บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรียตามภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ เช่น แบคทีเรียทนกรด (acid tolerant bacteria) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มี pH ต่ำ แบคทีเรียทนร้อน (thermophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความร้อนสูง และแบคทีเรียทนเกลือ (halophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆ เป็นต้น ความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญเติบโตได้ที่ภาวะดังกล่าวเกิดจากการแสดงออกของยีนบางชนิดที่มีมากกว่าหรือน้อยกว่าในภาวะปกติ เช่น ความสามารถในการเจริญของ *Escherichia coli* ในอุณหภูมิสูง เกิดจากการแสดงออกของยีน *rpoH* ที่มากขึ้นหลังจากมีการเพิ่มอุณหภูมิจาก 40°C จนกระทั่งถึง 43.5°C (Tilly *et al.*, 1986) การที่แบคทีเรีย *Salmonella enteric* สามารถเจริญได้ในภาวะที่มี pH ต่ำ เกิดจากการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *cadB* ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่ง lysine และ cadaverine ขณะที่ยีน *OxyR* ซึ่งมีหน้าที่สร้างโปรตีนควบคุมในภาวะที่เซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (regulatory protein sensor for oxidative stress) มีการแสดงออกลดลง (Greenacre *et al.*, 2006) จากการศึกษาการสังเคราะห์ degradative enzyme ของ *Bacillus subtilis* ในภาวะที่มีเกลือ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนในระบบ degradative enzyme 2 ชนิด ได้แก่ *sacB* และ *aprE* โดย *sacB* ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ levansucrase มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นถึง 9 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* ในภาวะที่ไม่มีเกลือ ส่วน ยีน *aprE* ซึ่งทำหน้าที่ผลิต alkaline protease มีการแสดงออกลดลง (Kunst and Rapoport, 1995)

จากการแสดงออกของยีนบางชนิดที่ทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อภาวะแวดล้อม นักวิทยาศาสตร์จึงสนใจที่จะนำยีนดังกล่าวมาใส่ในสิ่งมีชีวิตอื่น เพื่อให้สิ่งมีชีวิตที่ได้รับยีน

นั้นๆ สามารถเจริญได้ในภาวะที่ต้องการ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านการเกษตร โดยส่วนใหญ่จะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ในปี ค.ศ. 2000 Gisbert และคณะ ได้นำยีน *HAL1* จากยีสต์ใส่เข้าไปในมะเขือเทศ เพื่อให้มะเขือเทศเจริญได้ดีในดินเค็ม เมื่อนำยีน *betA* และ *betB* จาก *E. coli* มาใส่เข้าไปในต้นยาสูบ จะทำให้ยาสูบสามารถเจริญได้ในดินเค็ม เนื่องจาก *betA* ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการออกซิไดซ์ choline ให้เป็น betaine aldehyde และ *betB* ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการเปลี่ยน betaine aldehyde ให้เป็น glycine betaine ที่ช่วยป้องกันแรงดันของเซลล์ในสภาวะที่มีเกลือ (Holmström *et al.*, 2000) เพื่อประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมและทางด้านการแพทย์

จากงานวิจัยของ Sánchez และคณะ (2007) ได้นำเอาเทคนิคโปรติโอมิกส์มาวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีการตอบสนองต่อสภาวะทนกรดที่ pH 4.8 ของแบคทีเรีย *Bifidobacterium longum* biotype longum NCIMB 8809 (Wild type) เปรียบเทียบกับ *B. longum* biotype longum 8809d pH 4.8 (Mutant) พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน 9 ชนิด โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมี 5 ชนิด ได้แก่ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C, UDP-glucose 4-epimerase, methionine synthase, cystathionine gamma-synthase, *O*-acetylhomoserine (thiol)-lyase และเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง 4 ชนิด ได้แก่ xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase, aldehyde-alcohol dehydrogenase 2, ATP binding protein of ABC transporter for peptides และ bile salt hydrolase การศึกษาการตอบสนองของแบคทีเรีย *Brucella melitensis* 16M ที่เลี้ยงภายใต้ 3 สภาวะ ได้แก่ ที่อุณหภูมิสูง สภาวะที่เซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (oxidative stress) และ ที่ pH ต่ำ ด้วยวิธีโปรติโอมิกส์ พบว่าสามารถแยกโปรตีนได้ทั้งหมด 676 โปรตีน ซึ่งมีโปรตีน 19 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นบางสภาวะ ขณะที่บางสภาวะมีการแสดงออกลดลง และมีโปรตีนอยู่ 8 ชนิด ที่พบเช่นเดียวกันในแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ AapJ, alpha-ETF, ClpP, Fe Mn SOD, malate dehydrogenase, IalB, 30S ribosomal protein S1 และ pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit (Teixeira-gomes *et al.*, 2000)

การศึกษาผลของกรดที่มีต่อการแสดงออกของโปรตีนใน Biofilm ของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มี pH 5.5 และ pH 7.5 พบว่าที่สภาวะ pH 5.5 มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดใหม่เพิ่มขึ้นทั้งหมด 23 ชนิด ซึ่งโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ได้แก่ phosphofructokinase, fructose bisphosphate aldolase, enolase, pyruvate dehydrogenase, L-lactate

dehydrogenase, formate acetyltransferase, α-glucosidase และ NADH oxidase เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มี pH 7.5 (Welin *et al.*, 2003) จากการศึกษาความสามารถในการทนกรดของแบคทีเรีย *Bradyrhizobium japonicum* โดยเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนใน *B. japonicum* ที่เลี้ยงในอาหาร HM ที่มี pH 4.7 และ 6.8 พบว่า มีโปรตีนบางชนิดที่มีการแสดงออกในอาหารทั้ง 2 สภาวะแต่มีบางชนิดที่มีการแสดงออกมากในอาหารที่มีค่า pH 4.7 ได้แก่ triosephosphate isomerase, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ในขณะที่มีโปรตีนบางชนิดมีการแสดงออกลดลง ได้แก่ GroEL, acyl-CoA dehydrogenase และ ATP synthase beta chain อย่างไรก็ตาม มีโปรตีนบางชนิดที่มีการแสดงออกเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 6.8 เท่านั้น ได้แก่ ATP dependent protease ATP-binding subunit, N-utilization substance protein A และ 2-isopropylmalate synthase (Niamsup *et al.*, 2006)

