

บทที่ 2

วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี เชื้อแบคทีเรีย

2.1.1 วัสดุอุปกรณ์

ชื่อวัสดุอุปกรณ์และรุ่น

Analytical balance, PB 1502-S

Autoclave, MLS-3780

Bench top centrifuge,

Centrifuge tube, 50 cm

Cuvette quartz cell

Electrophoresis power supply, EPS601

Ettan IPG Strip holder, 7 cm

Grinding kit

Hot plate and magnetic stirrer, Torrey

ImageMaster 2D Platinum software,

ImageScanner, UTA-1120

Immobiline DryStrip pH 4-7 L, 7 cm

Incubator, WB M15

Isoelectric focusing system,

Ettan IPGphor II

Microcentrifuge, MIKRO 20

Microcentrifuge tube, 1.5 ml

Micropipette, Biohit Proline

Minishaker, MS 1

LabScan software version 5.0

บริษัทผู้ผลิตและประเทศ

Mettler Toledo, Switzerland

Sanyo, Japan

Allegra 64R Beckman Coulter, USA

Falcon, USA

Perkin Elmer, USA

Amersham Biosciences, Sweden

Amersham Biosciences, Sweden

Amersham Biosciences, Sweden

Pines Scientific, USA Clifton Cerastir

Amersham Biosciences, England

version 5.0

Amersham Biosciences, Sweden

Amersham Biosciences, Sweden

Falc, Italy

Amersham Biosciences, Sweden

Hettich Zentrifugen, Germany

Hycon, USA

Finland

Ika, Malaysia

Amersham Biosciences, UK

ชื่อวัสดุอุปกรณ์และรุ่น

Lambda 25 UV/VIS Spectrometer
 Laminar flow, Telstar Bio-II-A
 Light microscope, CH 30 RF-200
 Photography Eyepiece-PC
 Pipette tip
 Platform stirrer, STR 8 Stuart
 pH meter, 713
 Refrigerator (-20°C), WCP 65L
 Vertex, Genie-2 G-560E
 Vertical electrophoresis system, miniVE

บริษัทผู้ผลิตและประเทศ

Perkin Elmer, USA
 Terrassa, Spain
 Olympus, Japan
 Gammaco, Thailand
 Axygen, USA
 Scientific, England
 Metrohm, Switzerland
 Whirlpool, Thailand
 Bohemia, USA
 Amersham Biosciences, USA

2.1.2 สารเคมี**ชื่อสารเคมี**

Acetic acid, glacial
 Acrylamide PAGE
 Agarose NA
 Ammonium persulfate
 Bromophenol blue sodium salt
 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-
 1-propane sulfonate, CHAPS
 2D Clean-up kit
 Dithiothreitol, DTT
 2D Quant kit

บริษัทผู้ผลิตและประเทศ

Carlo Erba, Italy
 Amersham Biosciences, Sweden
 Amersham Biosciences, Sweden
 Amersham Biosciences, Sweden
 USB, USA
 USB, USA
 Amersham Biosciences, USA
 USB, USA
 Amersham Biosciences, USA

ชื่อสารเคมี

DryStrip cover fluid
 Ethanol (95%)
 D (+)-Glucose Ajax
 Glycerol (87%)
 Glycine
 Hydrochloric acid (37%), HCl
 N, N'-methylenebisacrylamide
 Murashige and Skoog basal salt mixture,
 MS 5524
 Nutrient agar
 Nutrient broth
 Iodoacetamide, IAA
 IPG buffer pH 4-7 L
 Phytigel
 Protease inhibitor mix
 Protein marker, LMW calibration kit
 Silver staining kit, protein
 Sodium hydroxide, NaOH
 Sodium hypochlorite
 Sodium dodecyl sulfate, SDS
 D (+)-Sucrose
 N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine,
 TEMED
 Thiourea
 Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris
 Triton X-100 SPI
 Tween 20
 Urea

บริษัทผู้ผลิตและประเทศ

Amersham Biosciences, Sweden
 Merck, Germany
 Finechem, Australia
 Amersham Biosciences, Sweden
 USB, USA
 Carlo Erba, Italy
 Amersham Biosciences, Sweden
 Sigma, USA

 Conda, Spain
 Conda, Spain
 Amersham Biosciences, England
 Amersham Biosciences, Sweden
 Sigma, USA
 Amersham Biosciences, USA
 Amersham Biosciences, Sweden
 Amersham Biosciences, Sweden
 Carlo Erba, Italy
 Carlo Erba, Italy
 USB, USA
 Fisher Scientific, England
 Amersham Biosciences, Sweden

 Carlo Erba, Italy
 USB, USA
 Supplies, USA
 Promega, USA
 Amersham Biosciences, Sweden

2.1.3 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *Dermaococcus abyssi* ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร.วสุ ปฐมอารีย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.2 การเลี้ยงเชื้อ *Dermaococcus abyssi* และ ทดสอบการตอบสนองในสภาวะที่มีเกลือ

2.2.1 การเลี้ยงเชื้อ *Dermaococcus abyssi*

นำเชื้อ *D. abyssi* มากระตุ้นโดยการเขี่ยเชื้อลงใน NA medium จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เมื่อได้ 48 ชั่วโมง จึงเขี่ยเชื้อ *D. abyssi* 1 loop ลงใน NB medium แล้วนำไปไว้ใน incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 150 ต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.2.2 การทดสอบการตอบสนองของเชื้อ *Dermaococcus abyssi* ในสภาวะที่มีเกลือ

เตรียม NB medium 50 ml ลงใน flask ขนาด 250 ml โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มการทดลองคือ กลุ่ม NB medium ที่ไม่เติมเกลือ 6 flask และกลุ่ม NB medium ที่เติมเกลือ NaCl (5%) 2 flask เมื่อได้เชื้อ *D. abyssi* ที่มีอายุ 12 ชั่วโมงแล้วให้เปิด cell suspension ลงใน NB medium flask ละ 1 ml จากนั้นนำ flask ทั้งหมดไปบ่มใน incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 150 ต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 620 nm โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3 การศึกษารูปแบบโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี 2DE

2.3.1 การสกัดและการเตรียมโปรตีนเชื้อ *Dermaococcus abyssi*

2.3.1.1 การสกัดโปรตีนจากเชื้อ *Dermaococcus abyssi*

หลังจากได้เชื้ออายุ 8 ชั่วโมง กลุ่มที่ไม่มีเกลือจะมีค่าความหนาแน่นของเชื้อประมาณ 10^6 cell/ml ส่วนกลุ่มที่มีเกลือ มีค่าความหนาแน่นของเชื้อประมาณ 10^9 cell/ml ทำการเก็บ cell โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm 10 นาที จากนั้นเติม lysis solution ปริมาตร 250 μ l ลงในหลอด centrifuge ของแต่ละกลุ่มการทดลองแล้วเปิดสารละลายมารวมกันให้เหลือสารกลุ่มละ 1 หลอด ที่มีสารปริมาตร 500 μ l จากนั้นเปิดสารละลายลงใน grinding kit (Amersham Biosciences) หลอดละ 250 μ l นำไป Freeze-Thaw โดยแช่ liquid nitrogen นาน 90 วินาที และ แช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 40 °C นาน 90 วินาที สลับกัน 10 รอบ ทำการบด cell ด้วย grinding kit หลอดละ 1 นาที แล้วนำไปปั่น

