained 0.1% (w/v) SDS. Samples 10 µl (9.25µg) were mixed in 2x sample buffer without reducing agent (62.5 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8, 0.006% (w/v) bromophenol blue as tracking dye, 20% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS). Electrophoresis was performed using Atto electrophoresis cell (Atto, Japan) at a constant 120 V for 1.4 h. The gel was washed twice with 1 % Triton X-100 in 50 mM Phosphate buffer pH 7.0 for 3-5 hours to remove SDS and gently shaken at 37 °C. After SDS was washed out, proteins refolded and re-function of antimicrobial activity. The activities of antimicrobial proteins were shown as the clear zone in an otherwise opaque bluish gel.

10. Tris- Tricine SDS-PAGE

Leukocyte extracts and protein fractions P1 from Anion-exchange column chromatography were separated by Tris-tricine SDS-PAGE as described by Schagger & Von (1987) using 16.5% separating gel, 10% spacer gel and 4% stacking gel in an AE-6440 gel electrophoresis instrument (Atto, Japan). Rain bow marker (which contained; Insulin (α,β) chain MW 2.5 and 3.5 kDa, respectively; Aprotinin MW 6.5 kDa; Lysozyme 14.0 kDa; Trypsin inhibitor MW 20.1 kDa; Carbonic anhydrase MW 30.0 kDa; Ovalbumin MW 45 kDa) was used. The concentration of leukocyte extracts and P1 fraction was 1 µg/ µl (20 µl) and 0.1633 µg/ µl (20 µl), respectively. The gel was stained with Coomassie Brilliant blue R-250 for 1 h. Then de-stain was done and band of peptides were detected.

13. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Peptides

The minimal inhibitory concentrations (MICs) of peptide Leucrocin I, II, III and IV was determined by a microdilution susceptibility test in 96-well micro titer plates, according to a modified version of Hancock's "Modified MIC method for cationic antimicrobial peptides". (Hancock, 1996) The antibacterial was tested on the reference strains *S. epidermidis* (Leucrocin I and II), *V. cholerae* (Leucrocin III and IV). The antimicrobial assayed was conducted with different concentrations of these peptides to compare their effects on the bacterial growth. Antibacterial activity was examined using log phase culture bacteria in nutrient broth at 37 °C. The cultures

were diluted with 10 mM PB buffer pH 7.4 to give approximately 10^6 CFU/ml. One hundred micro liters of diluted test strain was transferred to a 96 well plate and 100 μ l of the different peptide concentrations diluted in 10 mM PB buffer pH 7.4 was added to each well. The plates were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 16 h. After incubation for 16 h, the optical density at 550 nm (OD_{550}) of each well was determined using Benchmark microliter plate reader (Bio-Rad, U.S.A.). Sterile water and streptomycin (0.4 mg/ml) were used as negative and positive control, respectively. Antimicrobial activity is expressed as no growth observed when test with above experiment (Nakamura et al., 1988; Casteels, Ampe, Jacobs, Vaeck & Tempst, 1989; Charles & Phillippe, 1997). The minimal inhibitory concentration (MIC) is defined as the minimal agent concentration that inhibits bacteria growth (Zhu et al., 2007).

14. Microbicidal Activity Assay of Antimicrobial Agents

S. epidermidis, *S. typhi* and *V. cholerae* were used as target organisms in microbicidal assay as previously described by Selsted et al. (1984 & 1993). Bacteria (OD_{600} 0.5-0.6) was centrifuged at 800 x g for 5 min, then washed by 5 mM glucose in 0.1 M PB buffer pH 7.4 for 3 times. Bacterial cells were suspended in the same buffer. The suspended bacterial cells OD_{600} around 0.5 were mixed with 100 μ l of antimicrobial peptides; *S. epidermidis* and *S. typhi* were mixed with Leucrocine I and Leucrocine II; *V. cholerae* was mixed with Leucrocine III and Leucrocine IV, 70% ethanol and buffer were used as positive and negative control, respectively. The mixture solution of each test was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 2 h. Then, all of the reactions were diluted by ten fold dilution. Next, the plates were spread with the solution. Colonies of bacteria from each reaction were counted and expressed as CFU/ml.

15. Determination Toxicity of Antimicrobial Agents by Hemolytic Assay

Human red blood cells (2% w/v) were centrifuged and washed by phosphate buffer saline (PBS buffer) pH 7.4. Then human red blood cells was suspended by the same buffer. One milliliter of 2 % HRBCs was mixed with peptides and incubated at room temperature for 30 min. The reactions were centrifuged and then the supernatant was measured absorbance at 525 nm which PBS buffer and 1% Triton X-100 was used as negative control and positive control, respectively. The percentage of hemolytic was calculated and compared.

16. Outer Membrane Permeabilization Assay

1-N-phenylnaphthylamine (NPN) is a hydrophobic fluorescence probe (Loh, Grant & Hancock, 1984; Falla, Karunaratne & Hancock, 1996) which is used to study mode of action of the antimicrobial peptides. Gram negative bacteria have two envelope membranes. This experiment used a modified method of Loh et al., (1984); an overnight culture of *S. typhi* and *V. cholerae* was transferred to fresh nutrient broth medium and grown to OD₆₀₀ of 0.5-0.6. Cells were harvested, washed by HEPES buffer pH 7.24 and re-suspended in 5mM KCN in HEPES buffer pH 7.24 (OD₆₀₀ ~ 0.5). To 3 ml cells, 60 µl of 500 µM NPN was mixed and peptide samples were added after 30 second. If peptides can bind and permeabilize of the outer membrane, NPN was uptake into interior which showed hydrophobic environment. The increase in fluorescence as a result of partitioning of NPN into the interior outer membrane; was measured 14 min after the addition of peptides using a fluorescence spectrophotometer. Streptomycin sulphate (100 µg) was used as a positive control.

17. Synthetic Membrane Permeabilization Assay

17.1 Preparation Liposome Encapsulated Enzyme β -Galactosidase

Lecithin from soy bean (1.2 g) was dissolved in 50 ml PBS buffer pH 7.4. A solution of lecithin was placed in a 50 ml beaker. Then the lecithin solution was dispersed in β -galactosidase enzyme (0.001g) in 50 ml phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and was sonicated for 10 min using an ultrasonic to obtain vesicles. After that, the reaction was incubated at 4 °C overnight. Liposome was transfer into new tube. Then, liposome was suspended in the same buffer and stored at room temperature prior to use.

17.2 Inner Membrane Permeabilization Assay

The extent of cytoplasmic membrane permeabilization was determined by measurement of β -galactosidase activity in liposome using *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), a non-membrane-permeative chromogenic substrate. Liposome encapsulated β -galactosidase (50 µl) was added in 96 well plate and then

1.5 mM ONPG (100 μ l) was added. Peptides were mixed at the concentration of Leucrocine I (0.015 μ g/50 μ l); Leucrocine II (0.25 μ g/50 μ l), Leucrocine III (0.8 μ g/50 μ l); Leucrocine IV (0.6 μ g/50 μ l). The hydrolysis of ONPG to *o*-nitrophenol over time was monitored spectrophotometrically at 415 nm following the addition of peptide samples at five fold of MIC.

18. Bacteriolytic Assay

S. epidermidis was grown in 50 ml of nutrient broth at 37 °C. The mid logarithmic phase cultures were centrifuged at 3000 rpm for 5 min and harvested by 10 mM PB buffer pH 7.4 for two times. Cell pellets were re-suspended in same buffer (OD 600 ~ 0.5). To 3 ml of suspended cells were mixed with peptides at 37 °C for 1 h. Culture suspensions were centrifuged at 10,000 rpm. The absorbances of supernatants were measured by spectrophotometer at OD 260 nm (Wang, 2003).

19. Peptide Mass Analysis by LC-MS-MS Mass Spectrophotometer

Purified peptides Leucrocine I and II were frozen dry. Each fragment was digested with trypsin and the tryptic peptides were resolved by reverse phase HPLC. After that, peptide fragment were analyzed by mass spectrometry.

20. Analysis Mechanism of Action of Antimicrobial Substances by Scanning Electron Microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was performed according to Lau et al. (2004) with slight modifications. *S. epidermidis*, *S. typhi* and *V. cholerae* were grown in nutrient broth and harvested at the logarithmic phase of growth by centrifugation at 3,000 $\times$ g for 5 min. The bacterial cells were then washed twice with PBS (pH 7.0) and resuspended to final concentration of 10⁶ CFU/ml. Aliquots of suspension of *S. epidermidis* (100 μ l) and *S. typhi* were individually incubated with Leucrocine I (10 μ g/50 μ l), Leucrocine II (10 μ g/50 μ l) and *V. cholerae* was individually incubated with Leucrocine III (10 μ g/50 μ l) and Leucrocine IV (10 μ g/50 μ l) at 37 °C for 2 h, respectively. The 150 μ l of incubated bacteria were fixed with equal volumes of 5% w/v of glutaraldehyde (Sigma, USA) for 1 h. The fixed cells were carefully pipette and settled onto a 0.2 μ m cellulose acetate membrane filter (Sartorius AG, Germany)

for 5 min and then washed twice with PBS buffer. The fixed material was dehydrated by rinsing (for 15 min) repeatedly with ethanol solutions, of which the concentrations are elevated stepwise from 30%, 50%, 70%, 90%, and finally 100% ethanol. The dehydrated materials in the absolute ethanol were dried in a critical point drier (CPD7510; Thermo VG Scientific, England) with carbon dioxide as the drying agent. Dry materials were coated by sputter Coater (SC7620, Polaron, England) with gold palladium and examined by SEM (LEO1450VP, LEO Electron Microscopy Ltd, England) operating at 12-20 kV. The negative control was performed in a similar manner except that the bacterial cells were incubated with PBS buffer (pH 7.0) instead of the antibacterial compound.

21. Amino Acid Analysis and Sequence Analysis

Peptides were hydrolyzed in evacuated sealed tubes with constant boiling HCl containing 0.05% β -mercaptoethanol at 110 °C, for 20 h. Then the hydrolysates were analyzed with amino acid analyzer (Model L-8500A, Hithachi Co., Japan). Tryptophan residues in peptides were calculated as previously reported by Prager et al. (1972). Peptide sequencing was done by a DABITC/PITC double coupling manual micro sequencing method or a protein sequencer (abi Model 477A, Applied Biosystem Co., Japan and PSQ-1, Shimadzu Co., Japan).

22. Determination of N-Terminal Amino Acid Sequence

The N-terminal amino acid sequence of peptides was analyzed with tryptic peptide performed on an Applied Biosystem/MDS Sciex API QSTAR Pulsar Hybrid LC/MS/MS System equipped with o-MALDI ionization source (MDS Sciex, API-QSTAR, Applied Biosystems, Toronto). The digested solution was purified by RP-HPLC column using Jasco 800 series HPLC (Japan Spectroscopic Co., Japan). Automated Edman peptides sequencing was carried out on a glass fibre disk using a Procise 492 Protein Sequencer (Applied Biosystem), with pulsed liquid TFA delivery.

Result and Discussion

1. Antimicrobial Activity of Crocodile Leukocyte Extracts Using Disc Diffusion Method.

Antimicrobial activity of Siamese crocodiles leukocyte extracts was screened using the 15 species of gram positive bacteria, 12 species of gram negative bacteria, 1 specie of fungi, and 2 species of yeast. Leukocyte extracts were tested against organisms with concentrations ranging from 30 to 60 µg/disc revealed the dose-dependent activity of leukocyte extracts as measured by the size of the clear zone surrounding the sample disc (Pata et al., 2007). All 9 species organisms; *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus megaterium*, *B. licheniformis* TISTR 1010, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi*, *S. typhi* ATCC 5784, *Vibrio cholerae*, and *Candida albicans* were sensitive with crocodiles leukocyte extracts. In this case, the zone of clearing was greater against *V. cholerae* than other species (Figure 15). The test conducted with 10 µg streptomycin disc as positive control, whereas the test performed with 0.01% sterile acetic acid as negative control, resulted in no such clear zone.

2. Purification of Antimicrobial Agents in Crocodiles Leukocyte Extracts by Anion Exchange Column Chromatography

The leukocyte extract was first separated through an anion-exchange column chromatography which used UNO Q1 (Bio-Rad) containing Q Sepharose fast flow resin. Four protein fractions were obtained namely as P1, P2, P3, and P4 (Figure 16). All four proteins fractions were tested, for antimicrobial activity by disc diffusion assay. The disc diffusion plate assay showed that all of the fractions displayed broad spectrum antimicrobial activity against the test organisms (Figure 17, 18, and 19).

However, to confirm the antimicrobial activity of fraction P2, P3 and P4 which might be contained some salt from the used buffer, pooled fraction P2, P3 and P4 were dialyzed against double distilled water, lyophilized, and dissolved in 0.01% sterile acetic acid, and then assayed antimicrobial activity by disc diffusion method.

The results showed that P1 and P3 fractions still showed antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi* and *Candida albicans* (Figure 20).