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาเพื่ออธิบายกลไกการตอบสนองของแบคทีเรียต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ แต่การศึกษาในแบคทีเรียชนิดหนึ่งไม่สามารถอธิบายกลไกการตอบสนองของแบคทีเรียทุกชนิดได้ เนื่องจากการตอบสนองของแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจไม่เหมือนกัน งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษากลไกการตอบสนองต่อเกลือของแบคทีเรีย *Dermacoccus abyssi* แยกได้จากตะกอนใต้ทะเลลึกที่ 10,898 เมตร จัดอยู่ในกลุ่ม actinomycetes (Pathom-aree *et al.*, 2006) ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้เทคนิคโปรติโอมิกส์เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่แสดงออกใน *D. abyssi* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือและอาหารที่ไม่เติมเกลือ แล้ววิเคราะห์หาโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการตอบสนองต่อการทนเกลือ อันจะนำไปสู่ความเข้าใจต่อกลไกการตอบสนองของโปรตีนต่างๆ ในแบคทีเรีย *D. abyssi* รวมถึงการนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นให้มีความสามารถในการทนต่อเกลือ ตลอดจนนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมที่มีความต้องการสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการทนเกลือ

1.2 *Dermacoccus abyssi*

จีนัส *Dermacoccus* จัดอยู่กลุ่ม Actinomycetes ซึ่งถูกแยกมาจากผิวหนังของมนุษย์และน้ำ ก่อนหน้านี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Micrococcus nishinoyanesis* Oda 1935 emend จีนัส*Dermacoccus* จัดอยู่ใน Family *Dermacoccaceae* อยู่ใน genera *Demetria* สิ่งมีชีวิตที่อยู่ใน Family นี้ โดยส่วนมากมีแหล่งที่อยู่บนบก ช่วยถนอมผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ไม่ให้เน่าเสีย

เชื้อ *Dermacoccus abyssi* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Actinomycetes แยกได้จากตะกอนใต้ทะเล Mariana Trench ที่ตำแหน่ง 11° 19.911′ N 142° 12.372′ E ความลึก 10,898 เมตร จากการแยก Chromosomal DNA ด้วยวิธี PCR amplification แล้วเปรียบเทียบด้วยฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม PHYDIT และหาปริมาณ G + C ด้วยวิธี reversed-phase HPLC พบว่ามีลำดับยีนที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Dermacoccus nishinomiyaensis* DSM 20448^{T} เท่ากับ 98.5 % และมีปริมาณ G + C เท่ากับ 65.2 mol% เชื้อชนิดนี้มีลักษณะรูปร่างแบบ coccoid เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.8-1.5 ไมโครเมตร โคโลนีเป็นสีครีมถึงเหลือง กลม ผิวเรียบโค้งนูน มันวาว เจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร tryptic soy agar และเจริญเติบโตได้น้อยใน inorganic nitrogen agar สามารถเจริญเติบโตได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 10 ถึง 37 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 28 องศาเซลเซียส นอกจากนี้สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 7.5% และทนความดันได้ถึง 40 Mpa จึงจัดอยู่ในเชื้อกลุ่ม piezotolerant (Pathom-aree *et al.*, 2006)

1.3 กลไกการปรับตัวของแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลือ

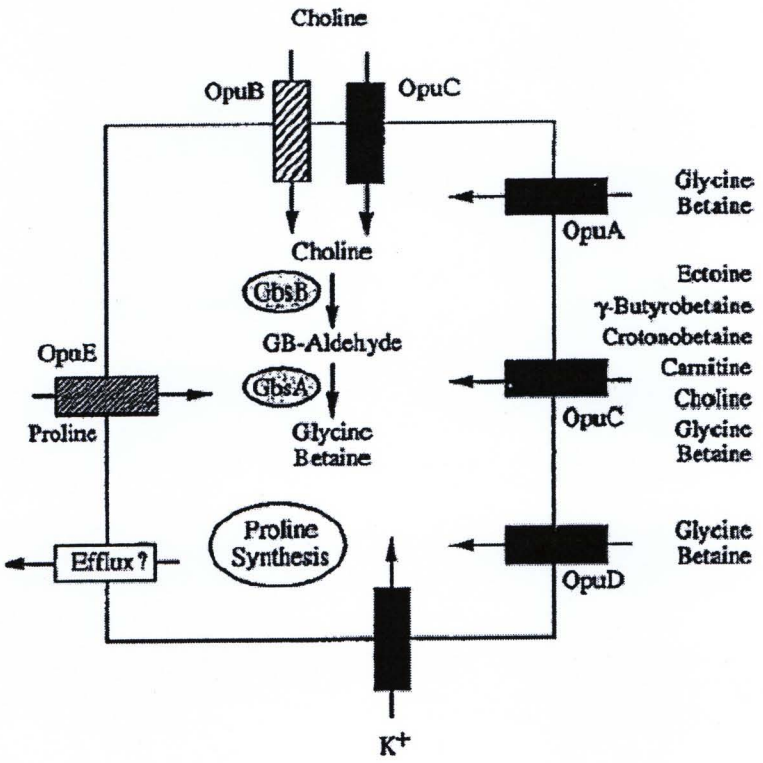
ในสภาวะที่มีเกลือจะส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงความดันของเซลล์ โดยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือภายนอกมากกว่าภายในเซลล์ทำให้เกิดการแพร่ออกของน้ำจากเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์เหี่ยวซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียมีกระบวนปรับตัวให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะดังกล่าว โดยลดความเข้มข้นของสารละลาย ประกอบด้วย ขั้นตอนดังนี้คือ ลดกระบวนการสำหรับการเจริญเติบโต, ลดกระบวนการสลายพวกโมเลกุลเฉื่อย เช่น H_2O หรือ CO_2 และการขับของเสียออกสู่อาหาร เช่นการขับ K^+ ผ่านทางระบบ KefB และ KefC ในเชื้อ *E. coli* การสูญเสียปริมาณน้ำตาล ทรีฮาโลส ในเชื้อ Cyanobacteria ส่วนหนึ่งเกิดจากการขับออกนอกเซลล์