เหวี่ยงที่ 16000 rpm 15 นาที 4°C ปิดเปิดส่วนที่เป็นของเหลวใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติม TCA หลอดละ 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C 24 ชั่วโมง

2.3.1.2 การตกตะกอนโปรตีน

หลังเติม TCA เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16000 rpm 30 นาที 4 °C กำจัดของเหลวอย่างรวดเร็ว ทำให้ตะกอนแห้งโดยใช้ micropipette เป่าเบาๆ แล้วเติม acetone solution หลอดละ 1 ml ปั่นเพื่อกระจายตะกอนบ่มที่ -20 °C 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 16000 rpm 5 นาที 4 °C ขั้นตอนนี้ทำ 2 ครั้ง กำจัดของเหลวอย่างรวดเร็ว ทำให้ตะกอนแห้งโดยใช้ micropipette เป่าเบาๆ เติม rehydration stock solution ปริมาตร 50 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16000 rpm 5 นาที ดูดของเหลวใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ นำไปหาปริมาณ โปรตีน หรือเก็บที่ -80 °C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

2.3.1.3 การวัดปริมาณที่สกัดด้วย 2D Quant Kit

เตรียมหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จำนวน 10 หลอด โดยหลอดที่ 1 ไม่เติม สารละลาย BSA (2 mg/ml) ส่วนหลอดที่ 2-6 เติมในปริมาณ 5, 10, 15, 20 และ 25 μ l ตามลำดับ สำหรับหลอดที่ 7-8 เติมสารละลาย โปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารที่ไม่มี กลีโกลี ปริมาตร 2 และ 4 μ l หลอดที่ 9-10 เติมสารละลาย โปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียในอาหารที่มีกลีโกลี 5% ปริมาตร 2 และ 4 μ l ตามลำดับ จากนั้นเติม precipitant ปริมาตร 500 μ l ลงในทุกหลอดผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วเติม co-precipitant ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm 5 นาที เพื่อตกตะกอน โปรตีน เเทของเหลวที่อยู่ในหลอดทิ้งอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการละลายกลับของตะกอนอาจปั่น เหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดของเหลวออกให้หมด จากนั้นเติมสารละลาย copper ปริมาตร 100 μ l ลงไป ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 400 μ l ผสมให้เข้ากันเพื่อละลายตะกอนโปรตีน แล้ว เติม working color reagent ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที ก่อน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 nm (A_{480}) โดยใช้น้ำเป็นตัวตั้งค่าศูนย์ จากนั้นสร้างกราฟ มาตรฐานของ BSA จากค่า A_{480} และปริมาณ โปรตีน เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของ โปรตีนตัวอย่าง

2.3.2 การแยกโปรตีนด้วยวิธี IEF

เตรียมสารละลายสำหรับทำ IEF ปริมาตร 125 μ l ซึ่งประกอบไปด้วยตัวอย่างโปรตีน 60 μ g ที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงในอาหารไม่มีเกลือ หรือ โปรตีนที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงในอาหารมีเกลือ 5%, 20 mM DTT, 0.8% v/v IPG buffer และ rehydration stock solution (การคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก ค) หลังจากผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงแบบ quick spin 20 นาที ปิดสารละลายที่เตรียมไว้ลงไป strip holder ขนาด 7 cm โดยค่อยๆ ปล่อยสารจากขั้วบวกไปลบ 2 ใน 3 ของ strip holder อย่างให้มีฟองอากาศ

เตรียม IPG strip (pH 4-7 ขนาด 7 cm)* โดยใช้ forceps ลอกพลาสติกที่ติดอยู่กับ IPG strip ออก ระวังอย่าจับส่วนที่เป็นเจลวาง strip ลงใน strip holder โดยคว่ำหน้าเจลลงระวังอย่าให้เกิดฟอง ปิดผิวหน้า strip ด้วย Drystrip cover fluid เพื่อป้องกันการระเหยและการตกผลึกของ urea ระหว่างทำ IEF จากนั้นปิดฝา strip holder แล้วนำไปวางบนเครื่อง Ettan IPGphor II โดยวางให้ขั้วบวกและลบของ electrode ใน strip holder อยู่ตรงกับพื้นที่ขั้วบวกและลบของ electrode ในเครื่อง IPGphor II จากนั้นปิดฝาเครื่องแล้วตั้งโปรแกรมทำ IEF ดังนี้

Prot#1	7 cm	pH 4-7 L	
Rehydration	12:00 Hr	@ 20 °C	
IEF	@ 20 °C	50 μ A/strip	
	2 strips 5 steps		
S1 Step and hold		150V	300 Vhr
S2 Step and hold		300V	300 Vhr
S3 Gradient		1000V	300 Vhr
S4 Gradient		5000V	4500 Vhr
S5 Step and hold		5000V	3000 Vhr
Total			8400 Vhr

* ในการทำการทดลองช่วงแรกใช้ IPG strip 3-10 NL เพื่อดูความสามารถในการแยกของโปรตีนที่แสดงออกทั้งหมด

เมื่อเริ่มทำ IEF ให้กดปุ่ม Start และเมื่อเสร็จสิ้นการทำ IEF หน้าจอเครื่อง IPGphor II จะปรากฏข้อความดังนี้

Run ended at		
5000 V	8401 VHrs	Total
28 uA	5:33 Hrs	Total
Press STOP to reset		

กดปุ่ม stop แล้วเปิดฝาเครื่องเพื่อนำ strip ออกจาก strip holder ไปทำการแยกโปรตีนในทิศทางที่ 2 ต่อไป

2.3.3 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

2.3.3.1 การเตรียมเจลสำหรับทำ SDS-PAGE

การประกอบเครื่อง mini VE เริ่มจากประกอบกระจกเว้าและตรง โดยมี spacer คั่นกลางแล้ววางลงใน module โดยให้กระจกเว้าอยู่ด้านใน จากนั้นจัดกระจกทั้งสองให้ขอบเท่ากัน ยกที่ยึดทั้งสองด้านมาอยู่ในตำแหน่งเหนือ spacer หมุนสกรูคู่ตรงข้ามจนกระทั่งที่ยึดทั้งคู่ติดกับกระจกพอดี แล้วยก sealing plate ด้านล่างขึ้นปิดด้านล่างของกระจก เติมน้ำกลั่นลงไปในช่วงว่างระหว่างกระจกทั้งสองเพื่อตรวจการรั่วของ module ปิด acrylamide solution ความเข้มข้น 12.5% v/v ใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองจนกระทั่งสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบกระจกเว้าประมาณ 5 mm จากนั้นปิดฝิหน้าด้วยน้ำ deionized แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

2.3.3.2 การ equilibrate IPG strip ก่อนทำ SDS-PAGE

เตรียมหลอดทดลอง centrifuge ขนาด 15 ml 4 หลอด โดย 2 หลอดมี 0.04 g DTT และอีก 2 หลอด มี 0.1 g IAA จากนั้นเติม SDS equilibration buffer 4 ml ลงไปในแต่ละหลอดเพื่อละลายสารที่อยู่ในหลอด นำ IPG strip 2 อันที่ผ่านการทำ IEF แล้ว มาใส่ในหลอดที่มี DTT หันด้านพลาสติกของ IPG strip แนบกับข้างหลอด แล้วนำไปวางบนเครื่องโยกเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้าย IPG strip มาใส่ใน 2 หลอดที่มี IAA แล้วนำไปวางบนเครื่องโยกต่ออีก 15 นาที

