เอกสารอ้างอิง

หัทยา กาวีวงศ์. (2546) อณูพันธุศาสตร์. เชียงใหม่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 127 น.

Antonellis, A. and Green, E. D. (2008). The Role of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Genetic Diseases. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* (9) 87-107.

Alaimo, C., I. Catrein, L. Morf, C. L. Marolda, N. Callewaert, M. A. Valvano, M. F. Feldman, and Aebi, M. (2006). Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *EMBO J.* (25) 967-976.

Csonka, L. N. and Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic Osmoregulation: Genetics and Physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* (45) 569-606.

Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C and Chen, J. (2008). "Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (72) 317–364.

Dong, J., Yang, G. and Mchaourab, H.S. (2005). Structural basis of energy Transduction in the Transport Cycle of MsbA. Science (308) 1023-1028.

Duche´, O., Tre´moulet, F., Glaser, P. and Labadie J. (2002). Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* (68) 1491-1498.

Eswaramoorthy, S., Bonanno, J. B., Burley, S. K. and Swaminathan, S, (2006). Mechanism of action of a flavincontaining monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (103) 9832–9837.

Feng, D. Q., Zhang, B., Lu, W.D. and Yang, S. S. (2006). Protein expression analysis of *Halobacillus dabanensis* D-8T subjected to salt shock. *J. Microbiol.* (44) 369-374.

Ghosh, S.and Deutscher, M. P. (1999). Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (96) 4372–4377.

Gisbert, C., Rus, A M., Bolarín, M. C., López-Coronado, J. M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R. and Moreno, V. (2000). The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol.* (123) 393-402.

Görg, A. 2004. *2-D electrophoresis principles and methods*. Buckinghamshire: Amersham Biosciences. 162 p.

Greenacre, E. J., Lucchini, S., Hinton, J. C. D. and Brocklehurst, T. F. (2006). The lactic acid induced acid tolerance response in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium induces sensitivity to hydrogen peroxide. *Appl. Environ Microbiol.* (72) 5623-5625.

Hollenstein K., Frei D.C and Locher K.P. (2007). Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* (446) 213-216.

Holmström, K.O., Somersalo, S., *Mandal*, A., Palva, T.E. and Welin B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.* (51) 177-185.

Höper, D., Bernhardt, J. and Hecker, M. (2006) Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: A physiological proteomics approach, *Proteomics.* (6)

Jason, C. Y., Vishwas, R. A., Katja, S. and Ulrich, H. F. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **(5)** 781-791.

John, M., Kemner, X.L., and Eugene, W.N., (1997). The *Agrobacterium tumefaciens* Virulence Gene *chvE* Is Part of a Putative ABC-Type Sugar Transport Operon. *J. Bacteriol.* (179) 2452–2458.

Joyard, J. and Brygoo, H.B. (2004). Focus on plant proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* (42) 913-917.

Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J. and Bremer, E. (1999) Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine *in Bacillus subtilis. Mol. Microbiol.* (32) 203-216

Kempf, B. and Bremere, E. (1998) Stress responses of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: Uptake and synthesis of osmoprotectants. *J. Biosci.* (4) 447-455

Kersten, B., Feilner, T., Angenendt, P., Giavalisco, P., Brenner, W. and Bürkle, L. (2004). Proteomic approaches in plant biology. *Curr. Proteomics*. (1) 131-144.

Kunst, F. and Rapoport, G. (1995). Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis. J. Bacteriol.* (177) 2403-2407.

Lennon, J.J. (1997). *Reflecting TOF mass spectrometer.* [Online]. Available http://www.abrf.org/ABRFNews/1997/June1997/jun97lennon.html (22 April 2011).

Niamsup, H., Puranamaneewiwat, N. and Tajima, S. (2006). Proteomic analysis of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 in acidic condition. *Chiang Mai J. Sci.* (33) 335-345.

Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, L. C., Ward, A C., Horikoshi, K., Bull, A T. and Goodfellow, M. (2006). *Dermacoccus abyssi* sp. nov., a piezotolerant actinomycete isolated from the Mariana Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (56) 1233-1237.

Paul D, Dineshkumar N. and Nair S. (2006). Proteomics of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Pseudomonas fluorescens* MSP-393, subjected to salt shock. *J. Microbiol. Biotechnol.* (22) 369-374.

