

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2

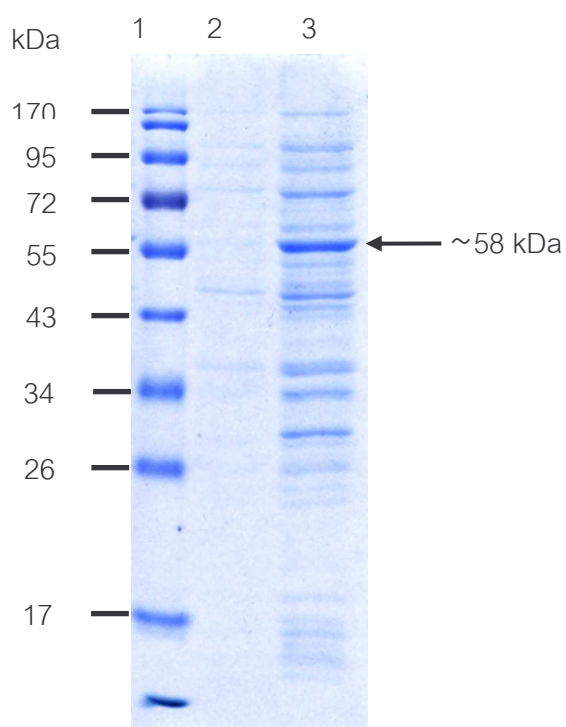
4.1.1 ผลการวิเคราะห์การชักนำให้แบคทีเรีย *E. coli* JM109 มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 โดยสาร Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ภายหลังจากการเตรียมแบคทีเรียตัวเริ่มต้น (starter) โดยการทำให้โคลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGEX-tMtx2 มีการเจริญในอาหารเหลว LB medium ที่ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (rpm) และทำการเลี้ยง 0.1% ของปริมาณแบคทีเรียตัวเริ่มต้น ภายในขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุอาหารเหลว LB medium ที่ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 μ g/ml โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเข้าสู่ระยะ mid-Log phase จึงได้ทำการเติมสาร IPTG (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1mM) เพื่อชักนำให้แบคทีเรียมีการเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน GST-tMtx2 จากนั้นจึงทำการเลี้ยงแบคทีเรีย ที่อุณหภูมิ 25 °C ความเร็วรอบ 200 rpm โดยใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ไม่ถูกชักนำ และ ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 ด้วยสาร IPTG มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลีอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

ผลจากการวิเคราะห์แบคทีเรีย *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pGEX-tMtx2 ที่ไม่ถูกชักนำ และ ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 ด้วยสาร IPTG ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แสดงในภาพที่ 10 ซึ่งพบว่า แบคทีเรียที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 จะพบแถบของโปรตีน GST-tMtx2 ขนาดประมาณ 58 kDa อย่างชัดเจน (ภาพที่ 10 (Lane ที่ 3)) ในขณะที่แบคทีเรียที่ไม่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 จะไม่พบแถบของโปรตีนดังกล่าว (ภาพที่ 10 (Lane ที่ 2))

ภาพที่ 10

ผลการวิเคราะห์แบคทีเรีย *E. coli* JM109+pGEX-tMtx2 ที่ไม่ได้รับและได้รับการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 ด้วยสาร IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วย 12% SDS-PAGE ถูกแสดงแถบโปรตีน GST-tMtx2 ขนาดประมาณ 58 kDa



Lane ที่ 1 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2 = แบคทีเรีย *E. coli* JM109+pGEX-tMtx2 ที่ไม่ได้รับการชักนำด้วยสาร IPTG

Lane ที่ 3 = แบคทีเรีย *E. coli* JM109+pGEX-tMtx2 ที่ได้รับการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 ด้วยสาร IPTG

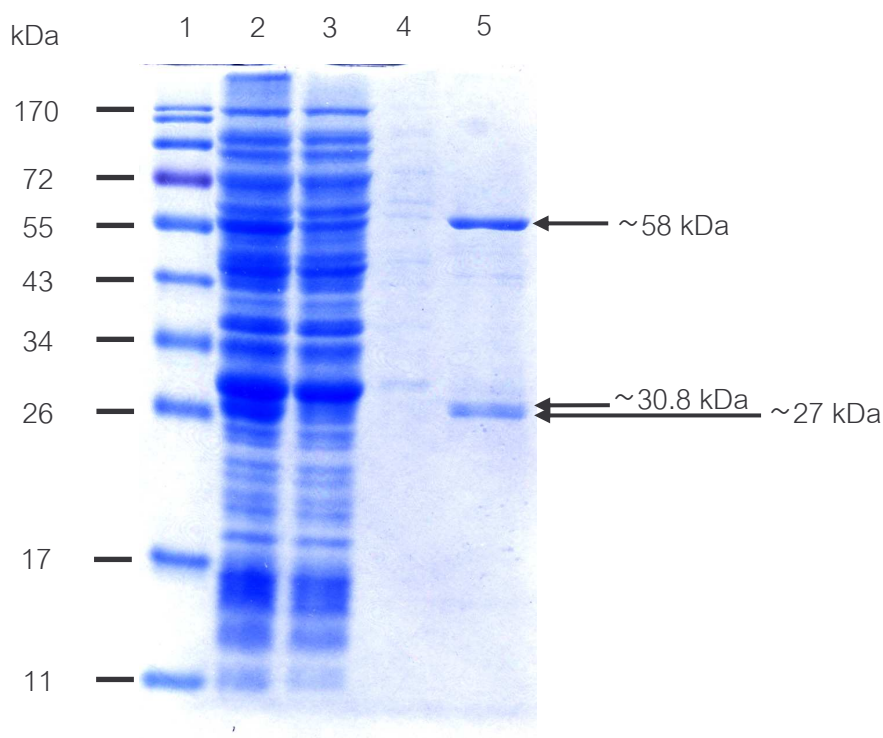
4.1.2 ผลการวิเคราะห์การสกัดแยกโปรตีน GST-tMt2 บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ภายหลังจากการแยกโปรตีน GST-tMt2 ออกจากสารสกัดโปรตีนทั้งหมดจากแบคทีเรีย *E. coli* JM109+pGEX-tMt2 ด้วยคอลัมน์ GSTrap™ FF โดยใช้คุณสมบัติการจับกันระหว่างโมเลกุลโปรตีน GST และ Glutathione (GSH) แมทริกซ์ ภายในคอลัมน์ ซึ่งจะทำให้โปรตีน GST-tMt2 ถูกแยกออกจากโปรตีนชนิดอื่นจากการสังเคราะห์ของแบคทีเรียได้อย่างบริสุทธิ์ สารสกัดที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการสกัดแยกโปรตีน GST-tMt2 บริสุทธิ์ จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลีอะครีลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

ผลจากการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 11 แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน GST-tMt2 ด้วยคอลัมน์ GSTrap™ FF สามารถสกัดแยกโปรตีน GST-tMt2 บริสุทธิ์ออกจากโปรตีนชนิดอื่นได้ ดังแสดงในภาพที่ 11 (Lane ที่ 5) จะพบแถบของโปรตีน GST-tMt2 บริสุทธิ์ ที่มีขนาดประมาณ 58 kDa อย่างไรก็ตามยังมีการพบแถบของโปรตีนจำนวน 2 แถบ ที่มีขนาดอยู่ระหว่างโปรตีนเครื่องหมายขนาด 26-34 kDa ดังแสดงในภาพที่ 11 (Lane ที่ 5) ซึ่งภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามด้วยการติดตามโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot พบว่าแถบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าคือ แถบของโปรตีน tMt2 ในขณะที่แถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าคือ แถบของโปรตีน GST ที่มีขนาดประมาณ 30.8 และ 27 kDa ตามลำดับ (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่โปรตีน GST และโปรตีน tMt2 สามารถแยกออกจากกันได้ แม้ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการตัดโปรตีน GST ด้วยเอนไซม์ทรอมบิน

ภาพที่ 11

ผลการวิเคราะห์โปรตีนแต่ละส่วนจากขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน GST-tMtx2 บริสุทธิ์ ด้วย 12% SDS-PAGE ลูกศรแสดงแถบโปรตีน GST-tMtx2 โปรตีน tMtx2 และโปรตีน GST ที่มีขนาดประมาณ 58 30.8 และ 27 kDa ตามลำดับ



Lane ที่ 1 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2 = สารละลายโปรตีนที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM109+pGEX-tMtx2

Lane ที่ 3 = สารละลายโปรตีนที่ไม่สามารถจับกับ Glutathione (GSH) แมทริกซ์ ในขั้นตอนการ Binding

Lane ที่ 4 = สารละลายโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ในขั้นตอนการ Washing

Lane ที่ 5 = สารละลายโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย Glutathione ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.0 ในขั้นตอนการ Elution

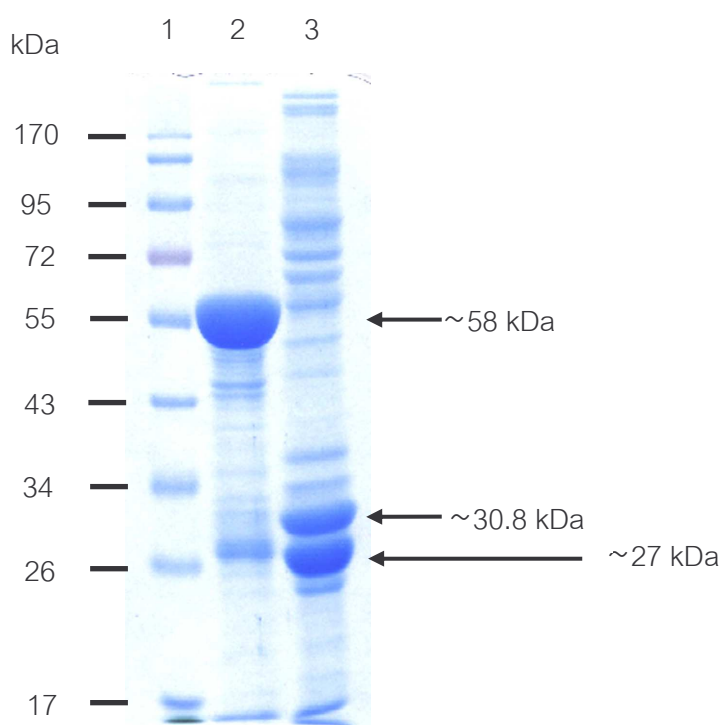
4.1.3 ผลการวิเคราะห์การย่อยโปรตีน GST-tMtx2 ด้วยเอนไซม์ทรอมบิน (Thrombin) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ภายหลังจากการสกัดแยกโปรตีน GST-tMtx2 บริสุทธิ์ โปรตีน GST ซึ่งเป็นโปรตีนติดตาม (tag protein) จะถูกตัดออกจากโปรตีน tMtx2 โดยการเติมเอนไซม์ทรอมบิน (Thrombin) (10U/mg protein) ลงไปในสารสกัดโปรตีน GST-tMtx2 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 22-25 °C เป็นเวลา 2-16 ชั่วโมง โดยโปรตีน GST-tMtx2 บริสุทธิ์ และโปรตีน GST-tMtx2 ที่ผ่านขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ทรอมบินจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจโลฟิลอะครีลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

ผลการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 12 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน GST-tMtx2 ที่ถูกนำมาผ่านขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ทรอมบิน มีผลทำให้โปรตีน GST และ โปรตีน tMtx2 จะถูกตัดแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 12 (Lane ที่ 3)) ในขณะที่โปรตีน GST-tMtx2 บริสุทธิ์ที่ไม่ผ่านขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวจะยังคงมีแถบของโปรตีน GST-tMtx2 ที่มีขนาดประมาณ 58 kDa (ภาพที่ 12 (Lane ที่ 2)) อย่างไรก็ตามจากภาพที่ 12 (Lane ที่ 3) จะเห็นแถบของโปรตีนจำนวนมากที่นอกเหนือจากแถบโปรตีนหลัก (major band) ของโปรตีน GST และ โปรตีน tMtx2 ซึ่งอาจเป็นแถบของโปรตีน GST และ โปรตีน tMtx2 ที่เกิดจากการที่โมเลกุลเดี่ยวของโปรตีน GST มีการจับกันด้วยจำนวนโมเลกุลต่างๆกัน ซึ่งจะเห็นแถบโปรตีนขนาดบางที่มีขนาดระหว่าง 26 ถึง 170 kDa เนื่องจากโปรตีน GST เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มที่จะจับกันเป็นไดเมอร์ ซึ่งการจับกันดังกล่าวของโปรตีน GST อาจเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE นอกจากนี้แถบโปรตีนที่มีขนาดบางที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 17-26 kDa อาจเป็นแถบของโปรตีน GST ที่เกิดการถูกตัดโครงสร้างบางส่วน (degradation) ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างเช่นกัน ในขณะที่แถบโปรตีนขนาดบางที่มีขนาดระหว่าง 26 ถึง 170 kDa เป็นแถบของโปรตีน tMtx2 ปะปนอยู่ด้วย เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีน tMtx2 สามารถจับกันเป็นโอลิโกเมอร์ได้ ซึ่งเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot และติดตามด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนสารพิษ Mtx2 จะพบแถบของโปรตีน tMtx2 ที่มีขนาดระหว่าง 26-170 kDa (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งเกิดจากการที่โปรตีน tMtx2 มีความสามารถในการจับกันจำนวนหลายโมเลกุลกลายเป็นโอลิโกเมอร์ ซึ่งสามารถมองเห็นแถบของโปรตีน tMtx2 ที่มีขนาดต่างๆกัน

ภาพที่ 12

ผลการวิเคราะห์โปรตีน GST-tMtx2 บริสุทธิ์ และโปรตีน GST-tMtx2 ที่ผ่านขั้นตอน
การถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทรมบิน ด้วย 12% SDS-PAGE ลูกศรแสดง
แถบโปรตีน GST-tMtx2 โปรตีน tMtx2 และโปรตีน GST ที่มี
ขนาดประมาณ 58 30.8 และ 27 kDa ตามลำดับ



Lane ที่ 1 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2 = โปรตีน GST-tMtx2 บริสุทธิ์

Lane ที่ 3 = โปรตีน GST-tMtx2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทรมบิน

4.1.4 ผลการวิเคราะห์การสกัดแยกโปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค

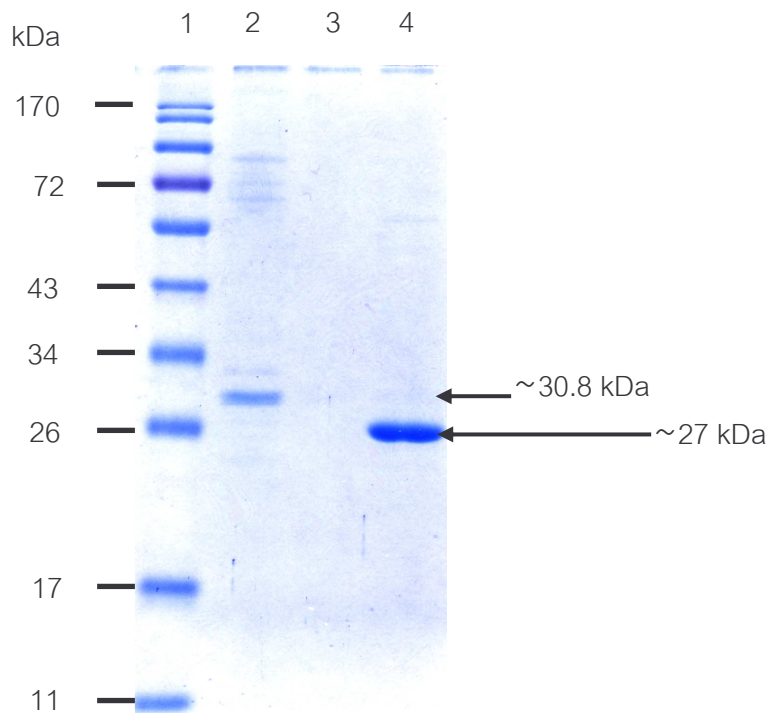
Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ภายหลังจากการนำสารสกัดโปรตีน GST-tMtx2 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ทอร์มบินไปผ่านขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ GSTrap FF อีกครั้ง ซึ่งจะทำให้มีเพียงโปรตีน GST เท่านั้นที่ถูกตรึงอยู่กับแมทริกซ์ภายในคอลัมน์ ในขณะที่โปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์จะถูกชะออกจากคอลัมน์ หลังจากนั้นได้ทำการแยกโปรตีน GST ออกจากคอลัมน์โดยการผ่านสารละลาย reduced-GSH ไปยังภายในคอลัมน์ ซึ่งจะทำให้โปรตีน GST ถูกชะออกจากคอลัมน์เช่นกัน โดยสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการสกัดแยกโปรตีน โปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลีอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

ผลการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 13 จากการสกัดแยกโปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ GSTrap™ FF สามารถสกัดแยกโปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ได้ โดยจะพบแถบของโปรตีน tMtx2 ขนาดประมาณ 30.8 kDa ดังแสดงในภาพที่ 13 (Lane ที่ 2) ในขณะที่โปรตีน GST จะถูกแยกออกจากคอลัมน์โดยจะพบแถบของโปรตีน GST ขนาดประมาณ 27 kDa ในสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งคือโปรตีน GST ที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์ในภายหลัง ดังแสดงในภาพที่ 13 (Lane ที่ 4) นอกจากนี้ยังพบแถบของโปรตีน tMtx2 ที่มีการจับกันเป็นโอลิโกเมอร์ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 13 (Lane ที่ 3))

ภาพที่ 13

ผลการวิเคราะห์โปรตีนแต่ละส่วนจากขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน tMt2 บริสุทธิ์ ด้วย
12% SDS-PAGE ถูกแสดงแถบโปรตีน tMt2 และโปรตีน GST ที่มี
ขนาดประมาณ 30.8 และ 27 kDa ตามลำดับ



Lane ที่ 1 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2 = สารละลายโปรตีนจากขั้นตอนการ Binding

Lane ที่ 3 = สารละลายโปรตีนจากขั้นตอนการ Washing

Lane ที่ 4 = สารละลายโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย Glutathione
ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.0 ในขั้นตอนการ Elution

4.2 การวิเคราะห์โปรตีนจาก Brush Border Membrane Fraction (BBMF) ของลูกน้ำยุง

4.2.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างจากขั้นตอนการเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

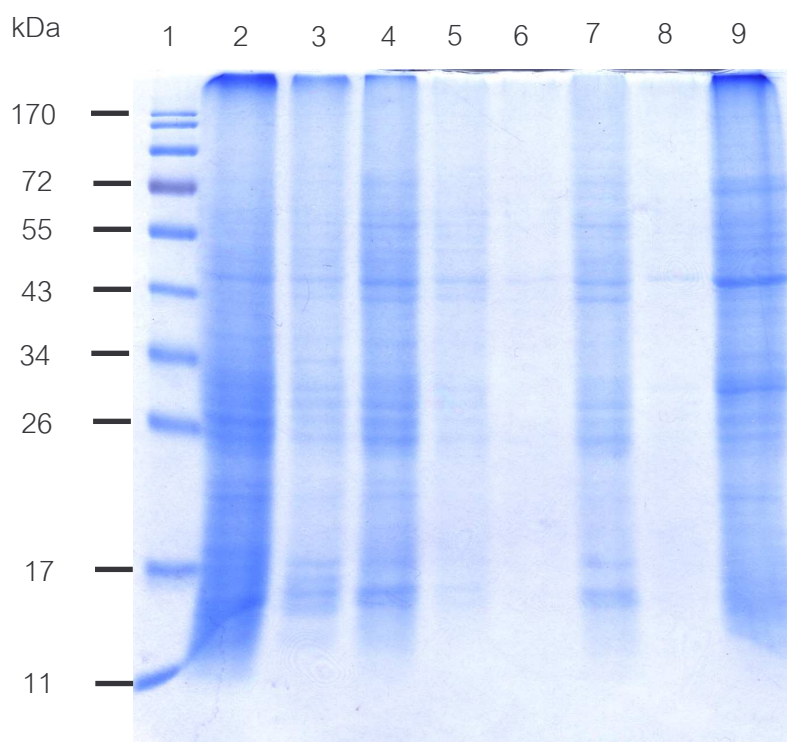
จากขั้นตอนการเตรียม Brush border membrane fraction (BBMF) ของลูกน้ำยุง จะได้สารละลายโปรตีนแต่ละส่วนจากการเตรียมแต่ละขั้นตอนทั้งในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ $MgCl_2$ ($MgCl_2$ precipitation) และการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างๆ (differential centrifugation) จนกระทั่งถึงขั้นตอนสุดท้ายซึ่งจะได้ BBMF ที่ต้องการ โดยสารละลายโปรตีนแต่ละส่วนจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลฟอสโฟรีลอะครีลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250 โดยผลการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 14