2.3.3.3 การนำ strip ใส่เครื่อง mini VE และทำ SDS-PAGE

แช่ IPG strip ที่ได้จาก 2.3.2.2 ใน 1X SDS electrophoresis running buffer เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้ววาง strip ลงบนเจลที่เตรียมไว้ (จากข้อ 2.3.2.1) โดยให้ด้านพลาสติกแนบกับกระจกด้านนอก และให้ด้านบวกลอยซ้าย เตรียม protein marker โดยปีเปิด protein marker ปริมาตร 1 μ l ลงบนกระดาษกรอง ขนาด 3 x 5 mm) แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นวางกระดาษกรองลงตรงช่องว่างด้านซ้ายของ IPG strip แล้วปิดผิวหน้า IPG strip ด้วย agarose sealing solution

ปลดล็อก sealing plate ของ module ให้อยู่ในระดับล่างสุดก่อนนำมาใส่ใน electrophoresis chamber ให้อยู่เหนือขีดที่บอกระดับต่ำสุด กำจัดฟองอากาศที่อยู่ขอบกระจกทั้งด้านบนและล่าง ปิดฝาต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วตั้งโปรแกรมการทำ SDS-PAGE ดังนี้

Step1: Current 10 mA/gel 0:15 Hr

Step2: Current 20 mA/gel 1:30 Hr

Max 600 V and 100 W

เมื่อตั้งโปรแกรมทั้ง 2 ขั้นตอนเสร็จให้กดปุ่ม Run เพื่อเริ่มการทำ SDS-PAGE ในขั้นตอนแรก เมื่อเสร็จสิ้นตามเวลาที่กำหนด ให้กดปุ่ม Stop ตามด้วย Set เพื่อเปลี่ยนโปรแกรมเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ซึ่งในขั้นตอนนี้ให้สังเกตแถบของ bromophenol blue เมื่อแถบเคลื่อนที่ลงมาห่างจากขอบเจลด้านล่าง 5 mm ให้กดปุ่ม Stop เพื่อหยุดการทำงานของเครื่อง จากนั้นปิดเครื่องจ่ายไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากเครื่อง miniVE ใส่กล่องพลาสติกใสสำหรับย้อมสีเจลด้วยวิธี Coomassie Blue staining ต่อไป

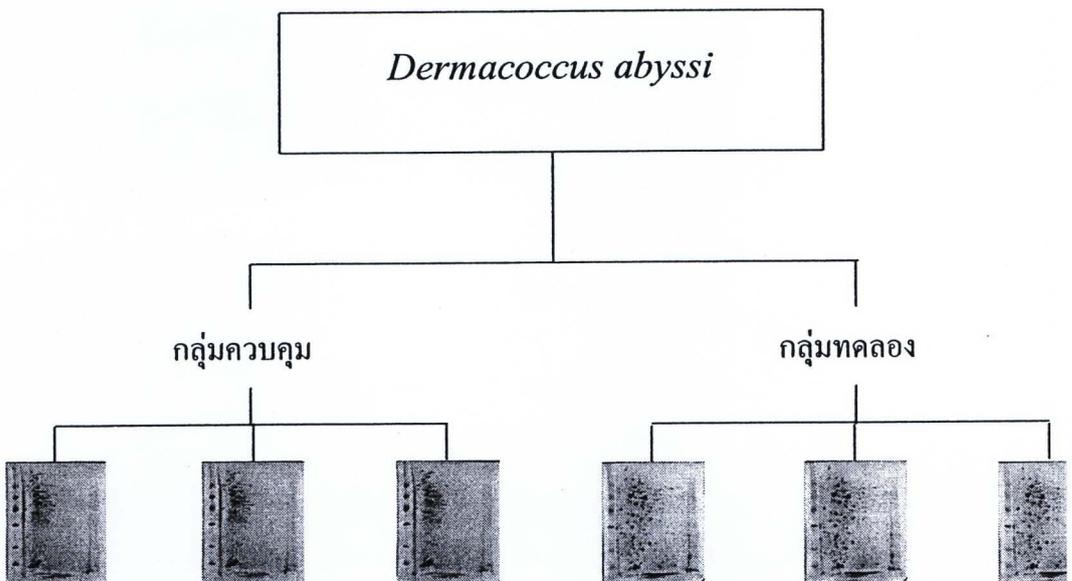
2.3.4 การตรวจหาจุดโปรตีนด้วยวิธี Coomassie Blue staining

เตรียม fixation solution และ coomassie blue staining solution ตามภาคผนวก ข จากนั้นนำเจลจากข้อ 2.3.2 มาแช่ใน fixation solution อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นแช่เจลใน coomassie blue staining solution อย่างน้อย 5 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างด้วยน้ำ deionized จนกระทั่งน้ำ deionized ที่ล้างไม่มีสีของ coomassie blue ออกมากับน้ำ จากนั้นจึงนำเจลที่ได้ไปสแกนเพื่อวิเคราะห์ภาพเจลต่อไป

2.3.5 การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในเจล

บันทึกภาพเจลที่ได้จากการย้อมด้วย coomassie blue ด้วยเครื่องสแกน ImageScanner และใช้โปรแกรม ImageMaster 2D Platinum version 5.0 หาจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันและเกิดขึ้นใหม่ โดยแบ่งกลุ่มของการเปรียบเทียบออกเป็น 2 กลุ่ม ดังแสดงในรูป 2.1 ได้แก่

1. การวิเคราะห์เชื้อ *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB medium ที่ไม่ได้เติม
2. การวิเคราะห์เชื้อ *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB medium ที่เติมเกลือ 5%

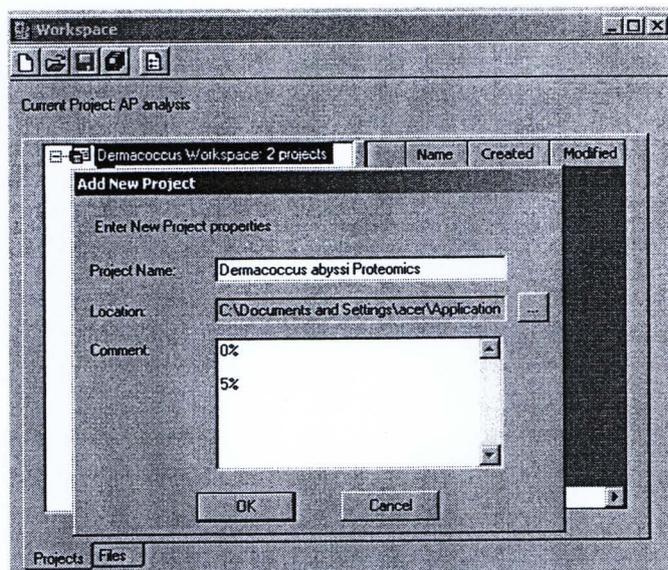


รูป 2.1 แผนภาพแสดงการแบ่งกลุ่มการวิเคราะห์ภาพเจลเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนใน *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB 2 สภาวะ

2.3.5.1 การสร้าง workspace เพื่อวิเคราะห์ภาพเจล (Create workspace)

1. เลือกโปรแกรม **Image Master** เพื่อเปิดหน้าต่างของโปรแกรม
2. เปิดภาพเจลที่อยู่ในชุดของการวิเคราะห์ทั้งหมด โดยใช้เมนู **File** คำสั่ง **Import** ตามด้วย **Images** จากนั้นจะปรากฏหน้าต่างของ **Import Image** เลือก **Reduction factor** เป็น **TIFF** กด **OK** แล้วเลือกภาพเจลที่ต้องการ
3. สร้าง **workspace** หรือแผนการวิเคราะห์โดยเลือกไอคอน 