4. Purification of P1 Fraction by Gel Filtration Using Superdex -30 Prep

Column

To purify the antibacterial peptides containing sample which displayed antibacterial activity were subjected to gel filtration chromatography on a Superdex-30 prep column. The buffer was 0.1% trifluoroacetic acid and 1.0 ml/min of flow rate which used in this purification. Two major protein peaks (designed as A and B) were obtained. (Peak A contained protein molecular weight more than 10 kDa and protein molecular weight less than 10 kDa were estimated in peak B (Figure 24). The collected peak A and B were freeze-dried and stored at -70 °C until needed. Peak A and B were assayed for antimicrobial activity against *S. epidermidis*, *S. typhi*, *V. cholerae* and *C. albicans* which was used as test organism. Both of peaks A and B could inhibit *S. epidermidis* (Figure 25A) and *V. cholerae*. (Figure 25B). Further, peak B fraction showed antimicrobial activity against *S. typhi* (Figure 26A) and *C. albicans* (Figure 26B) when assayed by liquid growth inhibition. Further, peak B (MW < 10 kDa) were purified by C18 RP-HPLC.

. Purification of Antimicrobial Peptide by C18 Reverse Phase HPLC

Peak B from gel filtration (MW < 10 kDa) was purified by C18 reverse phase HPLC. The chromatogram of purification was presented in Figure 27. Ten peptide peaks were obtained, namely as HP1 (6.29 min), HP2 (8.37 min), HP3 (9.41 min), HP4 (11.02), HP5 (11.59 min), HP6 (14.32min), HP7 (18.39 min), HP8 (19.55 min), HP9 (21.41 min), and HP10 (20.31 min). All of the peptides were determined for antibacterial activity against *S. epidermidis* and *V. cholerae*. HP1 and HP9 showed antibacterial activity against *S. epidermidis* (Figure 28), HP3 and HP4 inhibit growth of *V. cholerae* (Figure 29). Peptides HP1, HP9, HP3, and HP4 were named Leucrocine I, Leucrocine II, Leucrocine III, and Leucrocine IV, respectively. In addition, Leucrocine I-IV was tested for antimicrobial activity to more species, *S. typhi* and *C. albicans*. The result showed that, *S. typhi* was weakly inhibited by Leucrocine I and II (Figure 30A); *C. albicans* was inhibited by peptide Leucrocine III (Figure 30B).

A further P1 fraction was chosen for assay antimicrobial activity because this fraction might be contained cationic antimicrobial molecules which are reported in animal leukocyte (Zasloff, 2002). In this study, P1 fraction was determined for antibacterial activity from proteins or peptides using zymogram refolding gel method. The proteins band MW around 14 kDa in P1 fraction exhibited antibacterial activity to *M. luteus* (Figure 21). To identify the protein band MW 14 kDa, the Western immunoblotting using anti hen egg white lysozyme antisera was done. The result showed that this protein band showed weak interaction with anti hen egg white lysozyme antibody (Figure 22).

3. Separation of the Components in P1 Fractions by 16.5% Tricine SDS-PAGE

To characterize the peptides in P1 fraction, the tricine SDS-PAGE was performed. The result showed that P1 fraction contained protein molecular weight ranging from 6.5 kDa to more than 45 kDa (Figure 23). However, the peptides or proteins band with molecular weight less than 6.5 kDa were not detected by this method. Further, to identify the antimicrobial peptide containing sample, P1 was purified by Superdex-30 prep gel filtration, which this gel filtration separated peptides according their size ranging from 1 to 10 kDa.

6. Minimal Inhibitory Concentration

The minimal inhibitory concentration of Leucrocine I, Leucrocine II, Leucrocine III and Leucrocine IV was shown in Table 11. Leucrocine II had the most potent activity against *Staphylococcus epidermidis* (0.66µg/ml), *Salmonella typhi* (0.66µg/ml), and *Vibrio cholerae* (2.88µg/ml). Leucrocine III (16.56µg/ml) had good activity against *V. cholerae*. Leucrocine IV showed strong antimicrobial activity against *S. epidermidis* (5.31µg/ml) more than other species test. However, Leucrocine III was less active against *S. epidermidis* and *S. typhi* (>156 µg/ml). Therefore, these MICs were chosen for further characterization antimicrobial properties.

7.1 The Killing Property (Microbicidal Activity) of Leucrocine I, II, III and IV

Killing property of the Leucrocine I-IV was determined by total plate count method. Leucrocine I and Leucrocine II were mixed with 1 ml of suspended of used bacterial cell. Then the reaction mixture was incubated for 2 h at 37 °C. After that,

each reaction was diluted by ten fold dilution. Bacterial cells 100 µl were pipetted onto nutrient agar plate and spread. Plates were incubated at 37 °C for 16-18 h. Colony was counted in each reaction. In negative control; PB buffer pH 7.4 supplement by 5 mM glucose was added instead of peptides. For Leucrocin III and IV, they were mixed with *V. cholerae* under the same conditions. Leucrocin I and II showed strong killing mechanism of bacteria *S. epidermidis* (Figure 31A) and weak killing mechanism with bacteria *S. typhi* (Figure 32A) by decreasing the colony of these bacteria. Leucrocin II decreased cells bacteria amount 10 fold when compared with negative control. Leucrocin III and IV mediated cells killing of *V. cholerae* (Figure 33A). The decreasing colonies of *V. cholerae* have 5 (Leucrocin III) and 6 fold (Leucrocin IV) when compared with negative control. Percentage survival of bacterial cells was decreased when treated by peptides (Figure 31B, 32B, 33B).

Toxicity with Human Red Blood Cells

Hemolytic assays have been used to assess the toxicity of peptides toward human red blood cell (HRBC) in vitro. The ability of Leucrocin I and II to disrupt HRBCs by incubation of 2% HRBCs (w/v) with these peptides for 30 min at room temperature resulted in increasing of optical density at 525 nm. The percentages of hemolytic human red blood cells are calculated from the optical density at 525 nm. Triton X-100 was used as positive control, calculated to be 100 % of hemolytic. The results showed that peptide Leucrocin I has percentage of hemolytic around 12.97, 10.74 and 15.88 at the concentration 12, 24 and 48 µg/ml, respectively; Leucrocin II showed percentage of hemolytic around 8.28, 11.63 and 91.73, at the concentration 3, 6 and 10 µg/ml, respectively (Figure 34). When the toxicity from Leucrocin I and II was compared, the results showed that Leucrocin II has higher toxicity with HRBCs, more than that of Leucrocin I (Figure 34). In addition, Leucrocin III and IV were assayed for the toxicity with HRBCs. The result indicated that peptide Leucrocin III and IV displayed none toxicity with HRBCs at the test concentration (Leucrocin III: 4, 8, 16 µg/ml; Leucrocin IV: 87, 175 µg/ml). However, the concentration of Leucrocin IV at amount of 346 µg/ml has been reported toxicity with HRBCs (Figure 35).

Scanning Electron Microscopy

The effects of Leucrocins I and II on the cell membranes of *S. epidermidis* and *S. typhi* were examined by scanning electron microscopy (SEM), to gain insight into the direct effects of Leucrocins I and II on the morphology of *S. epidermidis* and *S. typhi*. The result showed that, untreated bacteria for 1 and 2 h displayed a smooth bright surface with no apparent cellular debris (Figure 36A, 36B, 37A and 37B). In contrast, peptide-exposed cells exhibited a wide range of significant abnormalities. The cell surface of *S. epidermidis* was blebs formation by Leucrocins I and II (Figure 36C and 36E) and the collapsed of the cell structure (Figure 36D and 36E). In contrast, Leucrocins I and II included deep roughening of the *S. typhi* cell surface (Figure 37C and 37E) and collapsed of the cell structure (Figure 37D and 37F).

9. Membrane Permeabilization Assay

9.1 Outer Membrane Permeabilization Assay

In the present study, the ability to permeabilize the outer membrane of *S. typhi* and *V. cholerae* was determined by using NPN. NPN is a hydrophobic fluorescent probe that fluoresces weakly in aqueous environment and strongly when it enters a hydrophobic environment such as the interior of a membrane. Normally, NPN is excluded from gram-negative bacterial cells. At this stage, the maximum excitation wavelength is 315 nm, and the maximum emission wavelength is 400 nm, similar to the maxima observed with NPN added to aqueous solution (Figure 38). From three repeats experiment, the result demonstrated that, the polycationic antibiotic (streptomycin 20 µg/ml), Leucrocins I, II, III, and IV showed a rapid increase in fluorescence intensity, reaching a stable plateau after 7 min when compared with cell in buffer only and cell added NPN only. The increasing intensity of fluorescence is presented in *S. typhi* cell which treated by Leucrocins I and Leucrocins II (Figure 39). In addition, the increasing intensity of fluorescence is presented in intact *V. cholerae* cell. Leucrocins IV was able to disrupt the bacterial outer membrane better than the Leucrocins III and able to permeabilize the outer membrane, albeit at a higher rate than Leucrocins III, as indicated by the slower increase of fluorescence intensity (Figure 40).

9.2 Inner Membrane Permeabilization

Liposome encapsulated enzyme β -galactosidase was used to target of inner membrane. The result showed that Leucrocine I, II, III and IV showed ability to lyse the liposome lysis (Figure 41). After incubation for 10 min, the reaction was determined for activity of the inner β -galactosidase which will be leakage to the solution. Leucrocine II, III and IV showed the increasing of OD 415 nm, while for Leucrocine I the β -galactosidase could not be detected in conditions used.

Triton X-100 is used as positive control. The reaction of Triton X-100 showed more inner β -galactosidase activity than the reaction treated by peptides.

10 Amino acid composition

The amino acid compositions of Leucrocine I and II were shown in Table 12. Result indicated that the amino acid compositions were very different. Peptide Leucrocine I was particularly rich in isoleucine residues. The high nanomol of Gly (0.2450) and Glx (0.2457) presented in peptide Leucrocine II. Both of peptides contained both hydrophobic and cationic amino acid. However, amino acid compositions of Leucrocine III and IV could not be analyzed.

12. LC/MS/MS Analysis

Peptides Leucrocine I and II were analyzed for amino acid sequence by LC/MS/MS. The profile showed that peptide Leucrocine I contained precursor mass around 806.99 Da.(Figure 46 and 47). Leucrocine II had the precursor mass at 956.37 Da.(Figure 48 and 49). The amino acid sequence of these peptides was showed in Table 13. Amino acid sequence of Leucrocine I was NGVQPKY with the approximately mass of around 804.90 Da, pI 8.59. Amino acid sequence of Leucrocine II was presented as NAGS_LSGWG with the approximately mass of around 847.88 Da, pI 5.52. These amino acid sequences were not homolog with any antimicrobial peptide in database.

CONCLUSION AND DISCUSSION

Antimicrobial peptides have been isolated from a broad variety of phylogenetically diverse organisms (Ganz & Lehrer, 2001). These peptides can be segregated into a variety of classes based on their structures (Boman, 1995). These classes exhibited different mechanisms of antimicrobial action (Yeaman & Yount, 2003). However, all antimicrobial peptides have several factors in common. They all tend to be cationic in nature so that they are able to interact with the negatively charged phospholipids in the membranes of microbes. Leukocytes are one source of antimicrobial agents. They produce a variety of antimicrobial compounds. The spectrum of antimicrobial agents produced by leukocytes includes, but is not limited to, nitrous oxide, hydrogen peroxide, and antimicrobial cationic peptides (Ganz & Lehrer, 1999). These antimicrobial properties of leukocytes are important for innate immunity against infections that occur outside of the circulation. Broad-spectrum antimicrobial activities have been reported for peptides isolated from amphibian skin (Lorin et al., 2005), human leukocytes (Garcia et al., 2001), sheep and goat leukocytes (Shamova et al., 1999), rat leukocyte (Eisenhaver et al., 1989), rabbit leukocyte (Lehrer et al., 1975), guinea pig (Selsted & Harwig, 1987), bovine (Tydell et al., 2006), alligator leukocytes (Merchant et al., 2006) and etc.

The same as our result, Siamese leukocyte extracts exhibited antimicrobial activities against a wide variety of microbial species such as, *S. typhi*, *S. typhi* ATCC 5784, *Ps. aeruginosa*, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *V. cholerae*, *S. epidermidis* and *C. albicans*. These results coincided with the reported of Merchant et al. (2006), that alligator leukocyte extracts shown for antibacterial, antifungal, antiameba and antiviral activity. Mostly found antimicrobial peptides from vertebrate leukocyte contained basic amino acids in there structure. They showed net positive charge in these molecules. These antimicrobial peptides are classified into cationic antimicrobial agents (Yeaman & Yount, 2003), for example, defensin family, Indolicidin, Bac 5 (Zasloff, 2002). So, we hypothesized that the innate immunity system of reptile contained cationic antimicrobial agents. The antimicrobial agents in alligator are reported to cationic molecules (Merchant et al., 2006). Thus, we used anion exchange column chromatography to purify antimicrobial substance in the Siamese leukocyte. Four proteins fractions are separated according to their anion charge. We predicted that cationic proteins or peptides are contained in P1 fraction.

These results agree with the result of antimicrobial activity which showed strong and broad spectrum for P1.