ผลจากการวิเคราะห์โปรตีนจาก BBMF ดังแสดงในภาพที่ 14 (Lane ที่ 9) จะเห็นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆกัน โดยส่วนใหญ่แถบโปรตีนจะมีลักษณะเป็น smear ซึ่งเป็นแถบโปรตีนที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในการเตรียมแต่ละครั้งจะใช้ลูกน้ำยุงน้ำหนัก 1.5 g (น้ำหนักสด) ซึ่งในขั้นตอนสุดท้ายจะได้ BBMF 100 μ l โดยมีความเข้มข้นของโปรตีนจาก BBMF ประมาณ 0.5-1 μ g/ μ l อย่างไรก็ตามในการเตรียม BBMF แต่ละครั้งสำหรับในแต่ละการทดลองจะให้รูปแบบของแถบโปรตีนที่มีลักษณะเหมือนกัน

ภาพที่ 14

ผลการวิเคราะห์สารละลายโปรตีนแต่ละส่วนจากขั้นตอน

การเตรียม BBMF ด้วย 12% SDS-PAGE



Lane ที่ 1 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2 = ส่วนใส S0 (supernatant) จากการบดครั้งที่ 1, บั่นเหวี่ยงที่ 1,000 x g

Lane ที่ 3 = ส่วนใส S'0 จากการบด P0 และบั่นเหวี่ยงที่ 1,000 x g

Lane ที่ 4 = ส่วนใส S1 จากการตกตะกอน S0+S'0 ด้วย $MgCl_2$ และบั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g

Lane ที่ 5 = ส่วนใส S'1 ที่ได้จากการทำซ้ำขั้นตอนการตกตะกอน ครั้งที่ 1

Lane ที่ 6 = ส่วนใส S''1 ที่ได้จากการทำซ้ำขั้นตอนการตกตะกอน ครั้งที่ 2

Lane ที่ 7 = ส่วนใส S2 ที่ได้จากการบั่นเหวี่ยง S1+S'1+S''1 ที่ 80,000 x g

Lane ที่ 8 = ส่วนใส S3 ที่จะนำไปบั่นเหวี่ยงที่ 80,000 x g เพื่อให้ได้ตะกอนของ BBMF

Lane ที่ 9 = ตะกอน P4 ซึ่งคือ BBMF

4.2.2 การตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot

ภายหลังจากการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จึงทำการวิเคราะห์หาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot ซึ่งภายหลังจากการแยกโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF บนเจลโพลีอะครีลาไมด์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โปรตีนดังกล่าวจะถูกถ่ายโอนลงแผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อทำการติดตามหาโปรตีนที่สามารถจับกับโปรตีน tMtx2 ได้ โดยการบ่มโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยโปรตีน tMtx2 แอนติบอดีลำดับที่หนึ่ง (Anti-Mtx2) และแอนติบอดีลำดับที่สอง (Goat-Anti-Rabbit IgG (Alkaline phosphatase conjugate)) ตามลำดับ ภายหลังจากการเติมสับสเตรตสำหรับเอนไซม์ Alkaline phosphatase จึงทำการตรวจผล

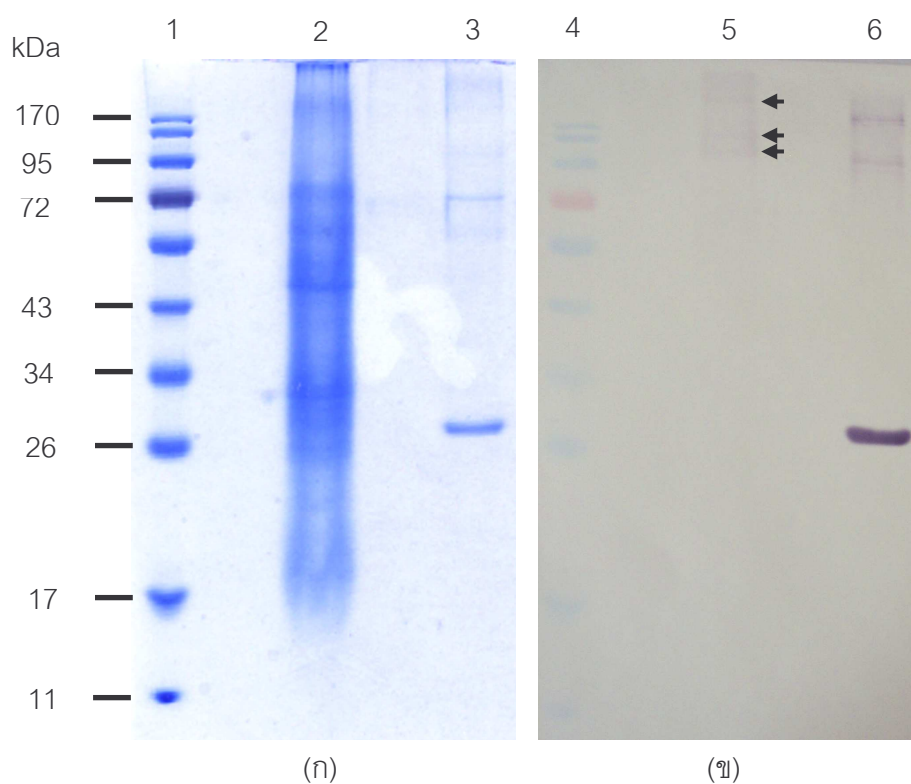
ผลจากการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ที่สามารถจับได้กับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot ดังแสดงในภาพที่ 15 ซึ่งพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 100 140 และ 200 kDa ที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ที่มีความสามารถในการจับได้กับโปรตีน tMtx2 (ภาพที่ 15 (Lane ที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีน tMtx2 (ภาพที่ 15 (Lane ที่ 6) ที่เกิดจากการติดตามโปรตีน tMtx2 ซึ่งเป็น positive (+) control

อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองนี้ได้ถูกตรวจสอบโดยการทำการทดลองซ้ำ โดยได้ทำการทดลองซึ่งกำหนดให้โปรตีน tMtx2 เป็น negative (-) control กล่าวคือในขั้นตอนการตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot จะไม่มีขั้นตอนการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยโปรตีน tMtx2 เพื่อเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้น

ผลจากการติดตามโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF จากลูกน้ำยุงโดยมีโปรตีน tMtx2 เป็น negative (-) control พบว่าให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลที่ได้จากการติดตามโปรตีนด้วยการทำ Western blot ในขั้นตอนปกติ กล่าวคือ สามารถตรวจพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 100 140 และ 200 kDa ดังแสดงในภาพที่ 16 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแถบโปรตีนทั้งสามแถบที่ตรวจพบนั้นไม่ใช่แถบโปรตีนที่เกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีนดังกล่าวกับโปรตีน tMtx2 อย่างแท้จริง

ภาพที่ 15

ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก) และการ
 ตรวจหาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ที่มีความสามารถในการจับกับ
 โปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค Western blot (ข) ลูกศรแสดงแถบ
 โปรตีนที่ตรวจพบจากการทำ Western blot



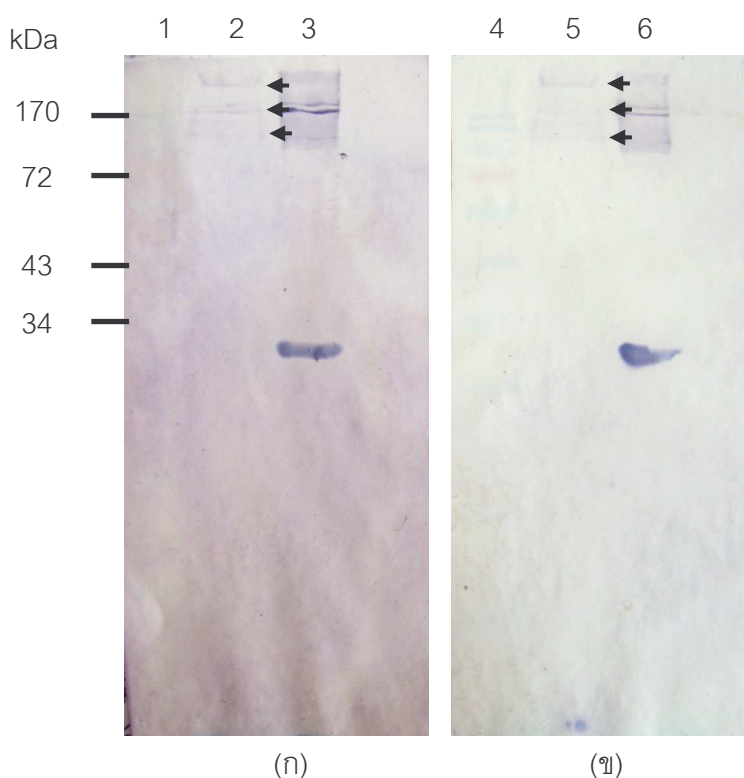
Lane ที่ 1, 4 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2, 5 = โปรตีนจาก BBMF ของลูกน้ำยุง

Lane ที่ 3, 6 = โปรตีน tMt2

ภาพที่ 16

ผลการตรวจหาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ที่มีความสามารถในการจับกับ
โปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot ในขั้นตอนปกติ (ก) เปรียบเทียบ
กับการทดลองที่มีโปรตีน tMtx2 เป็น negative (-) control ลูกศร
แสดงแถบโปรตีนที่ตรวจพบจากการทำ Western blot



Lane ที่ 1, 4 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2, 5 = โปรตีนจาก BBMF ของลูกน้ำยุง

