

248487

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



248487

โปรตีนโคโรนินส์การทดสอบเพื่อกรดอะมิโนของแบคทีเรีย

Dermatococcus sibiriacus ที่แยกได้จากทะเลดำ

โกจิเช่ อ่อนนุ่น

วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัย
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

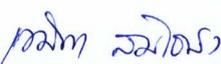
พฤษภาคม 2554

โปรตีนโอมิกส์การตอบสนองต่อเกลือของแบคทีเรีย *Dermacoccus abyssi*
ที่แยกได้จากทะเลลึก

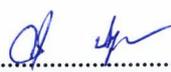
โกวิทย์ อ่อนนุ่ม

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เขมิกา ลมไชสง

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์

.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. วสุ ปฐมอารีย์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. วสุ ปฐมอารีย์

8 เมษายน 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

๐๐๐๒๕๓๑๗๓

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



248487

โปรตีนโอมิกส์การตอบสนองต่อเกลือของแบคทีเรีย
Dermaococcus abyssi ที่แยกได้จากทะเลลึก

โกวิทย์ อ่อนนุ่ม



วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เมษายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ททัชชนก เนียมทรัพย์ และอาจารย์ ดร.วสุ ปฐมอารีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและคำปรึกษา เสนอข้อคิดเห็น ชี้แนะแนวทาง ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหา และตรวจทาน แก้ไขจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เขมิกา ลมไธสง ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ปัญญาภัทร โสจิกุล ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกตลอดเวลาที่ทำการศึกษาวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่น้องทุกคนในระดับบัณฑิตศึกษาที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ท้ายสุดขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำพร้อมช่วยเหลือในทุก ๆ เรื่อง ขอบพระคุณสำหรับความรัก การดูแลเอาใจใส่ และเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง ทำให้สามารถผ่านพ้นทุกอุปสรรคที่ผ่านเข้ามาตลอดเส้นทางในการทำงานวิจัย และประสบความสำเร็จในการเรียนได้อย่างทุกวันนี้

โกวิทย์ อ่อนนุ่ม

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

โปรตีนโอมิกส์การตอบสนองต่อเกลือของแบคทีเรีย
Dermaococcus abyssii ที่แยกได้จากทะเลลึก

ผู้เขียน

นายโกวิทย์ อ่อนนุ่ม

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

อ. ดร. วสุ ปฐมอารีย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

248487

เชื้อแบคทีเรีย *Dermaococcus abyssii* ที่แยกได้จากตะกอนของ Mariana Trench ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม แอคติโนไมซีท แสดงความสามารถในการทนเกลือ ในงานวิจัยนี้ ได้ใช้เทคนิคโปรตีนโอมิกส์ในการศึกษาโปรตีนที่ตอบสนองต่อเกลือในเชื้อ *D. abyssii* เพื่อความเข้าใจกลไกในการตอบสนองต่อเกลือของ *D. abyssii* โดยนำโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth ที่ไม่เค็มเกลือมาเปรียบเทียบกับ โปรตีนที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร ที่เค็มเกลือ 5% จากผลการทดลองเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 2 ทิศทางพบว่า มีโปรตีน 94 จุดที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.05 โดยมีโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 32 จุด ลดลง 14 จุด และเกิดขึ้นใหม่ 48 จุดในสภาวะที่เค็มเกลือ 5% จึงได้เลือกโปรตีน 12 จุด (7 เพิ่มขึ้น, 1 ลดลง และ 4 เกิดขึ้นใหม่) ไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยแมสสเปกโตรเมตรี MALDI-ToF/MS จากการบ่งชี้ชนิด โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า โปรตีน 8 ชนิดมีความคล้ายกับโปรตีนในกลุ่มโปรตีนในสภาวะเครียด โปรตีนขนส่ง โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสังเคราะห์โปรตีน และการสลายอาร์เอ็นเอ

Thesis Title Proteomic of Salt Response in Bacteria *Dermacoccus abyssi*
Isolated from Deep Sea