To identify that, P1 containing antimicrobial proteins or peptides, Zymogram refolding gel method was performed. The antimicrobial activity was detected on gel by the clearing zone around the protein bands. The P1 showed clearing zone presented proteins at MW around 23 and 14 kDa. These clearing zones also found in leukocyte extracts. From our knowledge, proteins at MW around 23 kDa which showed antimicrobial peptides never reported before. However protein MW 14 kDa a several reported has been reported (Blake et al., 1965) that it displayed antibacterial activity, such lysozyme. Western immuno blotting was used to determine lysozyme proteins from leukocyte extracts and P1 fraction. The result showed that protein MW 14 kDa showed weak interaction with anti hen egg white lysozyme. This protein is called lysozyme like activity (Pata et al., 2007). The result indicated that one of antimicrobial activity in crude leukocyte extracts from proteins MW 23 and 14 kDa. P1 fraction showed antimicrobial activity of protein MW 14 kDa. To identify the peptides in P1 fraction, the tricine SDS-PAGE was performed. The result showed that, P1 fraction contained protein molecular weight ranging from 6.5 kDa to more than 45 kDa but the peptides or proteins band with molecular weight less than 6.5 kDa were not detected by this method. Further, to identify the antimicrobial peptide containing sample, P1 was purified by Superdex-30 prep gel filtration. The cationic proteins and peptides fraction showed broad spectrum antibacterial activity against *S. epidermidis*, *V. cholerae*,

S. typhi and *C. albican* that leukocyte of crocodile containing both of antimicrobial protein and peptides. This result the same as antimicrobial activity of mammalian leukocyte, for example, bovine leukocyte which found antimicrobial proteins such as PGRPs (Tydell et al., 2006) and defensin peptide (Selsted et al., 1993). Next, cationic peptides were purified by C18 reverse phase HPLC. Peptides were separated by hydrophobic properties. HP1, HP3, HP4 and HP9 showed antibacterial activity against *S. epidermidis* while *V. cholerae*. These active peptides HP1, HP9, HP3 and HP4 were named Leucrocine I, II, III and IV, respectively. The Leucrocine I and Leucrocine II had the most potent activity against *S. epidermidis* (25 µg/ml, 0.66µg/ml, respectively), *S. typhi* (25 µg/ml, 0.66µg/ml, respectively), and *V. cholerae*

(0.156, 2.88µg/ml, respectively). Leucrocins III and IV have strong effects to *S. epidermidis* at the MIC around 5.31µg/ml and *V. cholerae* 16.56 and 10.50 µg/ml, respectively. The killing properties of these peptides are measured by total plate count method. The number of CFU was decreased by these peptides which revealed the presence of dead cells under these conditions. Leucrocins II showed the killing property than Leucrocins I, Leucrocins IV showed higher killing property with *V. cholerae* than Leucrocins III. This property is similar to cationic antimicrobial peptides in mammalian leukocyte, for example, temporin L (Mangoni et al., 2004), Indolicidin (Falla et al., 1996), rat defensin (Yenugu et al., 2006). Leucrocins were assayed toxicity with human red blood cell. The result showed that Leucrocins were friendly to HRBCs in the concentration equally to MIC. However, Leucrocins II and IV showed toxicity to HRBCs when the concentration of peptide is increased.

Next, mode of action antimicrobial peptides was studied by scanning electron microscopy. The direct effect of Leucrocins I, II, III and IV on the morphology of *S. epidermidis* and *S. typhi* (Leucrocins I and II) and *V. cholerae* (Leucrocins III and IV) was examined. In this study, the concentrations of Leucrocins I-IV were used at sub lethal and killing for different stain. The leucrocins causes a remarkable modification of their cell shape, as shown by SEM. Untreated bacteria displayed a rough bright surface, typical of their strains, with no apparent cellular debris. In contrast, peptide-exposed cells exhibited a wide range of significant abnormalities. The cell surface of *S. epidermidis* was blebs formations after mixed with peptide Leucrocins I and II for 1 h. Although occurring rarely, lysed bacteria were also observed after mixed with peptide Leucrocins I and II for 2 h. In addition, *S. typhi* cell surface was abnormally from control when mixed with peptide Leucrocins I and II, the cell was shriveled and then collapsed. The activity of Leucrocins I and II on Gram negative bacteria is similarity with antimicrobial activity of Temporin-L on *E. coli* cells (Mangoni et al., 2004) and serum of Siamese crocodile on *S. typhi* cells (Preecharam et al., 2008). Cell shape of these bacteria is shriveled and then collapsed when the time enhances went. While Gram positive bacteria was made the blebs formations on cell surface and then collapsed when the time enhances tall went, this action is similarity with Magainin 2, (Park et al., 2000), SMAP29 and CAP18 (Kalfa et al., 2001). These results indicated

that Leucrocins had the active target sites at the cell surface, this activity also showed time dependent for binding, disruption and killing microorganism.

The next experiment, we also examined the effect of Leucrocin I, II, III and IV on the integrity of the outer membrane's Gram negative bacteria by monitoring the increasing of the NPN fluorescence probe. *S.typhi* was used for the experiment of Leucrocin I and II; *V. cholerae* is used for Leucrocin III and IV. NPN is a hydrophobic fluorescence probe which shows weak fluorescence in hydrophilic environment, but expresses the strong fluorescence in hydrophobic environment such as interior outer membrane. The increase of NPN fluorescence probe indicated that Leucrocin I, II, III and IV had permeability of outer membrane of the intact of the cells test. This result is similarity with cationic antimicrobial peptides; SMAP-29 (Kalfa et al., 2001), Indolicidin (Falla et al., 1996), Temporin-L (Mangoni et al., 2004).

Further, the mimic cytoplasmic membrane, encapsulated β -galactosidase enzyme in liposome was used to determine the leakage of inner membrane by these peptides. The activity of enzyme β -galactosidase was measured by the absorbance of o-nitrophenol at 415 nm. The loss of liposome membrane integrity has been followed by the increase of o-nitrophenol. The result indicated that Leucrocin II, III and IV could disrupt liposome membrane. However for Leucrocin I, the activity of β -galactosidase could not detected by this condition. This result may be due to low concentration of Leucrocin I. We confirmed the evidence of the effectors Leucrocin on inner membrane by bacteriocidal effects. Peptide can damage bacterial cell via membrane target site, which intracellular nucleotides are found in reactions. The reaction was monitored by detection absorbance at 260 nm. The intracellular nucleotides were found in all reaction which incubated with Leucrocins for 1 h. These results indicated that Leucrocin I, II, III and IV could damage bacterial cell (*S. epidermidis*) via membrane target site. This result is similarity with the study of Wang (2003), the antimicrobial protein in porcine leukocyte can kill *S. aureus* and *E. coli* cells which increasing activity is time dependent. Talking all data into account, we believed that Leucrocin kill bacteria all by perturb the permeabilization membrane of cell bacteria.

To obtain the structural information of Leucrocin I and II, the amino acid compositions and sequence were analyzed. From the result, the amino acid composition profile of Leucrocin I and II revealed high amount of free amino acid. Leucrocin I and II showed different amino acid components. Leucrocin I was particularly rich in isoleucine residues. For Leucrocin II high nanomol of Gly (0.2450) and Glx (0.2457) were obtained. Both of peptides contain both hydrophobic and cationic amino acids. Amino acid sequence of Leucrocin I and II were analyzed by LC/MS/MS. Amino acid sequence of Leucrocin I is NGVQPKY, with the approximate mass of around 804.90 Da, pI 8.59. The secondary structure of Leucrocin I was predicted by Gor IV Secondary Structure Prediction Method. The results showed that secondary structure of Leucrocin I (Figure 49).is extended strand (28.57%), random coil (71.43%) Amino acid sequence of Leucrocin II (Figure 50) was presented NAGS_LSGWG (Mass 847.88, pI 5.52). The secondary structure showed extended strand (44.44%), random coil (55.56%). From this result, both of peptides can adopt the helix structure. This structure is important for the binding with cell surface of bacteria. From reported of Brogden (2005), first cationic antimicrobial peptides bind with LPS or LTA on bacterial cells by using the ionic interaction (ion binding), after that they formed their structure to disrupt and permeabilizations membrane of cell bacteria. However, Leucrocins were analyzed the N-terminal sequence by Automate Edman degradation, unfortunately no signal was detected by this method. This result may be the low concentration of these peptides or N-terminal of these peptides is blocking or modification.

For the conclusion, Siamese crocodile leukocyte containing antimicrobial proteins and peptides shows broad spectrum antibacterial activity. These peptides are cationic antimicrobial peptides which action on the membrane target site of microorganism cells. They have the killing property and friendly with HRBCs. In their structures (Leucrocin I and II) showed both of the sequence to have the positively charge on their structure, and are not homolog with any antimicrobial peptides in data base searching. These results indicate that Leucrocin I and II are novel antimicrobial peptides. This study is the first report of antimicrobial peptides in leukocyte of Siamese crocodile.

Acknowledgment

This work was supported financially by Thailand Research Fund, Agricultural Biotechnology for sustainable economy research center, Protein and Proteomics research Group Khon Kaen University. Khon Kaen Thailand.

Reference

REFERENCES

- Anderson, R. C., & Yu, P. L. (2003). Isolation and characterisation of proline/arginine-rich cathelicidin peptides from ovine neutrophils. **Biochem Biophys Res Com**, **312**, 1139–1146.
- Beccerra, F. M., Silva, D. A., Ramirez, L. D., Hernandez, G. M., Vidal, Y. L., Soldevila, G., & Zepeda, E. A. G. (2007). Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine derived peptide (CDAP-4) on *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochem Biophys Res Com**, **355**, 352-358.
- Bechinger, B. (1999). The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochem Biophys Acta**, **1462** (1-2), 157-183.
- Beck, G., & Habicht, G. S. (1996). Immunity and the invertebrates. **Scientific American**, 60-61.
- Bensch, K. W., Raida, M., Maegert, H. J., Schulz-Knappe, P., & Forssmann, W. G. (1995). HBD-1: a novel b-defensin from human plasma. **FEBS Lett**, **368**, 331–335.
- Blanke, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., & Serma, V. R. (1965). Structure of hen egg white lysozyme; A three dimensional Fourier synthesis at 2 Å⁰ resolution. **Nature**, **206**, 757-761.
- Boman, H. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annu. Rev. Immunol**, **13**, 61–92.

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. **Anal biochem**, **72**, 248–254.
- Britton, A., Diamond, G., Laube, D., & Kaiser, V. (2002). **Antimicrobial activity in the blood of the saltwater crocodile. Identification of serum complements activity in the American alligator.** In: Crocodiles. Proceedings of the 16th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge UK.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. **Nat rev microbio**, **3**(3), 238-250.
- _____, Ackermann, M., & Huttner, K. M. (1998). Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. **Infect Immunol**, **66** (12), 5948-5954.
- _____, Ackermann, M. R., McCray, P. B. Jr., & Huttner, K. M. (1999). Differences in the concentrations of small, anionic, antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid and in respiratory epithelia of patients with and without cystic fibrosis. **Infect Immunol**, **67** (8), 4256-4259.
- _____, De Lucca, A. J., Bland, J., & Elliott, S. (1996). Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, **93** (1), 412-416.
- Campbell, T. W. (1996). **Clinical Pathology; In reptile medicine and surgery**, Saunders, Philadelphia, P, 248-257.
- Canfield, R. E. (1963). The amino acid sequence of egg white lysozyme. **J Biol Chem**, **238**, 2698-2707.
- Cantor, R. S. (2002). Size distribution of barrel-stave aggregates of membrane peptides of the influence bilayer lateral pressure profile. **Biophys. J**, **82**, 2520–2552.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. **EMBO J**, **8** (8), 2387-2391.
- Charles, H., & Phillippe, B. (1997). Strategies for the Isolation and Characterization of Antimicrobial Peptides of Invertebrates. In W. M. Shafer (Ed.), **Antimicrobial peptide Protocols** (pp. 35-49). New Jersey: Humana Press.

