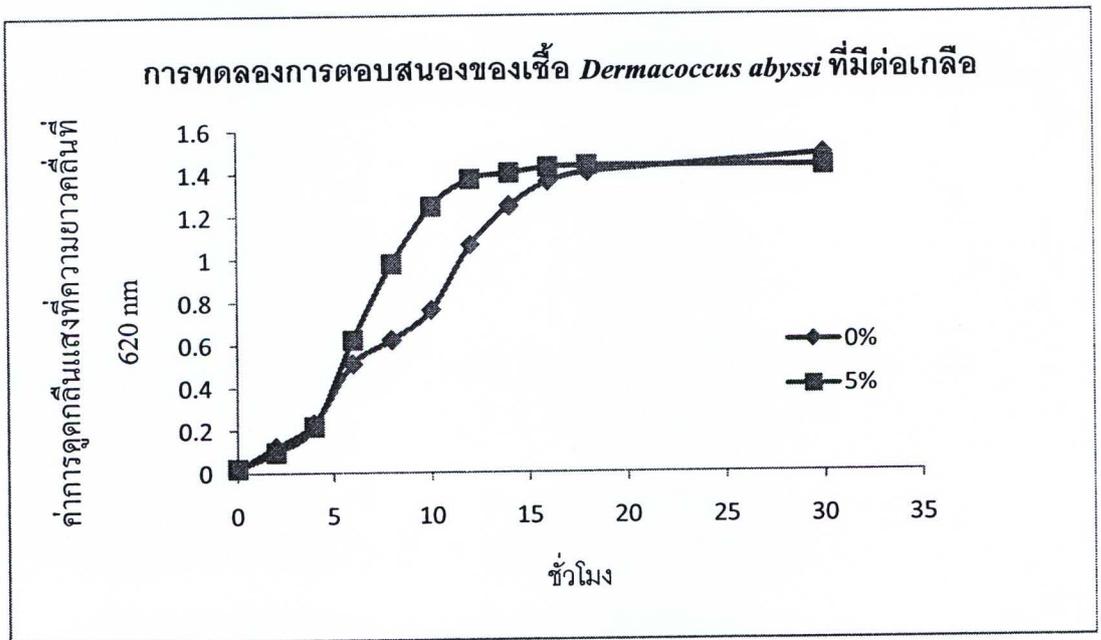


บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การตอบสนองของเชื้อ *Dermaococcus abyssi* ที่มีต่อเกลือ

เพื่อดูการตอบสนองของเชื้อ *Dermaococcus abyssi* ที่มีต่อเกลือ จึงแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม โดยนำเชื้อ *D. abyssi* มาเลี้ยงใน NB ที่มีเกลือ 5% และไม่มีเกลือเป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง โดยนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ทุก 2 ชั่วโมงเพื่อดูการเจริญเติบโตของเชื้อพบว่าเชื้อที่มีการเจริญเติบโตดังแสดงในตาราง 3.1 และ รูป 3.1 จากกราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *D. abyssi* ที่เลี้ยงใน NB ที่มีเกลือมีการเจริญเติบโตมากกว่าเชื้อ *D. abyssi* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่มีเกลืออย่างเห็นได้ชัดในช่วงเจริญเติบโตที่ log phase และเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 14



รูป 3.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Dermaococcus abyssi* ใน NB ที่มีเกลือ 5% และไม่มีเกลือ

ตาราง 3.1 การเจริญเติบโตของ *Dermaococcus abyssi* โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm

Time (hrs.)	Salt concentration	
	0%	5%
0	0.018±0.002	0.021±0.003
2	0.120±0.003	0.096±0.003
4	0.230±0.003	0.216±0.006
6	0.511±0.004	0.622±0.005
8	0.622±0.001	0.978±0.003
10	0.761±0.002	1.244±0.005
12	1.065±0.002	1.372±0.001
14	1.245±0.005	1.400±0.003
16	1.358±0.004	1.427±0.003
18	1.402±0.002	1.434±0.003
30	1.484±0.003	1.430±0.002