4. สร้าง **project** หรือชุดการทดลอง โดยคลิกขวาที่ **Image Master Workspace** ในหน้าต่างของ **Workspace** แล้วเลือก **New Project** จากนั้นตั้งชื่อ **project** ในหน้าต่างที่ปรากฏขึ้นซึ่งในการทดลองนี้มี **project** ของ *D. abyssii* ที่เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ตามรูป 2.2



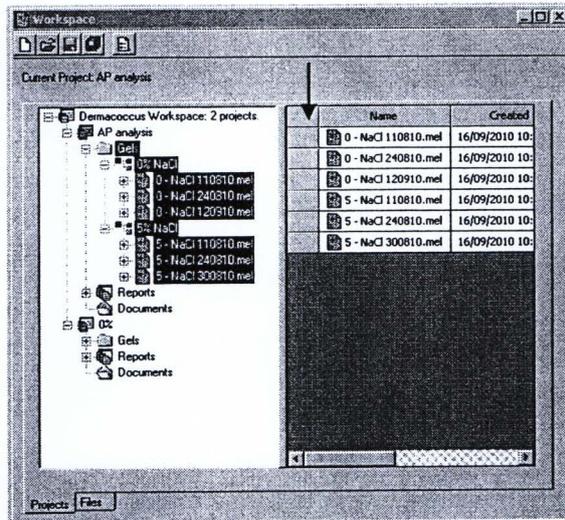
รูป 2.2 หน้าต่างของ Workspace และ Add New Project

5. สร้าง **class** หรือกลุ่มของภาพเจลที่จัดอยู่ในพวกเดียวกันใน **project** โดยคลิกขวาที่ชื่อ **project** แล้วเลือก **Add New Class** จากนั้นใส่ชื่อของ **class** และระบุรายละเอียดในแต่ละ **class** ลงในหน้าต่างของ **Create Class** ที่ปรากฏขึ้น
6. หลังจากสร้าง **class** แล้ว เลือกภาพเจลใส่ลงในแต่ละ **class** โดยคลิกขวาที่ชื่อ **class** แล้วเลือก **Add** ตามด้วย **Gels From Disk** เลือกภาพเจลที่อยู่ในรูปของไฟล์แบบ **.mel** ที่ต้องการให้อยู่ใน **class** เดียวกัน ดังรูป 2.3
7. กดคลิกขวาที่ชื่อ **project** แล้วเลือก **Set As Active Project** เพื่อกำหนดให้ **project** ที่สร้างขึ้นเป็น **project** ที่ใช้ในการวิเคราะห์
8. คลิกซ้ายที่มุมซ้ายบนของตารางภาพเจลตามลูกศรในรูป 2.3 เพื่อเลือกภาพเจลทั้งหมด จากนั้นคลิกขวา เลือก **Open** เพื่อเปิดภาพเจลใน **project** ที่ต้องการวิเคราะห์

9. กด ไอคอน



เพื่อจัดเก็บ workspace ที่สร้างขึ้นเป็นลำดับสุดท้าย



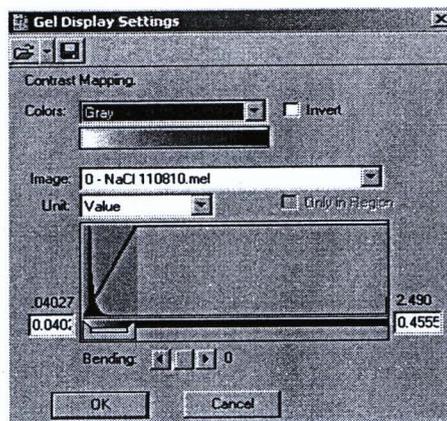
รูป 2.3 Workspace ที่สร้างจากภาพเจลและข้อมูลในการทำโปรตีนของ

D. abyss

2.3.5.2 การปรับความแตกต่างระหว่างจุดโปรตีนและพื้นหลัง (Adjust contrast)

การปรับลักษณะภาพทำได้โดยใช้เมนู View คำสั่ง **Adjust Contrast** แล้วเลือก

Current จะปรากฏหน้าต่างของ Gel Display Setting (รูป 2.4)

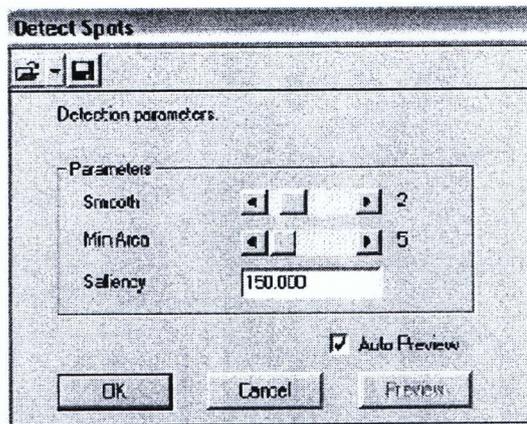


รูป 2.4 หน้าต่างของ Gel Display Setting

กด **Bending** หรือลากแถบเครื่องมือตามลูกศรในภาพเพื่อปรับภาพเจด กด **OK** จากนั้นสีของภาพเจดจะเปลี่ยนไปตามที่ตั้งไว้ ลองปรับเปลี่ยนค่าต่างๆ เพื่อให้ภาพเจดมีลักษณะที่สะดวกต่อการวิเคราะห์โดยลวดสีของพื้นหลังได้ในขณะที่ความเข้มของจุดโปรตีนคมชัดขึ้น เมื่อได้ภาพเจดตามที่ต้องการแล้ว ไปที่เมนู **File** คำสั่ง **Save** แล้วเลือก **All Changes**

2.3.5.3 การตรวจหาจุดโปรตีนบนภาพเจด (Spot detection)

เลือกภาพเจดที่ต้องการวิเคราะห์แล้วไปที่เมนู **Edit** คำสั่ง **Spot** เลือก **Auto - Detect** ตามด้วย **Current** จะปรากฏหน้าต่างของ **Detect Spot** (รูป 2.5)



รูป 2.5 หน้าต่างของ Detect Spot

ในการทดลองนี้จะปรับค่า **smooth**, **min area**, และ **saliency** ไว้ 2, 5 และ 150 ตามลำดับ เมื่อตั้งค่า **parameter** ต่างๆ แล้วกด **OK** ซึ่งจุดต่างๆ บนภาพเจดจะถูกตรวจพบตามค่าที่ตั้งไว้ จนได้ลักษณะของจุดโปรตีนที่ต้องการแล้ว ไปที่เมนู **File** คำสั่ง **Save** เลือก **All Changes** เพื่อจัดเก็บจุดบนภาพเจดที่ได้ตั้งค่าไว้

2.3.5.4 การปรับแก้ไขจุดโปรตีนที่ได้ (Spot editing)

จุดโปรตีนบนภาพเจดสามารถปรับแก้ไขได้โดยกดไอคอน  เลือกจุดโปรตีนที่ต้องการ จากนั้นคลิกขวาเลือก **Spot** ตามด้วย **Edit** และ **Edit enabled** รูปไอคอนจะเปลี่ยนเป็น  แล้วจึงปรับแก้ไขจุดโปรตีนโดยใช้วิธีการต่างๆ ต่อไปนี้