- Cox, J. H., Frazier, R. S., & Maturbongs, R. A. (1993). Freshwater crocodiles of Kalimantan (Indonesian Borneo). **Copeia**, 564–566.
- Daher, K., Lehrer, R. I., Ganz, T., & Kronenberg, M. (1988). Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **85**, 7327–7331.
- Diamond, G., Jones, D. E., & Bevins, C. L. (1993). Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **90**, 4596–4600.
- Ehrenstein, G., & Lecar, H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. **Q. Rev. Biophys.**, **10**, 1–34.
- Eisenhaver, P. B., Harwog, S. S. L., Szklarek, D., Ganz, T., Selsted, M. E., & Lehrer, R. I. (1989). Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. **Infect. Immun.**, **57**, 2021–2027.
- Elsbach, P. (1998). The bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. **J Leukocyte Biol.**, **64**, 14–18.
- Falla, T. J., Karunaratne, D. N., & Hancocks, R. E. W. (1996). Mode of action of the antimicrobial peptide Indolicidin. **J Biol Chem.**, **271**, 19298–19303.
- Ganz, T., & Lehrer, R. I. (1995). Defensins. **Pharmacology and Therapeutics**, **66**, 191–205.
- _____, T. (2003). The role of antimicrobial peptides in innate immunity. **In Comp Biol.**, **43**, 300–304.
- _____, T., Rayner, J. R., Valore, E. V., Tumolo, A., Talmadge, K., & Fuller, F. (1989). The structure of rabbit macrophage defensin genes and their organ specific expression. **J. Immunol.**, **143**, 1358–1365.
- Garcia, J., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F., Kluver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., & Forssmann, W. (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. **FASEB J.**, **10**, 1819–1821.
- Gennaro, R., & Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. **Biopolymers**, **55** (1), 31–49.
- Girons, M. C. S. (1970). **Morphology of the circulating blood cells.** Biological the

- Grutter, M. G., Weaver, L. H., & Matthews, B. W. (1983). Goose lysozyme structure an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozyme? **Nature**, **303**, 828-831.
- Gudmundsson, G. H., & Agerberth, B. (1999). Neutrophil antimicrobial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. **Immunol methods**, **232**, 45-54.
- Hancock, R. E. (1997). Peptide antibiotics. **Lancet**, **349** (9049), 418-422.
- _____. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infect Dis**, **1** (3), 156-164.
- Hancock, R. E. (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. **Lancet Infect Dis**, **5** (4), 209-218.
- Hardt, M., Guo, Y., Henderson, G., & Laine, R. A. (2003). Zymogram with Remazol Brilliant Blue-labeled Micrococcus Lysodeikticus Cells for the Detection of Lysozymes: Example of a New Lysozyme Activity in Formosan Termite Defense Secretions. **Anal Biochem**, **312**(1), 73-76.
- He, K., Ludtke, S. J., Huang, H. W., & Worcester, D. L. (1995). Antimicrobial peptide pores in membranes detected by neutron in-plane scattering. **Biochemistry**, **34**, 15614-15618
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of Drosophila. **Nature**, **426**, 33-38.
- Huchzermeyer, F. W. (2003). **Crocodiles: biology, husbandry and diseases**. New York: CABI Pub.
- Inoye, M., Imada, M., & Tsugita, A. (1970). The amino acid sequence of T4 phage lysozyme IV. Diluted acid hydrolysis and order of tryptic peptides. **J Biol Chem**, **245**, 3479-3484.
- Isaacs, N. W., Mqachin, K. J., & Masakuni, M. (1985). Three dimensional structure of goose-type lysozyme from the egg white of the Australian black swan (*Cyguos atratus*) **Aust. J Biol Sci**, **38**, 13-22.
- Jacobson, E. (1984). Immobilization, blood sampling, necropsy techniques and diseases of crocodilians. **Rew. J. Zoo Anim Med**, **15**, 38-45.
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. **Annu Re Immunol**, **20**, 197-216.

- Jolles, J., Jauregui, A. J., Bernier, I., & Jolles, P. (1963). La structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule: etude detailee. **Biochem Biophys Acta**, **78**, 668-689.
- Kalfa, V. C., Jia, H. P., Kunkle, R. A., McCray Jr, P. B., Tack, B. F., & Brogden, K. A. (2001). Congeners of SMAP29 kill ovine pathogens and induce ultrastructural damage in bacterial cells. **Antimicrob. Agents Chemother**, **45**, 3256–3261.
- Kanchanapangka, S., Youngprapakorn, P., Pipatpanukul, K., Krobpan, S., & Kongthaworn, N. (1999). **Differentiation of crocodilian granulocytes using histochemical techniques**. Proceeding of the 4th Symposium on Diseases in Asian Aquacultures Cebu City (Philippines), p 43.
- Kang, D., Liu, G., Lundstrom, A., Gelius, E., & Steiner, H. (1998). A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. **Proc. Natl.Acad. Sci. U. S. A.**, **95**, 10078–10082.
- Kappeler, S. R., Heuberger, C., Farah, Z., & Puhan, Z. (2004). Expression of the peptidoglycan recognition protein, PGRP, in the lactating mammary gland. **J. Dairy Sci**, **87**, 2660–2668.
- Ladokhin, A. S., & White, S. H. (2001). 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. **Biochem. Biophys. Acta**, **1514**, 253–260.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Woo, G. K., Fung, A. M., Wong, M. K., Chan, K. M. & et al. (2004). *Eggerthella hongkongensis* sp. nov and *eggerthella sinensis* sp. nov., two novel *Eggerthella* species, account for half of the cases of *Eggerthella* bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, **49** (4), 255-263.
- Lee, M. T., Chen, F. Y., & Huang, H. W. (2004). Energetic of pore formation induced by membrane active peptides. **Biochem J**, **43**, 3590–3599.
- Leem, J. Y., Jeong, I. J., Park, K. T., & Park, H. Y. (1999). Isolation of p-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki* S. **FEBS Lett**, **442** (1), 53-56.
- _____, Nishimura, C., Kurata, S., Shimada, I., Kobayashi, A., & Natori, S. (1996). Purification and characterization of N-β-alanyl-5-S-glutathionyl-3, 4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). **J Biol Chem**, **271** (23), 13573-13577.

- Lehrer, R. I., Ladra, K. M., & Hake, R. B. (1975). Nonoxidative fungicidal mechanisms of mammalian granulocytes: demonstration of components with candidacidal activity in human, rabbit, and guinea pig granulocytes. **Infect. Immunol**, **11**, 1226–1234.
- _____, Liehtenstein, A. K., & Ganz, T. (1993). Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of Mammalian cells. **Annu. Rev. Immunol**, **11**, 105-128.
- Levy, O., Ooi, C. E., Weiss, J., Lehrer, R. I., & Elsbanch, P. (1994). Individual and synergistic effects of rabbit granulocyte proteins on *E. coli*. **Clinic Invest**, **94**, 672-682.
- Liu, C., Gelius, E., Liu, G., Steiner, H., & Dziarski, R. (2000). Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. **J. Biol. Chem**, **275**, 24490–24499.
- _____, Xu, Z., Gupta, D., & Dziarski, R. (2001). Peptidoglycan recognition proteins; a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. **J. Biol. Chem**, **276**, 34686–34694.
- Loh, B., Grant, C., & Hancock, R. E. W. (1984). Use of the Fluorescent Probe 1-N-Phenyl-naphthylamine to Study the Interactions of Aminoglycoside Antibiotics with the Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemo**, **26**, 546-551.
- Lorin, C., Saidi, H., Belaid, A., Zairi, A., Baleux, F., Hocini, H., & et al. (2005). The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology**, **334** (2), 264–275.
- Ludtke, S. J. (1996). Membrane pores induced by magainin. **Biochem J**, **35**, 13723–13728
- Mader, D. R. (2006). **Reptile medicine and surgery**. 2nd ed. C. Grans and T.S. parsons (eds). 3, 73-91.
- Mak, P., Wojcik, K., Thogersen, I. B., & Dubin, A. (1996). Isolation, antimicrobial activities, and primary structures of hamster neutrophil defensins. **Infect. Immunol**, **64**, 4444–4449.

- Mallow, E. B., Harris, A., Salzman, N., Russell, J. P., DeBernardinis, R. J., Ruchelli, E., & Bevins, C. L. (1996). Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. **J. Biol. Chem**, **271**, 4038–4045.
- Mangoni, M. L., Papo, N., Barra, D., Simmaco, M., Bozzi, A., Giuliardi, A., & Rinaldi, A. C. (2004). Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. **Biochem J**, **380**, 859–865.
- Mateo, M. R., Roberts, E. D., & Enright, F. M. (1984). Morphologic cytochemical and functional studies of peripheral blood cell of young healthy American alligator (*Alligator mississippiensis*). **J Vet Res**, **45**, 1046-1053.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., & Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. **Biochem J**, **35**, 11361–11368.
- Matthews, B. W., & Remington, S. J. (1974). The three dimensional structure of the lysozyme from bacteriophage T4. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, **71**, 4178-4182
- Merchant, M. E., Leger N., Jerkins E., Mills K., Pallansch B. M., Paulman L. R., & Ptak G. R. (2006). Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Vet. Immunol Immunopathol**, **110** , 221–228.
- _____, Pallansch, M., Paulman, R. L., Wells, J. B., Nalca, A., & Ptak, R. (2005a). Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Antiviral Res**, **66** (1), 35-38.
- _____, Roche, C., Elsey, R. M., & Prudhomme, J. (2003). Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, **136** (3), 505-513.
- _____, Roche, C. M., Thibodeaux, D., & Elsey, R. M. (2005b). Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, **141** (3), 281-288.
- Meylaers, K., Cerstiaens, A., Vierstraete, E., Baggerman, G., Michiels, C.W., De Loof, A. & et al. (2003). Antimicrobial compounds of low molecular mass are

- constitutively present in insects: characterisation of beta-alanyl-tyrosine. **Curr Pharm Des**, **9** (2), 159-174.
- MJCR/MBMB 403: ([n.d.]). **Bacteria cell components**. Medical microbiology southern Jllinois University Carbondale General microbiology, Retrieved October 3, 2007, from <http://www.cehs.siu.edu/fix/medmicro/pix/walls.gif>
- Michaelson, D., Rayner, J., Couto, M., Valore, E. V., & Ganz, T. (1992). Cationic defensins arise from charge-neutralized propetides: a potential mechanism for avoiding leukocyte autocytoxicity. **J. Leukoc. Biol**, **51**, 634–639.
- Mussart, N. B., Barboza, N. N., Fioranelli, S. A., Koza, G. A., Prado, W. S., & Coppo, J. A. (2006). Age, sex, year season and handling system modify the leukocytal parameters from captive *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodilia: Alligatoridae). **Rev Vet**, **17**(1), 3-10.
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S. & et al.(1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. **J Biol Chem**, **263** (32), 16709-16713.
- Neu, C. H. (1992). The crisis in antibiotic resistance. **Science**, **257**, 1064-1073.
- Oliveira, L. W., Moura, W. L., Matushima, E. R., & Egami, M. I. (1998). Morphological and electronic cytochemistry observation in eosinophil in caiman *crocodylus yacare*. **Rev Chil Anat**, **16**, 245-254.
- Olson G., Hessler, J., & Faith, R. (1977). Technics for the blood collection and intravascular Infusion of reptiles. Lab. **J Animal Sci**; **25**, 783–786.
- Oren, Z., & Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, **47**, 451–463
- _____, & Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, **47** (6), 451-463.
- _____, Hong, J., & Shai, Y. (1999a). A comparative study on the structure and function of a cytolytic alpha-helical peptide and its antimicrobial beta-sheet diastereomer. **Eur J Biochem**, **259** (1-2), 360-369.

- _____, Lerman, J. C., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., & Shai, Y. (1999b). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. **Biochem J**, **341** (Pt3), 501-513.
- Ouellette, A. J., Greco, R. M., James, M., Frederick, D., Naftilan, J., & Fallon, J. T. (1989). Developmental regulation of cryptidin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. **J. Cell Biol**, **108**, 1687–1695.
- Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., & Kim, S. C. (2000). Structure–activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, **97**, 8245–8250
- Pata, S., Daduang, S., Svasti, J., & Thammasirirak, S. (2007). Isolation of lysozyme like protein from crocodile leukocyte extracts (*Crocodylus siamensis*). **KMITL Sci. Tech. J**, **7** (S1), 70-85.
- Pellegrini, A. Waiblinger, S., & Fellenberg, R. V. (1991). Purification of equine neutrophil lysozyme and its antibacterial activity against Gram positive and Gram negative bacteria. **Vet Res Com**, **15**, 427-435.
- Platt, S. G., Sovannara, H., Kheng, L., Stuart, B. L., & Walston, J. (2006). *Crocodylus siamensis* along the Sreambel river, southern Cambodia; Habitat, Nesting and Conservation. **Herpeto Nat His**, **9**(2), 183-188.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., & Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. **Biochem J**, **31**, 12416–12423.
- Preecharam, S., Daduang, S., Bunyatratchata, W., Araki, T., & Thammasirirak, S. (2008). Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. **African Journal of Biotechnology**. **7** (16), 3121-3128
- Qu, X. D., Lloyd, K. C., Walsh, J. H., & Lehrer, R. I. (1996). Secretion of type II phospholipase A2 and cryptidin by rat small intestinal Paneth cells. **Infect. Immun**, **64**, 5161–5165.
- Raj, P. A., Karunakaran, T., & Sukumaran, D. K. (2000). Synthesis, microbicidal activity, and solution structure of the dodecapeptide from bovine neutrophils. **Biopol**, **53**, 281–292.

- Rehman, A., Taishi, P., Fang, J., Majde, J. A., & Krueger, J. M. (2001). The cloning of a rat peptidoglycan recognition protein (PGRP) and its induction in brain by sleep deprivation. **Cytokine**, **13**, 8–17.
- Risso, A. (2000). Leukocyte antimicrobial peptide: multifunctional effector molecules of innate immunity. **J Leukoc Biol**, **68**, 785-792.
- Ross, J. P. (1998). **Crocodiles, status, survey and conservation**. Action plan IUCN. Publications, Gland, Switzerland.
- Sakulwira, K., Khomklew, W., Vethchagarun, S., & Pothiwong, W. (2004). The structure of red blood cells, white blood cells and thombocytes in Freswater crocodiles (*Crocodylus siamensis*). **Thai Vet Med**, **34**(1), 84-90.
- Schagger, H., & Jagow, V. G. (1987). Tricine sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 kDa to 100 kDa. **Anal and Biochem**, **166**, 368–379.
- Schonwetter, B. S., Stolzenberg, E. D., & Zasloff, M. A. (1995). Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. **Sci**, **267**, 1645–1648.
- Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., Harwig, S. S. L., & Lehrer, R. I. (1984). Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. **J Biol Chem**, **260**, 4579–4584.
- _____, & Harwig, S. S. L. (1987). Purification, primary structure and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin. **Infect. Immunol**, **55**, 2181–2186.
- _____, Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y.Q., Smith, W., & Cullor, J. S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. **J Biol Chem**, **267**, 4292–4295.
- _____, Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W. Henschen, A. H., & Cullor, J. S. (1993). Purification, primary structures and antimicrobial activities of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. **Biol Chem**, **268** (9), 6641-6648.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alphahelical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochem Biophys Acta**, **1462**, 55–70.
- Shamova, O., Brogden, K., Zhao, C., Nguyen, T., Kokryakov, V., & Lehrer, R.I.