แต่ส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการ catabolism หรือการส่ง glycine betaine และ ecotoine ออกสู่นอกเซลล์ของเชื้อ *E. halochloris* (Csonka และ Hanson, 1991)

นอกจากการเกิดกระบวนการต่างๆแล้ว การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือยังมีผลต่อ Periplasmic space ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วย โอลิโกแซคคาไรด์ เรียกว่า membrane-derived oligosaccharides ซึ่งรวมถึงการเกิด osmoregulation (การควบคุมสมดุลน้ำและสารละลายในเซลล์) ของ periplasm โอลิโกแซคคาไรด์ ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเหล่านี้ เช่น ในเชื้อ *E.coli* และβ-glucans ในเชื้อ*Agrobacterium, Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* เรียกว่า membrane-derived oligosaccharides (MDOs) สารละลายที่อยู่ร่วมกันภายในเซลล์มีความแตกต่างกัน คือ ระดับของ oligosaccharides ลดลงกับค่าของ Osmolarity ภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น ค่า MDOs ของเชื้อ *E. coli* และβ-glucans ของเชื้อ *A. tumefaciens* เชื้อ B. *japonicum*, เชื้อ *R. meliloti* คือ negatively charged เพราะฉะนั้นจึงสามารถทำให้เกิด Donnan potential ทำให้ส่งผ่านสารออกนอกเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ดังนั้น เมื่อความเข้มข้นของ cation ใน periplasm มีมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดแรงดันออสโมซิสใน periplasm จากการเกิดมิวเตชัน ในกระบวนการสังเคราะห์ β-glucans ส่งผลให้เชื้อ *R. meliloti* และเชื้อ *A. tumefaciens* มีความไวต่อ low osmolarity แต่การเกิดมิวเตชันแบบ pleiotropic (การที่ยีนหนึ่งยีน มีผลควบคุมหลายลักษณะ) ส่งผลให้ hosts ถูกรุกล้ำได้ง่าย ซึ่ง *E.coli* ที่เกิดมิวเตชัน ไม่มี MDOs จะไม่ไวต่ออาหารที่มีค่า Osmolarity ต่ำ จากผลดังกล่าวนั้นขัดแย้งกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ electrical charge ของ β-glucans ของเชื้อ *R. meliloti* เพราะจากการศึกษาพบ anionic และ neutral ในเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ซึ่ง โอลิโกแซคคาไรด์จะส่งผลตอบสนองโดยตรงสำหรับการเกิดแรงดันออสโมติกใน periplasm เพราะ long chain polyols สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกได้มาก (Csonka และ Hanson, 1991)

ส่วนในกรณีของแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งจะไม่มีส่วนของ periplsm จึงมีขั้นตอนในการตอบสนองต่อสภาวะเกลือคร่าวๆ 2 ขั้นตอน โดยเริ่มจะทำการดึงดูดประจุเข้าสู่เซลล์เช่น K^+ จากนั้นทำการแทนที่ประจุนั้นด้วย proline จัดเป็นสารที่มีหน้าที่รักษาความดันของเซลล์(Whatmore and Reed, 1990) สารรักษาความดันของเซลล์ดังกล่าวอาจได้มาจากอาหารหรือแบคทีเรียสังเคราะห์จากกระบวนการตอบสนองในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงความดันทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ในการขนส่งสารเหล่านี้จะต้องอาศัยโปรตีนในกลุ่ม ABC transporter(Kappes *et al.*, 1999) นอกจากนี้ในสภาวะที่มีเกลือก็เปรียบเสมือนแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่แบคทีเรียนั้นอยู่ในสภาวะเครียดแบบ oxidative จากสถานการณ์ดังกล่าวทำให้เซลล์ของแบคทีเรียตอบสนองโดยการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นของ PerR-dependent catalase KatA, alkyl hydroperoxide reductase subunits AhpC และ AhpF

glutamyl tRNA reductase HemA รวมไปถึงเอนไซม์ในการสังเคราะห์ cysteine (HÖper *et al.*, 2006)



รูป 1.1 การขนส่งและการสังเคราะห์สารที่ช่วยในการรักษาความดันของ *Bacillus subtilis*

ที่มา: Kempf และ Bremer (1998)

1.4 Proteomic

โปรติโอมิกส์หมายถึงการศึกษารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกโดยจีโนมของสิ่งมีชีวิต ณ เวลาหนึ่งๆ ภายใต้สภาวะที่กำหนดและปัจจุบันโปรติโอมิกส์ได้รับความสนใจในการนำมาศึกษากระบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตภายหลังยุคของจีโนมิกส์

นับจากความสำเร็จในการหาลำดับยีนทั้งหมดในจีโนมของสิ่งมีชีวิตต้นแบบหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana* รวมทั้งจีโนมของมนุษย์ ได้มีการค้นคว้าและพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนเหล่านั้น อย่างไรก็ตามข้อมูลจากลำดับยีนเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะนำไปสู่ความเข้าใจในกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เนื่องจากการดำเนินไปของกระบวนการทางชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับการแสดงออกของ

ยีนในจีโนม การแสดงออกของยีนเริ่มจากการถอดรหัสยีนจากลำดับเบสในจีโนมกลายมาเป็น mRNA แล้วจึงแปลออกมาเป็นโปรตีน โดยโปรตีนดังกล่าวจะถูกดัดแปลงรูปร่าง และองค์ประกอบของโมเลกุล (post-translational modifications หรือ PTMs) ผ่านกระบวนการต่างๆ ได้แก่ glycosylation, phosphorylation, acetylation หรือ isoprenylation เป็นต้น (Kersten *et al.*, 2004; Thurston *et al.*, 2005) นอกจากการเกิด PTMs แล้ว โปรตีนยังสามารถแตกตัวหรือรวมตัวกับโปรตีนอื่นเกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนเพื่อให้มีลักษณะและสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงาน ก่อนที่จะถูกส่งไปทำหน้าที่ต่างๆ ยังตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ จึงอาจกล่าวได้ว่าโปรตีนเป็นผู้มีบทบาทอันแท้จริงในการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้จีโนมของสิ่งมีชีวิตมีรูปแบบที่ค่อนข้างเหมือนกันในทุกเซลล์ ในขณะที่ โปรติโอมหรือโปรตีนทั้งหมดนั้นมีการแสดงออกในรูปแบบที่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ แต่ละส่วนของสิ่งมีชีวิต ขึ้นอยู่กับอายุเซลล์ วงจรชีวิตหรือการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นข้อมูลทางโปรติโอมิกส์ซึ่งบ่งบอกถึงสภาวะของเซลล์ในระดับโปรตีน จึงเป็นองค์ประกอบสำคัญในการช่วยอธิบายกลไกทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าการใช้ข้อมูลในระดับยีนเพียงอย่างเดียว

อย่างไรก็ตาม ในการวิเคราะห์ทางโปรติโอมิกส์จะต้องมีการนำเทคนิคต่างๆ มาศึกษาสมบัติของโปรตีนควบคู่กันไปด้วย อันได้แก่ การศึกษาลำดับกรดอะมิโน แอคติวิตีจำเพาะ สภาวะการเกิด PTMs การมีปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลหรือโปรตีนชนิดอื่น ตลอดจนการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน ดังนั้นคำว่าโปรติโอมิกส์จึงไม่ได้หมายถึงการศึกษารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตเพียงเท่านั้น แต่ยังหมายถึงการศึกษาสมบัติของโปรตีน การเกิด PTMs และการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนชนิดอื่นด้วย ซึ่งทำให้สามารถอธิบายเครือข่ายการทำงานของโปรตีนในระดับเซลล์และนำไปสู่ความเข้าใจถึงภาพรวมของกระบวนการทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิตได้ดียิ่งขึ้น (Joyard and Brygoo, 2004)

เนื่องจากโปรติโอมิกส์เป็นการศึกษาที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ในงานวิจัยหลายๆด้าน การเรียนรู้และเข้าใจถึงหลักการพื้นฐานของเทคนิคดังกล่าวนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยทั่วไปการศึกษาโปรติโอมิกส์ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนการแยกโปรตีน ด้วยวิธี Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) และ การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Mass spectrometry MS ซึ่งมีหลักการดังนี้

1.4.1 Two-dimensional gel electrophoresis (2DE)

1.4.1.1 **Isoelectric focusing (IEF)**

IEF เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยความแตกต่างของค่า isoelectric points (pI) ซึ่งเป็น pH ที่ทำให้โปรตีนมีประจุรวม (net charge) เป็นศูนย์ ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนเป็นโมเลกุลที่มีทั้งประจุบวกและลบ (amphoteric molecule) ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของประจุที่อยู่ในหมู่แขนงข้าง (side chain) ของกรดอะมิโน เช่น หมู่ amino (ประจุบวก) และหมู่ carboxyl (ประจุลบ) การแตกตัวของหมู่ดังกล่าวขึ้นกับ pH ของสภาพแวดล้อมที่โปรตีนชนิดนั้นละลายอยู่

เมื่อโปรตีนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ถูกสร้างขึ้นให้มี pH ต่างกันเป็นลำดับ (pH gradient) และให้กระแสไฟฟ้าเข้าไป โปรตีนจะเคลื่อนที่ ซึ่งหากโปรตีนมีประจุบวกจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ ในทางตรงข้ามหากโปรตีนมีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก จนกระทั่งโปรตีนเคลื่อนที่ไปตรงบริเวณที่ pH เท่ากับ pI ของตัวเอง โปรตีนจะไม่เคลื่อนที่ต่อไป เนื่องจากประจุรวมของโปรตีนในบริเวณดังกล่าวมีค่าเท่ากับศูนย์ อย่างไรก็ตามกระแสไฟฟ้าอาจทำให้โปรตีนมีการแพร่ออกจากตำแหน่ง pI ทำให้โปรตีนกลับมามีประจุอีกครั้งแต่ก็จะเคลื่อนกลับไปที่บริเวณเดิมที่ทำให้ประจุรวมเป็นศูนย์ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า focusing effect (Görg, 2004)

1.4.1.2 **Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elctrophoresis (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนออกจากกันด้วยกระแสไฟฟ้าตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight: MW) ของโปรตีน โดยตัวกลางที่ใช้ในการแยกคือ polyacrylamide gel ที่มีส่วนผสมของ SDS ซึ่งเป็น anionic detergent เมื่อ SDS ละลายอยู่ในน้ำ จะเกิดการรวมตัวเป็น micelle มีลักษณะเป็นทรงกลมที่มี SDS อยู่ 70-80 โมเลกุล โดยหันหางที่เป็นไฮโดรคาร์บอนเข้าไปข้างใน ส่วนหัวที่มีหมู่ซัลเฟตจะหันออกด้านนอก โปรตีนจะจับตัวกับ micelle เกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ที่มีโครงสร้างคล้ายสายสร้อย (necklace-like structure) ซึ่งเชื่อมกันด้วย พอลิเปปไทด์ สายสั้นๆ โดยอัตราส่วนระหว่าง SDS และโปรตีนที่ประกอบเป็นสารเชิงซ้อนนั้นเท่ากับ

1.4:1 กรัม SDS จะทำหน้าที่ห่อหุ้มประจุของโปรตีนเกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนซึ่งมีประจุลบสุทธิต่อมวลที่แน่นอน