Sánchez, B., Verge`s, M. C. C., Collado, M. C., Anglade, P., Baraige, F., Sanz, Y., Gavila´n, C. G. R., Margolles, A. and Zagorec, M. (2007). Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* Biotype longum. *Appl. Environ. Microbiol.* (3) 6450-6459.

Saier, M. H. (2000). Families of proteins forming transmembrane channels. *J. Membr. Biol.* 175:165–180.

Shamseldin, A., Nyalwidhe, J. and Werner, D. (2006). A proteomic approach towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* strains. *Microbiol.* (52) 333-339.

Sonja, D., Helena. L, Werner, E. G., and Vera. G. (2002). Signal Recognition Particle 54 kD Protein (SRP54) from the Marine Sponge *Geodiacydonium*. (3) 233–237.

Sonja-Verena, A., Zalán, S. and Arnold, J. M. (2006). Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nature Rev. Microbiol.* (4) 537-547.

Teixeira-gomes, A. P., Cloeckaert, A. and Zygmunt, M. S. (2000). Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* (68) 2954-2961.

Tilly, K., Erickson, J., Sharma S. and Georgopoulos C. (1986). Heat shock regulatory gene rpoH mRNA level increases after heat shock in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* (168) 1155-1158.

Welin, J., Wilkins, J.C, Beighton, D., Wrzesinski, K., Fey, S.J., Mose-Larsen, P., Hamilton, I.R. and Svensäter, G. (2003). Effect of acid shock on protein expression by biofilm cells of *Streptococcus mutans. Microbiol.* (227) 287-293.

Westermeier R. and Naven T. (2002). *Proteomic in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. Weinheim: Wiley-VCH. pp. 3-10.

Whatmore, A. M. and Reed, R. H. (1990) Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis:* a possible role for K + in turgor regulation. *J. Gen. Microbiot.* (136) 2521-2526

Xu, C., Ren, H., Wang, S. and Peng, X. (2004). Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus. Microbiol.* (155) 835-842.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. การเตรียม Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 550 ml

Gelatin Peptone	2.5	g
Beef extract	1.5	g

ชั่ง nutrient broth 4 g ซึ่งประกอบด้วย Gelatin Peptone 2.5 g และ Beef extract 1.5 g ลงบีกเกอร์ขนาด 250 ml เติมน้ำกลั่นเพื่อละลายผง nutrient broth จนหมด เทลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรถึง 500 ml นำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียม Nutrient Agar (NA) ปริมาตร 500 ml

Gelatin Peptone	2.5	g
Beef extract	1.5	g
Agar	8	g

ชั่ง nutrient broth 4 g ซึ่งประกอบด้วย Gelatin Peptone 2.5 g Beef extract 1.5 g และผงวุ้น 8 g ลงบีกเกอร์ขนาด 1,000 ml เติมน้ำกลั่นแล้วต้มจนผงวุ้นละลายหมด จากนั้นเทลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml 2 ขวดปิดปากขวดด้วยสำลีและ foil แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายและบัฟเฟอร์

1. การเตรียม 1% v/v sodium hypochlorite ปริมาตร 500 ml

ปิเปตสารละลาย 100% sodium hypochlorite มา 5 ml ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปรับปริมาตรให้เป็น 500 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่ขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2. การเตรียม 1% w/v bromophenol blue stock solution ปริมาตร 1 ml

ชั่ง bromophenol blue 0.01 g และ Tris base 0.006 g ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดละ 500 µl เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3. การเตรียม 10% w/v SDS ปริมาตร 20 ml

ชั่ง Sodium dodecyl sulfate (SDS) 2.0 g ละลายในน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 20 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียม 10% w/v ammonium persulfate ปริมาตร 500 µl

ชั่ง ammonium persulfate จำนวน 0.05 g ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml แล้วเติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C (ควรเตรียมก่อนใช้งาน)

5. การเตรียม 0.5 M DTT stock solution ปริมาตร 1 ml

ชั่ง dithiothreitol (DTT: MW 154.2) 0.0771 g ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml แล้วเติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดละ 500 µl แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

6. การเตรียม 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 ปริมาตร 100 ml