- (1999). Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. **Infect.Immunol**, **67** (8), 4106–4111.
- Simpson, R. J., & Morgan, F. J. (1983). Complete amino acid sequence of embden goose (*Anwer anwer*) egg white lysozyme. **Biochem Biopys Acta**, **744**, 349-351.
- Singh, P. K., Jia, H. P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B. A., & et al. (1998). Production of beta-defensins by human airway epithelia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, **95**, 14961–14966.
- Sirisanglert, S. ([n.d.]). **Immunology and chemical in immune system**. Retrieved October 3, 2007, from <http://www.gpo.or.th/rdi/html/immunesystem.html>.
- Spaar, A., Munster, C., & Salditt, T. (2004). Conformation of peptides in lipid membranes studied by X-ray grazing incidence scattering. **Biophys. J**, **87**, 396–407
- Tang, Y., Yuan, J, Miller, C. J., & Selsted, M. E. (1999). Isolation, characterization, cDNA cloning, and antimicrobial properties of two distinct subfamilies of alpha-defensins from rhesus macaque leukocytes. **Infect. Immunol**, **67**, 6139–6144.
- Teuber, M., & Bader, J. (1976). Action of polymyxin B on bacterial membranes. Binding capacities for polymyxin B of inner and outer membranes isolated from *Salmonella typhimurium* G30. **Arch Microbiol**, **109** (1-2), 51-58.
- Tossi, A., Sandri, L., & Giangaspero, A. (2000). Amphiphatic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymer**, **55**, 4-30.
- Towbin, H., Au, J., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, **76**(9), 4350-4354.
- Treffers, C., Chen, L., Anderson, C. R. & Yu, L. P. (2005). Isolation and characterization of antimicrobial peptides from deer neutrophils. **Antimicrobial Agents**, **26**, 165-169.
- Tydell, C. C., Yuan, J., Tran, P. & Selsted, M. E. (2006). Bovine peptidoglycan recognition protein-S: Antimicrobial activity, localization, secretion and binding properties. **Immunol**, **176**, 1154-1162.
- Wang, F. S. (2003). Effects of antimicrobial proteins from porcine leukocyte on *S. taphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in comminuted meats. **Meat Sci**, **65**, 616-621

- Westerhoff, H. V., Zasloff, M., Rosner, J. L., Hendler, R. W., Wal, D. A., Gomes, & et al. (1995). Functional synergism of Magainins, PGLa and Magainin-2 in *E. coli*, Tumor cell and liposome. **Biochem J**, **228**, 257-264.
- Wikipedia. ([n.d.]). **Human Red Blood cells**. Retrieved June 26, 2008, from <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Siamcroc.JPG>
- Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R. I., & Hong, M. (2002). Solid-state NMR investigations of peptide–lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, protegrin. **Biochem J**, **41**, 9852–9862.
- Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., & Huang, H. W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophys J**, **81** (3), 1475-1485.
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanism of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol Rev**, **55**(1), 27-55.
- Yenugu, S., Chintalgattu, V., Wingard, C. J., Radhakrishnan, Y. French. S., & Hall, S.H. (2006). Identification, cloning and functional characterization of novel beta-defensins in the rat (*Rattus norvegicus*). **Reprod Biol Endocrinol**, **4**, 1-9
- Yoshida, H., Kinoshita, K., & Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*.. **Biol Chem**. **271**, 13854–13860.
- Zanetti, M. (2004). Cathelicidins; multifunctional peptides of the innate immunity. **Leuko Biol**, **15**, 39-48.
- _____, Litteri, L., Gennaro, R., Horstmann, H., & Romeo, D. (1990). Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils are generated from precursors molecules stored in the large granules. **J. Cell Biol**, **111**, 1363–1371.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, **415**, 389-395.
- Zhu, W. L., Song, Y. M., Park, Y., Park, K. H., Yang, S. T., Kim, J. I. & et al. (2007). Substitution of the leucine zipper sequence in melittin with peptoid residues affects self-association, cell selectivity, and mode of action. **Biochem Biophys Acta**, **1768** (6), 1506-1517.
- Zippel, K., Lillywhite, H., & Mladnich C. (2003). Anatomy of the crocodilian spinal vein. **J. Morphol**, **258**, 327–335.

ZOOTHAILAND. (2004). **Siamese crocodile**. Retrieved October 3, 2007, from [http://www. Zoothailand.org/animals/images/373_001.jpg](http://www.Zoothailand.org/animals/images/373_001.jpg).

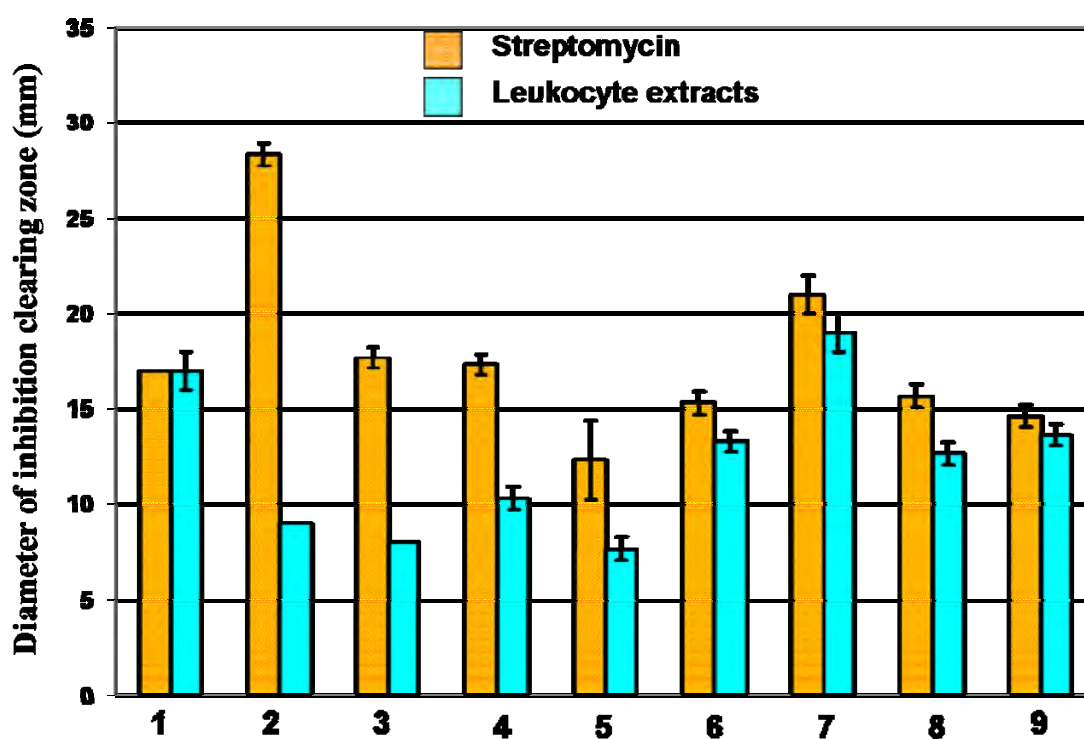
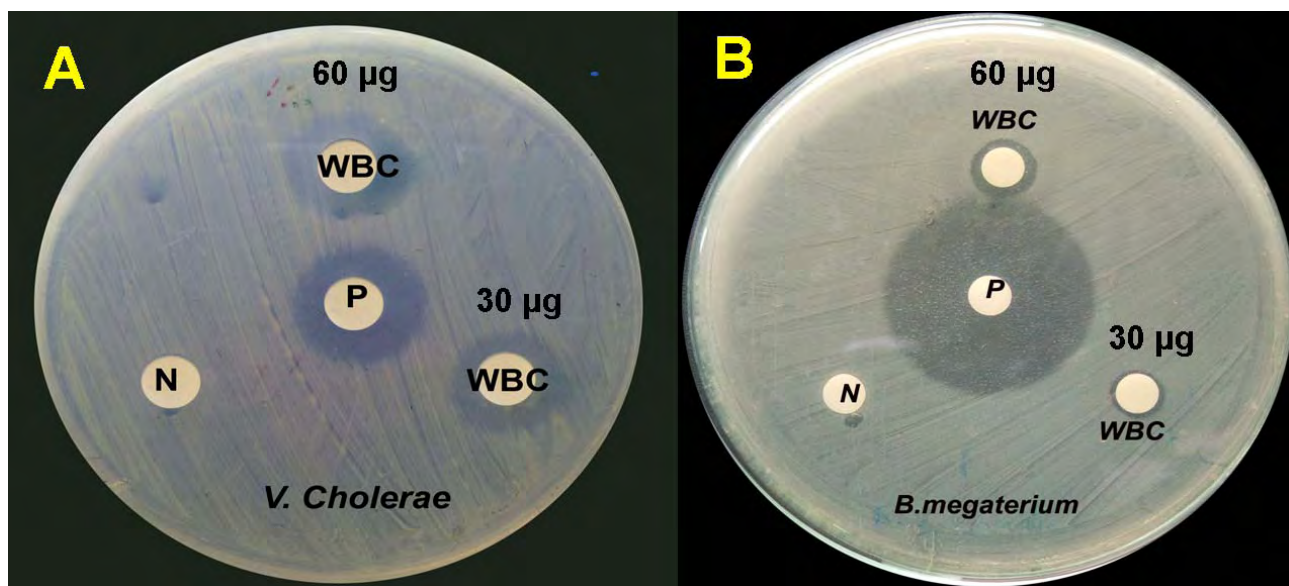


Figure 15 Antimicrobial activities of crocodile leukocyte extract. Crocodile leukocyte extract were tested for antimicrobial activities as described in Method 6 and the zones of inhibition for each bacterial species were plotted.