Split: การตัดจุดโปรตีนที่ควรมีมากกว่า 1 จุดออกจากกัน โดยคลิกขวาแล้ววาดเส้นตัดระหว่างจุด

Grow: การขยายขนาดขอบของจุดโปรตีน โดยคลิกซ้ายแล้ววาดเส้นขอบนอกโดยตั้งต้นจากภายในขอบเดิมของจุด

Reduce: การลดขนาดขอบของจุดโปรตีน โดยคลิกซ้ายแล้ววาดเส้นขอบในโดยตั้งต้นจากภายในขอบเดิมของจุด

Merge: การรวมจุดโปรตีนที่มี 2 จุด ซึ่งควรเป็นจุดเดียวกัน โดยคลิกซ้ายเลือกจุดที่ 1 แล้ววาดเส้นเชื่อมจากภายในจุดที่ 1 ไปยังภายในจุดที่ 2 เป็นวงรอบทั้ง 2 จุด

เมื่อเสร็จสิ้นการปรับแก้ไขจุดโปรตีนแล้ว คลิกขวาเลือก **Spot** ตามด้วย **Edit** และ **Delete** จากนั้นทำการ **Save all changes** เพื่อจัดเก็บจุดโปรตีนที่ปรับแก้ไขแล้วเป็นลำดับสุดท้าย

2.3.5.5 การจับคู่จุดโปรตีนบนภาพเจลกับเจลแม่แบบ (Gel matching)

1. สร้างตำแหน่ง **landmark** เพื่อให้เป็นจุดสังเกตเมื่อนำภาพเจลมาซ้อนกัน โดย

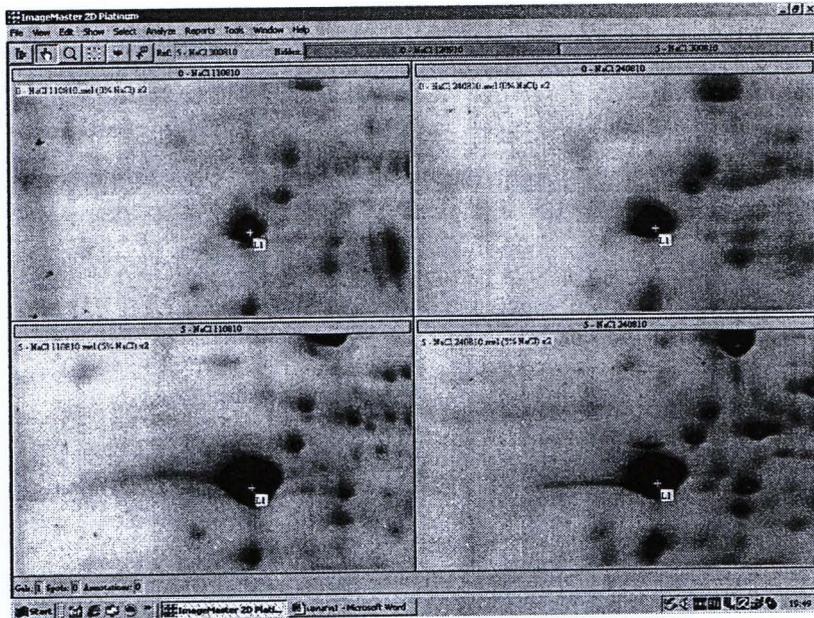
1.1 กดไอคอน  แล้วตั้ง **landmark** โดยกด **shift** ร่วมกับการคลิกซ้ายเพื่อเลือกจุดโปรตีนเดียวกันที่มีอยู่ในทุกภาพเจล จุดที่เลือกควรเป็นจุดที่กลมและอยู่ห่างจากจุดอื่นๆ ใกล้เคียง

1.2 คลิกขวาเลือก **Annotations** ตามด้วย **Edit** และ **Add label**

1.3 เลือกชนิดของ **annotations** เป็น **landmark** ในหน้าต่างของ **Add Label** ที่ปรากฏขึ้น

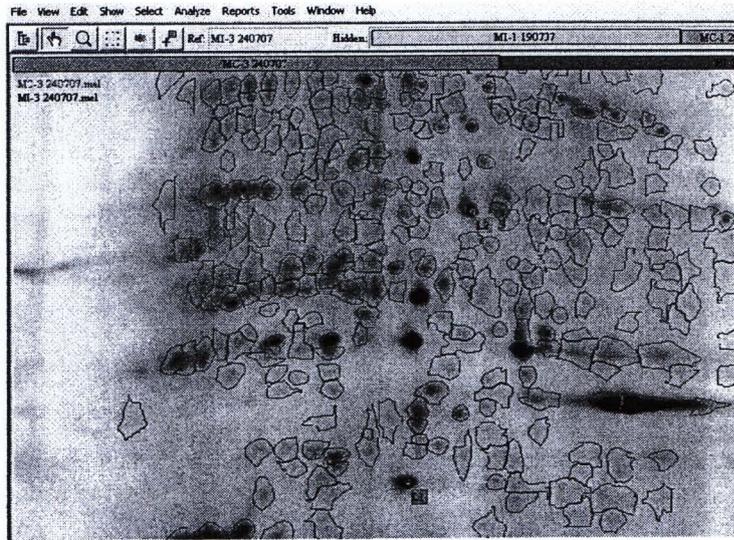
1.4 ใส่ชื่อ เช่น **L1, L2,...** แล้วกด **OK** จะได้ตำแหน่ง **landmark** ดังรูป 2.6

1.5 ทำซ้ำตั้งแต่ข้อที่ 1.1 สำหรับการสร้าง **landmark** ตำแหน่งถัดไป โดยปกติมักใส่ 2-3 ตำแหน่ง



รูป 2.6 การแสดงตำแหน่ง landmark ในแต่ละภาพเจล

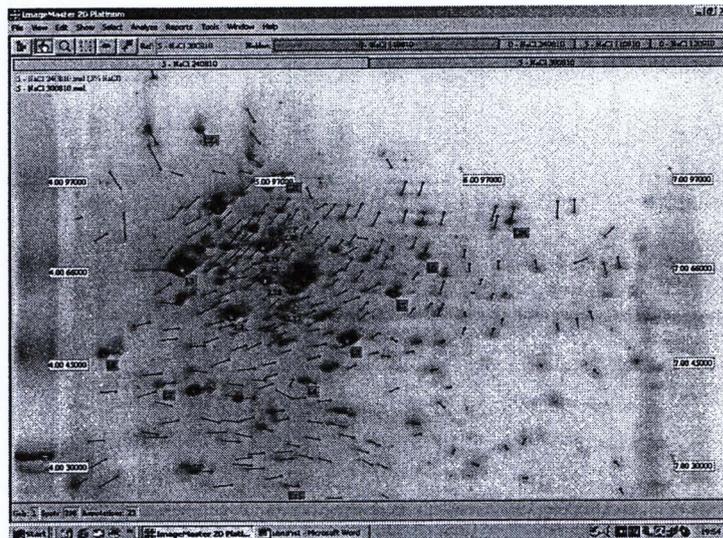
2. เลือกเจลแม่แบบ (**reference gel**) ในแต่ละชุดของการวิเคราะห์ โดยควรเป็นภาพเจลที่มีจุดโปรตีนมากที่สุด
3. จับคู่โปรตีนบนภาพเจลกับเจลแม่แบบ โดยเลือกภาพเจลที่ต้องการจับคู่แล้วใช้เมนู **Edit** คำสั่ง **Pairs** เลือก **Auto - Match Gels** ภาพเจลทั้งหมดที่เลือกจะถูกจับคู่กับเจลแม่แบบเป็นคู่ๆ
4. ตรวจสอบการจับคู่ของจุดโปรตีนโดยนำภาพเจลแต่ละภาพมาซ้อนกันกับเจลแม่แบบหรือ เรียกว่า **stacking gel** ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้
 - 4.1 กด **Ctrl + A** เพื่อเลือกภาพเจลทั้งหมด
 - 4.2 ใช้เมนู **View** คำสั่ง **Stack** เลือก **Selected Gels** เพื่อนำภาพเจลมาซ้อนกัน
 - 4.3 ใช้เมนู **View** คำสั่ง **Stack** เลือก **Show Transparent** เพื่อให้มองเห็นจุดโปรตีนที่ซ้อนทับกัน ดังแสดงในรูป 2.7