ชั่ง Tris base (MW 121.14) จำนวน 18.17 g ละลายในน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 80 ml ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย 37% v/v HCl จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ผสมให้เข้ากัน เทใส่ขวดสีชาแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

7. การเตรียม SDS electrophoresis buffer (10X) ปริมาตร 1 L

Tris-base (MW 121.14)	30.3 g
Glycine (MW 75.07)	144.1 g
SDS	10.0 g

ชั่ง Tris-base, glycine และ SDS ลงในบีกเกอร์ตามน้ำหนักที่กำหนด เติมน้ำกลั่นลงไป 600 ml แล้วผสมให้เข้ากันจนของแข็งละลายหมด ปรับปริมาตรให้ครบ 1 L ผสมให้กันแล้วเทใส่ขวด เก็บที่อุณหภูมิห้อง หากนำไปใช้เจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

8. การเตรียม agarose sealing solution ปริมาตร 20 ml

ชั่ง agarose 0.1 g ลงในบีกเกอร์เติม 1X SDS electrophoresis running buffer ปริมาตร 20 ml ลงไป แล้วนำไปอุ่นให้ agarose NA ละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย จากนั้นเติม bromophenol blue stock solution ปริมาตร 40 µl ผสมให้เข้ากัน เทใส่ขวดใส แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียม 1X sample buffer ปริมาตร 50 ml

DTT (MW 154.2)	0.771 g
SDS	1.0 g
Bromophenol blue	0.005 g
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.1 ml
87% w/w glycerol	5 ml

ชั่ง DTT, SDS และ bromophenol blue ตามน้ำหนักที่กำหนด เท DTT และ SDS ใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นจึงตวง Tris-HCl และ glycerol ใส่ตามลงไป เติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 20 ml แล้วผสมให้เข้ากันจนของแข็งละลายหมด ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย 37% v/v HCl จากนั้นเติม bromophenol blue ที่ชั่งเตรียมไว้แล้วคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml เทใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

10. การเตรียม protein marker ปริมาตร 200 µl

ปิเปต 1X sample buffer ปริมาตร 200 µl ใส่ในขวด vial ของ protein marker (LAW calibration kit) ที่อยู่ในรูป lyophilized protein mixture ผสมจนละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน เวลานำไปใช้ให้เจือจางลง 10 เท่าด้วย 1X sample buffer ส่วนที่เหลือให้เก็บไว้ที่ -20 °C

11. การเตรียม lysis solution ปริมาตร 20 ml

Urea (MW 60.06)	9.6 g
CHAPS	0.8 g
DTT (MW 154.2)	0.062 g
IPG buffer, pH 4-7 L	400 µl

ชั่ง Urea, CHAPS และ DTT ตามกำหนด เทใส่หลอดทดลองและเติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป 2-3 ml จากนั้นผสมให้เข้ากันจนของแข็งละลายหมด เติม IPG buffer แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 20 ml ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

12. การเตรียม 10% TCA / Acetone solution ปริมาตร 100 ml

TCA (Tricholoacetic acid)	12.0 g
24 mM DTT (MW 154.2)	0.37 g
Acetone	100 ml

ชั่ง TCA และ DTT ตามน้ำหนักที่กำหนด ลงในบีกเกอร์ 250 ml เติม acetone ประมาณ 20 ml ละลายจนของแข้งละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย acetone เทใส่ขวดสีชาแล้วเก็บที่อุณหภูมิ –20 °C

13. การเตรียม Acetone solution ปริมาตร 100 ml

20 mM DTT (MW 154.2)	0.31 g
Acetone	100 ml

ชั่ง DTT ตามน้ำหนักที่กำหนดลงในบีกเกอร์ 250 ml เติม acetone 100 ml ละลายของแข็งจนหมด เทใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

14. การเตรียม rehydration stock solution ปริมาตร 5 ml

Urea (MW 60.06)	2.1 g
CHAPS	0.1 g
Bromophenol blue stock solution	10 µl

ชั่ง urea และ CHAPS ตามน้ำหนักที่กำหนด เทใส่หลอดทดลองและเติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1-2 ml จากนั้นผสมให้เข้ากันจนของแข้งละลายหมด เติม bromophenol blue stock solution แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 5 ml ผสมให้เข้ากัน แบ่งใสหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