1 = *Staphylococcus epidermidis*,

2 = *Bacillus megaterium*,

3 = *B. licheniformis*,

4 = *Pseudomonas. aeruginosa*,

5 = *Ps. aeruginosa* ATCC 27853,

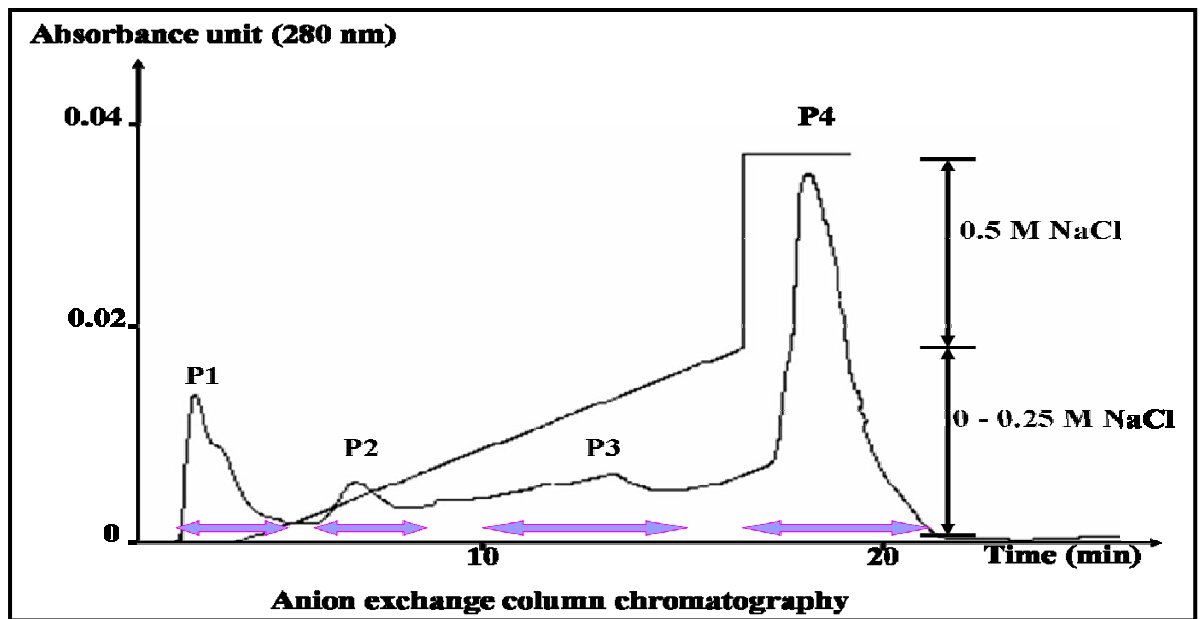
6 = *Salmonella typhi*,

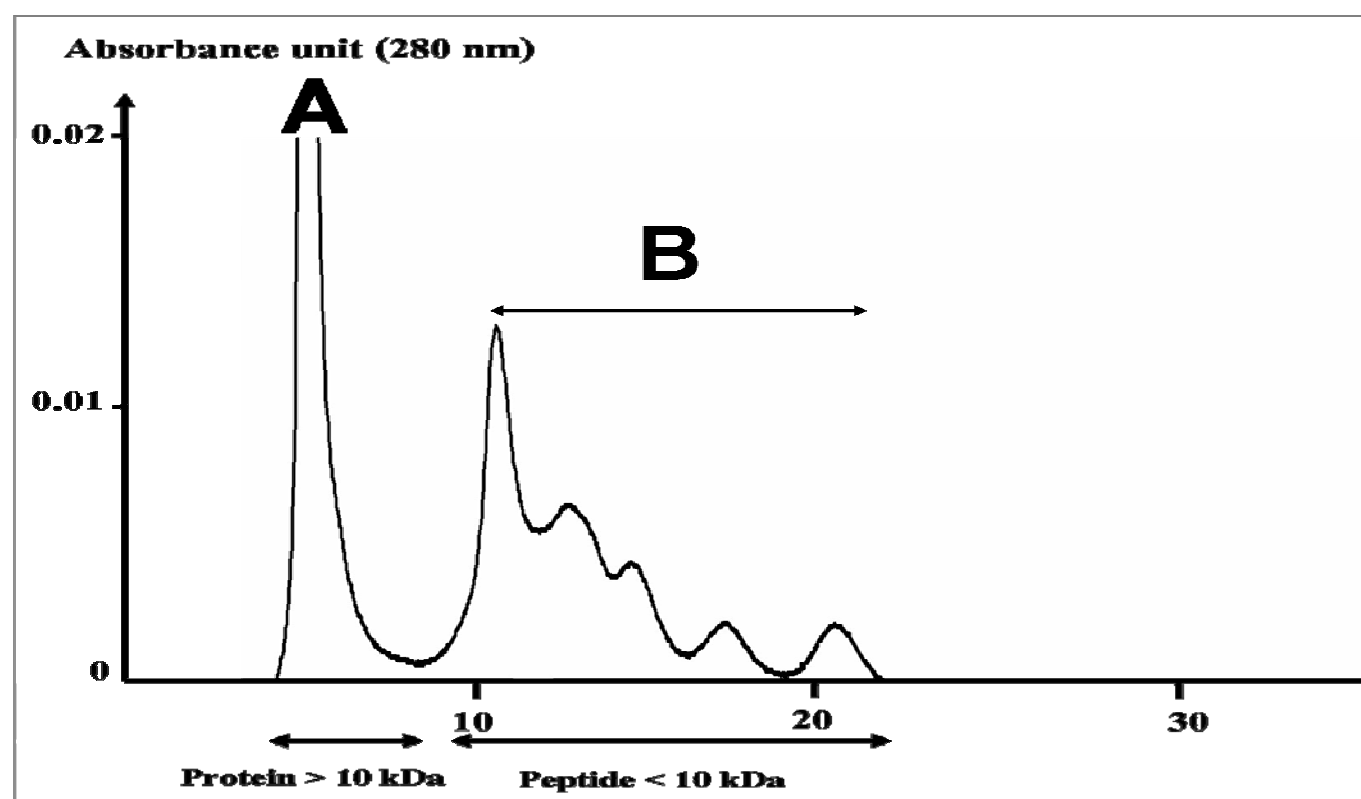
7 = *Vibrio cholerae*,

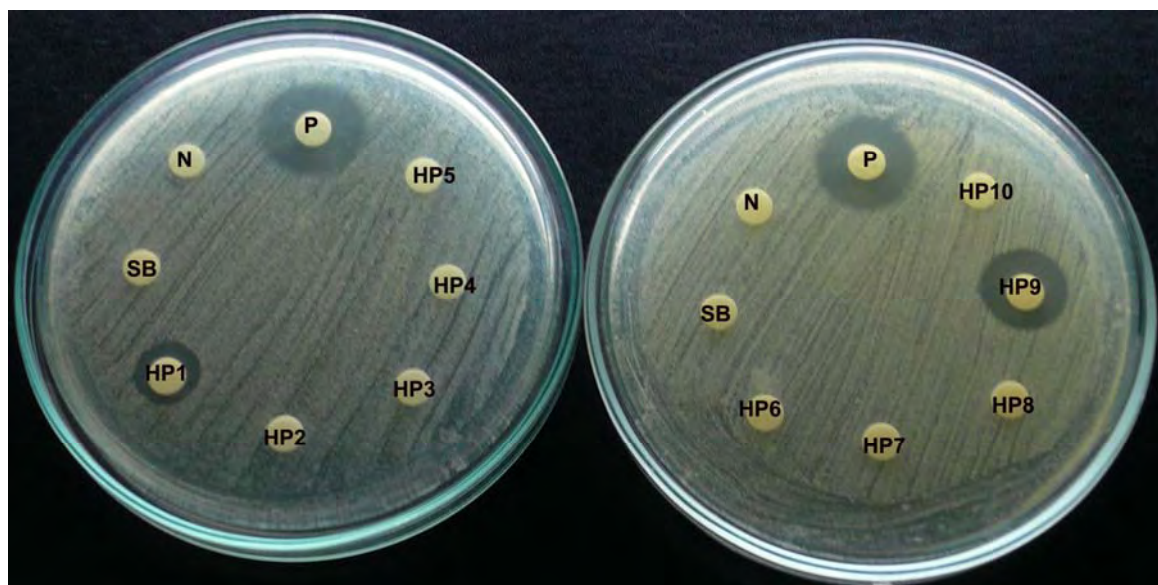
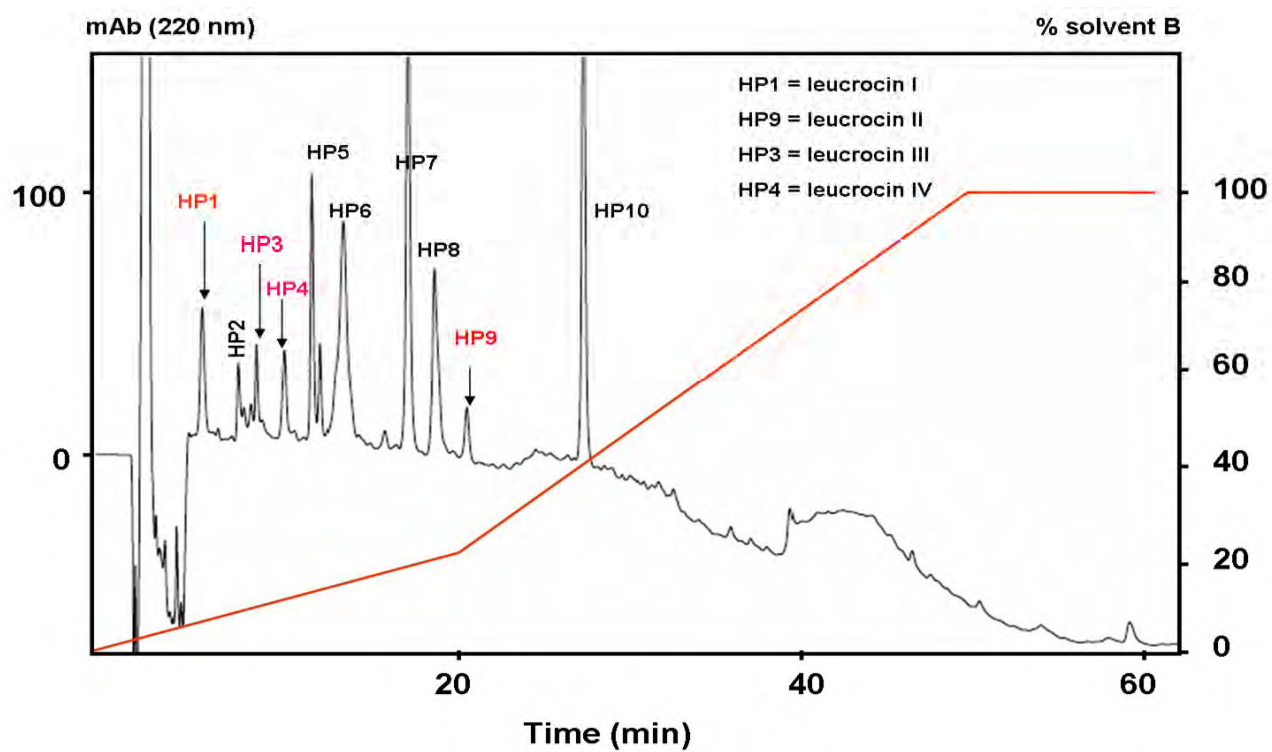
8 = *S. typhi* ATCC 5784 and

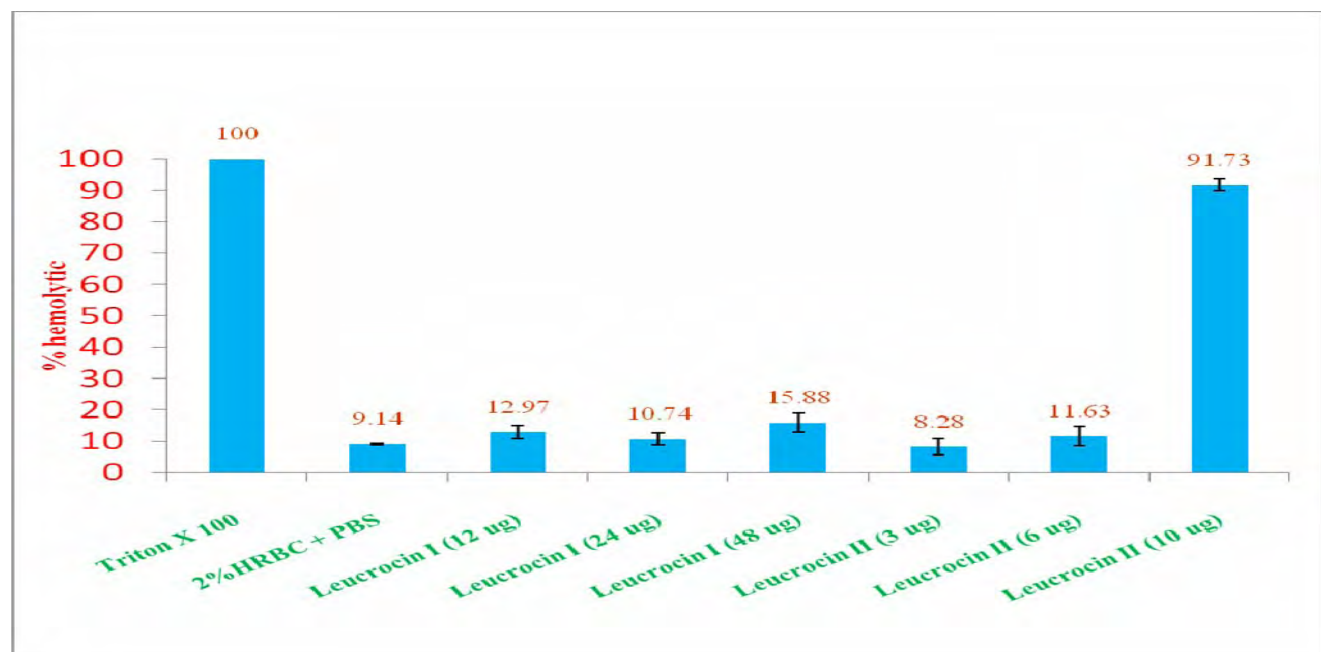
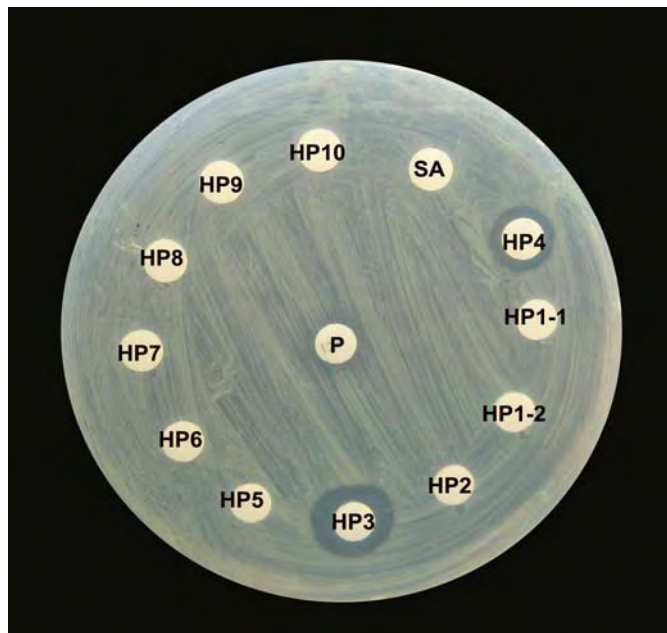
9 = *Candida albicans*