Lane ที่ 3, 6 = โปรตีน tMtx2

นอกจากนี้ผู้ศึกษาได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนจาก BBMF ด้วยเทคนิค Dot blot ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างโปรตีน ซึ่งขั้นตอนในการวิเคราะห์เริ่มจากการจุด (dot) โปรตีนจาก BBMF จำนวน 3 จุด ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยแต่ละจุดจะมีความเข้มข้นของโปรตีนจาก BBMF แตกต่างกัน จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western

blot โดยแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะไม่ถูกบ่มด้วยโปรตีน tMtx2 หรือแม้แต่แอนติบอดีใดๆ (กำหนดให้โปรตีน tMtx2 แอนติบอดี Anti-Mtx2 และแอนติบอดี Goat anti-Rabbit IgG เป็น negative (-) control) แต่จะถูกบ่มด้วยสารผสมระหว่าง BCIP/NBT ในสารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอนเนต ซึ่งสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ผลจากการวิเคราะห์พบสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสกับสารตั้งต้นที่จำเพาะ โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นมีความแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนจาก BBMF ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 17

ภาพที่ 17

ผลการวิเคราะห์โปรตีนจาก BBMF ด้วยเทคนิค Dot blot และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค

Western blot โดยกำหนดให้โปรตีน tMtx2 แอนติบอดี Anti-Mtx2

และแอนติบอดี Goat anti-Rabbit IgG

เป็น negative (-) control



Dot ที่ 1: โปรตีนจาก BBMF ที่ไม่ได้ทำการเจือจาง

Dot ที่ 2: โปรตีนจาก BBMF ที่ทำการเจือจาง 10 เท่า

Dot ที่ 3: โปรตีนจาก BBMF ที่ทำการเจือจาง 100 เท่า

จากผลการทดลองในขั้นตอนนี้แสดงให้เห็นว่าผลที่ตรวจพบไม่ได้เกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีน tMtx2 กับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF แต่อย่างใด ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันผลการตรวจหาโปรตีนจาก BBMF ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot ได้ว่าแถบโปรตีนทั้งสามแถบที่ตรวจพบนั้นไม่ใช่แถบโปรตีนที่เกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีนดังกล่าวกับโปรตีน tMtx2 อย่างแท้จริง

4.3 การวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36

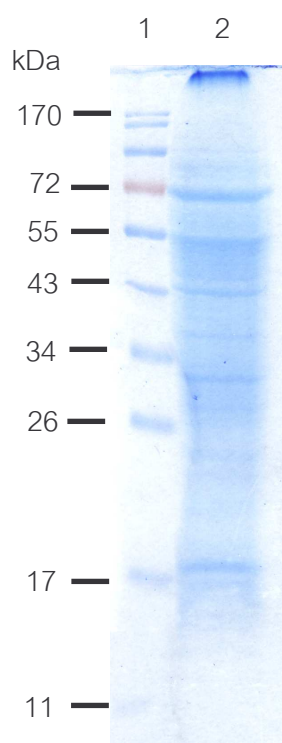
4.3.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 มีการเจริญและเพิ่มจำนวนมากขึ้น เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกแยกออกจากขวดเลี้ยงและเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง ตะกอนของเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องสลายผนังเซลล์โดยเสียงความถี่สูง และทำการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด (total protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง C6/36 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลีอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 แสดงดังภาพที่ 18 จะเห็นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆกัน โดยแถบโปรตีนส่วนใหญ่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามในการเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละครั้งสำหรับในแต่ละการทดลองจะให้รูปแบบของแถบโปรตีนที่มีลักษณะเหมือนกัน โดยแถบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบดังกล่าวจะถูกทำการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt_x2 ในขั้นตอนต่อไป

ภาพที่ 18

ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด (total protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยง
ลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ด้วย 12% SDS-PAGE



Lane ที่ 1 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2 = โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36

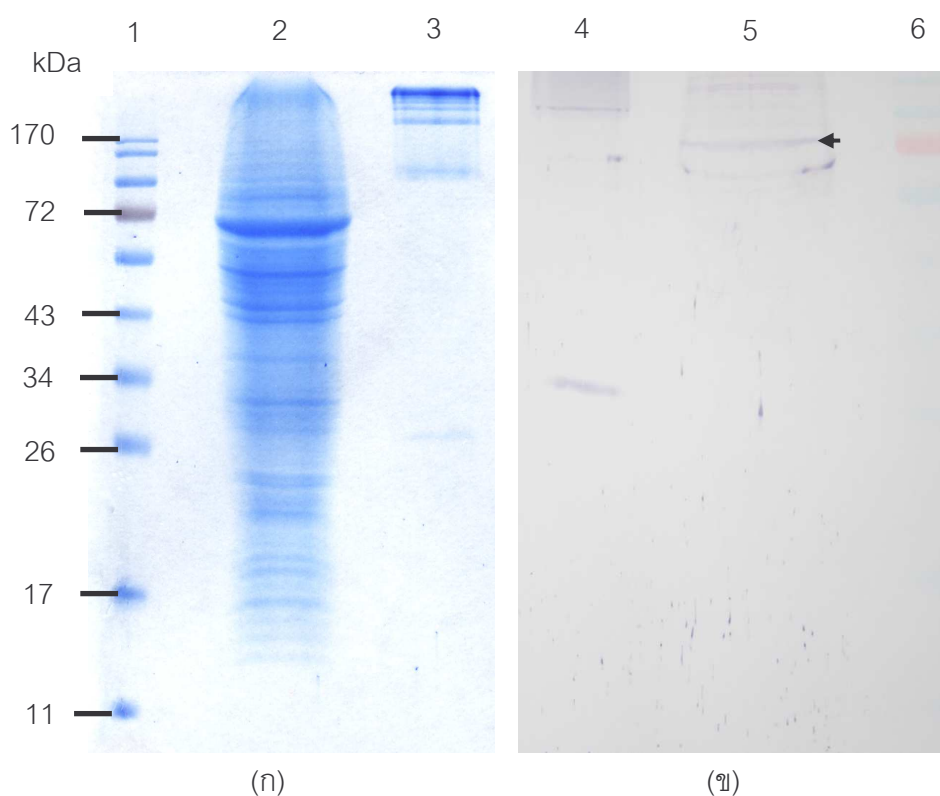
4.3.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot

ภายหลังจากการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย *Aedes albopictus* C6/36 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นจึงทำการถ่ายโอนโปรตีนบนเจลโพลีอะครีลาไมด์ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อทำการติดตามหาโปรตีนเป็นองค์ประกอบจากเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot โดยการบ่มโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยโปรตีน tMtx2 แอนติบอดีลำดับที่หนึ่ง (Anti-Mtx2) และแอนติบอดีลำดับที่สอง (Alkaline phosphatase conjugated-Goat anti Rabbit-IgG) ตามลำดับ จากนั้นจึงเติมสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ alkaline phosphatase และทำการตรวจผล

ผลจากการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงที่สามารถจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot แสดงในภาพที่ 19 ซึ่งพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 75 kDa ที่เป็นองค์ประกอบจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีน tMtx2 (ภาพที่ 19 (Lane ที่ 4) ที่เกิดจากการติดตามโปรตีน tMtx2 ซึ่งเป็น positive (+) control

ภาพที่ 19

ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt_x2 ด้วยเทคนิค Western blot (ข) ลูกศรแสดงแถบโปรตีนที่ตรวจพบจากการทำ Western blot



Lane ที่ 1, 6 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2, 5 = โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36

Lane ที่ 3, 4 = โปรตีน tMt_x2

4.3.3 ผลการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) โปรตีนจากองค์ประกอบภายในเซลล์ (cytosolic protein) และโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt_x2 ด้วยเทคนิค Western blot

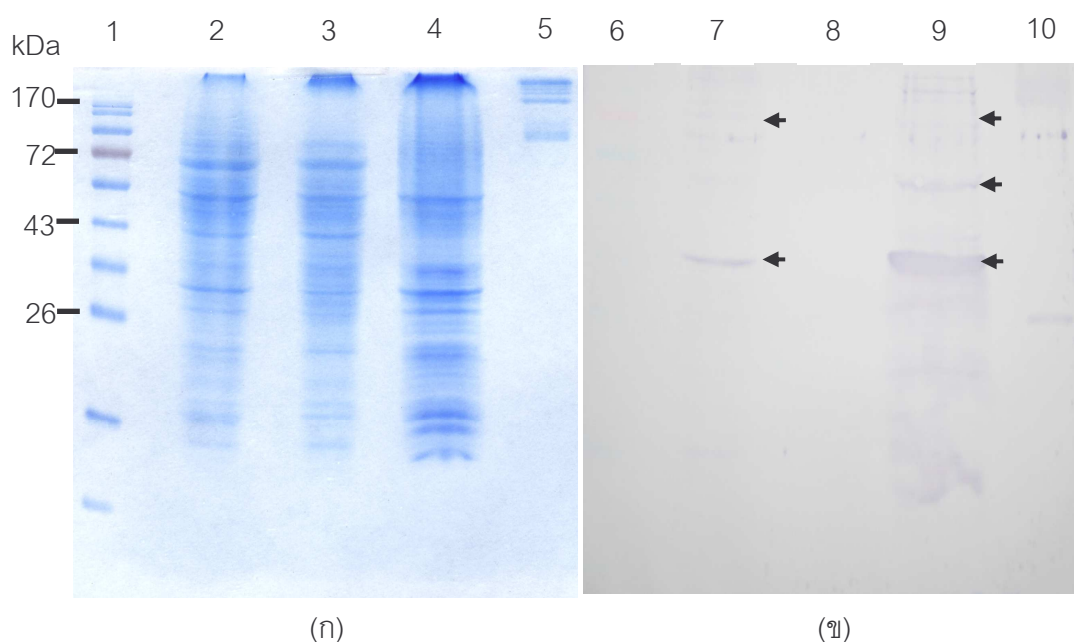
ภายหลังจากการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 แตก โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนตะกอนและส่วนใส ซึ่งคือโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) และ โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ (cytosolic protein) ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot เพื่อติดตามโปรตีนที่มีความสามารถจับกับโปรตีน tMt_x2

ผลจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามโปรตีนสามารถจับกับโปรตีน tMt_x2 ด้วยเทคนิค Western blot แสดงในภาพที่ 20 จากผลการทดลองพบแถบโปรตีนหลัก (major band) ขนาดประมาณ 35 และ 75 kDa ที่สามารถจับกับโปรตีน tMt_x2 โดยพบในตัวอย่างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด (total protein) และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) (ภาพที่ 20 (Lane ที่ 7 และ Lane ที่ 9) นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 45 kDa ที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt_x2 (ภาพที่ 20 (Lane ที่ 9) ในขณะที่ตัวอย่างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ (cytosolic protein) ไม่พบว่ามีโปรตีนใดๆที่สามารถจับกับโปรตีน tMt_x2 ได้ ดังแสดงในภาพที่ 20 (ข) อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ยังพบว่าแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 75 kDa ซึ่งติดตามได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ เป็นเพียงแถบโปรตีนขนาดบาง โดยอาจเป็นไปได้ว่าแถบโปรตีนขนาดประมาณ 35 และ 45 kDa อาจเป็นผลจากการถูกย่อย (degradation) ของโปรตีนขนาดประมาณ 75 kDa

ผลที่ได้จากการทดลองนี้เป็นผลการทดลองที่ให้ข้อมูลที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นการแสดงให้เห็นว่าโปรตีนขนาดประมาณ 75 kDa ที่มีความสามารถจับกับโปรตีน tMt_x2 เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการมีอยู่ของโปรตีนตัวรับที่จำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษที่มีอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย

ภาพที่ 20

ผลการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) โปรตีนที่ละลายอยู่ในเซลล์ (cytosolic protein) และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt_x2 ด้วยเทคนิค Western blot (ข) ลูกศรแสดงแถบโปรตีนที่ตรวจพบจากการทำ Western blot



Lane ที่ 1, 6 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2, 7 = โปรตีนทั้งหมด (total protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36

Lane ที่ 3, 8 = โปรตีนที่ละลายอยู่ในเซลล์ (cytosolic protein)

Lane ที่ 4, 9 = โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein)

Lane ที่ 5, 10 = โปรตีน tMt₂

4.3.4 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtX2 ด้วยเทคนิค Western blot

ภายหลังจากการตรวจสอบและยืนยันจากการทดลองก่อนหน้านี้แล้วว่า แถบของโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtX2 นั้น เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นไปตามลักษณะของการมีอยู่ของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับที่จำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษ อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้เป็นการทดลองซ้ำจากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยจะทำการวิเคราะห์เพียงโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) เท่านั้น

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนของโปรตีนขนาดประมาณ 75 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย *Aedes albopictus* C6/36 ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtX2 ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ ดังแสดงผลในภาพที่ 21

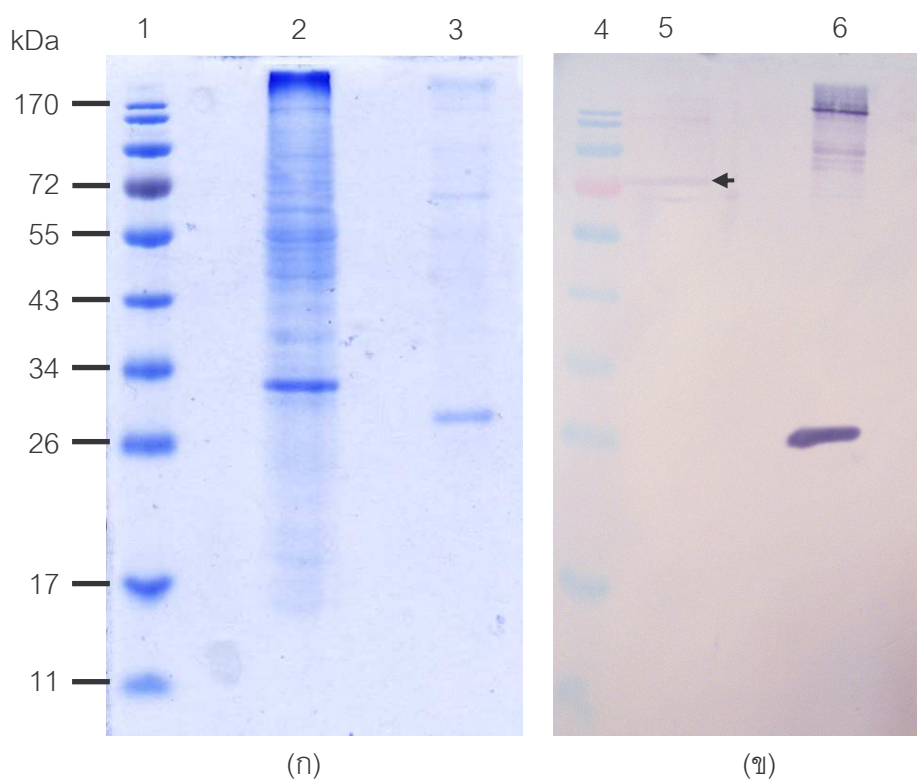
ภาพที่ 21

ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก)

และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt_x2 ด้วย

เทคนิค Western blot (ข) ลูกศรแสดงแถบโปรตีนที่ตรวจ

พบจากการทำ Western blot



Lane ที่ 1, 4 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2, 5 = โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36

Lane ที่ 3, 6 = โปรตีน tMt_x2

อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองนี้ได้ถูกตรวจสอบโดยการทำการทดลองซ้ำ โดยได้ทำการทดลองซึ่งกำหนดให้โปรตีน tMtx2 แอนติบอดี Anti-Mtx2 แอนติบอดี Goat Anti-Rabbit IgG เป็น negative (-) control ซึ่งมีความหมายดังนี้

การทดลองที่กำหนดให้โปรตีน tMtx2 เป็น negative (-) control หมายถึง ในระบบการตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot นั้น จะไม่มีการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยโปรตีน tMtx2

การทดลองที่กำหนดให้แอนติบอดี Anti-Mtx2 เป็น negative (-) control หมายถึง ในระบบการตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot นั้น จะไม่มีการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยแอนติบอดี Anti-Mtx2

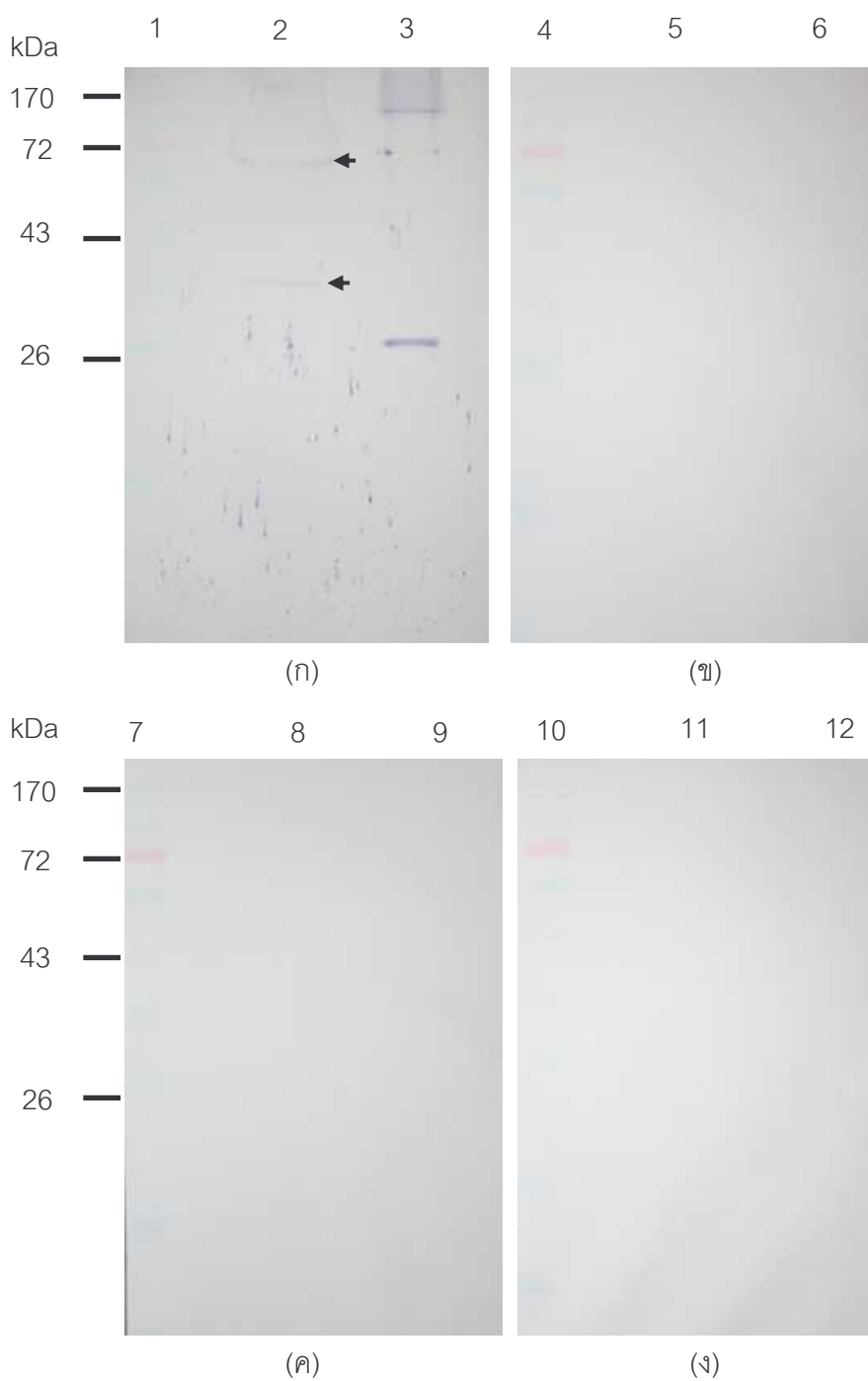
การทดลองที่กำหนดให้แอนติบอดี Goat Anti-Rabbit IgG เป็น negative (-) control หมายถึง ในระบบการตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot นั้น จะไม่มีการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยแอนติบอดี Goat Anti-Rabbit IgG

