รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินความปลอดภัยของโปรตีน Vip3Aa

Biosafety assessment of Vip3Aa

ดร.กนกพร ศรีสุจริตพานิช

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 21006

สัญญาเลขที่ 59/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินความปลอดภัยของโปรตีน Vip3Aa

Biosafety assessment of Vip3Aa

ดร.กนกพร ศรีสุจริตพานิช

คณะสหเวชศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 59/2562

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ ม.บูรพา ในการอำนวยความสะดวกด้านนโยบายการทำวิจัยของบุคลากร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน องค์กรมหาชน ในการสนับสนุนการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการ และ beamline 7.1

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล และศูนย์เครื่องมือศาลายา ในการดำเนินงานวิจัย

Abstract

Bacillus thuringiensis produces vegetative insecticidal protein as Vip3A protein. Vip3A is toxic to important *Lepidoptera* insect pests of Thailand such as *Spodoptera exigua Spodoptera litura* etc. To use Vip3Aa toxin as insect pests control, the toxicity information is important. In this study, safety assessment and stability of the toxin was performed. Firstly, recombinant Vip3Aa was produced in *E.coli* as 90 kDa soluble protein. Vip3A toxin was exposed to high temperature for heat stability test. At 75°C Vip3A was degraded after 30 min. Moreover, Vip3Aa was not stable under UV light after 2 days. Human cell line toxicity test was performed using human fibroblast and cell viability was analyzed using MTT assay. Fibroblast treated Vip3Aa at 2 mg/ml could grow comparable with untreated control. Taken together, Vip3A was not toxic to human cell line and not stable in environment. It can imply that Vip3A safe to human.

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ผลิตโปรตีนสารพิษ Vip3Aa ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการฆ่าหนอนศัตรูพืช ในอันดับ Lepidoptera ที่มีความสำคัญต่อพืชเศรษฐกิจไทย ได้แก่ กลุ่มหนอนกระทู้และหนอนกอ ในการพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์จำเป็นต้องมีข้อมูลด้านพิษวิทยาของโปรตีนสารพิษ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลนี้เพียงพอสำหรับโปรตีน Vip3Aa งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นพิษของ Vip3Aa และศึกษาสภาพความคงทนต่อสภาวะต่าง ๆ โดยเริ่มจากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน Vip3Aa ใน *E. coli* พบว่าโปรตีนสามารถแสดงออกมาในรูปแบบละลายน้ำได้ที่ขนาด 90 kDa จากนั้นนำไปทดสอบความคงทนต่ออุณหภูมิ พบว่า Vip3Aa จะสลายไปเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่า 75°C ในเวลา 30 นาที และไม่ทนต่อแสง UV เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ปกติ ชนิดไฟโบบลาส เมื่อวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ยังมีการเจริญเติบโตปกติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับโปรตีนสารพิษที่ความเข้มข้นสูงสุด 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่า โปรตีน Vip3A ปลอดภัยต่อเซลล์มนุษย์และไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมหากนำไปใช้งานจริง

สารบัญ

บทที่	**หน้า**
1. บทนำ (introduction)	1
1.1 วัตถุประสงค์	2
1.2 กรอบแนวคิด สมมุติฐาน	2
2. ทบทวนวรรณกรรม	3
2.1 ข้อมูลทั่วไปของ *Bacillus thuringiensis* (Bt)	4
2.1.1 *Bacillus thuringnensis*	4
2.1.2 ลักษณะทางชีววิทยาของ *Bacillus thuringnensis*	4
2.2 สารพิษที่สร้างและกลไกการเข้าทำลายแมลงของ *Bacillus thuringiensis*	5
2.2.1 Crystal toxins (δ-endotoxins)	6
2.2.2 Secreted toxins	7
3. ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and methods)	8
3.1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดและสายพันธุ์แบคทีเรีย	8
3.2 Vip3Aa Protein expression and purification	8
3.3 Protein stability test	9
3.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ด้วยเทคนิค	9
Sulforhodamine B colorimetric (SRB) assay	10
3.5 Bioassay	10
3.6 Crystallization screening	12
4. ผลการทดลอง (Results)	13
4.1 Protein expression and purification	13
4.2 Stability test	17
4.3 Human cell line toxicity test	21
4.4 Protein crystallization screening	21
5. อภิปรายและสรุปผลการทอลอง	22
6. เอกสารอ้างอิง	24
7. ภาคผนวก/เอกสารแนบท้าย	27

สารบัญภาพ (List of illustrations)

หน้า

ภาพที่ 1 การสร้างสปอร์ภายในเซลล์ของ *Bacillus thuringiensis*

ภาพที่ 4-1 การแสดงออกของโปรตีน Vip3Aa

ภาพที่ 4-2 12% SDS-PAGE Vip3Aa ขนาด 90 kDa หลังผ่าน Desalting column

ภาพที่ 4-3 แสดงผลโปรตีน Vip3Aa ที่อยู่ในอุณหภูมิ 25°C, 50°C, 75°C และ 100°C

ภาพที่ 4-4 แสดงผลโปรตีน Vip3Aa ที่โดนแสงแดดเป็นเวลา 4 วัน

ภาพที่ 4-5 แสดงผลโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกตัดด้วย Trypsin

ภาพที่ 4-6 แสดงผลโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกตัดด้วย Trypsin และวางไว้ในที่ที่มีแสงแดด

ภาพที่ 4-7 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ของ Vip3A

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

µg	Microgram
µl	Microliter (s)
µm	Micrometer
α	Alpha
APS	ammonium per sulfate
Bp	Base pair (s)
Bt	*Bacillus thruringiensis*
Bti	*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*
$CaCl_2$	Calcium chloride
Cry	Crystal toxin
Cyt	Cytolytic toxin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyguanosine triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EtOH	ethyl alcohol
IPTG	Isopropyl 3-D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton (s)
KH_2PO_4	Potassium phosphate
LB	Luria-Bertani medium
M	Molar
ml	Milliter (s)
mM	Millimolar
nm	Nanometer
°C	Degree Celsius
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
pH	Potential of Hydrogen ion
rpm	Round per minute
SDW	Sterile Distilled Water
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide

	gel electrophoresis
TAE buffer	Tris-Acetate-EDTA buffer
TEMED	Tetramethyl ethylenediamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

แบคทีเรียบีที (*Bacillus thuringiensis*, Bt) เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างโปรตีนสารพิษฆ่าหนอนแมลง (insecticidal crystal proteins, ICPs) หรือ โปรตีนในกลุ่ม Cry toxin ซึ่งผลิตในช่วงของการสร้างสปอร์ ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางสำหรับความสามารถในการควบคุมแมลงศัตรูพืชซึ่งปลอดภัยต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โปรตีนสารพิษนี้ถูกนำมาฉีดพ่นหรือพัฒนาเป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น โปรตีน Cry1A มีความเป็นพิษต่อแมลงศัตรูพืช (Agricultural pests) ที่สำคัญหลายชนิดในอันดับ Lepidoptera เช่น หนอนผีเสื้อ โดยการทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อบุกระเพาะของหนอนแมลง และโปรตีนสารพิษในกลุ่มนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงโดยออกฤทธิ์ผ่านการจับกับตัวรับจำเพาะในหนอนแมลง และฆ่าเฉพาะหนอนศัตรูพืชโดยไม่ทำลายหนอนหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการใช้โปรตีนสารพิษฆ่าแมลงชนิดเดียวไม่เพียงพอในการกำจัดหนอนศัตรูพืชที่หลากหลาย และเมื่อใช้ในปริมาณมากเป็นเวลานาน ส่งผลให้แมลงเกิดความต้านทานต่อโปรตีนสารพิษเหล่านี้ โดยมีรายงานที่เป็นผลมาจากห้องปฏิบัติการและในบริเวณที่มีการใช้สเปรย์แบบดั้งเดิมหรือพืชดัดแปลงพันธุกรรม ถัดมาเมื่อมีการค้นพบ Vegetative insecticidal proteins หรือ Vip ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียบีทีในช่วงของการเจริญเติบโตปกติซึ่งมีความสามารถในการฆ่าหนอนแมลงได้ จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาส่งเสริมหรือทดแทนการใช้ผลึกโปรตีนสารพิษฆ่าแมลงชนิดโปรตีน Cry เพียงอย่างเดียว โดยโปรตีนสารพิษในกลุ่ม Vip ที่น่าสนใจตัวหนึ่งคือ Vip3A ซึ่งมีความสามารถในการฆ่าหนอนแมลงศัตรูพืช ในอันดับ Lepidoptera ที่มีความสำคัญต่อพืชเศรษฐกิจไทย ได้แก่ กลุ่มหนอนกระทู้และหนอนกอ เช่น หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) และหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ที่เป็นศัตรูสำคัญของผักชนิดต่าง ๆ หลายชนิด เช่น คะน้า กะหล่ำปลี ผักกาดขาว ผักกาดเขียว หนอนในกลุ่มหนอนกอ (rice stemborer) และหนอนกระทู้กล้า (rice seeding armyworm) ที่ทำลายกัดกินต้นกล้าข้าว ทำให้ข้าวไม่ออกรวง หนอนกออ้อย (sugarcane borer) เป็นหนอนที่กัดกินหน่ออ้อยหรือลำต้นอ้อย โดยโปรตีนสารพิษชนิด Vip3A มีลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างที่ไม่เหมือนกันกับโปรตีน Cry และยังมีฤทธิ์ในการทำลายหนอนแมลงศัตรูพืชได้กว้างและหลากหลายกว่าโปรตีนสารพิษในกลุ่ม Cry1A นอกจากนี้หนอนแมลงศัตรูพืชเหล่านี้สามารถต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลงหลายชนิดทำให้การใช้สารเคมีเหล่านั้นไม่ได้ผล รวมทั้งความต้องการพืชผักที่ปลอดสารพิษในปัจจุบันมีมากขึ้นทั้งเพื่อการบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก การใช้ผลิตภัณฑ์ควบคุมแมลงที่มาจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัยต่อ คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการพัฒนาโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียบีที เป็นสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ (Biopesticides) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการ

กำจัดแมลงศัตรูพืช วิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ และป้องกันการดื้อของหนอนศัตรูพืชต่อสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ คือการใช้โปรตีนสารพิษมากกว่าหนึ่งชนิดที่มีกลไกการทำงานที่แตกต่างกันและมีประสิทธิภาพเสริมฤทธิ์กัน ในการพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์จำเป็นต้องมีข้อมูลด้านพิษวิทยาของโปรตีนสารพิษ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลนี้เพียงพอสำหรับโปรตีน Vip3A ดังนั้นจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาด้านพิษวิทยาและความปลอดภัยต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม เพื่อนำข้อมูลไปประกอบกับโครงสร้าง หน้าที่และการทำงานเชิงลึกในระดับโมเลกุลของโปรตีน Vip3A และเป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงประสิทธิภาพของโปรตีนสารพิษ Vip3A ต่อไปในอนาคต

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อประเมินความเป็นพิษของโปรตีน Vip3A ต่อ human cell
2. เพื่อประเมินความเป็นพิษของโปรตีน Vip3A ในสัตว์ทดลอง
3. เพื่อศึกษาความคงทนของโปรตีนสารพิษ (Protein stability test)

1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

แบคทีเรียบีทีสามารถผลิตโปรตีนสารพิษชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายหนอนแมลงที่มีความจำเพาะในการออกฤทธิ์และมีความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกัน สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียบีทีถูกนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งปลอดภัยต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม และไม่มีสารพิษตกค้างในพืชผักสำหรับการบริโภค ดังนั้นการใช้ชีวภัณฑ์ธรรมชาติในการควบคุมหนอนศัตรูพืชจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ ปัจจุบันมีการค้นหาแบคทีเรียบีทีใหม่จากแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย เพื่อที่จะค้นพบโปรตีนสารพิษฆ่าหนอนแมลงชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะแตกต่างออกไป ซึ่งโปรตีนสารพิษชนิด Vip3A ที่ถูกสร้างขึ้นจากแบคทีเรียบีที สามารถออกฤทธิ์ฆ่าหนอนศัตรูพืชที่เป็นปัญหาสำคัญต่อผลผลิตพืชเศรษฐกิจได้หลายชนิด เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย จึงมีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปเป็นชีวภัณฑ์ธรรมชาติ และเพื่อให้การใช้ประโยชน์จากชีวภัณฑ์ธรรมชาติเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องศึกษาในด้านความปลอดภัยทั้งต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาการดื้อของหนอนศัตรูพืชต่อสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ จึงต้องมีการศึกษาถึงผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย (non-target organisms) และยังต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงโปรตีนให้มีรูปแบบที่คงทนต่อสภาวะแวดล้อม โครงการวิจัยนี้เป็นการทดลองเบื้องต้นในการศึกษาด้านความปลอดภัยทั้งในคนและสัตว์ และความคงทนต่อการถูกย่อยสลาย เพื่อเป็นแนวทางในนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชต่อไปในอนาคต

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม (Literature review)

2.1 ข้อมูลทั่วไปของ *Bacillus thuringiensis* (Bt)

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง พบแพร่กระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน ในน้ำ และซากแมลงที่ตาย โดยแบคทีเรียบีที สามารถสร้างโปรตีนสารพิษฆ่าตัวอ่อนแมลง (Insectical crystal proteins, ICPs) ได้หลากหลายชนิด ซึ่งโปรตีนสารพิษที่สร้างขึ้นในรูปของผลึกโปรตีนระหว่างการสร้างสปอร์เรียกว่า Cry toxins (Schepf 1998) นอกจากนี้แบคทีเรียบีทียังสามารถสังเคราะห์โปรตีนฆ่าแมลงอื่น ๆ ได้ในช่วงการเจริญเติบโต โดยโปรตีนสารพิษนี้จะถูกหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า vegetation insecticidal protein หรือ Vip (Chakroun, *et al*. 2016) ปัจจุบันโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียบีทีถูกนำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพหรือชีวภัณฑ์ธรรมชาติ*แทนการใช้สารเคมี* โดยโปรตีนสารพิษในกลุ่ม Cry นั้นมีความจำเพาะในการฆ่าหนอนแมลงศัตรูที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะอาหารในหนอนแมลง

โปรตีนสารพิษกลุ่ม Vip ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ Vip1, Vip2, Vip3 และ Vip4 ตามความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน โดยโปรตีน Vip1 และ Vip2 เป็นโปรตีนที่ต้องทำงานร่วมกันในการออกฤทธิ์ฆ่าหนอนแมลงในกลุ่ม Coleoptera แต่จะไม่ฆ่าหนอนแมลงในกลุ่ม Lepidoptera ในขณะที่โปรตีนอีกหนึ่ง คือ Vip3 สามารถออกฤทธิ์ฆ่าหนอนแมลงในกลุ่ม Lepidoptera ส่วน Vip4 ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาวิจัยมากนัก (Hernandez-Martinez*, et al.*, 2013)

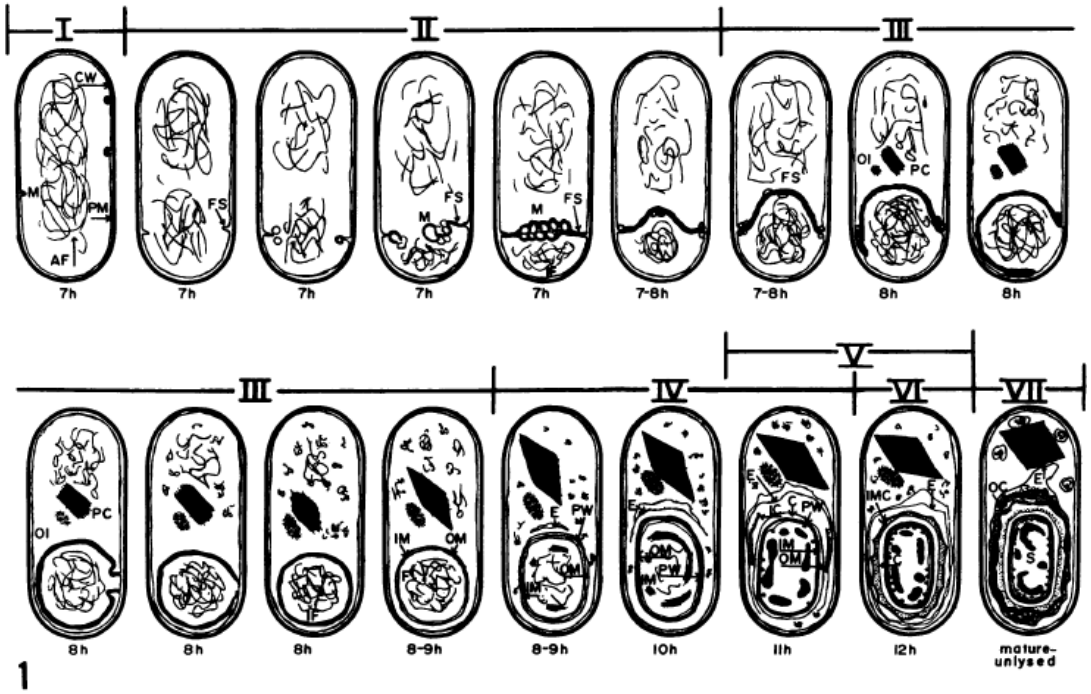
2.1.1 *Bacillus thuringnensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) ถูกพบค้นเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค. ศ. 1901 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Shigetane Ishiwata ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากตัวหนอนไหมที่ตายแล้วจากโรค “sotto disease” โดยตั้งชื่อว่า Bacillus sotto โรคนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดการสูญเสียหนอนไหมเป็นจำนวนมากในญี่ปุ่น นอกจากนี้เขายังพบว่าตัวหนอนหลายตัวเมื่อสัมผัสกับบาซิลลัสนั้นไม่ได้ทำให้เกิดการตายแม้ตัวหนอนจะอ่อนแอและแคระมาก จากการทดลองดูเหมือนจะเกิดจากพิษบางอย่างจากการตายที่เกิดขึ้นก่อนการเพิ่มจำนวนของบาซิลลัส แสดงให้เห็นว่ามีสารพิษบางอย่างที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดโรคของ แบคทีเรียบีที(Sansinenea, 2012) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยของเขายังไม่ได้มีการจดบันทึกอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นในปี ค. ศ. 1915 นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Ernst Berliner ได้ทำการแยกสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องจากตัวอ่อน Mediterranean flour moth (*Anagasta kuehniella*) และตั้งชื่อว่า *Bacillus thuringiensis* ตามชื่อเมืองที่พบเชื้อคือเมือง Thuringia ประเทศเยอรมนี ต่อมาในปี ค. ศ. 1953 Christopher Hannay ได้ศึกษาการ

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบีที ในระยะที่กำลังสร้างสปอร์และพบโครงสร้างอย่างหนึ่งในเซลล์คือ parasporal body และได้ให้ข้อสังเกตว่าโครงสร้างที่พบน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของแมลง

2.1.2 ลักษณะทางชีววิทยาของ *Bacillus thuringnensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) มีการสร้างสปอร์และจัดอยู่ในกลุ่ม facultative aerobic bacteria พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถแยกได้มาจากหลายแหล่งในระบบนิเวศที่หลากหลาย เช่น ในดิน น้ำ ซากพืช ซากแมลง หรือจากสัตว์ที่กินแมลง เป็นต้น (Palma et al., 2014) โดยวงจรชีวิตของแบคทีเรียบีที มีการเจริญ 2 ระยะคือระยะการเจริญ (vegetative growth) และระยะการสร้างสปอร์ (sportulation)(Bulla et al., 1980) ในระยะการเจริญเซลล์เป็นรูปท่อนตรง (rod shape) มีความยาวประมาณ 2-5 ไมครอน และกว้างประมาณ 1.0 ไมครอน สปอร์จะพัฒนา (germination) และมีการแบ่งตัวได้เซลล์ต่อกันเป็นลูกโซ่ ส่วนระยะการสร้างสปอร์ เป็นการแบ่งเซลล์แบบอสมมาตรประกอบด้วยเจ็ดระยะ โดยจะมีการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ที่เรียกว่าเอนโดสปอร์ (endospore)อยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์และสร้างผลึกโปรตีนที่เรียกว่า parasporal body อยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่งไปพร้อม ๆ กัน ซึ่งประกอบด้วย (ระยะที่ 1) ระยะการสร้าง axial filament, (ระยะที่สอง) ระยะการสร้าง forespore septum, (ระยะที่สาม) ระยะ engulfment เริ่มมีการปรากฏขึ้นของผลึก และสร้าง forespore, (ระยะที่ 4 ถึง 6) มีการสร้าง exosporium เริ่มการสร้างผนังเซลล์ขั้นต้น, สร้างเปลือกนอกและหุ้มสปอร์พร้อมกับการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสสปอร์และ (ระยะที่เจ็ด) การเจริญเติบโตของสปอร์และสลายไปของ sporangial(Bechtel & Bulla, 1976)



ภาพที่ 1 การสร้างสปอร์ภายในเซลล์ของ *Bacillus thuringiensis* (Bechtel & Bulla, 1976)

2.2 สารพิษที่สร้างและกลไกการเข้าทำลายแมลงของ *Bacillus thuringiensis*

แบคทีเรียบีทีสร้างสารพิษได้หลากหลายชนิด โดยแบคทีเรียบีทีต่างสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงกับแมลงต่างชนิดกัน และมีความเป็นพิษที่มากน้อยแตกต่างกัน สารพิษส่วนใหญ่ที่แบคทีเรียบีทีสร้างขึ้นสามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้

2.2.1 Crystal toxins (**δ**-endotoxins)

โปรตีนคริสตัลเกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของผลึกโปรตีนในช่วงระยะพักของวงจรการเจริญเติบโต (Schnepf et al., 1998) เป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวาง คือ **δ**-endotoxins ตัวอย่างเช่น Cry และ Cyt toxins

2.2.1.1 Cry toxins

Cry toxins ถูกตั้งชื่อขึ้นโดย Heimpel เมื่อปี ค.ศ. 1967 เนื่องจากลักษณะของผลึกของโปรตีนเป็นรูปแบบผลึก parasporal crystal เป็นกลุ่มโปรตีนฆ่าแมลงที่ใหญ่ที่สุดที่ถูกผลิตในแบคทีเรียบีที ผลึกโปรตีนประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายย่อยของ protoxin จึงส่งผลทำให้ความหลากหลายของ protoxin ในการสร้างสารพิษให้เกิดความแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มขึ้นอยู่กับความจำเพาะกับโฮสต์ ตัวอย่างเช่น Cry1A และ Cry4 toxins มีขนาดประมาณ 65 kDa มีความสามารถในการฆ่าแมลงม็อธและยุง ซึ่งเป็นผลมาจากการผลิต protoxins ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 125 –135 kDa ในขณะที่ Cry3 toxins มีขนาดประมาณ 68 kDa มีความสามารถในการฆ่าด้วง หรือ แมลงปีกแข็ง ซึ่งเป็นผลมาจากการผลิต protoxins ที่น้ำหนักโมเลกุล 72 kDa (Osman et al., 2015) Cry toxins ถูกจำแนกออกเป็นกลุ่มใหญ่ตามความจำเพาะต่อโฮสต์ แมลงและยีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 จำเพาะต่อ lepidopteran คือ Cry1, Cry9 และ Cry15 กลุ่ม 2 จำเพาะต่อ lepidopteran และ dipteran คือ Cry2 กลุ่ม 3 จำเพาะต่อ coleopteran คือ Cry3, Cry7 และ Cry8 กลุ่ม 4 จำเพาะต่อ dipteran คือ Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 และ Cry20 กลุ่ม 5 จำเพาะต่อ lepidopteran และ coleopteran คือ Cry1I และกลุ่ม 6 จำเพาะต่อ nematode คือ Cry6 (Crickmore et al., 1998) กลไกการเข้าทำลายแมลงเริ่มโดยการที่แมลงกลืนผลึกโปรตีนเข้าไปในกระเพาะอาหารซึ่งลอยตัวอยู่ภายในช่องว่างลำตัวของแมลง สภาพความเป็นด่างภายในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงจะทำให้ผลึกโปรตีนละลายกลายเป็นโพลีเปปไทด์ขนาดเล็กที่เป็นพิษ ชิ้นส่วนขนาดเล็กนี้จะลอยไปจับกับตัวรับจำเพาะบนพื้นผิวผนังเซลล์ของเยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลาง และทำลายเซลล์เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารให้เกิดรูรั่ว เกิดการซึมผ่านเข้าออกสารในกระเพาะอาหารส่วนกลางและช่องว่างลำตัวของแมลง ทำให้แมลงตาย (Vachon, Laprade, & Schwartz, 2012)

2.2.1.2 Cyt toxins

Cytotoxic(Cyt) toxins เป็นกลุ่มโปรตีนฆ่าแมลงอีกชนิดหนึ่งที่ถูกผลิตโดยแบคทีเรียบีที ซึ่งถูกเข้ารหัสโดย cyt gene โดยพบว่าโปรตีน Cyt แสดงกิจกรรม hemolytic ในหลอดทดลองและมีความจำเพาะต่อแมลงกลุ่ม dipteran เช่น ยุง และ แมลงริ้นดำ (Guerchicoff, Delecluse, & Rubinstein, 2001) โดยสามารถจำแนกโปรตีน Cyt ออกเป็นสามชนิดตามกรดอมิโนที่แตกต่างกันดังนี้ Cyt1, Cyt2 และ Cyt3 ซึ่งพบว่ามีความเป็นพิษต่อแมลงชนิดต่าง ๆ เช่น Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera และ Dipteran (Pardo-López, Soberón, & Bravo, 2013) กลไกการเข้าทำลายแมลงของโปรตีน Cyt นั้นไม่จำเป็นต้องมีตัวรับโปรตีน แต่สามารถจับกับส่วนไขมันที่ไม่ใช่ glycosylated บนส่วน microvillar ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยตรง เมื่อโปรตีนแทรกตัวเข้าไปอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการรวมตัวกันเป็น oligomeric ของโปรตีน และทำให้เกิดความผิดปกติของไขมันบนผิวเซลล์ให้เกิดรูรั่ว ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของออสโมติก และสุดท้ายทำให้เซลล์สลาย(Butko, 2003)

2.2.2 Secreted toxins

โปรตีนอีกชนิดหนึ่งซึ่งผลิตมาจากแบคทีเรียบีที ถูกผลิตขึ้นในช่วงระยะ vegetative growth เรียกว่า vegetative insecticidal proteins หรือ Vip เป็น soluble protein ไม่รวมตัวกันเป็นผลึกโปรตีนแบบ parasporal และมีการปล่อยออกมาจากเซลล์ ซึ่งแตกต่างจากโปรตีน Cry เนื่องจากไม่มีการสร้างผลึก (Schnepf et al., 1998)

2.2.2.1 Vip1/Vip2 (Binary) toxins

โปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นในช่วงระยะ vegetative growth ทำหน้าที่ร่วมกันเป็น binary toxin ที่มีฤทธิ์ต้านตัวอ่อน coleopteran(Shi et al., 2004) และพบว่าโปรตีนไม่ก่อตัวเป็นผลึกจึงไม่มีความคล้ายกันกับ Cry โปรตีน Vip2A และ Vip1A มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 52 kDa และ 100 kDa ตามลำดับ ทำหน้าที่ร่วมกันเป็น binary toxin โดยที่ Vip2 ทำหน้าที่เป็นส่วนที่ออกฤทธิ์ (cytotoxic A-domain) และ Vip1 มีส่วนหนึ่งที่จับจำเพาะกับตัวรับ (B-domain) และอาจเป็นโดเมนที่ทำการย้ายขนส่งส่วนที่ออกฤทธิ์ ของ Vip2 ซึ่งพิษต่อเซลล์เข้าสู่เซลล์โฮสต์(Osman et al., 2015) กลไกการเข้าทำลายแมลงเริ่มจากการที่ตัวอ่อนกินโปรตีนสารพิษเข้าไปในกระเพาะอาหาร ซึ่งภายในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงมีโปรติเอสเช่น trypsin กระตุ้นเปิดใช้งาน Vip1 โดยจะตัด protoxin ให้โปรตีนสารพิษมีขนาดเล็กลง ทำให้โปรตีนอยู่ในโครงสร้างที่พร้อมจะทำให้เกิดความเป็นพิษ (Active toxin) และจับกับตัวรับเฉพาะบน brush border membrane ที่ผิวเซลล์ภายในกระเพาะอาหารส่วนกลาง จากนั้นโมโนเมอร์ที่ถูกกระตุ้นของ Vip1Ac ถูกสร้างเป็น oligomers ก่อตัวเป็นรูและทำการขนส่งส่วนที่ออกฤทธิ์ ของ Vip2 ซึ่งพิษแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในไซโทพลาสซึม จากนั้นจะออกฤทธิ์ทำลาย actin filament ส่งผลให้พอลิเมอร์รวมตัวกันไม่ได้และนำไปสู่การตายของเซลล์แบบ cytoskeletal disarrangement (Chakroun et al., 2016; Palma et al., 2014)