Author Mr. Kowit Onnoom

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup

Advisor

Lect. Dr. Wasu Pathom-aree

Co-advisor

ABSTRACT

248487

Dermacoccus abyssi isolated from Mariana Trench sediment that belongs to Actinomycetes, possesses the ability to tolerate salt. To a better understanding of salt response mechanisms in *D. abyssi*, proteins responding to salt in *D. abyssi* were investigated by proteomic technique. The proteome of bacteria grown in Nutrient broth medium without NaCl was compared with the proteome from NB medium supplemented with 5% NaCl. The two dimensional electrophoresis results indicated that 94 protein spots had significantly different expression at $p < 0.05$. Of these, 32 were up-regulated, 14 down-regulated and 48 expressed only in 5% NaCl condition. Selected 12 protein spots (7 up-regulated, 1 down-regulated and 4 expressed only in 5% NaCl condition) were identified by mass spectrometry (MALDI-ToF). After annotation by comparing with database, it was found that 8 proteins were similar to stress proteins, transporter proteins, proteins involving in protein synthesis and RNA degradation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ญ
อักษณย่อและสัญลักษณ์	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 <i>Dermaococcus abyssi</i>	4
1.3 กลไกการปรับตัวของแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลือ	4
1.4 Proteomic	6
1.5 การศึกษาโปรติโอมิกส์ของการตอบสนองต่อเกลือในแบคทีเรีย	15
1.6 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	17
บทที่ 2 วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	18
2.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี เชื้อแบคทีเรีย	18
2.1.1 วัสดุอุปกรณ์	18
2.1.2 สารเคมี	19
2.1.3 เชื้อแบคทีเรีย	21
2.2 การเลี้ยงเชื้อ <i>Dermaococcus abyssi</i> และ ทดสอบการตอบสนอง	21
ในสภาวะที่มีเกลือ	

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3 การศึกษารูปแบบโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี 2DE	21
2.3.1 การสกัดและเตรียมโปรตีนจากเชื้อ <i>Demacoccus abyssi</i>	21
2.3.2 การแยกโปรตีนด้วยวิธี IEF	23
2.3.3 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	24
2.3.4 การตรวจหาจุดโปรตีนด้วยวิธี Coomassie blue staining	25
2.3.5 การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในเจล	26
2.3.6 การย่อยและการเตรียมเพปไทด์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย MALDI TOF MS (In gel digestion)	37
2.4 การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยวิธี MS และ bioinformatics	38
บทที่ 3 ผลการทดลอง	41
3.1 การตอบสนองของเชื้อ <i>Demacoccus abyssi</i> ที่มีต่อเกลือ	41
3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อ <i>Demacoccus abyssi</i>	42
3.3 การวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการตอบสนองต่อเกลือของ <i>Demacoccus abyssi</i>	43
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	55
4.1 อภิปรายผลการทดลอง	55
4.2 สรุปผลการทดลอง	64
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	70

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายและบัฟเฟอร์	71
ภาคผนวก ค การคำนวณปริมาณ โปรตีนตัวอย่างสำหรับทำ IEF	78
ภาคผนวก ง ภาพเจล 2DE ของโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อ <i>Dermacoccus abyssi</i> ที่ตอบสนองต่อสภาวะที่มีเกลือและไม่มีเกลือ	81
ภาคผนวก จ Mass spectrum, PMF	84
ประวัติผู้เขียน	97

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคการตรวจหาจุลินทรีย์โปรตีนที่ใช้ในงานโปรตีโอมิกส์	10
3.1 การเจริญเติบโตของ <i>Dermaococcus abyssi</i> โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm	42
3.2 ปริมาณโปรตีนที่สกัดจาก <i>Dermaococcus abyssi</i> ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ (0%) และ <i>D. abyssi</i> ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% (5%)	43
3.3 ค่า pI MW การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก และ student T ของโปรตีนที่พบเฉพาะใน <i>D. abyssi</i> ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% เมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนใน <i>D. abyssi</i> ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ	47
3.4 ค่า pI MW การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก และ student T ของโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน <i>D. abyssi</i> ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% เมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนใน <i>D. abyssi</i> ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ	49
3.5 ค่า pI MW การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก และ student T ของโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงใน <i>D. abyssi</i> ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ 5% เมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของโปรตีนใน <i>D. abyssi</i> ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่เติมเกลือ	51
3.6 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเกลือของ <i>D. abyssi</i> โดย เปรียบเทียบ PMF กับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม MASCOT	52