การทดลองที่กำหนดให้แอนติบอดี Anti-Mtx2 และ แอนติบอดี Goat Anti-Rabbit IgG เป็น negative (-) control หมายถึง ในระบบการตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot นั้น จะไม่มีการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยแอนติบอดี Anti-Mtx2 และ แอนติบอดี Goat Anti-Rabbit IgG

หลังจากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้น ซึ่งผลจากการติดตามโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 โดยกำหนดให้มี negative (-) control สำหรับแต่ละการทดลอง พบว่าไม่พบแถบโปรตีนใดๆ จากการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 โดยมี negative (-) control ดังกล่าว ดังแสดงผลในภาพที่ 22 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแถบโปรตีนขนาดประมาณ 75 kDa ที่ตรวจพบนั้น เป็นแถบโปรตีนที่เกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีนดังกล่าวกับโปรตีน tMtx2 อย่างแท้จริง

ภาพที่ 22

ผลการตรวจหาโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยง
 ลูกน้ำยุง ด้วยเทคนิค Western blot โดยกำหนดให้มี negative (-) control
 ในแต่ละการทดลอง ลูกศรแสดงแถบโปรตีนที่
 ตรวจพบจากการทำ Western blot



Lane ที่ 1, 4, 7, 10 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

Lane ที่ 2, 5, 8, 11 = โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์
เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36

Lane ที่ 3, 6, 9, 12 = โปรตีน tMtx2

โดยภาพ (ก) คือผลจากการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยขั้นตอนปกติ และ ภาพ (ข) (ค) และ (ง) คือผลจากการทำ Western blot โดยมี โปรตีน tMtx2 แอนติบอดี Anti-Mtx2 และ แอนติบอดี Goat Anti-Rabbit IgG เป็น negative (-) control ตามลำดับ

4.3.5 การตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE) และ Western blot

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตามด้วยการตรวจหาโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Western blot ไม่สามารถสรุปได้ว่าแถบโปรตีนที่ได้จากการติดตามนั้นเป็นตัวแทนของโปรตีนชนิดเดียว (single protein) ดังนั้นในการศึกษาหาโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันและมีความละเอียดในการแยกมากขึ้น ซึ่งก็คือ เทคนิค 2-DE โดยโปรตีนแต่ละจุดที่ปรากฏบนเจลมีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นตัวแทนของโปรตีนเพียงชนิดเดียว

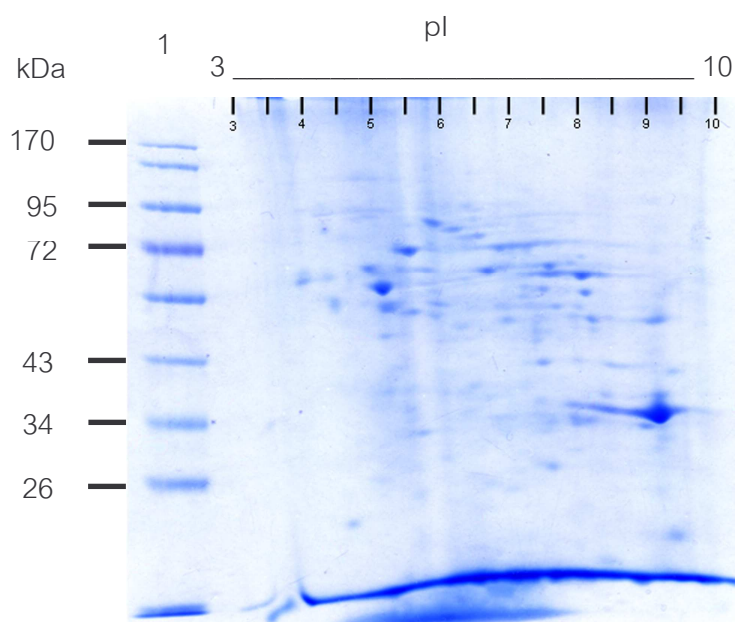
ภายหลังจากการทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง จึงทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนของเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นจึงทำการละลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Lysis buffer ที่ประกอบด้วย 30mM Tris base 2M Thiourea 7M Urea 4% CHAPS 0.1% Triton X-100 และ 0.01% SDS และทำการวิเคราะห์โปรตีนตามขั้นตอนดังที่กล่าวถึงข้างต้น จากนั้นจึงทำการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเพื่อทำการติดตามโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 โดยผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง C6/36 ด้วยเทคนิค 2-DE และ Western blot แสดงในภาพที่ 23

ภาพที่ 23

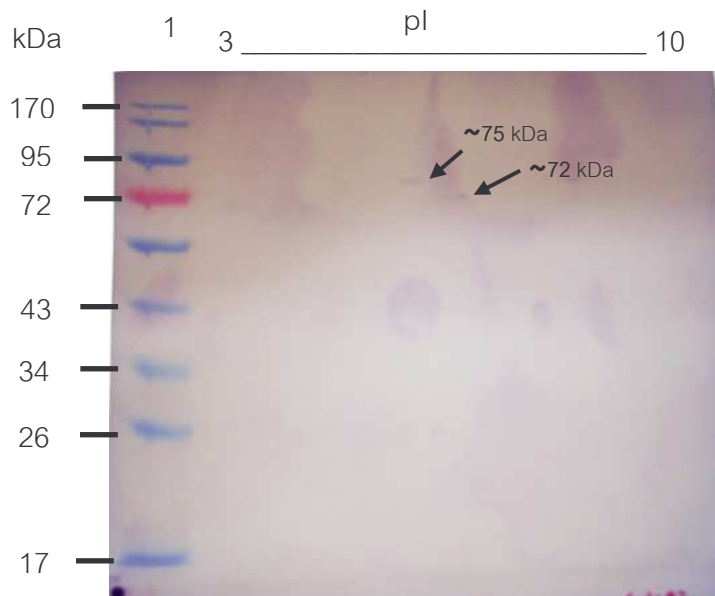
ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงด้วยเทคนิค 2-DE (ก) และการ

ตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค

Western blot (ข) ลูกศรแสดงแถบโปรตีนที่ตรวจพบ



(ก)



(ข)

1 = Protein marker (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas)

จากการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยง *Aedes albopictus* C6/36 พบว่าตำแหน่งของโปรตีนแต่ละจุดมีการแยกออกจากกันได้ดี โดยส่วนใหญ่จะมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอตั้งแต่ pH 4-9.5 และมีขนาดโมเลกุลต่างๆกัน ตั้งแต่ขนาดโมเลกุลประมาณ 20-95 kDa แสดงดังภาพที่ 23 (ก) อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิค 2-DE ซ้ำเป็นจำนวน 7 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งจะให้รูปแบบของตำแหน่งโปรตีนที่มีลักษณะเหมือนกัน

อย่างไรก็ตามจากผลการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 พบจุดของโปรตีนจำนวน 2 จุด ขนาดประมาณ 75 และ 72 kDa ที่มีค่า pI โดยประมาณเท่ากับ 5.9 และ 6.6 ตามลำดับ ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 แสดงดังภาพที่ 23 (ข) อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาไม่สามารถพบจุดของโปรตีนขนาดประมาณ 72 kDa นั้น ได้ในทุกๆการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์และการติดตามโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ซึ่งจะพบแถบของโปรตีนขนาดประมาณ 72 kDa ในบางการทดลองเช่นกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่เป็นผลจากการถูกย่อย (degradation) และมีการเสียโครงสร้างบางส่วนโปรตีนขนาด 75 kDa จึงทำให้โปรตีนนั้นมีขนาดเล็กลง และมีค่า pI ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังนั้นผู้ศึกษาจึงทำการเลือกเพียงโปรตีนขนาดประมาณ 75 kDa ที่จะนำไปทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Peptide mass fingerprinting (PMF) ในขั้นตอนต่อไป

4.3.6 การวิเคราะห์ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ด้วยเทคนิค 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค Western blot ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum

การวิเคราะห์ผลในขั้นตอนนี้เป็นการเปรียบเทียบหาตำแหน่งของโปรตีนที่ได้จากการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ที่ตรงกับตำแหน่งของโปรตีนบนเจลโพลีอะครีลาไมด์ โดยในการศึกษานี้ได้เลือกใช้โปรแกรม Image Master 2D Platinum ในการเปรียบเทียบหาตำแหน่งของโปรตีนดังกล่าว ขั้นตอนการทำงานของโปรแกรมประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการตรวจหาตำแหน่งโปรตีนทั้งหมดบนเจลโพลีอะครีลาไมด์และแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Spot detection) ขั้นตอนการกำหนดเครื่องหมายบ่งชี้ (Landmark addition) และขั้นตอนการเปรียบเทียบหาตำแหน่งโปรตีนที่ตรงกัน (Auto-match) ผลจากขั้นตอนต่างๆแสดงในภาพที่ 24

ภาพที่ 24

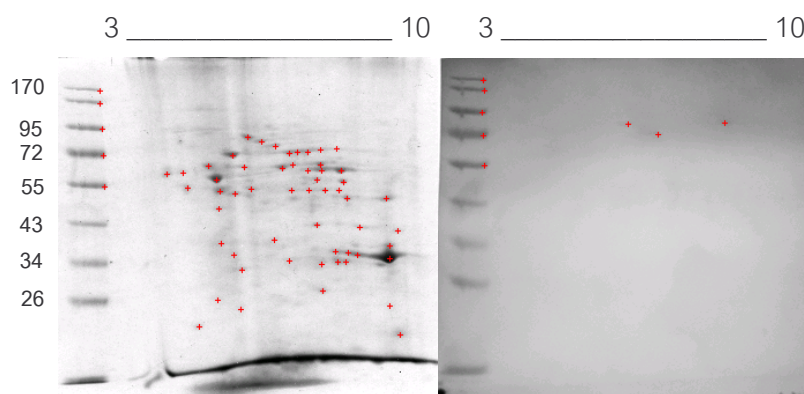
ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบตำแหน่งโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt_x2 ด้วย