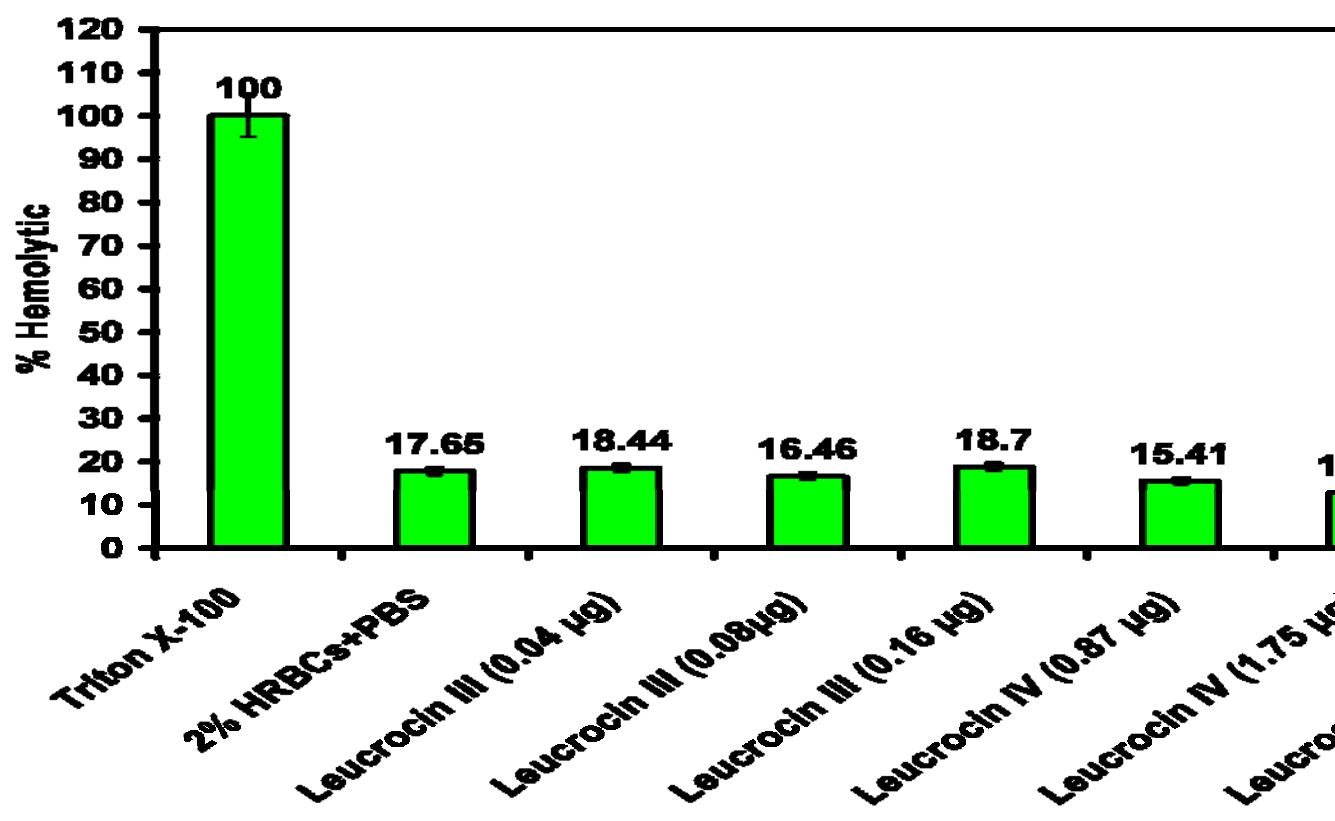
The solvent control (0.01% AcOH) did not exhibit antibacterial activity against any of the species tested. Not detected. The results were expressed as the means $\pm$ S.D. for three determinations.