รูป 2.7 การซ้อนทับกันของภาพเจลแบบโปร่งแสงเพื่อให้เห็นจุดโปรตีน
ที่อยู่ตำแหน่งเดียวกัน

4.4 ใช้เมนู **View** คำสั่ง **Stack** เลือก **Show Pairs** เพื่อให้เห็นทิศทางของเส้น
เชื่อม (vector) ระหว่างจุดโปรตีนในภาพเจลที่เลือกกับเจลแม่แบบดังแสดงในรูป

2.8



รูป 2.8 การซ้อนทับกันของภาพเจลและแสดงเส้นเชื่อม (vector)
ระหว่างจุดโปรตีนจากภาพเจลทั้งสอง

4.5 พิจารณาจุดเส้น vector ที่เชื่อมจุดโปรตีนแต่ละคู่ว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกันหรือไม่ หากมีเส้นไม่ไปในทางเดียวกับเส้นอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นจุดโปรตีนที่จับคู่ผิด ควรจะมีการแก้ไขให้ถูกต้องในขั้นตอนถัดไป

5. การแก้ไขจุดโปรตีนที่จับคู่ผิดทำได้โดย

5.1 ยกเลิกการนำภาพเจลมาซ้อนกัน โดยกด **Ctrl + A** เพื่อเลือกภาพเจลทั้งหมดแล้วไปที่เมนู **View** คำสั่ง **Stack** เลือก **Unstack Selected Gels**

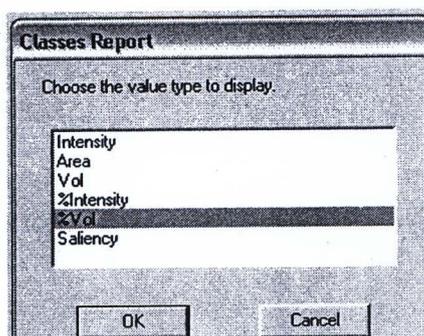
5.2 ลบจุดโปรตีนที่จับคู่ผิดโดยเลือกจุดโปรตีนคู่หนึ่งด้วยการคลิกซ้ายร่วมกับกด **shift** แล้วคลิกขวาไปที่ **Pairs** เลือก **Edit** ตามด้วย **Delete**

5.3 เพิ่มจุดโปรตีนที่ไม่ถูกจับคู่กันโดยเลือกจุดโปรตีนคู่หนึ่ง แล้วคลิกขวาไปที่ **Pairs** เลือก **Edit** ตามด้วย **Add**

5.4 นำภาพเจลมาซ้อนกันใหม่ แล้วดูเส้น vector ว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกันหรือไม่ เมื่อแน่ใจว่าแก้ไขจุดโปรตีนทุกคู่ให้จับคู่กันอย่างถูกต้องแล้ว กด **Save all changes** เพื่อจัดเก็บภาพเจล

2.3.5.6 การวิเคราะห์ผลที่ได้จากการจับคู่จุดโปรตีนในแต่ละภาพ (Data analysis)

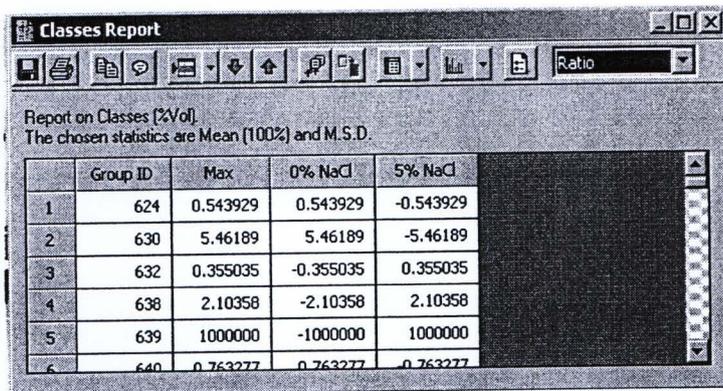
1. เลือกภาพเจลทั้งหมด แล้วเลือกกลุ่มของจุดโปรตีนทั้งหมดที่ถูกจับคู่กัน โดยใช้เมนู **Select** คำสั่ง **Group** เลือก **All**
2. สร้างรายงานการวิเคราะห์โดยใช้เมนู **Analyze** คำสั่ง **Classes Report** ซึ่งจะปรากฏหน้าต่างของ **Classes Report** (ภาพ 2.9) เลือกค่า **%Vol** กด **OK**



รูป 2.9 หน้าต่างของ Classes Report

3. เลือกใช้ค่า **Mean 100%** และ **M.S.D 100%** แล้วกด **OK** จะปรากฏหน้าต่างของ

Classes Report ดังภาพ 2.10



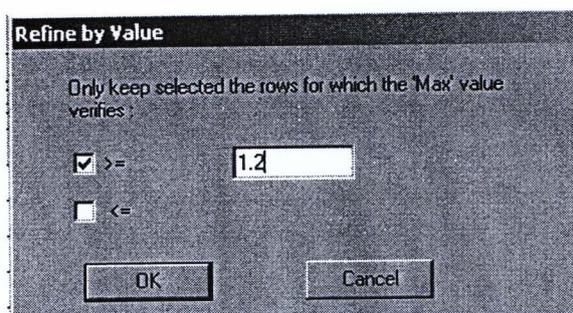
	Group ID	Max	0% NaCl	5% NaCl
1	624	0.543929	0.543929	-0.543929
2	630	5.46189	5.46189	-5.46189
3	632	0.355035	-0.355035	0.355035
4	638	2.10358	-2.10358	2.10358
5	639	1000000	-1000000	1000000
6	640	0.763277	0.763277	0.763277

รูป 2.10 หน้าต่าง Classes Report ซึ่งประกอบด้วย 4 คอลัมน์ ได้แก่ หมายเลขของจุดโปรตีน อ้างอิงจากเจลแม่แบบ (Group ID) ค่าเฉลี่ยของจุดโปรตีนแต่ละจุดในการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ ซึ่งแสดงในรูปของ %Vol และค่าสูงสุดของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่ม (Max)

4. เลือกการรายงานผลเป็นอัตราส่วน โดยเลือก **Ratio** จากช่อง **display value** ดังแสดงในรูป 2.15 แล้วจัดเก็บรายงานการวิเคราะห์โดยเลือกไอคอน 

5. เลือกไอคอน  ตามด้วย **Refine Selection** จะปรากฏหน้าต่างใหม่ เลือกค่า **Max** กด **OK**