2.2.2.2 Vip3 protein

โปรตีน Vip3 เป็นโปรตีนที่ผลิตในระยะ Vegetative stage ช่วงการเจริญระยะกลางถึงระยะแบ่งตัวทวีคูณในช่วงการสร้างสปอร์ มีขนาด 88 kDa ถูกหลั่งออกนอกเซลล์ซึ่งมีพิษจำเพาะกับแมลงในกลุ่ม Lepidoptera(Estruch et al., 1996; Yu et al., 1997) และพบว่าโปรตีนไม่ก่อตัวเป็นผลึก parasporal crystal และโปรตีนถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแปรผลบริเวณ N-terminal จึงมีความแตกต่างกันกับ **δ**-endotoxins (Estruch et al., 1996) ตรงกันข้ามกับ Vip1 และ Vip2 โปรตีน Vip3 มีลำดับ N-terminal signal ที่ไม่เหมือนกันกับ secreted proteins ตัวอื่น และพบว่าโปรตีน Vip3Aa เมื่อถูกกระตุ้นเปิดใช้งานของโปรตีนโดยน้ำย่อยภายในกระเพาะอาหารจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 62, 45, 33, และ 22 kDa (Yu et al., 1997) การศึกษาการทำงานของโปรตีน Vip3 ยังคงไม่เป็นที่แน่ชัดซึ่งข้อมูลของกิจกรรมการฆ่าหนอนแมลงของโปรตีน Vip3 ส่วนใหญ่มาจาก Vip3Aa subfamily และมีข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษน้อยมากสำหรับโปรตีน Vip3B, Vip3C และโปรตีน Vip3A อื่นที่นอกเหนือจาก Vip3Aa subfamily (Chakroun et al., 2016) โดยกลไกที่นำเสนอแสดงให้เห็นถึงโปรตีน Vip3Aa ซึ่งออกฤทธิ์สูงสุดในบริเวณ midgut ของกระเพาะอาหารแมลง โดยโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกกระตุ้นจะไปจับกับจะจับกับ receptor บริเวณ midgut epithelium cell ทำให้เกิดเป็นรูพรุนที่กระเพาะอาหาร และเกิดอัมพาตโดยรวมในลำไส้ของหนอนแมลง ส่งผลให้ออกฤทธิ์ในการฆ่าตัวอ่อนของแมลง (Yu et al., 1997)

2.2.2.3 Vip4 protein

โปรตีน Vip4Aa1 ถูกพบและระบุเมื่อปี ค. ศ. 2010 โดยพบว่า *vip4Aa1* gene มีความยาวประมาณ 2895 bp น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 108 kDa และมีระดับกรดอะมิโนคล้ายกันกับ Vip1Aa1 ถึง 34% (Palma et al., 2014) ส่วนคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและโฮสต์ของโปรตีนชนิดนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and methods)

3.1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดและสายพันธุ์แบคทีเรีย

โครงการวิจัยนี้ได้รับแบคทีเรียบีที สายพันธุ์ที่สามารถสร้างโปรตีน Vip3Aa ได้และมีความเป็นพิษสูง จากสายพันธุ์ท้องถิ่นของประเทศไทยที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จากนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน Vip3A ในรูปของ protoxin จากแบคทีเรียบีที จะถูกผลิตในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS ที่มียีน vip3Aa (full-length gene) เชื่อมต่อกับ 6xhistidine (histidine-fusion protein) หรือเรียกว่า pET28b-Vip3A

3.2 Vip3Aa Protein expression and purification

3.2.1 การแสดงออกโปรตีน (Protein expression)

การทดลองนี้ได้เลือกโคลนที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน Vip3Aa ในแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3)pLysS ที่มี pET28b-Vip3A โดยเริ่มจากการเลี้ยงใน LB Broth ปริมาณ 8 ml เพื่อเป็น Starter ทำการ incubate overnight ที่ 37 °C จากนั้นนำ starter นี้ไปเลี้ยงใน LB Broth 750 ml ใน flask ขนาด 2,000 ml ที่มียาปฏิชีวนะ (34 µg/ml chloramphenicol และ 50 µg/ml Kanamycin) ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งวัด OD_{600} ได้ค่าเท่ากับ 0.7 จึงทำการเหนี่ยวนำด้วยการเติม 1 mM IPTG และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 18°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่อยู่ใน flask ทั้งหมด เทใส่หลอด conical tube ขนาด 50 ml ทำการ centrifuge ที่ 8,000 rpm, 4 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำเซลล์ที่ปั่นได้ทั้งหมดเก็บใน -20 °C เพื่อนำไปใช้สำหรับการสกัดโปรตีนต่อไป

3.2.2 การแตกเซลล์แบคทีเรีย (Break cell)

เทคนิคที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกเพื่อนำโปรตีนที่เราต้องการออกมาจะใช้คลื่นความถี่สูงจากเครื่อง Sonicator โดยเริ่มจากเติม Lysis buffer ปริมาณ 30 ml ลงในหลอดทดลองที่มีเซลล์ที่เก็บใน -20 °C จากนั้นนำไป sonication เพื่อ break cell จนเห็นสารใสเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 9,000 rpm,1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการเก็บส่วนใส (supernatant) และนำส่วนใส ไปกรองด้วย filter ขนาด 0.45 µm เพื่อกำจัดเศษเซลล์ที่มีอนุภาคขนาดเล็ก

3.2.3 การสกัดโปรตีนด้วยเทคนิค gel filtration chromatography (Purification gel filtration chromatography by Ni column Hi- trap)

ทำการล้างคอลัมน์ด้วย milliQ water 25 ml โดยใช้อัตราการไหล 2.5 ml/min แล้ว Equilibrate column ด้วย Lysis buffer 25 ml อัตราการไหล 5 ml/min จากนั้นใส่ supernatant ที่ได้จากการ break cell แล้วเก็บสารที่ไหลออกมาทั้งหมด ที่อัตราการไหล 2.5 ml/min แล้วล้างคอลัมน์ด้วย lysis buffer 25 ml ใช้อัตราการไหล 5 ml/min จากนั้นทำการชะ (Elute) โปรตีนด้วย Elution buffer มีความเข้มข้นต่างกัน (25,50,100,250 และ 500 mM imidazole ตามลำดับ) แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทุกๆ fraction แยกกันโดยเก็บประมาณ 25 ml ของแต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย SDS PAGE

3.2.4 เทคนิคการนำเกลือของ imidazole ออกจากโปรตีน (Desalting)

เทคนิคนี้จะคล้ายกับเทคนิคการ Purification gel filtration เริ่มจากล้าง column ด้วย milliQ water 25 ml ใช้อัตราการไหล 2 ml/min แล้ว Equilibrate column ด้วย Lysis buffer 25 ml ใช้อัตรา การไหล 4 ml/min จากนั้น inject protein ทั้งหมดแล้วเก็บสารที่ไหลออกมา ใน Eppendorf tube แล้ว inject Lysis buffer เพื่อเก็บ fraction โดยเก็บครั้งละ 500 µl (ประมาณ 4 ml หรือ 8 fraction ขึ้นอยู่กับปริมาตรโปรตีน) สุดท้ายล้าง column ด้วย Lysis buffer ตามด้วย milliQ water แล้วเก็บคอลัมน์ ใน 20% EtOH จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปวัดความเข้มข้นโดย Nanodrop spectrophotometer

3.2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน และการตรวจสอบการสกัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน และการตรวจสอบการสกัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยในการเตรียมแผ่นเจลจะมีการใช้กระจก 2 แผ่น และใช้หวี (comb) ในการทำให้เจลเกิดช่องว่างสำหรับใส่สาร และเจลประกอบด้วย 12% separating gel และ 5% stacking gel โดยนำส่วน 12% separating gel ใส่ในกระจกที่เตรียมในชุดเตรียมเจล (Vertical slab gel system) ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็ง แล้วใส่ 5% stacking gel ลงไปบน separating gel พร้อมกับใส่หวี (comb) ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็ง จากนั้นนำเจลไปติดตั้งในชุดอุปกรณ์สำหรับรัน SDS-PAGE เพื่อนำมาแยกโปรตีนต่อไป การเตรียมตัวอย่างโปรตีน จะทำโดยผสมโปรตีนที่แบ่งไว้กับ 4X sample loading buffer จากนั้นนำไป heat ที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที และทำการปั่นด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการต่อชุดอุปกรณ์สำหรับ SDS-PAGE และใส่ 1X Running Buffer จากนั้นดูดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder) ลงในหลุมแรกและดูดสารละลายโปรตีนที่เตรียมไว้ลงในหลุมถัดๆไป ต่ออุปกรณ์กับเครื่องกำเนิดที่ไฟฟ้า (Power supply) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 volt เป็นเวลา 30 นาที และ 120 volt เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลออกจากกระจกและนำไปย้อมสี Coomassie Blue 15 นาที ระหว่างการย้อมสีควรเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร

(orbital shaker) จากนั้นล้างสีย้อมด้วย Destaining reagent จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน

3.3 Protein stability test

3.3.1 Heat stability study

นำโปรตีน Vip3A ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบเสถียรภาพการทนต่อความร้อนโดยการนำโปรตีนแบ่งใส่ไว้ใน Eppendorf ปริมาตรที่เท่ากันไปไว้ใน heat box ที่อุณหภูมิ 25°C, 50°C, 75°C และ 100°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็ง และทำการตรวจสอบตัวอย่างโดย SDS-PAGE