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จาก *Dermaococcus abyssi*

เมื่อทราบถึงการตอบสนองต่อเกลือของ *D. abyssi* จึงได้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนใน *D. abyssi* ด้วยวิธี 2DE เพื่อนำผลการทดลองไปเปรียบเทียบหาชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองในสภาวะที่มีเกลือของ *D. abyssi* หลังจากนำ *D. abyssi* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ (กลุ่มควบคุม) และ *D. abyssi* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% (กลุ่มทดลอง) มาสกัดโปรตีนและหาปริมาณโปรตีนที่สกัด พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 3.2

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าในแต่ละครั้งของการสกัดโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ได้จาก *D. abyssi* ในกลุ่มควบคุมปริมาณโปรตีนจะอยู่ในช่วง 2.64-7.85 µg/µl และกลุ่มทดลองปริมาณโปรตีนจะอยู่ในช่วง 11.09 – 17.70 µg/µl ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 ปริมาณโปรตีนที่สกัดจาก *Dermacoccus abyssi* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ (0%) และ *D. abyssi* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% (5%)

ครั้งที่	ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ปริมาณเฉลี่ย ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	0%	2.32	2.64
		2.96	
	5%	14.19	14.03
		13.87	
2	0%	7.59	7.85
		8.11	
	5%	12.90	11.09
		9.28	
3	0%	8.19	7.20
		8.46	
	5%	17.70	17.70
		-	

3.3 การวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการตอบสนองต่อเกลือของ *Dermacoccus abyssi*

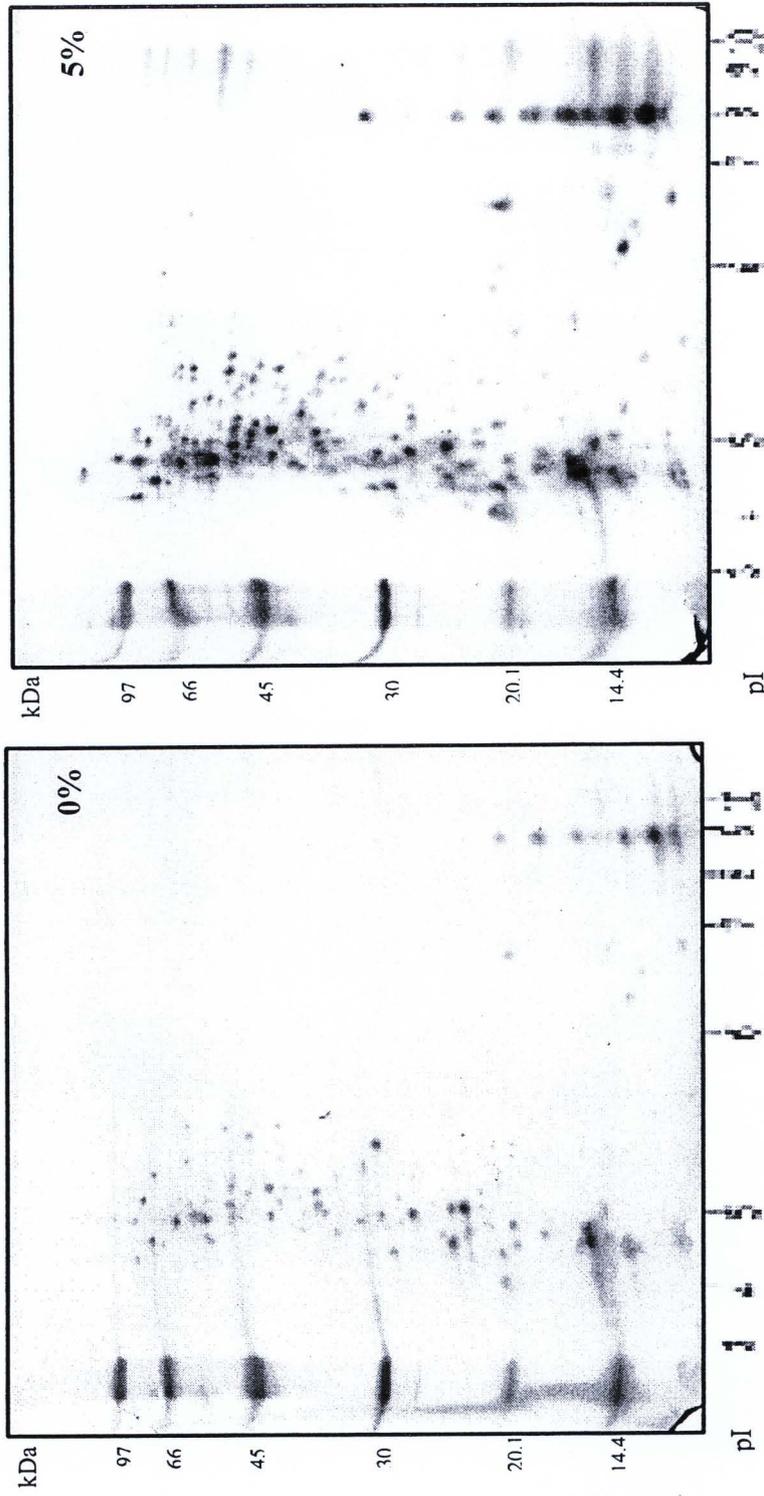
เมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้จาก *D. abyssi* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมาทำ IEF โดยใช้ IPG strip ขนาด 7 cm pH 3-10 NL เพื่อแยกโปรตีนตามความแตกต่างของค่า pI แล้วนำมาทำ SDS-PAGE เพื่อแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล พบว่าโปรตีนที่สกัดได้มีการแสดงออกส่วนใหญ่อยู่ในช่วง pH 4-7 ดังรูป 3.2

