การค้นหาและตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ในเบื้องต้นของโปรตีนออกฤทธิ์ ด้วยวิธีโพลีอะคลิลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

นางสาวนิสสา ตาติดอิน
นางสาวยุวดี ตันตินุกูล

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2552

RAPID SCREENING FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BIOACTIVE PROTEIN BY POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

MISS NISSA TATIDIN
MISS YUWADEE TANTINUKUL

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ

เรื่อง การค้นหาและตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในเบื้องต้นของโปรตีนออกฤทธิ์ ด้วยวิธีโพลีอะคลิลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

.....

(นางสาวนิสสา ตาติดอิน)

.....

(นางสาวยุวดี ตันตินุกูล)

.....

(อ.จิระพรรณ จิตติคุณ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(ผศ. วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ
การค้นหาและตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในเบื้องต้นของโปรตีนออกฤทธิ์ ด้วยวิธีโพลีอะคลิลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

นิสสา ตาติดอิน, ยุวดี ตันตินุกูล

อาจารย์ที่ปรึกษา : จิระพรรณ จิตติคุณ*, วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์*

*ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ : โพลีอะคลิลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส, ไลโซซัยม์, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธีการตรวจสอบโดยตรงจากโพลีอะคลิลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส (PAGE) ซึ่งการทดลองนี้ได้ใช้ไลโซซัยม์จากไข่ขาวของไก่เป็นโปรตีนต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากไลโซซัยม์มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียแกรมบวก โดยออกฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ส่วน peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนนอกสุดของผนังเซลล์เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก จากการศึกษาพบว่า ไลโซซัยม์มีความสามารถในการละลายสูงสุดในโพแทสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 7.5) ที่ความเข้มข้น 600 μg/μl และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* ATCC 6633) และแกรมลบ (*E. coil* ATCC 25922) ที่ความเข้มข้นของเชื้อ $1x10^7$ CFU/ml โดยใช้ไลโซซัยม์ความเข้มข้นต่างๆ (1, 4, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 300 และ 600 μg/μl) ด้วยวิธี disc diffusion และ agar well diffusion พบว่าไลโซซัยม์ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดด้วยวิธี disc diffusion แต่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกด้วยวิธี agar well diffusion ที่ความเข้มข้น 300 และ 600 μg/μl ด้วยขนาด clear zone 8.47 ± 0.5 และ 11.91 ± 0.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำไลโซซัยม์มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี PAGE ชนิด native-PAGE ที่ pH 7.5 พบว่ามีเพียงไลโซซัยม์ความเข้มข้น 600 μg/μl เท่านั้น ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ด้วยขนาด clear zone ที่ได้มีความสูง 12.44 ± 2.3 มิลลิเมตร แต่เมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. coli* พบว่าไม่มีความเข้มข้นใดเลยที่เกิด clear zone ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิคการตรวจหาโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธีการตรวจสอบโดยตรงจาก PAGE เป็นวิธีที่สามารถช่วยค้นหาและตรวจสอบฤทธิ์ในเบื้องต้นของโปรตีนออกฤทธิ์ได้ แม้เทคนิคนี้อาจมีความไวต่ำ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบได้อย่างสะดวกรวดเร็ว และมีราคาไม่สูง อันจะนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการค้นหาโปรตีนออกฤทธิ์จากวัตถุดิบทางธรรมชาติอื่นๆ ต่อไป

Abstract

Rapid screening for antibacterial activity of bioactive protein by polyacrylamide gel electrophoresis

Nissa Tatidin, Yuwadee Tantinukul

Project advisor : Jiraphun Jittikoon*, Wichet Leelamanit*

*Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword : Polyacrylamide gel electrophoresis, Lysozyme, Antibacterial activity

The aim of this project is to develop the rapid screening of antibacterial protein by using directly detection in polyacrylamide gel electophoresis (PAGE) technique. Lysozyme from chicken egg white was used to be a model since it has long been known that it acts as an antibacterial protein especially for anti-gram positive bacteria because it could break down the outer membrane of bacteria cell wall by destroying the peptidoglycan. The maximum solubility of lysozyme in potassium phosphate buffer (pH 7.5) is 600 μg/μl. The antibacterial activities of lysozyme were measured as a function of lysozyme concentration at 1, 4, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 300 and 600 μg/μl by using disc diffusion and agar well diffusion techniques performed with $1x10^7$ CFU/ml of bacteria cultures. For disc diffusion method, lysozyme could not inhibit neither gram positive bacteria (*B. subtilis* ATCC 6633) nor gram negative bacteria (*E. coil* ATCC 25922) at all concentrations. For agar well diffusion method, lysozyme could inhibit only gram positive bacteria at two concentrations (300 and 600 μg/μl) giving rise to clear bacterial-free zones around the well with 8.47 ± 0.5 mm and 11.91 ± 0.4 mm, respectively. In addition, the antibacterial activity of lysozyme was also performed by directly detection in PAGE (native-PAGE, pH7.5). Likewise, it could effect to only *B. subtilis* at only the highest concentration of lysozyme (600 μg/μl) with clear zone 12.44 ± 2.3 mm. In conclusion, the directly detection of bioactive protein by PAGE could be used for rapid screening for antibacterial activity as demonstrated by lysozyme. Although it is a low sensitivity method, however it is faster and cheaper than the others for screening bioactive protein from natural sources.