ในระยะแรกของการทำ SDS-PAGE ค่าการนำไฟฟ้าของเจลจะสูงเนื่องจากการมีไอออนของ chloride ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้เร็ว และเมื่อไอออนของ glycine หรือ tricine ซึ่งเคลื่อนที่ได้ช้าได้เข้าไปในเจลมากขึ้น ค่าการนำไฟฟ้าก็จะลดลงเป็นผลให้กระแสไฟฟ้าสูงขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดความร้อนที่มากเกินในช่วงท้ายของการทำ SDS-PAGE จึงควรใช้กระแสไฟฟ้าที่ต่ำในตอนแรกแล้วจึงเพิ่มขึ้นในตอนหลัง

การกำหนดสภาวะของการทำ SDS-PAGE นั้น สามารถกำหนดโดยการตั้งค่าที่เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) ซึ่งมักแบ่งสภาวะของการให้กระแสไฟฟ้าเป็น 2 ช่วง ในแต่ละช่วงจะใช้กระแสแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องมือที่ใช้และความหนาของเจล ตัวอย่างเช่น ในการทำ SDS-PAGE ของเครื่อง miniVE ที่ใช้ strip 7 cm และใช้ polyacrylamide gel ที่มีความหนา 1 mm นั้น จะกำหนดกระแสเป็น 10 mA ต่อเจลนาน 15 นาทีในช่วงแรก และ 20 mA ต่อเจลไปจนกระทั่งเสร็จสิ้น เป็นต้น (Westermeier and Naven, 2002)

1.4.1.3 **การตรวจหาจุดโปรตีน**

โดยทั่วไปเทคนิคการย้อมเพื่อตรวจหาโปรตีนในเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ธรรมดา สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับ 2DE เจลได้ แต่ควรคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้ ได้แก่

- มีความไวเพียงพอในการตรวจวัดโปรตีนที่มีปริมาณน้อย
- สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้
- มีช่วงของการตรวจวัดจุดโปรตีนที่กว้าง
- มีความเหมาะสมต่อการนำโปรตีนไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี MS
- ไม่มีความเป็นพิษ
- เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
- ราคาไม่แพง

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีเทคนิคใดที่มีลักษณะดังกล่าวครบทุกข้อ แต่ละเทคนิคมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันไปดังตารางที่ 1.1 ซึ่งการพิจารณาเลือกใช้เทคนิคใดๆ นั้น ขึ้นอยู่กับธรรมชาติและปริมาณของโปรตีน ลักษณะของการนำไปวิเคราะห์ต่อ ตลอดจนความเหมาะสมของเครื่องมือและต้นทุนเป็นหลักสำคัญ

ตารางที่ 1.1 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคการตรวจหาจุดโปรตีนที่ใช้ในงานโปรติโอมิกส์

เทคนิค	ข้อดี	ข้อจำกัด
Colloidal Coomassie Brilliant Blue staining	- เหมาะกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ - ราคาไม่แพง - เข้ากันได้กับการวิเคราะห์ด้วย MS	- มีความไวในการตรวจวัดต่ำ - ตรวจวัดโปรตีนได้ตั้งแต่ 100 ng ขึ้นไป - อนุภาคสีอาจรบกวนการวิเคราะห์เจล
Hot Coomassie Brilliant Blue staining	- เหมือนวิธีแรก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม	- มีความไวในการตรวจวัดต่ำ - ตรวจวัดโปรตีนได้ตั้งแต่ 200 ng ขึ้นไป - ต้องเอาสีย้อมออกจากพื้นหลังเจล
Zinc imidazol Negative staining	- มีความไวในการตรวจปานกลาง - ตรวจวัดโปรตีนได้ตั้งแต่ 10 ng - ไม่รบกวนต่อการวิเคราะห์ด้วย MS	- ไม่เหมาะต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
Silver staining (Silver nitrate)	- มีความไวในการตรวจวัดสูง - ตรวจวัดโปรตีนได้ตั้งแต่ 0.5 ng - ไม่รบกวนต่อการวิเคราะห์ด้วย MS	- วิเคราะห์เชิงปริมาณได้จำกัด - มีหลายขั้นตอนยุ่งยาก

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

เทคนิค	ข้อดี	ข้อจำกัด
Silver staining (Silver diamine)	- เหมือน silver staining วิธีแรก แต่สามารถย้อมสีโปรตีนในช่วงเบสได้ดีกว่า	- เหมือนวิธี silver staining แบบแรก แต่ใช้ silver nitrate ในปริมาณที่สูงกว่า
Fluorescent staining With RuBPS[1]	- มีความไวในการตรวจวัดค่อนข้างดี - ตรวจวัดโปรตีนได้ในระดับ 5 ng - ไม่รบกวนต่อการวิเคราะห์ด้วย MS	- ใช้เวลานานเพราะต้องย้อมสีข้ามคืน - ต้องมีเครื่องสแกนสำหรับ fluorescence - อนุภาคสีอาจรบกวนการวิเคราะห์เจล
Fluorescent labeling (DIGE)[2]	- เหมือน fluorescent staining แต่สามารถเปรียบเทียบตัวอย่าง 3 ชนิดได้ภายในเจลเดียว	- ต้องปรับวิธีติดฉลากให้เข้ากับตัวอย่าง - ต้องมีเครื่องสแกนสำหรับ fluorescence - มีค่าใช้จ่ายสูง
Radioactive labeling	- มีความไวในการตรวจวัดสูง - ตรวจวัดโปรตีนได้ถึงระดับ pg - เหมาะกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ	- มีข้อจำกัดต่อการใช้กับเซลล์ที่มีชีวิต - มีการปลดปล่อยสารกัมมันตรังสี
Stable isotope Labeling	- เหมือนวิธี radioactive	- ยังคงอยู่ในช่วงพัฒนาเพื่อใช้กับ 2DE - มีค่าใช้จ่ายสูง
Western blotting	- มีความไวในการตรวจวัดสูงมาก - สามารถตรวจวัดเฉพาะโปรตีนที่สนใจได้	- เพิ่มขั้นตอน electrophoresis เพื่อย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน - ต้องมี antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ

หมายเหตุ: [1]RuBPS หมายถึง Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate)

[2]DIGE หมายถึง Difference two-dimensional electrophoresis

สำหรับการตรวจหาจุดโปรตีนในห้องปฏิบัติการโปรติโอมิกส์ส่วนใหญ่มักนิยมใช้วิธีย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

Coomassie Brilliant Blue staining

มี 2 วิธีคือ colloidal staining และ hot staining สำหรับวิธีแรกจะย้อมเจลด้วยสี Coomassie G-250 ในเมทานอลสลับกับการแช่เจลด้วย 20% ammonium sulfate ในน้ำหลายๆ ครั้ง ammonium sulfate จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงของการจับกันระหว่างโปรตีนและสีย้อม วิธีนี้ใช้เวลานานและไม่เหมาะสำหรับงานที่ต้องการความรวดเร็วและทำในปริมาณมาก ส่วนการย้อมอีกวิธีหนึ่งจะให้ผลรวดเร็วกว่าวิธีแรก โดยใช้สี Coomassie R-350 ใน 10% acetic acid ที่ให้ความร้อนถึง 80-90°C แล้วเทลงบนเจล ย้อมสีนาน 10 นาทีแล้วจึงล้างออกด้วย 10% acetic acid หลายๆ ครั้งที่อุณหภูมิห้อง วิธีนี้สามารถย้อมสีซ้ำอีกจนได้ความเข้มตามที่ต้องการ

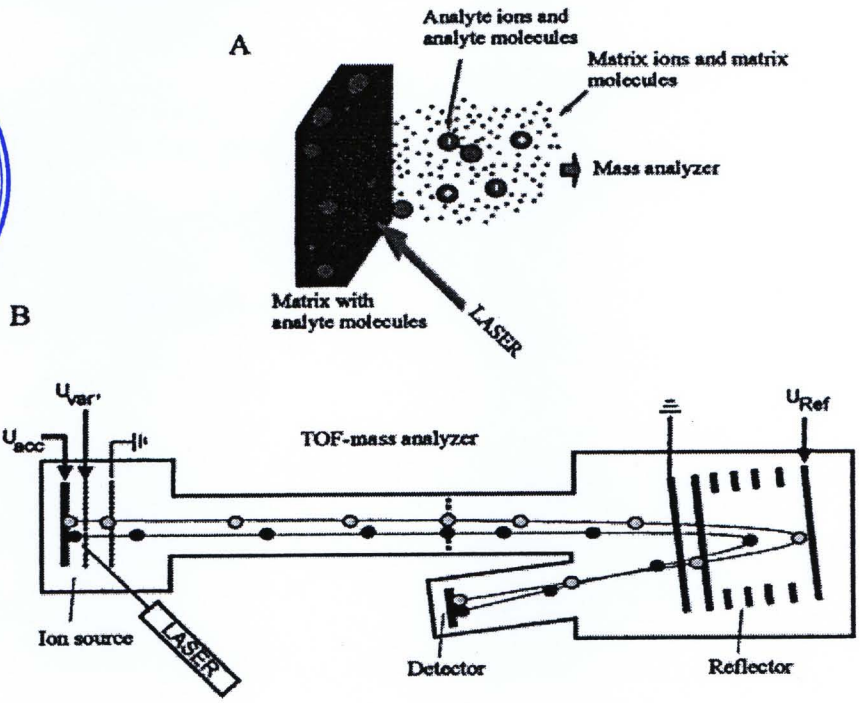
1.4.2 Mass spectrometry (MS)

แมสสเปกโทรเมตรี เป็นเทคนิคที่ใช้วัดมวลโมเลกุลของสารจากการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุ (charged particles) ในสนามไฟฟ้า (electric field) หรือสนามแม่เหล็ก (magnetic field) โดยสารจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปไอออนในสภาวะแก๊ส (gas phase) ก่อนจะถูกแยกออกจากกันตามอัตราส่วนของมวลต่อประจุของไอออน (mass: charge ratio, m/z) MS ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ (1) ส่วนที่เปลี่ยนสารให้อยู่ในรูปไอออน (ion source) (2) ส่วนที่แยกไอออนออกจากกันตาม m/z (analyzer) และ (3) ส่วนที่ตรวจวัดไอออนที่ออกมาเป็นลำดับ (detector) ในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี MALDI-ToF MS (Westermeier and Naven, 2002)

1.4.2.1 Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)

การเกิดไอออนโดยใช้เทคนิค MALDI (รูปที่ 1.1) เริ่มจากผสมสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) กับ matrix ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ขนาดเล็กในปริมาณที่มากเกินพอเพื่อให้แต่ละโมเลกุลของสารแยกกันอย่างอิสระ จากนั้นผ่านแสงเลเซอร์เข้าไปยังสารผสมดังกล่าว พลังงานแสงจะไปกระตุ้นโมเลกุลของ matrix ทำให้เกิดการสั่นและหลุดออกมาสู่สภาวะสุญญากาศโดยพาสารที่วิเคราะห์ออกมาด้วย จากนั้นไอออนของ matrix จะส่งผ่านโปรตอนไปยังโมเลกุลของ

สารที่วิเคราะห์เกิดเป็นไอออนก่อนที่ไอออนของ matrix จะระเหยไปเหลือแต่ไอออนของสารที่เดินทางเข้าสู่เครื่อง analyzer โดยทั่วไปเทคนิค MALDI มักใช้คู่กับ ToF analyzer



รูป 1.2 การทำงานของ MALDI ToF

ที่มา: Lennon (1997)