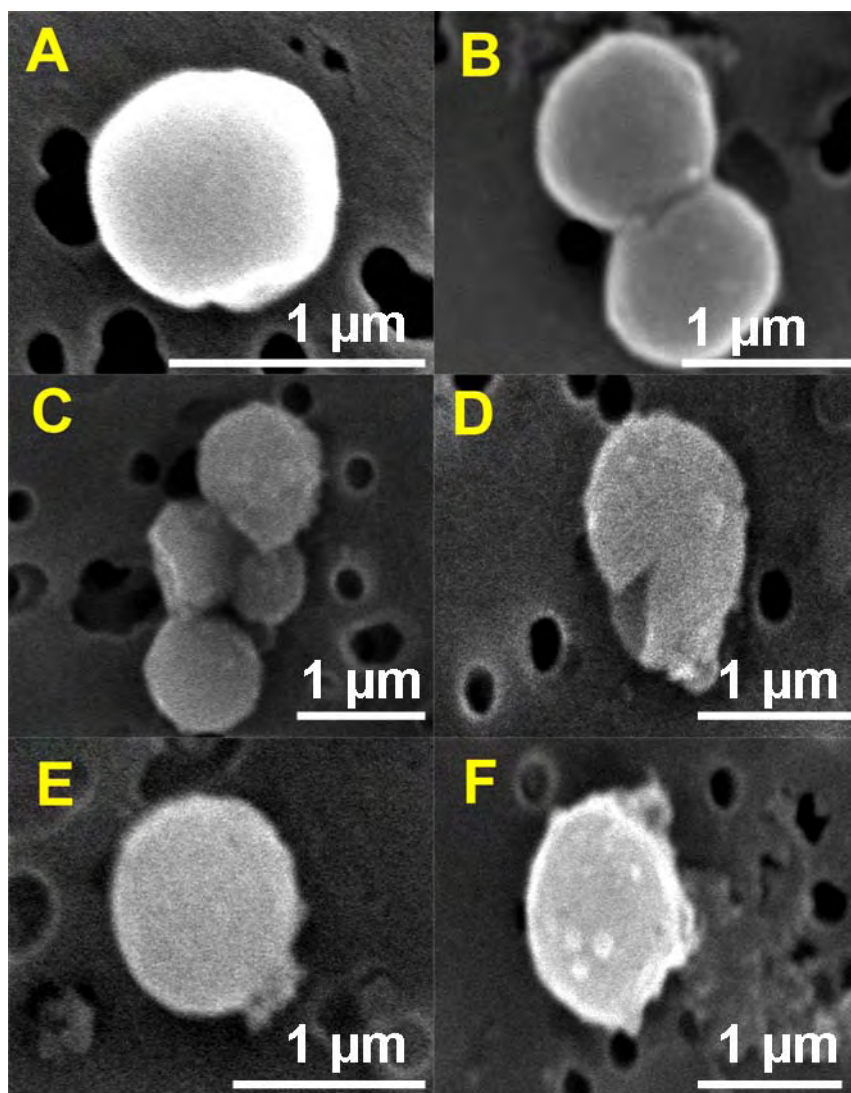


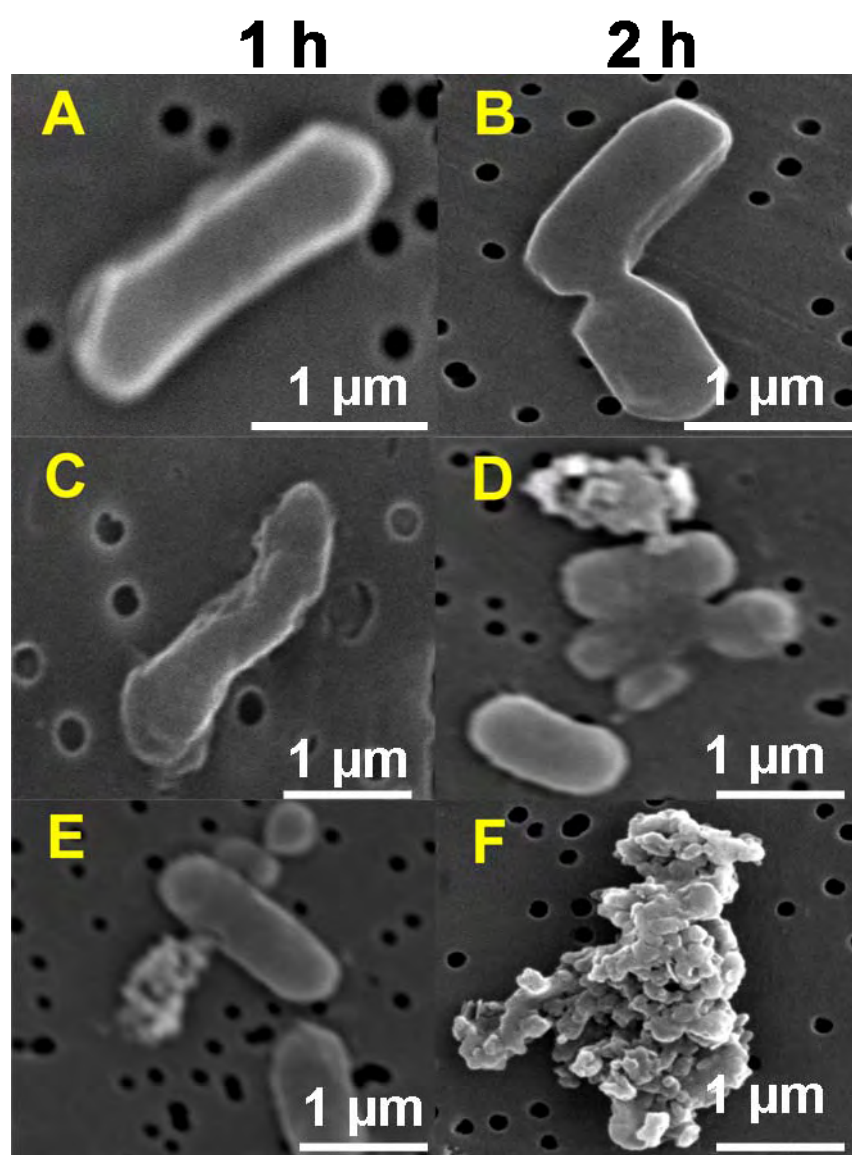


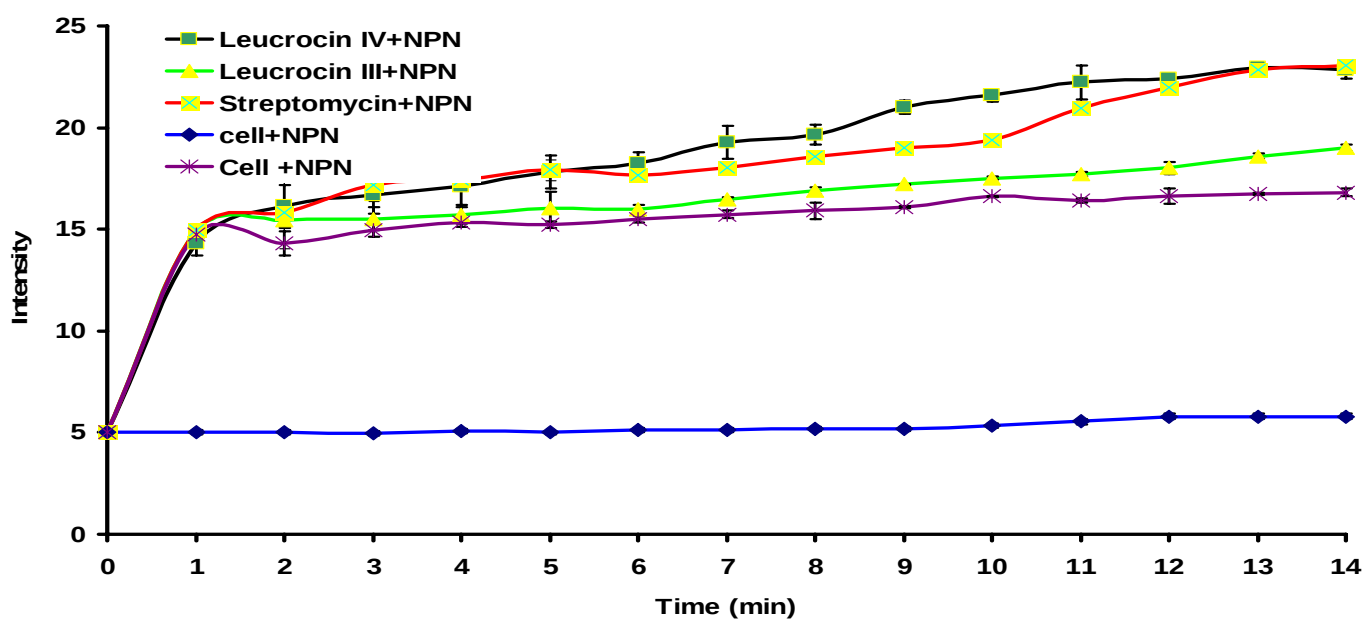


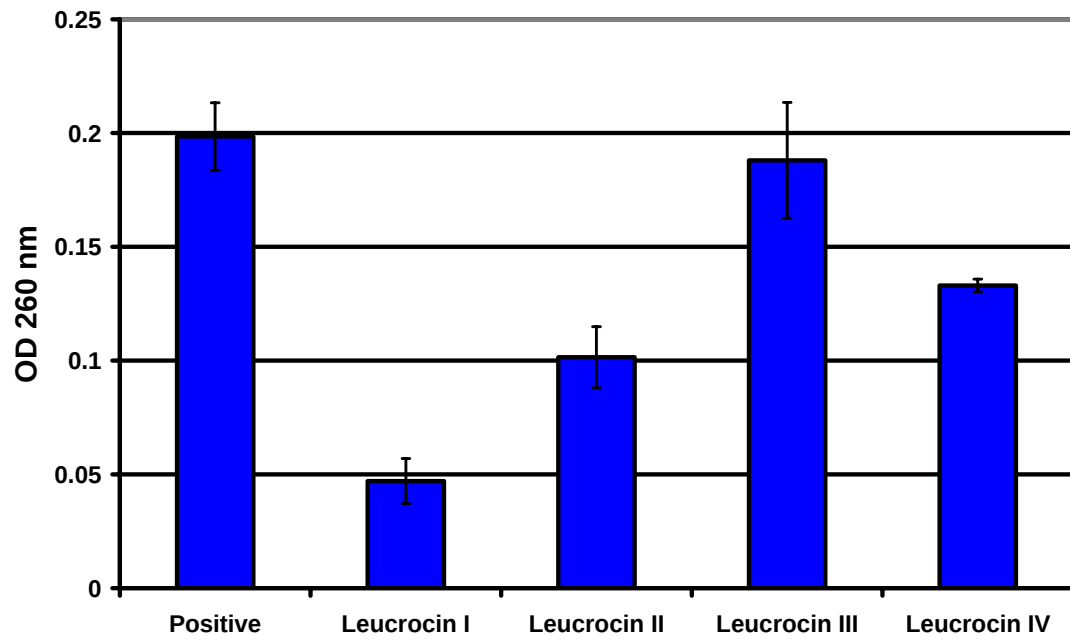
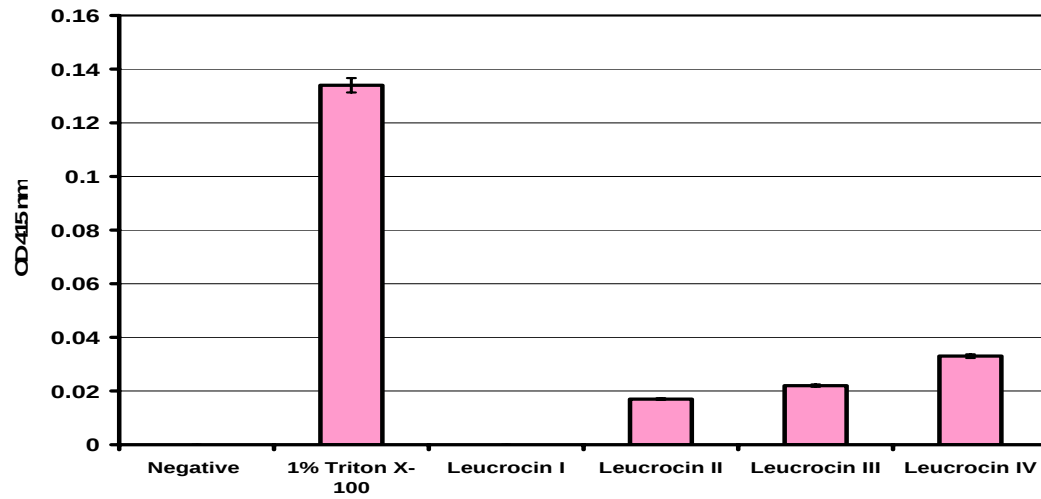
1 h

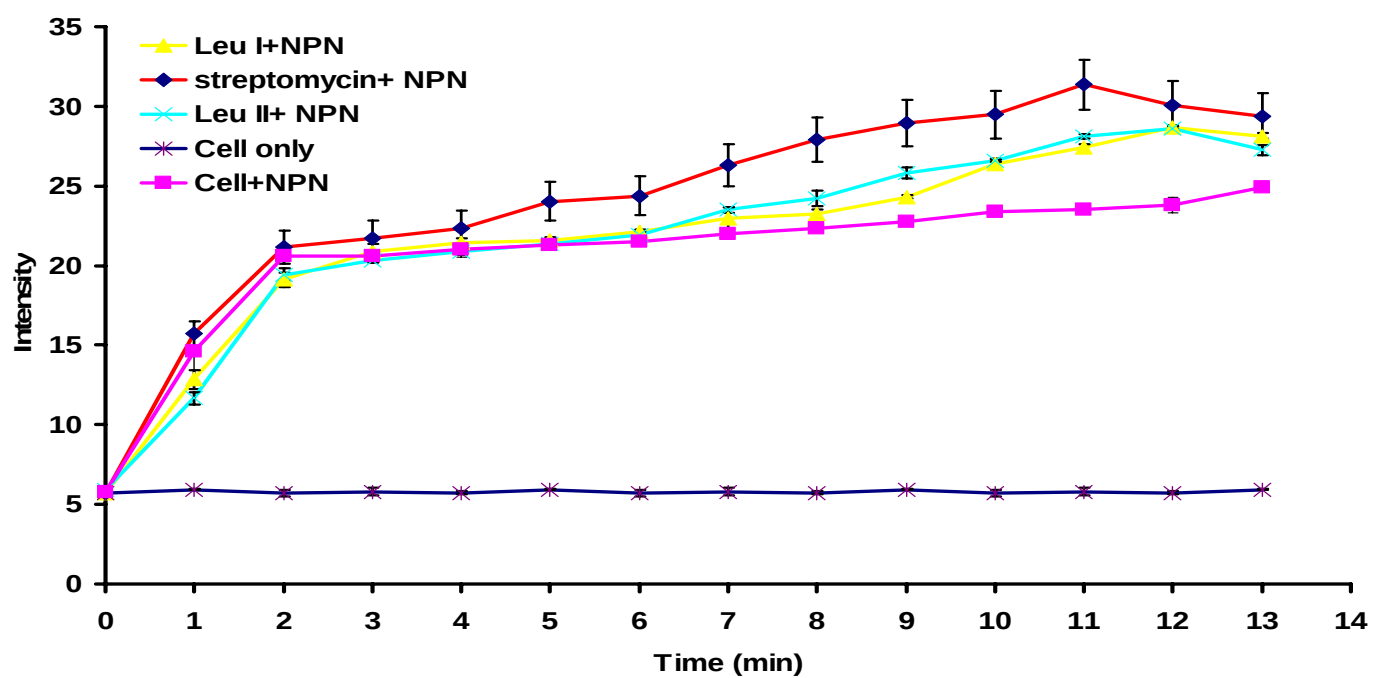
2 h





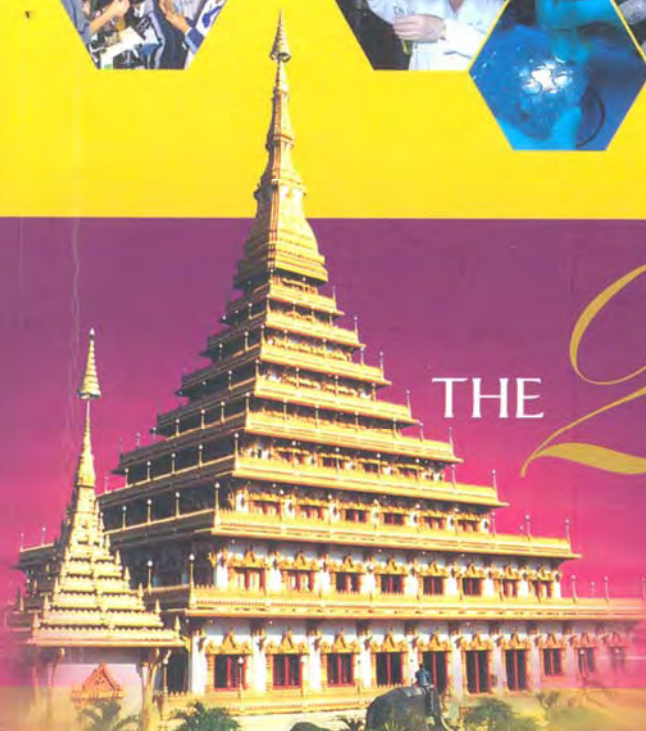








การประชุมวิชาการ
ระดับชาติ



THE *2nd*

BIOCHEMISTRY AND
MOLECULAR BIOLOGY FOR
REGIONAL SUSTAINABLE
DEVELOPMENT

ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ระหว่างวันที่ 7-8 พฤษภาคม 2552

Programs, Abstracts, and Proceedings

for The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference

จัดโดย:

- สาขาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล สภาคณบดีวิทยาศาสตร์
แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
- ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ และ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



ANTIBACTERIAL ACTIVITIES, SECONDARY STRUCTURE, AND KILLING MECHANISM OF CROCOSIN AND LEUCROCINS, THE NOVEL ANTIBACTERIAL AGENTS FROM SIAMESE CROCODILE (*Crocodylus siamensis*) BLOOD

Sompong Thammasirirak

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand (somkly@kku.ac.th)

Bacterial resistance against commonly used antibiotics has become an increasingly important public health problem. To avoid this problem, scientists have therefore searched for new antimicrobial agents. In this study, we have purified antibacterial agents, Crocosin and Leucrocins from Siamese crocodile (*C. siamensis*) blood and characterized for their functions. Crocosin was purified from crocodile plasma using a cutoff membrane, reverse phase HPLC and HypercarbTM HPLC column. The Crocosin exhibits antibacterial activity toward *S. typhi* and *S. aureus*. The structural feature of Crocosin was analyzed by amino acid composition, N-terminal amino acid sequence and ESI-MS/MS analysis. The novel group of innate immunity with alanine and glycine residues at the N-terminus shows its thermostable property and tolerance to pronase digestion. Scanning electron microscopic (SEM) observation indicates that Crocosin is likely to penetrate progressively into the cytoplasmic space, perturb and finally damage bacterial membrane. Leucrocins was purified from crocodile leukocyte extract using similar chromatography techniques. The Leucrocin I-IV showed antibacterial activity against *S. epidermidis*, *V. cholerae*, *S. typhi* and *C. albicans*. Leucrocin I, II, III and IV exhibited different properties in antimicrobial activity, and different toxicity to human red blood cells. SEM study indicated that peptides leucrocin I and II destroyed inner membrane of bacterial cells, resulting in lysis or death of bacterial cells. Further, we confirm that Leucrocins permeabilized the outer membrane of bacterial cell by using the fluorescence microscopy. The primary structures of peptides were deduced by LC-MS-MS, Leucrocin I contains NGVQPKY and Leucrocin II is NAGS_LSGWG. Sequence alignment analysis showed no homology to any proteins or polypeptides in the database. These studies indicate that the Siamese crocodile blood has an active antimicrobial system. This system may form the potency of independent innate immunity to fight with pathogens therefore, the crocodile can heal rapidly and almost always without infection.

This work was supported by Thailand Research Fund, Protein and Proteomics Research Group, Khon Kaen University, TRF Master Research Grants and KCU Research Fund.

Keywords: antibacterial activities, crocosin, leucrocin, siamese crocodile, *crocodylus siamensis*

PROGRAM AND ABSTRACTS

ODYSSEYS IN PROTEIN RESEARCH



*In Honor of
Professor M.R. Jisnuson Svasti's 60th Birthday*

Chulabhorn Research Institute Conference Center
Bangkok, Thailand

September 20-21, 2007



Second

Annual Symposium of Protein Society of Thailand :

ISOLATION OF LYSOZYME LIKE PROTEIN FROM CROCODILE LEUKOCYTE EXTRACT (*Crocodylus siamensis*)

Supawadee Pata¹, Sakda Daduang¹, Jisnuson Svasti² and Sompong Thammasirirak^{1*}

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

²Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Mahidol University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

In mammals, white blood cells (neutrophils, macrophages and natural killer cells) contain components of immune response such as antimicrobial proteins and antimicrobial peptides. A variety of proteins and peptides are effector molecules able to kill microbial pathogens. This study aims to screen and purify antimicrobial substances from crocodile leukocyte extract. The crude leukocyte extract showed antibacterial activity toward *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi* B, *Salmonella typhi* ATCC 5784, *Vibrio cholerae*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. The crude extract was purified by anion exchange column chromatography (FPLC) and 4 protein peaks (P1-P4) were obtained. Protein fractions (P1-P3) showed antibacterial and antifungal activity like the crude leukocyte extract. Protein fraction (P4) displayed specific activity against to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 and *Vibrio cholerae*. The leukocyte extract and protein fraction (P1) were characterized by zymogram refolding gel. Leukocyte extract demonstrated clear zones of inhibition at band molecular weight about 21 and 15 kDa. Antimicrobial activity and MW of these proteins are similar to that of lysozyme. When determined by western immunoblotting using anti-hen lysozyme as primary antibody, the protein of MW at 14-15 kDa could cross react with anti-hen lysozyme. In addition, the result from MALDI-TOF MS-MS confirmed that the 14-15 kDa protein was lysozyme. This result indicated that antimicrobial substance in crocodile leukocyte extract was lysozyme-like protein.

KEYWORDS: antimicrobial protein, white blood cell, *Crocodylus siamensis*

1. INTRODUCTION

Antimicrobial substances have been isolated from numerous types of organisms, ranging from bacteria to plants and animals [1]. Antimicrobial substances show their efficacy in killing or inhibiting microorganisms such as bacteria, fungal cells or enveloped viruses [2]. Mammalian leukocytes (neutrophils, macrophages, eosinophils, basophils and natural killer cells) are one source of antimicrobial substances [1].

*Corresponding author: Tel: +66-4-3342911

E-mail: somkly@kku.ac.th