โปรแกรม Image Master 2D Platinum ประกอบด้วยขั้นตอนการตรวจหาตำแหน่ง

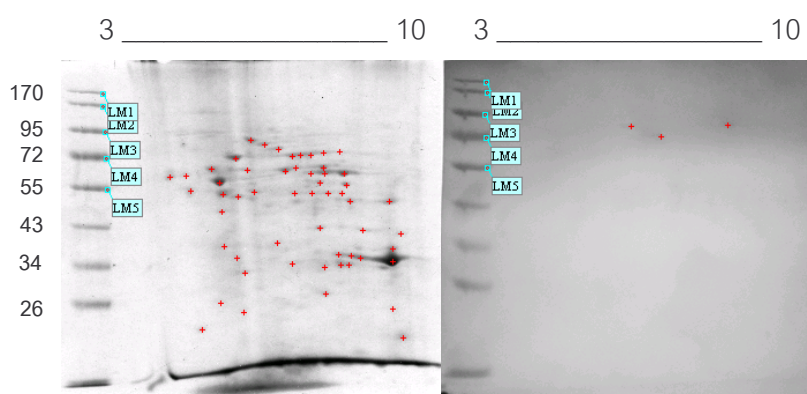
โปรตีน (Spot detection) (ก) การกำหนดเครื่องหมายบ่งชี้ (Landmark

addition) (ข) และการเปรียบเทียบหาตำแหน่ง

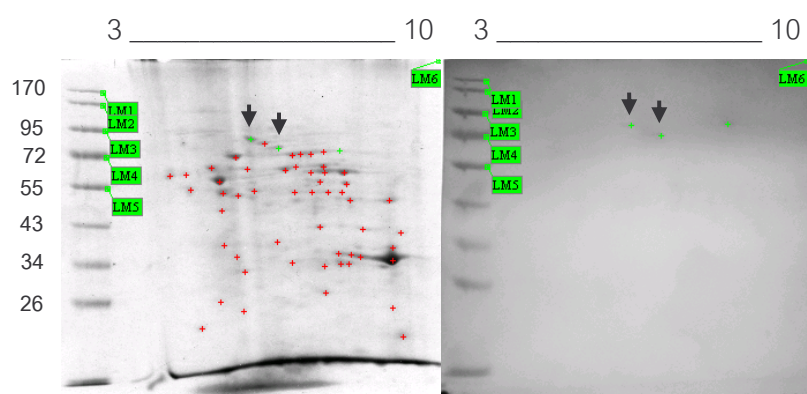
โปรตีนที่ตรงกัน (Auto-match) (ค)



(ก)



(ข)



(ค)

ในขั้นตอนแรกโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน (Spot detection) บนเจลโพลีอะคริลาไมด์และแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยจากผลการวิเคราะห์พบโปรตีนจำนวน 55 จุด และ 3 จุด บนเจลโพลีอะคริลาไมด์และแผ่นไนโตรเซลลูโลส ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ดังภาพที่ 22 (ก) จากนั้นจึงเป็นขั้นตอนการกำหนดเครื่องหมายบ่งชี้ (Landmark addition) โดยได้กำหนดให้ LM1 LM2 LM3 LM4 และ LM5 เป็นเครื่องหมายสำหรับใช้ในการเปรียบเทียบตำแหน่งโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 22 (ข) ขั้นตอนสุดท้ายโปรแกรมจึงทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบหาตำแหน่งโปรตีนขนาด 75 kDa บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีตำแหน่งตรงกันบนเจลโพลีอะคริลาไมด์ (Auto-match) โดยผลจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum แสดงตำแหน่งของโปรตีนบนเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่ตรงกันดังแสดงในภาพที่ 22 (ค) โดยถูกแสดงตำแหน่งของโปรตีนดังกล่าว โดยในขั้นตอนนี้ได้ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีนขนาด 72 kDa ด้วยเช่นกัน

4.4 การวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

เทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF) หรือ Protein Fingerprinting เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีน ดังนั้นโปรตีนตัวอย่างซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 72 และ 75 kDa จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทำให้โปรตีนดังกล่าวกลายเป็นโปรตีนสายสั้นๆ หรือเปปไทด์ (peptide) โดยเปปไทด์แต่ละชิ้นจะถูกวิเคราะห์มวล (mass) ด้วยเครื่องมือที่มีความแม่นยำสูง เช่น MALDI-TOF และ LC/MS-MS เป็นต้น ผลที่ได้จากการวิเคราะห์คือ ชุดของข้อมูลที่ประกอบด้วยมวลของเปปไทด์แต่ละชิ้น ชุดข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลของโปรตีนที่ทราบชนิดแล้วซึ่งมีอยู่ภายในฐานข้อมูลเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนว่ามีความน่าจะเป็นที่จะเป็นโปรตีนชนิดใด

4.4.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) และการวิเคราะห์ผลเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีน

จากผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ด้วยเทคนิค 2D-E และการติดตามโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Western blot สามารถตรวจพบโปรตีนขนาด 72 และ 75 kDa ดังแสดงในภาพที่ 17 (ข) จึงได้ทำการตัดจุดของโปรตีนทั้งสองขนาดมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

ภายหลังจากการตัดจุดของโปรตีนขนาดประมาณ 72 และ 75 kDa บนเจลโพลีอะคริลาไมด์ โปรตีนจะถูกนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS และ LC/MS-MS ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาการสูญเสียน้ำของเจล (dehydration) ด้วยสาร Acetonitrile (ACN) ปฏิกิริยาการนำน้ำกลับเข้าสู่เจล (rehydration) ด้วยสาร Ammonium bicarbonate การทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนด้วยสาร Dithiothreitol (DTT) ปฏิกิริยาการเติมหมู่เอซิลด้วยสาร Iodoacetamide (IAA) จากนั้นโมเลกุลของโปรตีนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน โดยเอนไซม์ทริปซินจะมีผลในการตัดกรดอะมิโนหลังตำแหน่งของกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) และกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) ทำให้โมเลกุลโปรตีนที่สมบูรณ์นั้นถูกทำให้เป็นโปรตีนสายสั้นๆ หรือ เปปไทด์ ซึ่งมีรูปแบบเฉพาะสำหรับโปรตีนแต่ละชนิด หลังจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนัก (mass) ของเปปไทด์แต่ละส่วนจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูลเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ดังกล่าว

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS และจัดจำแนกชนิดของโปรตีน โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีน ซึ่งฐานข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาคือ NCBI nr ที่มีลิขสิทธิ์อย่างสมบูรณ์ของ Mascot (<http://www.matrixscience.com>) โดยในการค้นหา มีการยินยอมให้เอนไซม์ทริปซินมีการย่อยผิดตำแหน่งเพียง 1 ตำแหน่ง (Trypsin missed cleavage) ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วย Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) และ Variable modifications: Oxidation (M) โดยผลที่ได้จะเรียงลำดับจากคะแนนสูงสุด 5 ลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 และตารางที่ 4 อย่างไรก็ตามโปรตีนที่แสดงในตารางที่ 2 และตารางที่ 3 เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ที่ไม่ตรงกับตำแหน่งโปรตีนในภาพที่ 21 (ข) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาดประมาณ 72 และ 75 kDa ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS และเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูล แสดงให้เห็นว่าไม่พบโปรตีนที่สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนขนาด 72 และ 75 kDa ดังกล่าว

ตารางที่ 3

ผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 72 kDa ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

โดยเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูล NCBI nr

Accession number	Mascot score*	Protein matched	pI	Mass	Species
gi 1350686	58	60S ribosomal protein L4 (L1)	11.53	43.280	
gi 196011347	41	Hypothetical protein TRIADDRAFT_29866	8.79	44.462	<i>T. adhaerens</i>
gi 212506810	40	methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, putative	6.81	74.062	<i>P. humanus corporis</i>
gi 170587987	39	LBP/BPI/CETP family, C-terminal domain containing protein	8.18	68.609	<i>B. malayi</i>
gi 158288987	38	AGAP000326-PA	10.01	31.804	<i>An. gambiae</i> str. PEST

* การคำนวณคะแนนโปรตีน $-10 \cdot \log(P)$ โดยค่า P คือ ค่าความเป็นไปได้ของการเปรียบเทียบโปรตีนจะเป็นไปอย่างสุ่ม

** คะแนนที่มีค่าสูงกว่า 68 แสดงถึงความมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4

ผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 75 kDa ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

โดยเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูล NCBI nr

Accession number	Mascot score*	Protein matched	pI	Mass	Species
gi 76156078	36	SJCHGC08517	5.67	20.111	<i>S. japonicum</i>
gi 193709413	29	PREDICTED: similar to Cytochrome P450	5.58	28.83	<i>A. pisum</i>
gi 215507821	29	Adenylate cyclase, putative	8.15	62.696	<i>I. scapularis</i>
gi 215491368	28	Conserved hypothetical protein	4.94	15.806	<i>I. scapularis</i>
gi 118779994	28	AGAP010842-PA	6.33	36.834	<i>An. gambiae</i> str. PEST

* การคำนวณคะแนนโปรตีน $-10 \cdot \log(P)$ โดยค่า P คือ ค่าความเป็นไปได้ของการเปรียบเทียบโปรตีนจะเป็นไปอย่างสุ่ม

** คะแนนที่มีค่าสูงกว่า 68 แสดงถึงความมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

4.4.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography/Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC/MS-MS) และการวิเคราะห์ผลเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีน

อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างโปรตีนขนาด 72 และ 75 kDa สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ผู้ศึกษาได้นำตัวอย่างโปรตีนดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS-MS โดยผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS-MS และจัดจำแนกชนิดของโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI nr ที่มีลิขสิทธิ์อย่างสมบูรณ์ของ Mascot (<http://www.matrixscience.com>) ซึ่งในการสืบค้นมีการสมมติให้เอนไซม์ทริปซินมีการย่อยผิดตำแหน่งเพียง 1 ตำแหน่ง (Trypsin missed cleavage) ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วย Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) และ Variable modifications: Oxidation (M) โดยผลที่ได้จะเรียงลำดับจากคะแนนสูงสุด 5 ลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 และ ตารางที่ 6

ตารางที่ 5

ผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 72 kDa ด้วยเทคนิค LC/MS-MS

โดยเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูล NCBI nr

Accession number	Mascot score*	Protein matched	pI	Mass	Species
gi 108881054	201*	lamin		64.012	<i>A. aegypti</i>
gi 157017914	47*	AGAP002830-PA		101.746	<i>An. gambiae</i> str. PEST
gi 157015068	43*	AGAP008015-PA		65.318	<i>An. gambiae</i> str. PEST
Proteins matching the same set of peptides:					
gi 158297175	43*	AGAP008015-PA		65.318	<i>An. gambiae</i> str. PEST
gi 167877156	43*	lamin Dm0		65.066	<i>C. quinque fasciatus</i>
gi 170035295	43*	lamin Dm0		65.066	<i>C. quinque fasciatus</i>
gi 108873639	42	Conserved hypothetical protein		79.010	<i>A. aegypti</i>
gi 167873922	36	Conserved hypothetical protein			<i>C. quinque fasciatus</i>

* การคำนวณคะแนนโปรตีน $-10 \cdot \log(P)$ โดยค่า P คือ ค่าความเป็นไปได้ของการเปรียบเทียบโปรตีนจะเป็นไปอย่างสุ่ม

** คะแนนที่มีค่าสูงกว่า 42 แสดงถึงความมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6

ผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 75 kDa ด้วยเทคนิค LC/MS-MS

โดยเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูล NCBItr

Accession number	Mascot score*	Protein matched	pI	Mass	Species
gi 167879012	276*	Conserved hypothetical protein		72.845	<i>C. quinque fasciatus</i>
gi 157017524	29	AGAP003676-PA			<i>An. gambiae</i> str. PEST
gi 108871059	26	heparan sulfate n-deacetylase/n-sulfotransferase			<i>A. aegypti</i>
gi 167870989	26	histone H1		22.205	<i>C. quinque fasciatus</i>
gi 107055211	25	Conserved hypothetical protein			<i>C. quinque fasciatus</i>

* การคำนวณคะแนนโปรตีน $-10 \cdot \log(P)$ โดยค่า P คือ ค่าความเป็นไปได้ของการเปรียบเทียบโปรตีนจะเป็นไปอย่างสุ่ม

** คะแนนที่มีค่าสูงกว่า 42 แสดงถึงความมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

*** เครื่องหมาย * แสดงโปรตีนที่มีความเป็นไปได้อย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาดประมาณ 72 และ 75 kDa ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค LC/MS-MS และเปรียบเทียบผลกับโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูล NCBI nr แสดงให้เห็นว่าโปรตีนขนาด 72 kDa มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีน lamin (*Aedes aegypti*) โปรตีน AGAP002830-PA (*Anopheles gambia*) และ โปรตีน AGAP008015-PA (*Anopheles gambia*) อย่างมีนัยสำคัญ โดยเรียงลำดับจากคะแนนสูงสุดตามลำดับ ในขณะที่โปรตีนขนาด 75 kDa มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีน Conserved hypothetical protein (*Culex quinquefasciatus*) อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยคะแนนสูงสุดเพียงลำดับเดียว

อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาได้เตรียมโปรตีนตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2-DE และได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิค 2-DE และติดตามโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 เข้าเป็นจำนวน 2 การทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งภายหลังจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2-DE ไม่พบโปรตีนขนาด 72 kDa บนเจลโพลีอะคริลาไมด์ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการติดตามโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot ซึ่งไม่สามารถตรวจพบโปรตีนขนาด 72 kDa ด้วยเช่นกัน พบเพียงโปรตีนขนาด 75 kDa ซึ่งสามารถมองเห็นได้บนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ และยังคงความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ซึ่งสามารถตรวจพบได้ภายหลังจากการติดตามด้วยเทคนิค Western blot (ไม่แสดงข้อมูล) จากนั้นผู้ศึกษาจึงทำการตัดเจลตรงตำแหน่งของโปรตีนขนาด 75 kDa และทำการเตรียมโปรตีนตัวอย่างของโปรตีนดังกล่าวเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS-MS โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 75 kDa ด้วยเทคนิค LC/MS-MS จะนำไปทำการจัดจำแนกชนิดของโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลของโปรตีนภายในฐานข้อมูล Mosquito_NCBI nr ที่มีลิขสิทธิ์อย่างสมบูรณ์ของ Mascot (<http://www.matrixscience.com>) ซึ่งในการสืบค้นมีการสมมติให้เอนไซม์ทริปซินมีการย่อยผิดตำแหน่งเพียง 1 ตำแหน่ง (Trypsin missed cleavage) ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วย Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) และ Variable modifications: Oxidation (M) โดยผลที่ได้จะเรียงลำดับจากคะแนนสูงสุด 5 ลำดับ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 75 kDa ด้วยเทคนิค LC/MS-MS และเปรียบเทียบผลกับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล จากการทดลองจำนวน 2 การทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน แสดงในตารางที่ 7 และ ตารางที่ 8 ตามลำดับ

ตารางที่ 7

ผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 75 kDa ด้วยเทคนิค LC/MS-MS โดยเปรียบเทียบผล

กับฐานข้อมูล Mosquito_NCBI จากการทดลองซ้ำครั้งที่ 1

Accession number	Mascot score*	Protein matched	pI	Mass	Species
gi 167879012	569*	Conserved hypothetical protein	5.91	72.845	<i>C. quinquefasciatus</i>
gi 61971317	91*	V-ATPase subunit A	5.26	68.528	<i>A. albopictus</i>
Proteins matching the same set of peptides:					
gi 108875173	91*	ATP synthase alpha subunit vacuolar		68.528	<i>A. aegypti</i>
		RecName: Full=V-type			
gi 122002537	91*	proton ATPase catalytic subunit A			
gi 167877490	63*	heat shock protein 70 B2			<i>C. quinquefasciatus</i>
gi 94469124	61*	regulator of chromosome condensation-like protein			<i>A. aegypti</i>
gi 167868814	50*	alpha-galactosidase A			<i>C. quinquefasciatus</i>

* การคำนวณคะแนนโปรตีน $-10 \cdot \log(P)$ โดยค่า P คือ ค่าความเป็นไปได้ของการเปรียบเทียบโปรตีนจะเป็นไปอย่างสุ่ม

** คะแนนที่มีค่าสูงกว่า 44 แสดงถึงความมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

*** เครื่องหมาย * แสดงโปรตีนที่มีความเป็นไปได้อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 8

ผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาด 75 kDa ด้วยเทคนิค LC/MS-MS โดยเปรียบเทียบผล
กับฐานข้อมูล NCBI จากการทดลองซ้ำครั้งที่ 2

Accession number	Mascot score*	Protein matched	pI	Mass	Species
gi 170036376	655*	Conserved hypothetical protein	5.91	72.845	<i>C. quinque fasciatus</i>
gi 194756900	581*	GF11360	6.03	74.154	<i>D. ananassae</i>
gi 158287949	427*	AGAP010876-PA	5.51	69.515	<i>An. gambiae</i> str. PEST
gi 78190531	371*	mitochondrial heat shock 70 kDa protein	5.22	35.863	<i>P. dumerilii</i>
gi 223648538	370*	Stress-70 protein mitochondrial precursor	5.90	73.922	<i>S. salar</i>

* การคำนวณคะแนนโปรตีน $-10 \cdot \log(P)$ โดยค่า P คือ ค่าความเป็นไปได้ของการเปรียบเทียบโปรตีนจะเป็นไปอย่างสุ่ม

** คะแนนที่มีค่าสูงกว่า 57 แสดงถึงความมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

*** เครื่องหมาย * แสดงโปรตีนที่มีความเป็นไปได้อย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการวิเคราะห์โปรตีนขนาดประมาณ 75 kDa ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค LC/MS-MS และเปรียบเทียบผลกับโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูล Mosquito_NCBI (จากการทดลองซ้ำครั้งที่ 1) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนขนาด 75 kDa มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีน Conserved hypothetical protein (*Culex quinquefasciatus*) โปรตีน V-ATPase subunit A (*Aedes albopictus*) โปรตีน heat shock protein 70 B2 (*Culex quinquefasciatus*) โปรตีน regulator of chromosome condensation-like protein (*Aedes*

aegypti) และโปรตีน alpha-galactosidase A (*Culex quinquefasciatus*) อย่างมีนัยสำคัญ โดยเรียงลำดับจากคะแนนสูงสุดตามลำดับ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ LC/MS-MS ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบผลกับโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูล NCBI (จากการทดลองซ้ำครั้งที่ 2) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนขนาด 75 kDa มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีน Conserved hypothetical protein (*Culex quinquefasciatus*) อีกเช่นกัน ซึ่งให้ผลที่ตรงกันกับการวิเคราะห์ในครั้งก่อนหน้า นอกจากนี้โปรตีนขนาด 75 kDa ยังมีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีน GF11360 (*Drosophila ananassae*) โปรตีน AGAP010876-PA (*Anopheles gambia*) โปรตีน mitochondrial heat shock 70 kDa protein (*Platynereis dumerilii*) และโปรตีน Stress-70 protein mitochondrial precursor (*Salmo salar*)) อย่างมีนัยสำคัญ โดยเรียงลำดับจากคะแนนสูงสุดตามลำดับ

อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนขนาด 75 kDa ด้วยเทคนิค Peptide mass fingerprinting (PMF) ตามด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS-MS ผู้ศึกษาได้ทำการสรุปผลของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ที่มีความใกล้เคียงกับโปรตีนขนาด 75 kDa ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9

โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลและ pI ที่มีความใกล้เคียงกับโปรตีนขนาด 75 kDa
และมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน 75 kDa อย่างมีนัยสำคัญ

Protein	Organism	MW	pI	Function
Conserved hypothetical protein	<i>C. quinque fasciatus</i>	72.845	5.91	Unknown
V-ATPase subunit A	<i>A. albopictus</i>	68.528	5.26	pH homeostasis, proton (H ⁺) pump
GF11360	<i>D. ananassae</i>	74.154	6.03	membrane transport, pores ion channels
AGAP010876-PA	<i>An. gambia</i>	69.515	5.51	Unknown
Stress-70 protein Mitochondrial precursor	<i>S. salar</i>	73.922	5.90	Mitochondrial precursor