3.3.2 UV stability study

นำโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบเสถียรภาพการทนต่อรังสี UV โดยการนำโปรตีนใส่ไว้ใน Eppendorf และนำไปวางไว้ในที่โล่งแจ้ง ที่มีแสงแดดส่องถึงตลอดทั้งวัน จากนั้นทำการแบ่งเก็บโปรตีนปริมาตร 10 µl มาหยุดปฏิกิริยาในตู้ -20°C ที่เวลาต่าง ๆ (0-4 วัน) และทำการตรวจสอบตัวอย่างโดย SDS-PAGE

3.3.3 Protease stability study

นำโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาผสมเข้ากับ Trypsin ในอัตราส่วน proVip3Aa :Trypsin คือ 20:1 (w/w) จากนั้นทำการแบ่งใส่ไว้ใน Eppendorf ละ 20 µl นำไปวางไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และแบ่งวางไว้ในที่โล่งแจ้งที่มีแสงแดดส่องถึงตลอดทั้งวัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำโปรตีนมาหยุดปฏิกิริยาในตู้ -20°C และทำการตรวจสอบตัวอย่างโดย SDS-PAGE

3.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ด้วยเทคนิค Sulforhodamine B colorimetric (SRB) assay

3.4.1 การเตรียมเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ ได้แก่ normal human fibroblast ใน T25 flask ที่มีอาหาร DMEM(1X) + GlutaMAX^{TM}-l (เติม 10% Fetal bovine serum และ 1% penicillin Streptomycin)ปริมาตร 4 ml บ่มในตู้ CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้น seed cell ลงใน 96-well plate ด้วยการ Trypsinized cell โดยนำเซลล์มาล้างด้วย 1x PBS 2 ครั้ง จากนั้นเติม 1x Trypsin ปริมาตร 1ml แล้วนำไปบ่มในตู้ CO_2 เป็นเวลา 3 นาที แล้วเติม media ปริมาตร 1 ml ถ่ายเซลล์ลงใน conical tube ขนาด 15 ml ทำการ centrifuge ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 5 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งแล้วเติม media ปริมาตร 1 ml ทำการ resuspend ให้เข้ากัน จากนั้นนับเซลล์ โดยดูด suspension ปริมาตร 20 µl ผสมกับ Trypan blue ปริมาตร 80 µl ใน Eppendorf ขนาด 1.5 ml จากนั้นดูดเซลล์ที่ย้อมสีแล้วปริมาตร 10 µl หยดลงบน hemocytometer ที่มี cover slide ปิดอยู่ ทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับ 4ช่อง คือช่องบนซ้าย ล่างซ้าย บนขวา และล่างขวา ซึ่งสามารถคำนวณเซลล์ที่มีชีวิตได้จากสูตรที่ 1 จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ final concentration เป็น $5x10^4$ cells/ml โดยคำนวณได้จากสูตรที่ 2 ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 5,000 cells/ml ลงใน 96 well plate โดยดูดเซลล์ที่เตรียมไว้ใส่หลุมละ 100 µl หลังจากนั้นนำเซลล์บ่มในตู้ CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C ,5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมโปรตีน Vip3Aa ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (2 mg/ml, 1 mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31 µg/ml และ 15 µg/ml) ลงไป และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT assay เพื่อดูการตายของเซลล์ต่อไป

<u>สูตรที่ 1</u> จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cells/ml) = $\frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \textbf{dilution factor} \times 10^4}{\text{จำนวนช่องที่นับ}}$

โดยที่ dilution factor = 5 และทำการนับ hemocytometer 4 ช่อง

<u>สูตรที่ 2</u> C1V1 = C2V2

3.4.2 การวัดการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay

เมื่อทำการบ่มเซลล์ด้วยโปรตีนที่ต้องการทดสอบครบเวลาที่กำหนดแล้ว นำ 96 well plate ที่ต้องการทดสอบออกมาจากตู้ CO_2 incubator ทิ้ง supernatant เติม Incomplete media จำนวน 100 µl ทุกหลุม จากนั้นเติม MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml จำนวน 50 µl ทุกหลุม แล้วนำไปบ่มที่ตู้ CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C ,5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูด supernatant ทิ้งแล้วเติม DMSO : Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 µl ลงในไปในแต่ละหลุมแล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 570 nm เพื่อดูอัตราการตายของเซลล์

3.5 Bioassay

ทำการเตรียม 24-well plate ที่มีอาหารหนอน (ประกอบด้วย soybean powder, agar, vitamin, yeast extract) เติมโปรตีน Vip3Aa ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50 µl จากนั้นนำ 24-well plate ไปตากใน fume hood ให้โปรตีนซึมลงไปในอาหารจนกระทั่งผิวหน้าแห้ง นำตัวอ่อนของหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* (Hubner) ใส่ลงไปหลุมละ 1 ตัว และทำการปิดด้วยกระดาษทิชชูตามด้วยฝา well เพื่อป้องกันหนอนข้ามหลุม โดยทดสอบเป็นเวลา 7 วัน และทำการนับการตายของหนอนทุกวัน

3.6 Crystallization screening ด้วยวิธี sitting drop vapor diffusion method

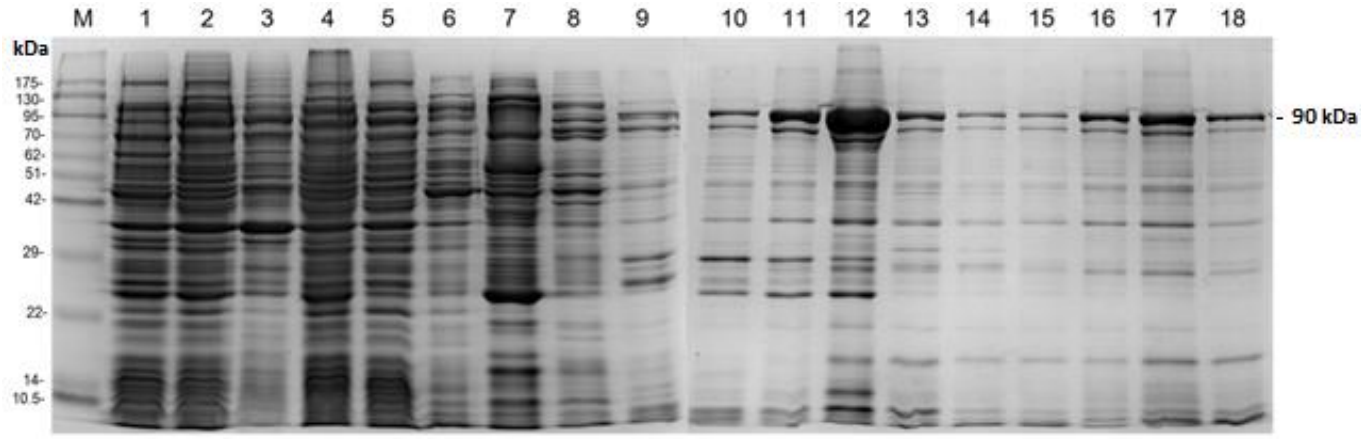
นำโปรตีนที่มีความเข้มข้นมาทำการก่อตกของผลึกด้วยวิธี Sitting drop vapor diffusion method crystallization ด้วยชุด kit จาก Hampton โดยเริ่มจากนำโปรตีนที่มีความเข้มข้น 20-50 mg/ml อย่างน้อย 100 µl มาทำการปั่น 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัดตะกอนส่วนเกิน นำ Crystallization reagent ใส่ลงในช่อง Reservoirs ของ 96 well sitting drop vapor diffusion plate โดยสาร reagent และใส่ Sample ลงในช่องละ 2 µl ดูด Crystallization reagent จากช่อง Reservoirs ใส่ช่องละ 2 µl ทำการปิด 96 well sitting drop vapor diffusion plate ด้วยเทปใส แล้วนำไป incubate ด้วย Cooling incubator ที่อุณหภูมิ 20°C แล้วตรวจสอบการก่อตกของผลึกด้วยกล้อง Stereo microscopy

บทที่ 4
ผลการวิจัย (Results)

4.1 Protein expression and purification

การแสดงออกของโปรตีน Vip3Aa ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ด้วยเทคนิค Large scale expression และการสกัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค Histidine affinity chromatography

การศึกษานี้ได้เลือกโคลนที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน Vip3Aa ในแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3)pLysS ที่มาจาก Stock ที่เก็บไว้ นำมาสังเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Large scale expression โดยนำมาเลี้ยงใน LB Broth ที่มียาปฏิชีวนะ (34 µg/ml chloramphenicol และ 50 µg/ml Kanamycin) ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งวัดค่า OD_{600} ได้ค่าเท่ากับ 0.7 เหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 18°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการแตกเซลล์ด้วยเครื่อง Sonicate และปั่นตกตะกอน กรองด้วย Millipore membrane filter 0.45 µm จะได้ส่วน Pallet และ Supernatant จากนั้นนำส่วน Supernatant มาทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (Protein Purification) ด้วยเทคนิค Histidine affinity chromatography โดยใช้ HiTrap™ Ni column โดย load ลงในคอลัมน์ที่ equilibrate ด้วย lysis buffer และล้างคอลัมน์ด้วย lysis buffer อีกครั้ง จากนั้นทำการชะ (Elute) โปรตีนด้วย Elution buffer ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (25,50,100,250 และ 500 mM imidazole) แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทุกๆ fraction ปริมาตร 5 เท่าของ column volume หรือประมาณ 25 ml เพื่อให้ได้โปรตีนบริสุทธิ์(purified protein) มาวิเคราะห์ขนาดด้วย 12% SDS-PAGE พบว่าโปรตีน Vip3Aa ถูกชะออกมาที่ 250 mM imidazole โดยพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 90 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับ protein ladder marker (ดังที่แสดงในภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 การแสดงออกของโปรตีน Vip3Aa และผลการสกัดแยกโปรตีน Vip3Aa ขนาด 90 kDa ให้บริสุทธิ์ด้วย เทคนิค Histidine affinity chromatography โดยตรวจสอบด้วย 12% SDS-PAGE เมื่อเปรียบเทียบกับ Protein Ladder marker