1.4.2.2 **Time of flight (ToF) analyzer**

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอออนที่มาจากส่วนของ ion source โดยตรวจวัดเวลาที่ไอออนเดินทางในท่อของ ToF ไปยังเครื่องตรวจวัดหรือ detector โดยเวลาดังกล่าวจะแปรตามรากที่สองของอัตราส่วนระหว่างมวลต่อประจุของไอออน เมื่อให้ความต่างศักย์คงที่ดังสมการ

$$\text{Time of Flight} = k\sqrt{m/z}$$

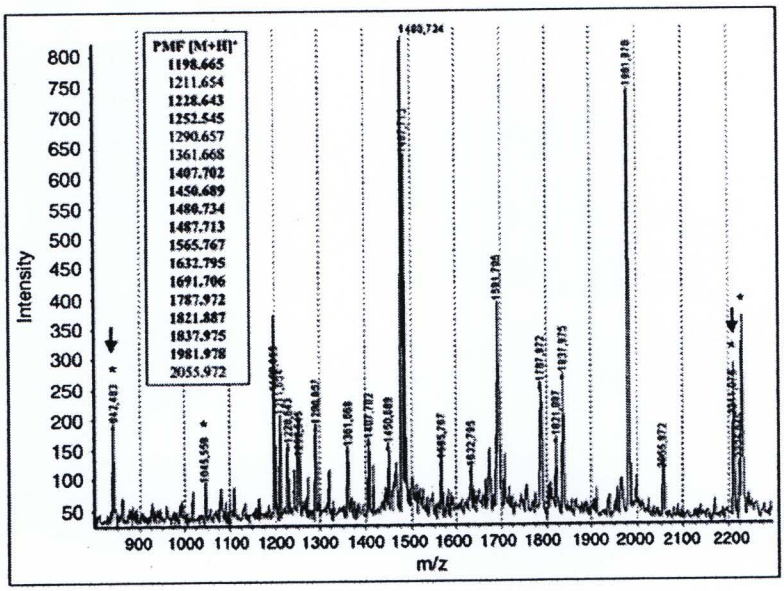
ToF analyzer แบบ linear ToF analyzer มีลักษณะเป็นท่อยาวและมีความต่างศักย์สูง ไอออนแต่ละตัวที่เข้ามาในท่อนี้จะมีพลังงานเท่ากันแต่มีค่ามวลต่อประจุแตกต่างกัน ดังนั้นความเร็วในการเคลื่อนที่ภายในท่อของ ToF analyzer จึงแตกต่างกันด้วย โดยไอออนขนาดเล็ก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 18 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน 246187
เลขเรียกหนังสือ

ซึ่งมีมวลต่อประจุต่ำจะมีความเร็วสูงกว่าไอออนขนาดใหญ่ที่มีค่ามวลต่อประจุสูง จึงตกกระทบ detector เป็นลำดับต่างกัน

1.4.2.3 Peptide mass fingerprint (PMF)

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค MS นั้น จะต้องตัดโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เสียก่อน ที่นิยมใช้มี 2 วิธี คือ (1) การย่อยด้วยเอนไซม์ และ (2) การตัดด้วยสารเคมี ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค MS จะอยู่ในรูปของ Mass spectrum ซึ่งแกน y เป็นความเข้ม (intensity) และแกน x เป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของ peptide fragment (รูปที่ 1.2) โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีค่ามวลต่อประจุของ peptide fragment ที่เฉพาะตัว ข้อมูลดังกล่าวนี้เรียกว่า peptide mass fingerprint หรือ PMF



รูป 1.3 Mass spectrum ของเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีน ตัวเลขในกรอบสี่เหลี่ยมคือค่า PMF

เนื่องจากค่า PMF ของโปรตีนเป็นค่าที่จำเพาะ ทำให้สามารถวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่สนใจด้วยการเปรียบเทียบค่า PMF ของโปรตีนที่ต้องการทราบชนิดกับค่า PMF ของโปรตีนที่มีในฐานข้อมูล (database) ซึ่งค่า PMF ในฐานข้อมูลอาจเป็นค่าจริงที่ได้จากการทดลอง หรือเป็นค่าที่คำนวณได้จากคอมพิวเตอร์ ซึ่งได้จากการนำโปรตีนทั้งหมดที่มีในฐานข้อมูลมาตัดด้วยเอนไซม์หรือสารเคมีแบบ *in silico* แล้วคำนวณหามวลโมเลกุลของแต่ละ fragment ผลที่ได้

จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจะแสดงเป็นคะแนน (score) หากคะแนนสูงแสดงว่าโปรตีนที่สนใจน่าจะเป็นโปรตีนชนิดเดียวกันกับที่พบในฐานข้อมูล นอกจากค่า PMF แล้ว อาจมีข้อมูลอื่นประกอบเพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการระบุชนิดของโปรตีนด้วย ได้แก่ ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ ค่า pH หรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน เป็นต้น

ในปัจจุบันมีการพัฒนาโปรแกรมสืบค้นหลายๆ โปรแกรม ที่สามารถนำค่า PMF รวมถึงข้อมูลอื่นๆของโปรตีนที่สนใจ เข้าไปเปรียบเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูลเช่น MASCOT (www.metrixscience.com), Profound (http://prowl.rockefeller.edu) และ MS-Fit (www.prospector.ucsf.edu) เป็นต้น

แม้ว่าการระบุชนิดของโปรตีนที่สนใจด้วยการนำ PMF รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนจะให้ความรวดเร็วและไม่ซับซ้อน แต่ในบางกรณีค่า PMF ที่ได้อาจไม่ตรงกับค่าของโปรตีนชนิดใดในฐานข้อมูล ทั้งนี้เนื่องมาจากในการตัดจุดโปรตีนออกจากเจล อาจมีโปรตีนอื่นที่อยู่ใกล้เคียงติดมาด้วย ทำให้ค่า PMF ที่ได้ส่วนหนึ่งมาจากเปปไทด์ของโปรตีนปนเปื้อน หรือโปรตีนอาจเกิดการดัดแปลงที่ไม่สามารถทำนายได้ในฐานข้อมูล นอกจากนี้ข้อมูล PMF ที่ได้อาจไม่เพียงพอต่อการระบุชนิดของโปรตีนเนื่องจากปริมาณโปรตีนสำหรับทำ MS มีน้อยเกินไป