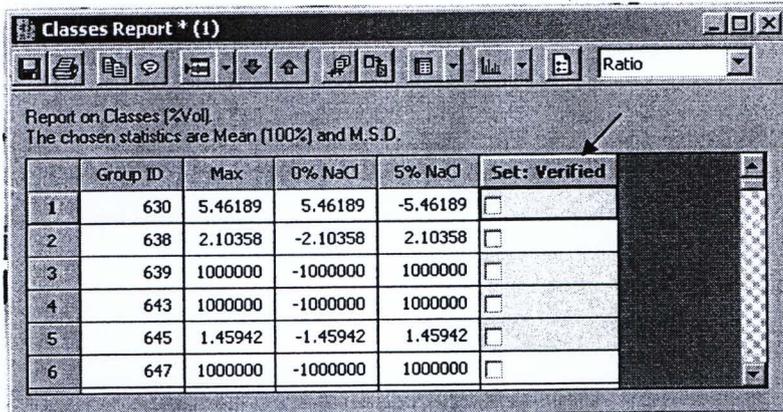
6. กำหนดอัตราส่วน %Vol จุดโปรตีนที่ถูกจับคู่ในแต่ละเจลในหน้าต่างของ **Refine by value** ที่ ปรากฏขึ้น (ภาพ 2.11) ตัวอย่างเช่น เลือก ≥ 1.2 หมายความว่าถ้าจุดโปรตีนคู่นั้นมีความแตกต่างของ %Vol มากกว่าหรือเท่ากับ 1.2 เท่าขึ้นไป จะถูกตรวจพบแสดงเป็นแถบสีเขียว



รูป 2.11 หน้าต่างของ Refine by Value

7. เลือกไอคอน  ตามด้วย **Report From Selection** เพื่อเลือกเอาเฉพาะคู่ของจุดโปรตีนที่ถูกตรวจพบในข้อ 6 มาสร้างเป็นรายงานอันใหม่

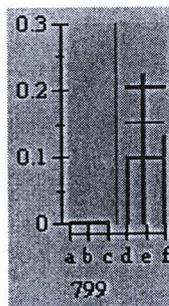
8. กดไอคอน  จะปรากฏหน้าต่าง **Annotate** เลือก **Set: Verified** กด **OK** จะได้คอลัมน์เพิ่มใน **Classes Report** ที่ถูกสรซึ่งีแสดงในรูป 2.12



	Group ID	Max	0% NaCl	5% NaCl	Set: Verified
1	630	5.46189	5.46189	-5.46189	<input type="checkbox"/>
2	638	2.10358	-2.10358	2.10358	<input type="checkbox"/>
3	639	1000000	-1000000	1000000	<input type="checkbox"/>
4	643	1000000	-1000000	1000000	<input type="checkbox"/>
5	645	1.45942	-1.45942	1.45942	<input type="checkbox"/>
6	647	1000000	-1000000	1000000	<input type="checkbox"/>

รูป 2.12 หน้าต่างของ Classes Report ที่เพิ่มคอลัมน์ Set: Verified

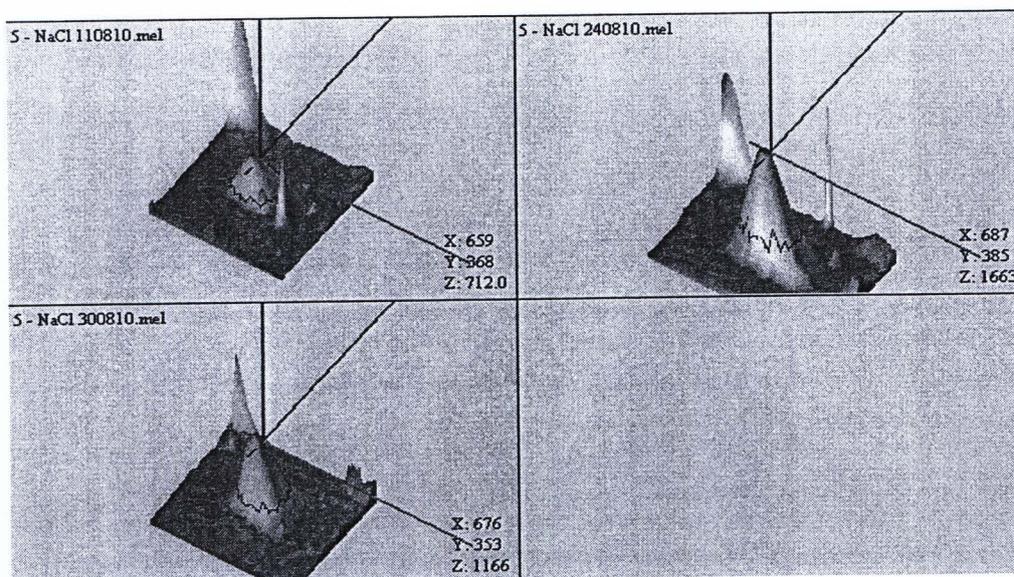
9. เลือกไอคอน  เพื่อสร้างฮิสโตแกรมของจุดโปรตีน จาก **Classes + Groups** histogram ดังแสดงในรูป 2.13



รูป 2.13 ฮิสโตแกรมของจุดโปรตีน spot ID 799 โดยเส้นสีส้มแสดงถึงค่า %Vol ของจุดโปรตีนในแต่ละกลุ่มทดลองซึ่งค้นด้วยเส้นสีเทา ส่วนเส้นสีฟ้าแสดงถึงค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดลอง (mean value) และเส้นสีแดงแสดงถึงการกระจายตัวของค่า %Vol ในแต่ละกลุ่มทดลอง (dispersion interval)

10. สร้างภาพ 3 มิติของจุดโปรตีนเพื่อคุณลักษณะของจุด โดยเลือกจุดโปรตีนที่ต้องการแล้วไปที่เมนู **Report** เลือก **3D View** จะปรากฏภาพ 3 มิติ ของจุดโปรตีนดังแสดงในรูป

2.14



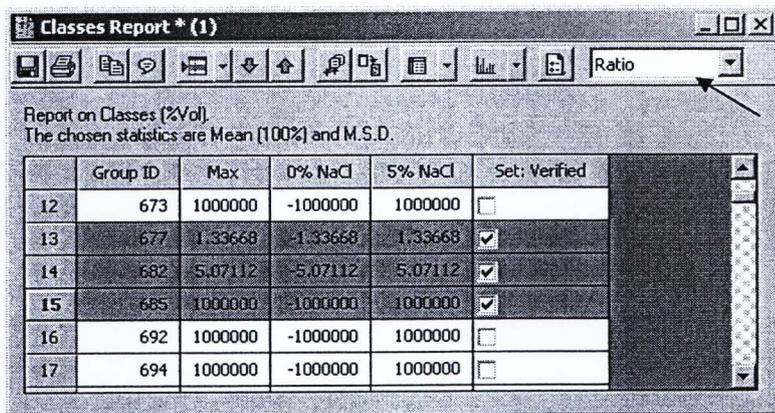
รูป 2.14 ภาพ 3 มิติของจุดโปรตีน spot ID 799

11. พิจารณาว่าจุดโปรตีนที่จับคู่กันมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันจริงหรือไม่ โดยใช้ข้อมูลฮิสโตแกรมและภาพ 3 มิติ ของจุดโปรตีน ซึ่งจุดโปรตีนในแต่ละกลุ่มทดลองควรมี %Vol ที่ใกล้เคียงกัน และมีความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มทดลองจึงจะถือว่าจุดโปรตีนคู่ นั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