Lane M: Marker

Lane 1: Cells before induce

Lane 2: Cells after induce

Lane 3: Pellet

Lane 4: Soluble

Lane 5: Flow through

Lane 6: Wash lysis buffer

Lane 7: Eluted 25 mM Imidazole

Lane 8: Eluted 50 mM Imidazole

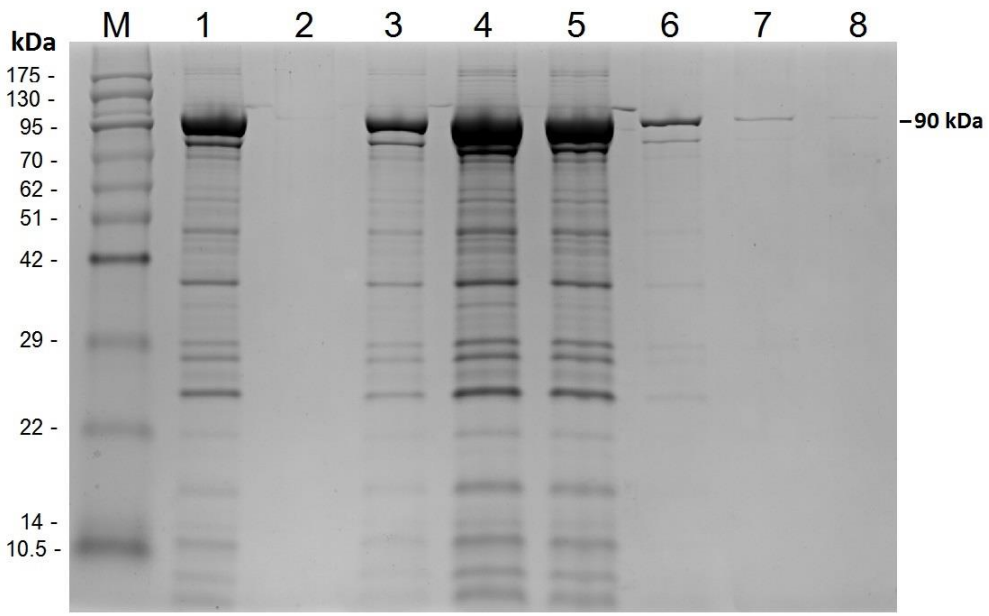
Lane 9: Eluted 100 mM Imidazole

Lane 10-14: Eluted 250 mM Imidazole fraction 1-5

Lane 15-18: Eluted 500 mM Imidazole fraction 1-4

4.2 การกำจัดเกลือของ imidazole ออกจากโปรตีน Vip3Aa ที่ทำให้บริสุทธิ์ ด้วย HiTrap™ Desalting column

เมื่อได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ด้วยการสกัดแยกโปรตีนด้วย เทคนิค Histidine affinity chromatography แล้ว นำแต่ละ fraction ที่มีโปรตีนมารวมกันเพื่อนำไป concentrate โปรตีนด้วยการปั่นกรองลดปริมาณด้วยการผ่าน membrane (Millipore, Amicon® Ultra 15 mL) ให้ได้โปรตีนบริสุทธิ์ที่ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 1.5 ml นำโปรตีนมาทำการกำจัดเกลือของ imidazole ออกจากโปรตีนด้วย HiTrap™ Desalting column โดยการใช้คอลัมน์ร่วมกับไซริงค์ (manual) โดยสารที่จะนำมาใช้ทุกตัวจะต้องผ่านการกรองผ่าน membrane 0.45 µM จากนั้น Equilibrate คอลัมน์ด้วย lysis buffer ใส่โปรตีนที่ต้องการกำจัดเกลือออก และเก็บ Flow through ทั้งหมด จากนั้น inject lysis buffer เพื่อเก็บแต่ละ fraction ครั้งละ 500 µl และทำการตรวจสอบตัวอย่างโดย 12% SDS-PAGE จากผลจะพบว่าโปรตีนถูกชะ (Elute) ออกมาได้ตั้งแต่ fraction ที่ 1 จนอาจถึง fraction ที่ 4 หรือ 5 แล้วแต่ปริมาณของโปรตีนที่ inject เข้าไป โดยจะพบแถบโปรตีน Vip3Aa ที่ขนาด 90 kDa (ดังที่แสดงในภาพที่ 4-2) เมื่อทำการ desalt เสร็จแล้ว จะนำโปรตีนไปวัดความเข้มข้น และนำโปรตีนไปเก็บที่ -20 °C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4-2 12% SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีน Vip3Aa ขนาด 90 kDa หลังผ่าน Desalting column เมื่อเทียบกับ Protein ladder marker

Lane M: Marker

Lane 1: Protein before desalt

Lane 2: Flow through

Lane 3: Eluted fraction 1

Lane 4: Eluted fraction 2

Lane 5: Eluted fraction 3

Lane 6: Eluted fraction 4

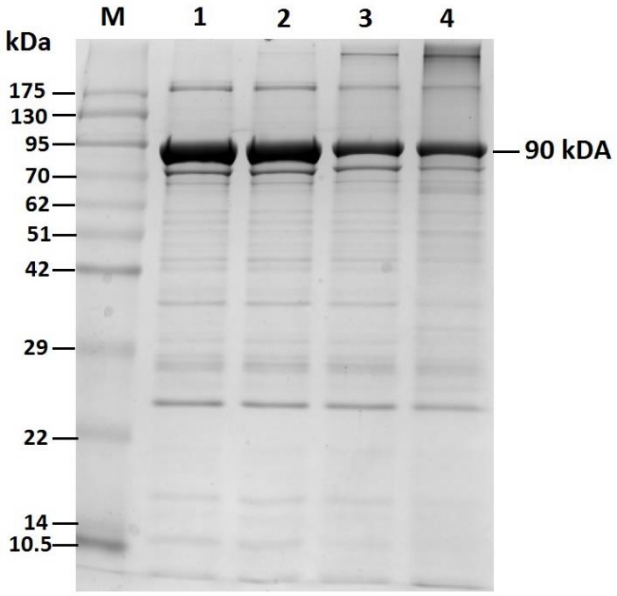
Lane 7: Eluted fraction 5

Lane 8: Eluted fraction 6

4.3 การทดสอบเสถียรภาพของโปรตีน Vip3Aa

4.3.1 Heat stability

นำโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์และทำการกำจัดเกลือออกแล้ว มาทดสอบเสถียรภาพการทนต่อความร้อนโดยการนำไปไว้ใน heat box ที่อุณหภูมิ 25°C, 50°C, 75°C และ 100°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็ง ตรวจสอบตัวอย่างโดย 12% SDS-PAGE ผลพบว่าที่อุณหภูมิ 75°C และ 100°C โปรตีนเริ่มมีการเสียสภาพโดยสังเกตได้จากแบนขนาด 90 kDa มีขนาดที่เล็กลงเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 25°C และ 50°C (ดังที่แสดงในภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-3 แสดงผลโปรตีน Vip3Aa ที่อยู่ในอุณหภูมิ 25°C, 50°C, 75°C และ 100°C เป็นเวลา 60 นาที โดยตรวจสอบด้วย 12% SDS-PAGE

Lane M: Marker

Lane 1: Vip3Aa ที่อุณหภูมิ 25°C

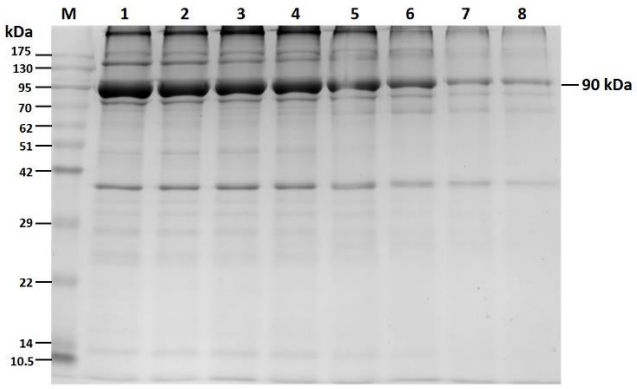
Lane 2: Vip3Aa ที่อุณหภูมิ 50°C

Lane 3: Vip3Aa ที่อุณหภูมิ 75°C

Lane 4: Vip3Aa ที่อุณหภูมิ 100°C

4.3.2 UV stability

นำโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์และทำการกำจัดเกลือออกแล้ว มาทดสอบเสถียรภาพการทนต่อรังสี UV โดยการนำโปรตีนใส่ไว้ใน micro tube และนำไปวางไว้ในที่โล่งแจ้ง ที่มีแสงแดดส่องถึงตลอดทั้งวัน จากนั้นทำการแบ่งเก็บโปรตีนปริมาตร 10 µl มาหยุดปฏิกิริยาใน -20°C ที่เวลาต่างๆ และตรวจสอบตัวอย่างโดย 12% SDS-PAGE พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน โปรตีนเริ่มมีการเสียสภาพโดยสังเกตได้จากแบนขนาด 90 kDa มีขนาดที่เล็กลงเมื่อเทียบกับช่วงเวลาก่อนหน้า (ดังที่แสดงในภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-4 แสดงผลโปรตีน Vip3Aa ที่โดนแสงแดดเป็นเวลา 4 วัน โดยตรวจสอบด้วย 12% SDS-PAGE