เพื่อให้การแยกดีขึ้น ในการทดลองนี้จึงใช้ IPG strip ขนาด 7 cm pH 4-7 L จากนั้นนำภาพเจลที่ได้ทั้ง 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ง) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum version 5 การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเกลือของ *D. abyssi* ผลการวิเคราะห์ได้จุดโปรตีนที่ระดับ

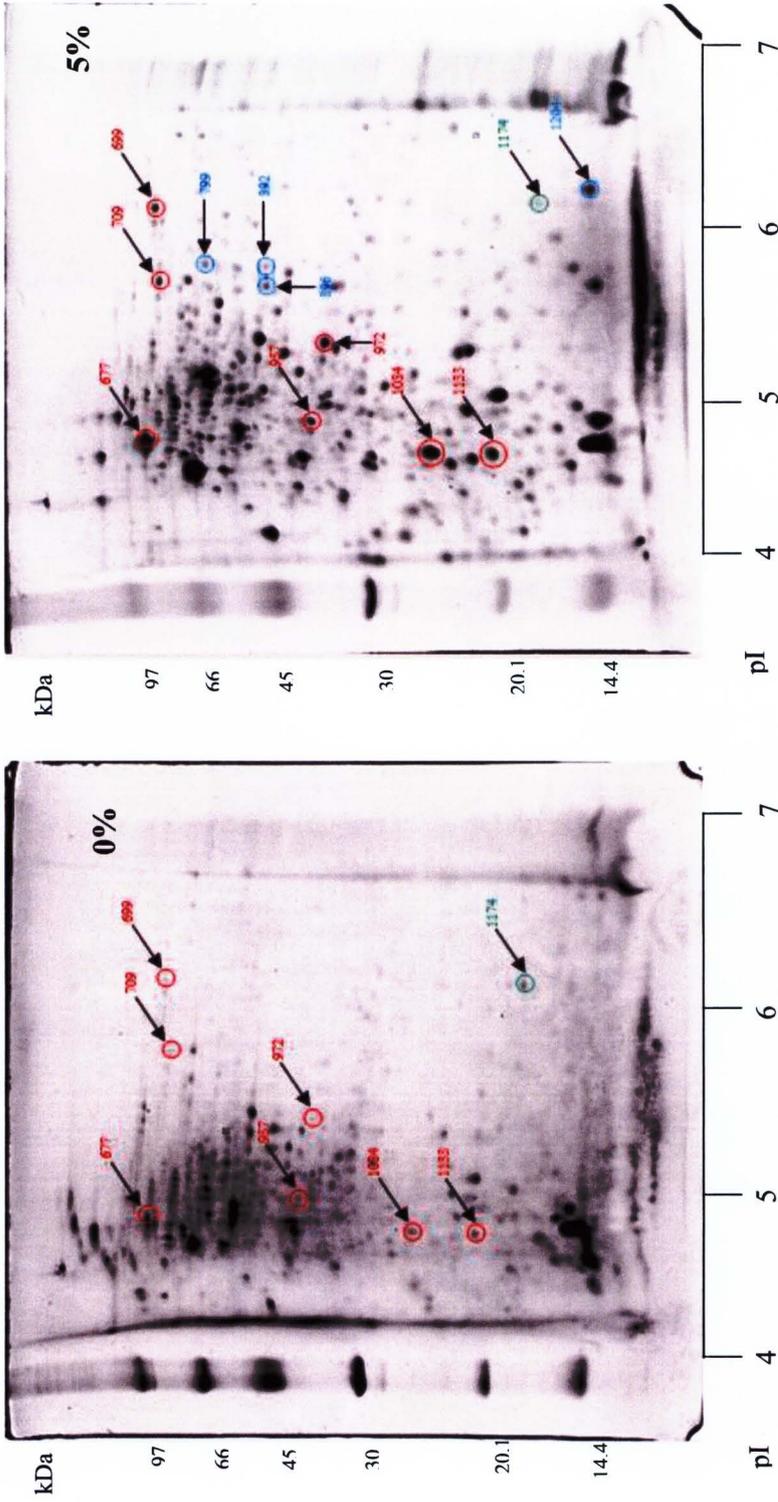
การแสดงออกเพิ่มขึ้น ลดลง และเกิดขึ้นใหม่ ซึ่งจุดโปรตีนดังกล่าวมีค่า pI และ MW ดังแสดงในตาราง 3.3, 3.4 และ 3.5

จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม ImageMaster พบว่ารูปแบบของโปรตีนที่ได้จาก *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่มีเกลือ ทั้ง 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ง) มีรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน โดยจุดโปรตีนที่ปรากฏมีจำนวนเฉลี่ยประมาณ 237 จุด ซึ่งส่วนใหญ่มี MW และ pI อยู่ในช่วง 97-14.4 kDa และ 4.36-6.77 ตามลำดับ เมื่อพิจารณารูปแบบของโปรตีนที่ได้จาก *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% ทั้ง 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ง) พบว่ามีรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน โดยจุดโปรตีนที่ปรากฏมีจำนวนเฉลี่ยประมาณ 361 จุด ซึ่งส่วนใหญ่มี MW และ pI อยู่ในช่วง 97-14.4 kDa และ 4.11-6.88 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของจุดโปรตีน *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ไม่มีเกลือและที่เติมเกลือ 5% และจากการเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนเพื่อหาโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเกลือของ *D. abyssii* พบว่ามีจุดโปรตีนที่เกิดขึ้นใหม่ 47 จุด เพิ่มขึ้น 31 จุด ลดลง 14 จุด ซึ่งส่วนใหญ่มี MW และ pI อยู่ในช่วง 97-14.4 kDa และ 4.36-6.77 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 3.3, 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