12. เมื่อจุดโปรตีนในแต่ละกลุ่มทดลองผ่านการพิจารณาว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแล้ว เติมเครื่องหมายถูกในช่องของ **Set: Verified** จากนั้นพิจารณาจุดโปรตีนคู่ต่อไปโดยเลื่อนไอคอน 

13. หลังจากพิจารณาจุดโปรตีนทั้งหมดแล้ว เลือก **Refine Selection** จะได้รายงานใหม่ที่มีเฉพาะจุดโปรตีนที่ระบุ **Set: Verified** หรือจุดที่แตกต่างกันอย่างแท้จริงดังรูป 2.15

14. จัดเก็บรายงานโดยกดไอคอน  จากนั้นอาจใช้เมนู **Edit** คำสั่ง **Annotations** เลือก **Add Label** แล้วสร้าง **Set: Picked** ของจุดโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ เพื่อเป็นเครื่องหมายว่าจุดโปรตีนในภาพเจลนั้นจะถูกตัดไปวิเคราะห์ด้วยวิธี MS ต่อไป



	Group ID	Max	0% NaCl	5% NaCl	Set: Verified
12	673	1000000	-1000000	1000000	<input type="checkbox"/>
13	677	1.33668	-1.33668	1.33668	<input checked="" type="checkbox"/>
14	682	5.07112	-5.07112	5.07112	<input checked="" type="checkbox"/>
15	685	1000000	-1000000	1000000	<input checked="" type="checkbox"/>
16	692	1000000	-1000000	1000000	<input type="checkbox"/>
17	694	1000000	-1000000	1000000	<input type="checkbox"/>

รูป 2.15 หน้าต่าง Classes Report ที่แสดงเฉพาะจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2.3.6 การย่อยและการเตรียมเปปไทด์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย MALDI TOF MS (In gel digestion)

1. ตัดจุดโปรตีนบน gel ที่สนใจด้วย tip ตัดปลาย นำจุดโปรตีนที่ตัดไปเก็บไว้ใน microtube ขนาด 1.5 ml แล้วเติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ท่วมชิ้น gel
2. กำจัดน้ำออกด้วยปิเปต เติม acetonitrile 30 μ l แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. กำจัด acetonitrile ด้วยปิเปต แล้วทำให้แห้งโดยนำไปวางไว้ใน dessicator เป็นเวลา 10 นาที
4. เติม 10 mM DTT ใน 100 mM NH_4HCO_3 , 150 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 °C 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. เติม iodoacetamide ใน 55 mM NH_4HCO_3 , 150 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ในความมืดที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที นำมา vortex เป็นครั้งคราว

6. กำจัดของเหลวออกด้วยปิเปต แล้วล้างชิ้นส่วนของ gel ด้วยการเติม 150 μl ของ 100 mM NH_4HCO_3 และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
7. กำจัด NH_4HCO_3 เติม acetonitrile 150 μl แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
8. ทำขั้นตอนที่ 6 และ 7 ซ้ำ กำจัด acetonitrile โดยนำไปวางไว้ใน desiccator เป็นเวลา 10 นาที
9. นำ microtube วางไว้ที่ในน้ำแข็งและเติม digestion buffer 30 μl (ภาคผนวก ข) แล้วตั้งไว้ในน้ำแข็ง 45 นาที
10. กำจัด digestion buffer เติม 50 mM NH_4HCO_3 8 μl ที่ปราศจาก trypsin แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน
11. หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที 2 นาที เพื่อให้ชิ้น gel ตกอยู่ที่ก้น microtube และเก็บของเหลวใส่ใน microtube ใหม่
12. เติม 20 mM NH_4HCO_3 20 μl ในหลอดที่มีชิ้น gel อยู่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเก็บส่วนที่เป็นของเหลว ใส่ใน microtube จากขั้นตอนที่ 11
13. เติมสารละลาย 5% formic acid และ 50% acetonitrile ปริมาตร 25 μl ลงใน microtube ที่มีชิ้นส่วนของ gel อยู่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
14. หลังจาก 20 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บส่วนที่เป็นของเหลวใส่ใน microtube จากขั้นตอนที่ 11
15. ทำขั้นตอนที่ 13-14 ซ้ำอีกสองครั้ง
16. นำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้ง โดยใช้ freeze-drier

2.4 การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยวิธี MS และ bioinformatics

จากจุดโปรตีนที่สนใจมีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญได้นำมาวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี MALDI-TOF MS ที่ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ประกอบด้วย mass spectrum และค่า PMF ของโปรตีนแต่ละจุด (ภาคผนวก จ) จากนั้นนำ PMF ของโปรตีนแต่ละจุดมาเปรียบเทียบกับ PMF ของโปรตีนในฐานข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยโปรแกรม MASCOT ซึ่งมีวิธีดังนี้

เข้าเว็บไซต์ <http://www.matrixscience.com/> เลือก Mascot ให้เลือก **Peptide Mass Fingerprint** จะปรากฏหน้าจอแสดงในรูป 2.16

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name Email

Search title

Database(s) Enzyme

Allow up to missed deavages

Taxonomy

Fixed modifications

Variable modifications

Protein mass kDa Peptide tol. \pm

Mass values MH⁺ M_r M-H⁻ Monoisotopic Average

Data file

Query
 NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.

Decoy Report top hits

รูป 2.16 หน้าจอของโปรแกรม MASCOT สำหรับสืบค้นชนิดโปรตีนจากค่า PMF

จากหน้าจอของโปรแกรมดังแสดงในรูป 2.16 ให้เติมหรือเลือกข้อมูลในแต่ละส่วนที่จำเป็นต่อ การสืบค้นดังนี้

Your name: Kowit

Email: icecream_ko@hotmail.com

Database: เลือก NCBI หรือ SwissProt ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย

Taxonomy: เลือก Actinobacteria (class)

Enzyme: เลือก Trypsin เนื่องจากใช้ Trypsin ในการย่อย โปรตีนให้เป็นเปปไทด์ สำหรับการทำให้ MALDI TOF MS

Allow up to: กำหนดเป็น 1 คือให้มีความผิดพลาดจากการตัดเปปไทด์ 1 ตำแหน่ง

Fixed modification: เลือก Carbamidomethyl (C) เนื่องจากในขั้นตอน strip equilibration iodoacetamide จะทำให้เกิดการดัดแปลงในกรดอะมิโน cysteine

Variable modifications: เลือก Oxidation (M) เนื่องจากเกิดการดัดแปลงขึ้นที่กรดอะมิโน methionine ในขั้นตอนของการย่อยโปรตีนเป็นสายเปปไทด์ด้วย Trypsin

Peptide tol ±: กำหนดให้เป็น 1.2 Da ซึ่งหมายถึงให้ค่า PMF เบี่ยงเบนไปจากค่าในฐานข้อมูลไม่เกิน 1.2 หน่วยมวลตัน

Mass values: เลือก MH^+ เนื่องจากใช้ MALDI เป็น ion source ซึ่งเป็นวิธีทำให้สารเกิดเป็นไอออนที่มีประจุ+1 (protonate) และเลือก Monoisotopic อันเป็นรูปแบบของ mass spectrum ที่ได้จากการวิเคราะห์

Query: พิมพ์ PMF ของจุดโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์