Lane M: Marker

Lane 1: เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที

Lane 2: เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง

Lane 3: เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง

Lane 4: เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง

Lane 5: เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน

Lane 6: เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน

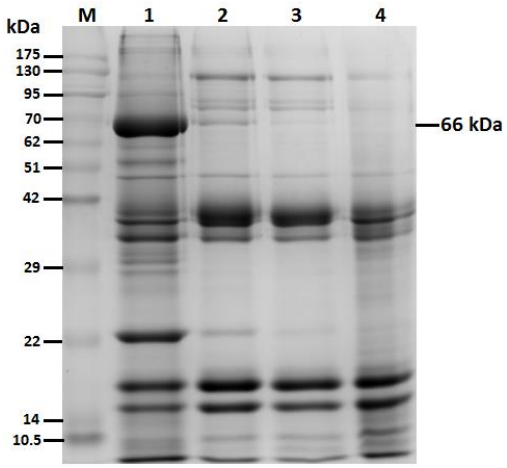
Lane 7: เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน

Lane 8: เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน

4.3.3 Protease stability

นำโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์และทำการกำจัดเกลือออกแล้ว มาผสมเข้ากับ Trypsin ในอัตราส่วน โปรตีน 20 ต่อ Trypsin 1 จากนั้นทำการแบ่งใส่ไว้ใน micro tube ละ 20 µl นำไปวางไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และแบ่งวางไว้ในที่โล่งแจ้งที่มีแสงแดดส่องถึงตลอดทั้งวัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำโปรตีนมา

หยุดปฏิกิริยาใน -20°C ที่เวลาต่างๆ และตรวจสอบตัวอย่างโดย 12% SDS-PAGE พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน โปรตีนในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C มีการเสียสภาพโดยสังเกตได้จากไม่พบแบนขนาด 66 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับ 1 ชั่วโมง (ดังที่แสดงในภาพที่ 4-5) แต่เมื่อเทียบกับโปรตีนที่วางไว้ในที่ที่มีแสงแดดส่องถึงพบว่า โปรตีนมีการเสียสภาพที่น้อยกว่าอาจเนื่องมาจากการที่ Trypsin ถูกทำลายด้วยรังสีUV โดยสังเกตได้จากพบแบนขนาด 66 kDa เมื่อเวลาผ่านไป 1 ถึง 2 วัน และโปรตีนเริ่มมีการเสียสภาพ(ดังที่แสดงในภาพที่ 4-6)



ภาพที่ 4-5 แสดงผลโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกตัดด้วย Trypsin และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน โดยตรวจสอบด้วย 12% SDS-PAGE

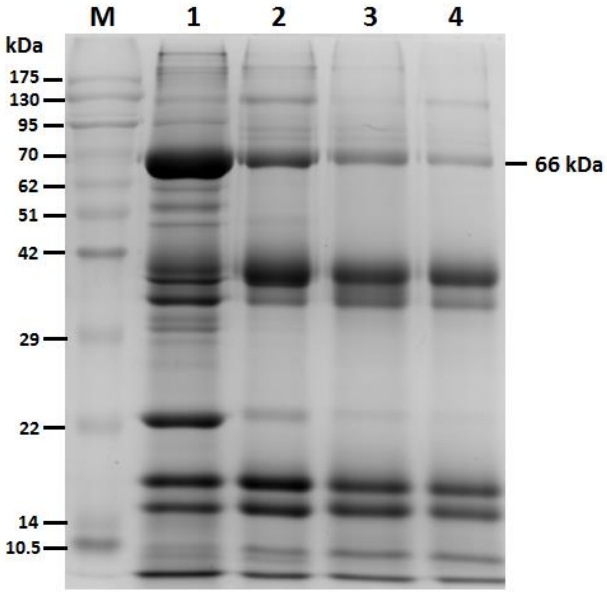
Lane M: Marker

Lane 1: เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง

Lane 2: เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน

Lane 3: เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน

Lane 4: เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน



ภาพที่ 4-6 แสดงผลโปรตีน Vip3Aa ที่ถูกตัดด้วย Trypsin และวางไว้ในที่ที่มีแสงแดดเป็นเวลาเป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบด้วย 12% SDS-PAGE

Lane M: Marker

Lane 1: เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง

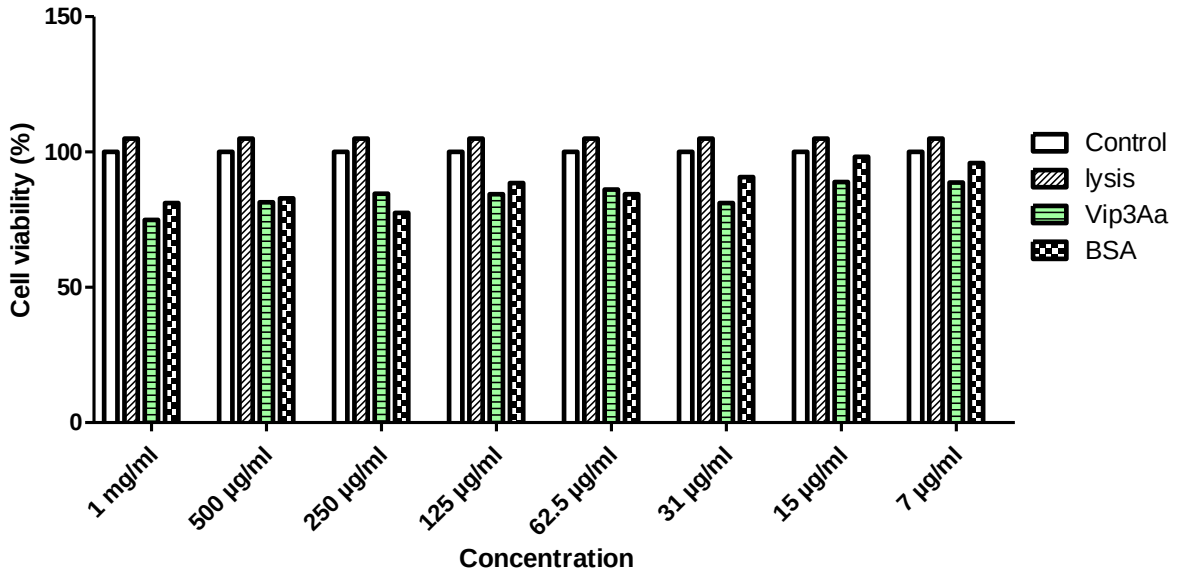
Lane 2: เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน

Lane 3: เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน

Lane 4: เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน

4.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ ได้แก่ normal human fibroblast ใน T25 flask ที่มีอาหาร DMEM(1X) + GlutaMAX^{TM}-l (เติม 10% Fetal bovine serum และ 1% penicillin Streptomycin)ปริมาตร 4 ml บ่มในตู้ CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้น seed cell ลงใน 96-well plate โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 5,000 cells/ml ต่อหลุม หลังจากนั้นนำเซลล์บ่มในตู้ CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C ,5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมโปรตีน Vip3Aa ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (2 mg/ml, 1 mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31 µg/ml และ 15 µg/ml) ลงไป และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT assay เพื่อดูการตายของเซลล์



ภาพที่ 4-7 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ของ Vip3A

4.5 Protein crystallization screening

จากการนำโปรตีน Vip3A ที่มีความเข้มข้น 10 mg/ml มาทำการก่อตกของผลึกโดยใช้ Robot เทคนิค Sitting drop vapor diffusion method crystallization ด้วยชุด kit จาก Qiagen พบว่า ไม่เกิดการตกของผลึกของโปรตีน จากสภาวะที่ใช้ทั้งหมด 500 condition

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

แบคทีเรียบีที (*Bacillus thuringiensis*, Bt) เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างโปรตีนสารพิษฆ่าหนอนแมลง (insecticidal crystal proteins, ICPs) หรือ โปรตีนในกลุ่ม Cry toxin ซึ่งผลิตในช่วงของการสร้างสปอร์ ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางสำหรับความสามารถในการควบคุมแมลงศัตรูพืชซึ่งปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ถัดมาเมื่อมีการค้นพบ Vegetative insecticidal proteins หรือ Vip ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียบีทีในช่วงของการเจริญเติบโตปกติซึ่งมีความสามารถในการฆ่าหนอนแมลงได้ จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาส่งเสริมหรือทดแทนการใช้ผลึกโปรตีนสารพิษฆ่าแมลงชนิดโปรตีน Cry เพียงอย่างเดียว โดยโปรตีนสารพิษในกลุ่ม Vip ที่น่าสนใจตัวหนึ่งคือ Vip3A ซึ่งมีความสามารถในการฆ่าหนอนแมลงศัตรูพืช ในอันดับ Lepidoptera ที่มีความสำคัญต่อพืชเศรษฐกิจไทย งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความปลอดภัยของโปรตีนสารพิษ Vip3A เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โดยงานวิจัยนี้เริ่มจากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน Vip3Aa ตามลำดับนิวคลีโอไทล์ใน GenBank GU733921 Bacillus thuringiensis strain M190 Vip190 gene, complete cds ในแบคทีเรียแกรมลบ ชนิด *E.coli* BL21(DE3) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตง่ายและสามารถกระตุ้นให้สร้างโปรตีนได้ในปริมาณมาก งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตโปรตีน Vip3A โดยพบว่าโปรตีนมีการหลั่งออกมาสู่ media จำนวนหนึ่ง และเป็นโปรตีนในรูปแบบที่ละลายน้ำได้อยู่ภายใน *E. coli* cells และไม่มีพิษต่อเซลล์เจ้าบ้านที่นำมาผลิตโปรตีน จากนั้นโปรตีนถูกสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ Histidine affinity chromatography พบว่าสามารถได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 90 kDa ซึ่งตรวจกับขนาดที่ได้คำนวณไว้จากจำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 789 ตัว จากนั้น Immidazole ถูกกำจัดออกโดยใช้ desalting column เพื่อลดการรบกวนเมื่อนำไปทำการทดสอบต่อไป พบว่าโปรตีน Vip3A ที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์สูงถึง 90% จากนั้นความคงคนของโปรตีนจะถูกทดสอบโดยนำไปให้ความร้อน แสง UV และความคงทนต่อเอนไซม์ trypsin จากการทดลองพบว่า โปรตีนสารพิษ Vip3A ถูกสลายได้ด้วยความร้อน แสง UV และเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโปรตีนสารพิษ Vip3A ไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมดังนั้นหากนำไปใช้จริงจะไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ โดยทดสอบกับเซลล์มนุษย์ปกติชนิด fibroblast พบว่า Vip3A ไม่ทำให้เซลล์ตายเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้เติมโปรตีนสารพิษ จากการทดสอบนี้ สรุปได้ว่า Vip3A ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษากับเซลล์มนุษย์อื่น ๆ เพิ่มเติมและทำการทดสอบความเป็นพิษแบบ in vivo ในสัตว์ทดลองต่อไป