1.5 การศึกษาโปรติโอมิกส์ของการตอบสนองต่อเกลือในแบคทีเรีย

โดยปกติเมื่อแบคทีเรียถูกเหนี่ยวนำด้วยเกลือ แบคทีเรียจะมีกลไกการตอบสนองเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่รอดภายใต้สภาวะที่มีเกลือได้ จากการศึกษาการตอบสนองในเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่มีต่อเกลือโดยใช้เทคนิคโปรติโอมิกส์ พบว่าโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับความเครียด (Ctc and DnaK), transporters (GbuA and mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB), และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมแทบอลิซึม (alanine dehydrogenase, CcpA, CysK, EF-Tu, Gap, GuaB, PdhA, and PdhD) มีการแสดงออกมากขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วยเกลือ (Duché *et al.*, 2002) การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรีย *Halobacillus dabanensis* D-8^{T} ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถทนเกลือ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *H. dabanensis* D-8^{T} ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 1 - 25% เป็นเวลา 5 และ 50 นาที ระดับการ

แสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรียดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงถึง 59 ชนิด โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมี 8 ชนิด ได้แก่ CheY-like receiver, Hypothetical protein plu3513, ATP-binding subunit, ClpC ATPase, heat shock protein, Oxaloacetate decarboxylase, Enolase และ Ornithine transcarbamylase ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการนำสัญญาณ (signal transduction) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมแทบอลิซึม และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด (Feng *et al.*, 2006)

Shamseldin และคณะ (2006) ได้ศึกษาโปรติโอมิกส์ของแบคทีเรีย *Rhizobium etli* และ *Sinorhizobium meliloti* ที่ตอบสนองต่อการทนเกลือ โดยใช้เทคนิค 2D difference in gel electrophoresis พบว่าหลังจากการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้กับแบคทีเรีย *R. etli* มีโปรตีน 49 ชนิด ที่มีการแสดงออกที่ต่างไปจากภาวะเดิมที่ไม่มีเกลือ โดยโปรตีน 14 ชนิดมีการแสดงออกมากขึ้น ส่วนอีก 35 ชนิดมีการแสดงออกลดลง แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นโปรตีนชนิดใด เนื่องจากยังไม่มีฐานข้อมูลจีโนมของ *R. etli* จึงต้องทำการศึกษาในแบคทีเรีย *S. meliloti* เนื่องจากมีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *R. etli* อย่างมาก พบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกมากขึ้นได้แก่ carboxynospermidine decarboxylase ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ spermidine ซึ่งเป็นโพลีเอมีนชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่ในการไปจับกับโปรตีน ไขมัน เพื่อทำให้เซลล์ของแบคทีเรียอยู่รอดในสภาวะนั้นได้ และ isoleucyl-tRNA synthase มีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการการสังเคราะห์โปรตีน ส่วนกลุ่มของโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงคือ เอนไซม์กลุ่ม catalase และ citase syntase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน โดยการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้เป็นการแสดงออกที่เป็นปกติของการตอบสนองในเซลล์แบคทีเรียที่ต้องปรับตัวให้อยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือได้

นอกจากการใช้โปรติโอมิกส์ศึกษาโปรตีนทั้งหมดของเซลล์แบคทีเรียแล้วยังมีการนำโปรติโอมิกส์มาใช้ในการศึกษาการตอบสนองของโปรตีนที่พบในบางส่วนของเซลล์ เช่น การศึกษาการตอบสนองของโปรตีนที่พบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของ *Vibrio parahaemolyticus* ต่อเกลือ โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือที่ 0.85% และ 3.5% พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน outer membrane protein ชนิด V และ W, elongation factor TU และ

polar flagellin โดยที่โปรตีนบางชนิดมีการแสดงออกมากในสภาวะที่มีเกลือ 0.85% แต่บางชนิดมีการแสดงออกของโปรตีนมากในสภาวะที่มีเกลือ 3.5% (Xu *et al.*, 2004)

Paul และคณะ (2006) ได้ศึกษาโปรติโอมิกส์ของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* MSP-393 ที่ทำให้ต้นข้าวเจริญเติบโตได้ในดินเค็ม เมื่อเปรียบเทียบกับแบคที่เรียดังกล่าวที่เจริญเติบโตในอาหารที่ไม่ได้เติมเกลือพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมด 22 โปรตีน แต่สามารถระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีนได้ 15 ชนิด เช่น glutamine synthetase มีบทบาทต่อการสังเคราะห์ glutamate ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในการควบคุมความดันของแบคทีเรีย acyl carrier protein (ACP) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ช่วยในการส่งเสริมต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ survival protein (SurE) มีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียในช่วง stationary-phase และในสภาวะที่มีความดันสูง RNA helicases ทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ในภาวะที่อุณหภูมิต่ำ และ acyl-CoA dehydrogenase oxidoreductase protein มีหน้าที่สำหรับย่อย carnitine แล้วได้ γ-butyrobetaine ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ glycine betaine ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ osmoprotectants

สำหรับการศึกษาการตอบสนองของแบคทีเรีย *Dermacoccus abyssi* ต่อเกลือด้วยเทคนิค โปรติโอมิกส์ยังไม่มีรายงานมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของแบคทีเรีย *D. abyssi* โดยใช้เทคนิคโปรติโอมิกส์ เพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการทนเกลือ โดยเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรีย *D. abyssi* ที่เลี้ยงในภาวะที่มีเกลือและไม่มีเกลือ อันจะนำไปสู่ความเข้าใจในกลไกการทนเกลือของแบคทีเรีย *D. abyssi* ต่อไป

1.6 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อวิเคราะห์หาโปรตีนที่ตอบสนองต่อเกลือของแบคทีเรีย *D. abyssi* โดยใช้เทคนิคโปรติโอมิกส์