ในส่วนการวิเคราะห์หาชนิดและหน้าที่ของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกด้วยวิธี MALDI-TOF MS และ bioinformatics ได้เลือกจุดโปรตีนรวมทั้งหมด 12 จุด โดยพิจารณาจากขนาดของจุดโปรตีน ระยะห่างของจุดโปรตีนที่สนใจกับจุดโปรตีนชนิดอื่น ระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ความแตกต่างอย่างชัดเจน และค่า student T test โดยเป็นจุดที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 7 จุด เกิดขึ้นใหม่ 4 จุด และลดลง 1 จุด เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS จะได้ผลในรูปของ peptide mass fingerprint (PMF) แล้วนำค่า PMF ที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม MASCOT พบว่าได้ผลการวิเคราะห์ตามตารางที่ 3.6



รูป 3.2 เจลที่ได้จากการใช้ IPG strip 3-10 NL ของ *D. abyssus* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่ได้เติมเกลือ เปรียบเทียบกับ *D. abyssus* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5%



รูป 3.3 ภาพเจล 2DE เมื่อใช้ IPG strip 4-7 L แสดงโปรตีนของ *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่ได้เติมเกลือเปรียบเทียบกับ *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% ตำแหน่งของโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ลดลงและเกิดขึ้นใหม่

ระบุด้วย Spot ID ของจุดโปรตีนในวงกลมสีแดง สีเขียว และสีฟ้าตามลำดับ

ตาราง 3.3 ค่า pI MW การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก และ student T ของโปรตีนที่พบเฉพาะใน *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% เมื่อเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของโปรตีนใน *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ

Spot ID	pI	MW (kDa)	ระดับการเปลี่ยนแปลง (เท่า) ^a	Student T
639	4.98	97	1000000	5.61
659	5.29	95.92	1000000	5.86
685	6.49	85.80	1000000	3.74
703	5.17	82.60	1000000	3.07
706	5.69	81.99	1000000	53.49
721	6.12	79.94	1000000	3.69
741	5.44	73.89	1000000	2.94
772	5.02	67.63	1000000	3.43
776	5.59	66.49	1000000	9.90
778	5.42	65.95	1000000	7.99
779	6.70	66.43	1000000	2.98
785	6.12	65.70	1000000	6.03
786	6.30	65.49	1000000	3.21
790	6.64	64.65	1000000	13.84
799 ^b	5.88	64.20	1000000	3.94
809	6.05	61.30	1000000	4.01
818	4.85	58.33	1000000	14.36
826	6.16	58.17	1000000	4.71
829	6.10	57.77	1000000	3.13
833	4.82	56.08	1000000	5.87
838	4.57	55.73	1000000	3.85
851	5.84	54.27	1000000	5.89
853	5.25	53.71	1000000	8.19
860	5.97	53.51	1000000	3.06
861	6.58	53.26	1000000	3.18
875	6.41	50.75	1000000	6.92

^a อัตราส่วนระหว่างกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

^b คีอจุดโปรตีนที่เลือกไปวิเคราะห์ชนิดด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ตาราง 3.3 (ต่อ)

Spot ID	pI	MW (kDa)	ระดับการเปลี่ยนแปลง (เท่า) ^a	Student T
892 ^b	5.86	47.60	1000000	3.28
896 ^b	5.74	47.60	1000000	6.93
926	6.33	43.35	1000000	4.70
931	4.49	42.02	1000000	5.76
934	6.60	42.34	1000000	3.90
951	5.90	40.06	1000000	3.96
965	5.86	37.40	1000000	5.86
1003	6.24	32.37	1000000	5.54
1004	5.55	32.19	1000000	2.90
1010	6.16	31.64	1000000	43.26
1011	5.91	31.18	1000000	56.82
1019	4.16	30.22	1000000	2.94
1026	6.70	30.02	1000000	19.95
1030	4.93	29.90	1000000	3.32
1063	4.26	26.06	1000000	5.44
1065	6.02	26.63	1000000	6.47
1068	6.23	26.54	1000000	3.41
1076	4.93	25.52	1000000	8.73
1097	5.18	23.80	1000000	11.57
1099	4.88	23.33	1000000	5.20
1204 ^b	6.31	14.73	1000000	5.14