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

1. งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตโปรตีนสารพิษชนิด Vip3A แบบรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรียแกรมลบ แต่เนื่องจากการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการมีราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สูง หากต้องการผลิตเพื่อนำไปใช้ประโยชน์จริงต้องมีการศึกษาหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนต่อไป

2. โปรตีน Vip3A ที่ผลิตได้ออกฤทธิ์เฉพาะต่อหนอนแมลงศัตรูพืช จึงไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียที่ใช้ผลิตโปรตีน และไม่พบว่าความเป็นต่อเซลล์ มนุษย์ จึงปลอดภัยหากนำไปใช้งานจริง

3. โปรตีน Vip3A สามารถถูกสลายได้ด้วยความร้อน แสง UV และเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ดังนั้น โปรตีนสารพิษ Vip3A จึงไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมหากนำไปใช้ประโยชน์จริง

4. จากผลการทดลองทั้งหมดเป็นการทำในระบบห้องปฏิบัติการแบบ *In vitro* หากจะนำไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีข้อมูลในสิ่งมีชีวิต หรือต้องทำการทดลองแบบ *In vivo* ต่อไป

ผลผลิต (Output)

1. นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา 1 คน เตรียมสอบจบ

2. การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมระดับนานาชาติ ในงาน 2nd Asia Pacific workshop and conference on molecular medicine ที่จะจัดขึ้นที่ประเทศไต้หวัน ในเดือนมิถุนายน

3. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ความปลอดภัยของโปรตีน Vip3A ในวารสารระดับชาติ ถึงนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Bechtel, D. B., & Bulla, L. A., Jr. (1976). Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J Bacteriol, 127(3), 1472-1481.
2. Bel, Y., Jakubowska, A. K., Costa, J., Herrero, S., & Escriche, B. (2013). Comprehensive analysis of gene expression profiles of the beet armyworm *Spodoptera exigua* larvae challenged with *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin. PLoS One, 8(12), e81927. doi:10.1371/journal.pone.0081927
3. Bulla, L. A., Jr., Bechtel, D. B., Kramer, K. J., Shethna, Y. I., Aronson, A. I., & Fitz-James, P. C. (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. Crit Rev Microbiol, 8(2), 147-204. doi:10.3109/10408418009081124
4. Butko, P. (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. Appl Environ Microbiol, 69(5), 2415-2422. doi:10.1128/aem.69.5.2415-2422.2003
5. Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., & Ferre, J. (2016). Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 80(2), 329-350. doi:10.1128/MMBR.00060-15
6. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D.,Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev, 62(3), 807-813.
7. Da Silva, K. F., Spencer, T. A., Camargo Gil, C., Siegfried, B. D., & Walters, F. S. (2016). Impact of *Spodoptera frugiperda* neonate pretreatment conditions on Vip3Aa19 insecticidal protein activity and laboratory bioassay variation. Pest Manag Sci, 72(4), 837-844. doi:10.1002/ps.4175
8. Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., & Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(11), 5389-5394. doi:10.1073/pnas.93.11.5389
9. Guerchicoff, A., Delecluse, A., & Rubinstein, C. P. (2001). The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. Appl Environ Microbiol, 67(3), 1090-1096. doi:10.1128/AEM.67.3.1090-1096.2001

10. Hernandez-Martinez P, Hernandez-Rodriguez CS, Rie JV, Escriche B & Ferre J (2013) Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. J Invertebr Pathol 113: 78-81.
11. Jurat-Fuentes JL, Gould FL, Adang MJ. Dual resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. Appl Environ Microbiol. 2003;69(10):5898-906.
12. Lamanna C, Jones L. 1963. Lethality for Mice of Vegetative and Spore Forms of *Bacillus Cereus* and *Bacillus Cereus*-Like Insect Pathogens Injected Intraperitoneally and Subcutaneously. J. Bacteriol. 85: 532–535.
13. Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N & Chen JS (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. Appl Environ Microbiol 69: 4648-4657.
14. Milne R, Liu Y, Gauthier D & van Frankenhuyzen K (2008) Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (*Lepidoptera*). J Invertebr Pathol 99: 166-172.
15. Melo, A. L., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. Crit Rev Biotechnol, 36(2), 317-326. doi:10.3109/07388551.2014.960793
16. Osman, G., Already, R., Assaeedi, A., Organji, S., El-Ghareeb, D., Abulreesh, H., & Althubiani, A. (2015). Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 25, 271-288.
17. Palma, L., Munoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins (Basel), 6(12), 3296-3325. doi:10.3390/toxins6123296
18. Pardo-Lopez, L., Soberon, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev, 37(1), 3-22. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x
19. Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiology Reviews, 37(1), 3-22. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x

20. Sansinenea, E. (2012). Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*. In (pp. 3-18).
21. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., . . . Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev, 62(3), 775-806.
22. Shi, Y., Xu, W., Yuan, M., Tang, M., Chen, J., & Pang, Y. (2004). Expression of vip1/vip2 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. J Appl Microbiol, 97(4), 757-765. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02365.x
23. Song, F., Chen, C., Wu, S., Shao, E., Li, M., Guan, X., & Huang, Z. (2016). Transcriptional profiling analysis of *Spodoptera litura* larvae challenged with Vip3Aa toxin and possible involvement of trypsin in the toxin activation. Sci Rep, 6, 23861. doi:10.1038/srep23861
24. Schepf E, Crickmore, N. Van Rie, J. Lereclus, D. Baum, J. Feitelson, J. Zeigler, D.R. & Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crytal proteins. . Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806.
25. Sjoblad RD, McClintock JT, Engler R. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. Regul. Toxicol. Pharmacol. 15: 3–9.
26. Selvapandiyan A, Arora N, Rajagopal R, Jalali SK, Venkatesan T, Singh SP, et al. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. 2001;67(12):5855-8.
27. Tabashnik, B. E. (2015). ABCs of Insect Resistance to Bt. PLoS Genet, 11(11), e1005646. doi:10.1371/journal.pgen.1005646
28. Tabashnik, B. E., & Carriere, Y. (2017). Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. Nat Biotechnol, 35(10), 926-935. doi:10.1038/nbt.3974
29. Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. J Invertebr Pathol, 111(1), 1-12. doi:10.1016/j.jip.2012.05.001
30. Tsai SF, Wang LJ, Wang SC. 1997. Clearance and effects of intratracheal instillation to spores of *Bacillus thuringiensis* or Metarhizium anisopliae in rats. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 23: 515–522.
31. Yu, C. G., Mullins, M. A., Warren, G. W., Koziel, M. G., & Estruch, J. J. (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl Environ Microbiol, 63(2), 532-536.

ภาคผนวก

ส่วนประกอบตอนท้าย

(1) รายงานการเงิน (ตามแบบฟอร์ม) โดยลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ 2562
รหัสโครงการ
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
ชื่อมหาวิทยาลัย.....มหาวิทยาลัยบูรพา.....

ชื่อโครงการ.....**การประเมินความปลอดภัยของโปรตีน Vip3Aa.....**

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย (~~ศ.~~ /~~รศ.~~ /~~ผศ.~~ /ดร. /~~อ.~~) .....กนกพร ศรีสุจริตพานิช.....

ระยะเวลาดำเนินการ จำนวน .....1.....ปี...6.....เดือน

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	งบประมาณรวมทั้งโครงการ (บาท)	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน) (บาท)	ร้อยละที่ใช้ในโครงการ
1. งบดำเนินการ : ค่าตอบแทน	50,000	50,000	0	9%
2. งบดำเนินการ : ค่าใช้สอย	180,000	(รวม 134,100)	45,900	26%
- ค่าจ้างเหมาเพาะเลี้ยงเซลล์ (12 เดือน)		120,000		
- ค่าพิมพ์โปสเตอร์		500		
- ค่าใช้บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์		2,000		
- ค่าเดินทางดำเนินงานวิจัยศูนย์เครื่องมือศาลายา นครปฐม 2 ครั้ง		2,000		
- ค่าเดินทางและที่พักเดินทางไปซินโครตรอน นครราชสีมา 2 ครั้ง		9,600		
3. งบดำเนินการ : ค่าวัสดุ 1) ค่าวัสดุสำนักงาน 2) ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	237,640	283,540	- 45,900	55%

- ชุดสกัด DNA - PCR reagent - ค่าสังเคราะห์ Primer - antibiotic - bacterial culture media - ค่าสารเคมี - ค่า cell line - อาหารเลี้ยงเซลล์ - ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์สิ้นเปลืองอื่น ๆ				
4. งบดำเนินการ : ค่าสาธารณูปโภค	51,960	51,960	0	10%
5. งบลงทุน : ครุภัณฑ์	0	0	0	0
รวม	519,600	519,600	0	0

<u>จำนวนงบประมาณที่ได้รับ</u>

- งวดที่ 1 จำนวน .....259,800.00.....บาท เมื่อ .....30 ก.ย. 2561.....
- งวดที่ 2 จำนวน .....207,840.00.....บาท เมื่อ .....พ.ค.2562.....
- งวดที่ 3 จำนวน .....51,960.....บาท เมื่อ .....

รวม .....519,600.....บาท

....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

วันที่..... วันที่.....