สารบัญภาพ

รูป	หน้า
1.1 การขนส่งและการสังเคราะห์สารที่ช่วยในการรักษาความดันของ <i>Bacillus subtilis</i>	6
1.2 การทำงานของ MALDI ToF	13
1.3 Mass spectrum ของเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนตัวเลขในกรอบสี่เหลี่ยม คือ ค่า PMF	14
2.1 แผนภาพแสดงการแบ่งกลุ่มการวิเคราะห์ภาพเจลเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการ แสดงออกของโปรตีนใน <i>D. abyssii</i> ที่เลี้ยงใน NB 2 สภาวะ	26
2.2 หน้าต่างของ Workspace และ Add New Project	27
2.3 Workspace ที่สร้างจากภาพเจลและข้อมูลในการทำโปรตีโอมิกส์ของ <i>D. abyssii</i>	28
2.4 หน้าต่างของ Gel Display Setting	28
2.5 หน้าต่างของ Detect Spot	29
2.6 การแสดงตำแหน่ง landmark ในแต่ละภาพเจล	31
2.7 การซ้อนทับกันของภาพเจลแบบโปร่งแสงเพื่อให้มองเห็นจุดโปรตีน ที่อยู่ตำแหน่งเดียวกัน	32
2.8 การซ้อนทับกันของภาพเจลและแสดงเส้นเชื่อม (vector) ระหว่างจุดโปรตีนจากภาพเจลทั้งสอง	32
2.9 หน้าต่างของ Classes Report	33
2.10 หน้าต่าง Classes Report	34
2.11 หน้าต่างของ Refine by Value	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูป	หน้า
2.12 หน้าต่างของ Classes Report ที่เพิ่มคอลัมน์ Set: Verified	35
2.13 ฮิสโตแกรมของจุดโปรตีน	35
2.14 ภาพ 3 มิติของจุดโปรตีน	36
2.15 หน้าต่าง Classes Report ที่แสดงเฉพาะจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ	37
2.16 หน้าจอของโปรแกรม MASCOT สำหรับสืบค้นชนิดโปรตีนจากค่า PMF	39
3.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Dermaococcus abyssi</i> ใน NB ที่มีเกลือ 5% และไม่มีเกลือ	41
3.2 เจลที่จากการใช้ IPG strip 3-10 NL ของ <i>D. abyssi</i>	45
3.3 ภาพเจล 2DE เมื่อใช้ IPG strip 4-7 L แสดงโปรตีนของ <i>D. abyssi</i>	46
4.1 การทำงานร่วมกันระหว่าง DnaK (Hsps70) กับ DnaJ (Hsps40)	58
4.2 ตัวอย่างการทำหน้าที่นำสารออกนอกเซลล์ของ ATP-binding cassette transporter (ABC transporter)	59
4.3 วิธีการทำงานของ signal recognition particle protein	60
4.4 กระบวนการทำงานของ aminoacyl- tRNA synthetase	62
4.5 การทำงานของ alkylated DNA repair protein โดยมี Fe ²⁺ เป็น cofactor และ O ₂ เป็นสารตั้งต้นร่วม	63

อักษรย่อและสัญลักษณ์

A	Absorbance
BSA	Bovine serum albumin
°C	Degree Celsius
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl) dimethylammomio- 1-propane sulfonate
cm	Centimeter
Da	Dalton
2DE	Two-dimemsional gel electrophoresis
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
g	Gram
IEF	Isoelectric focusing
IPG	Immobilized pH gradients
kDa	kilodalton
L	Litre
mA	Milliampere
MADI-ToF	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
mg	Milligram
mm	Millimeter
MS	Mass spectrometry
MW	Molecular weight
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram

nm	Nanometer
NA	Nutrient agar
pI	Isoelectric point
PMF	Peptide mass fingerprint
rpm	Round per minute
SDS	Sodim dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloroacetic acid
μA	Microampere
μg	Microgram
μl	Microlitre