^a อัตราส่วนระหว่างกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม^b คือจุดโปรตีนที่เลือกไปวิเคราะห์ชนิดด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ตาราง 3.4 ค่า pI MW การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก และ student T ของโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% เมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนใน *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ

Spot ID	pI	MW (kDa)	ระดับการเปลี่ยนแปลง (เท่า) ^a	Student T
645	4.99	10.52	1.46	3.17
652	5.12	10.00	1.55	3.30
665	5.09	95.53	2.63	3.93
677 ^b	4.87	89.14	1.33	2.70
682	5.14	87.72	5.07	5.57
699 ^b	6.21	84.25	1.96	3.60
709 ^b	5.79	82.01	5.03	5.41
711	5.57	81.92	3.65	5.40
713	5.89	82.19	3.43	7.36
743	5.32	73.46	4.93	6.73
748	5.75	73.15	3.10	5.81
751	5.59	72.43	1.68	3.33
764	4.69	66.90	1.44	3.76
795	5.28	63.40	5.60	3.38
804	5.74	64.39	2.23	4.36
806	5.19	62.66	1.75	3.25
821	4.77	58.72	1.69	2.83
822	5.40	59.75	1.95	3.97
859	5.33	53.70	3.92	4.53
897	5.31	47.45	1.33	2.90
917	5.61	45.41	2.50	3.64
930	5.84	43.43	1.25	2.81
957 ^b	4.98	38.74	1.68	4.11
972 ^b	5.43	36.74	1.80	4.20
983	5.76	35.37	1.41	2.90

^a อัตราส่วนระหว่างกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

^b คือจุดโปรตีนที่เลือกไปวิเคราะห์ชนิดด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ตาราง 3.4 (ต่อ)

Spot ID	pI	MW (kDa)	ระดับการเปลี่ยนแปลง (เท่า) ^a	Student T
1037	4.76	29.84	4.76	10.28
1067	5.37	26.40	3.55	7.50
1084 ^b	4.79	24.83	2.46	7.36
1100	4.72	23.30	1.39	3.65
1116	5.59	22.24	2.13	4.37
1133 ^b	4.78	20.39	1.86	5.53

^a อัตราส่วนระหว่างกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

^b คือจุดโปรตีนที่เลือกไปวิเคราะห์ชนิดด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ตาราง 3.5 ค่า pI MW การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก และ student T ของโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงใน *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% เมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนใน *D. abyssii* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ

Spot ID	pI	MW (kDa)	ระดับการเปลี่ยนแปลง (เท่า) ^a	Student T
630	4.98	97.00	0.18	3.12
728	4.94	77.19	0.42	5.72
760	5.08	69.80	0.63	10.28
767	4.911	69.44	0.69	3.76
794	5.02	63.87	0.46	4.66
805	4.87	62.59	0.77	3.50
883	5.35	49.78	0.82	3.08
887	4.83	48.016	0.40	3.16
900	4.94	46.47	0.44	6.35
920	5.26	44.41	0.57	4.11
968	5.12	36.51	0.75	3.19
992	4.55	32.98	0.82	2.84
1021	5.25	30.74	0.83	2.86
1174 ^b	6.25	17.75	0.55	3.93

^a อัตราส่วนระหว่างกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

^b คือจุดโปรตีนที่เลือกไปวิเคราะห์ชนิดด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ตาราง 3.6 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเกลือของ *D. abyssi* โดยเปรียบเทียบ PMF กับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม

MASCOT

Spot ID	Accession no. ¹	Name	Taxonomy	score ²	Coverage (%) ³	Theoretical	Experimental	pI/MW (DA) ⁴
677	gi 309812291	chaperone protein DnaK	<i>Dermacoccus sp.</i> Eilin185	56	61	4.71/67133	4.86/89145	
699	gi 284044955	urea ABC transporter, ATP- binding protein UrtE	<i>Conexibacter woesei</i> DSM 14684	58	41	5.82/27196	6.20/84251	
709	gi 282861368	signal recognition particle protein	<i>Streptomyces sp.</i> ACTE	52	35	8.97/55211	5.79/82015	
799	gi 315226274	oligoribonuclease	<i>Parascardovia denticolens</i> DSM 10105	50	37	5.04/28791	5.87/64198	

¹Accession number ของโปรตีนจากฐานข้อมูลของ NCBI, ²MASCOT score ของโปรตีนที่สืบค้นได้ โดยคะแนนค่าสุดท้ายที่ยอมรับได้ (significant; $p < 0.05$) คือ 72 สำหรับฐานข้อมูล NCBI, ³เปอร์เซ็นต์ของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกันกับลำดับอะมิโนในฐานข้อมูล, ⁴ค่า pI และ น้ำหนักโมเลกุล (DA) ของโปรตีนที่คำนวณได้จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในฐานข้อมูล (theoretical) และคำนวณจาก

ตาราง 3.6 (ต่อ)

Spot ID	Accession no. ¹	Name	Taxonomy	Mascot score ²	Coverage (%) ³	Theoretical	Experimental	pI/MW (DA) ⁴
892	gi 119025347	50S ribosomal protein L29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	50	67	5.87/ 9700	5.86/47604	
896	gi 283455205	glutamyI-tRNA synthetase	<i>Bifidobacterium dentium</i> Bd1	50	30	4.95/ 56812	5.74/47598	
957	gi 28404588	monooxygenase FAD-binding protein	<i>Conexibacter woesei</i> DSM 14684	63	27	5.42/ 52229	4.98/38743	
972	gi 29827672	alkylated DNA repair protein	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	66	59	7.02/ 22780	5.43/36739	



¹Accession number ของโปรตีนจากฐานข้อมูลของ NCBI, ²MASCOT score ของโปรตีนที่สัมพันธ์ได้ โดยคะแนนค่าสุดที่ยอมรับได้ (significant; p < 0.05) คือ 72 สำหรับฐานข้อมูล NCBI, ³เปอร์เซ็นต์ของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกันกับลำดับอ้างอิง 4 ลำดับ และ 5 ลำดับโดยเฉลี่ย (A.A.) ของโปรตีนที่สัมพันธ์ได้จากลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกัน (theoretical) และค่าที่มาจาก

ตาราง 3.6 (ต่อ)

Spot ID	Accession no. ¹	Name	Taxonomy	Mascot score ²	Coverage (%) ³	Theoretical	Experimental	pI/MW (DA) ⁴
1084	gi 15827938	hypothetical protein ML1752	<i>Mycobacterium leprae</i> TN	69	54	5.85/33554	4.79/24832	
1133	gi 169629329	putative nitrate ABC transporter, ATP- binding protein	<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977	65	43	7.96/26833	4.78/20388	
1174	gi 269217521	conserved hypothetical protein	<i>Actinomyces</i> sp. oral taxon 848 str. F0332	71	57	9.15/23993	6.25/17750	
1204	gi 311741050	conserved hypothetical protein	<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> ATCC 33035	60	44	8.09/24572	6.31/14730	

¹Accession number ของโปรตีนจากฐานข้อมูลของ NCBI, ²MASCOT score ของโปรตีนที่สืบค้นได้ โดยคะแนนต่ำสุดที่ยอมรับได้ (significant; $p < 0.05$) คือ 72 สำหรับฐานข้อมูล NCBI, ³เปอร์เซ็นต์ของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกันกับลำดับอะมิโนในฐานข้อมูล, ⁴ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล (DA) ของโปรตีนที่คำนวณได้จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในฐานข้อมูล (theoretical) และคำนวณจาก