15. การเตรียม SDS equilibration buffer ปริมาตร 100 ml

Urea (MW 60.06)	36.04 g
SDS	2.0 g
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	5 ml
87% w/w glycerol	34.6 ml
Bromophenol blue stock solution	200 µl

ชั่ง urea และ SDS ตามน้ำหนักที่กำหนดลงในบีกเกอร์ จากนั้นจึงตวง Tris-HCl และ glycerol ใส่ตามลงไป เติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 20 ml แล้วกวนจนละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน เติม bromophenol blue stock solution แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ผสมให้เข้ากัน แบ่งใสขวดสีชาขวดละ 25 ml แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 20 °C

16. การเตรียม monomer stock solution ปริมาตร 200 ml

Acrylamide	60.0 g
N, N-methlenebisacrylamide	1.6 g

ชั่ง acrylamide และ N, N-methlenebisacrylamide ลงในบีกเกอร์ตามน้ำหนักที่กำหนด เติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป 100 ml จากนั้นกวนจนละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 200 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

17. การเตรียม fixation solution ปริมาตร 200 ml

Acetic acid glacial	20 ml
Ethanol	84.2 ml

ตวง acetic acid และ ethanol ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml ตามที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ให้ครบ 200 ml จากนั้นกวนสารจนเป็นเนื้อด้วยกัน

18. การเตรียม Coomassie blue staining solution ปริมาตร 150 ml

Ammonium sulfate	12.0 g
Phosphoric acid	1.44 ml
5% CBB stock	2.4 ml
Methanol	30 ml

ชั่ง ammonium sulfate และตวง phosphoric acid 5% CBB stock methanol ตามที่กำหนด กวนให้สารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ให้ได้ปริมาตร 150 ml

19. การเตรียม 100 mM NH_4HCO_3 ปริมาตร 100 ml

Ammonium bicarbonate	0.7906 g

ชั่ง Ammonium bicarbonate 0.7906 g เติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 ml

20. การเตรียม 50 mM NH_4HCO_3 ปริมาตร 20 ml

ดูด 100 mM NH_4HCO_3 10 ml เติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 ml

21. การเตรียม 20 mM NH_4HCO_3 ปริมาตร 20 ml

ดูด 50 mM NH_4HCO_3 8 ml เติมน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 12ml

22. 10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3

DTT (MW 154.2)	0.31 g
100 mM Ammonium Bicarbonate	1 ml

ชั่ง DTT 0.00154 g ละลายด้วย 100 mM NH_4HCO_3 1 ml จากนั้นทำการ เจือจาง 10 เท่าด้วย 100 mM NH_4HCO_3

23. Iodoacetamide in 55 mM NH_4HCO_3

IAA (MW 184.96)	0.01 g
100 mM Ammonium bicarbonate	1 ml

ชั่ง IAA 0.01 g ละลายด้วย 100 mM NH_4HCO_3 1 ml

24. การเตรียม 40 mM NH_4HCO_3 ใน 9% acetonitrile solution ปริมาตร 10 ml

นำ100 mM NH_4HCO_3 4 ml ผสมกับน้ำ deionizied ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5.1 ml จากนั้นเติม acetonitrile 0.9 ml

25. การเตรียม Digestion buffer (12.5 ng/µl trypsin)

ละลาย trypsin ด้วย 1 mM HCl 100 µl และสารละลาย 40 mM NH_4HCO_3 in 9% acetonitrile 900 µl จะได้สารละลาย trypsin ที่มีความเข้มข้น 20 µg/ml. จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้ 4 สัปดาห์

ก่อนจะใช้งานทุกครั้งให้นำสารละลาย trypsin ที่มีความเข้มข้น of 20 µg/ml 125 µl มาผสมกับสารละลาย 40 mM NH_4HCO_3 in 9% acetonitrile 75 µl จะได้สารละลาย trypsin ที่มีความเข้มข้น 12.5 ng/µl.

26. การเตรียม Extraction buffer (5% v/v formic acid and 50% v/v acetonitrile) ปริมาตร 20 ml

นำ formic acid 1 ml ผสมกับ acetonitrile 10 ml จากนั้นปริมาตรให้ได้สารละลาย 20 ml ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ค

การคำนวนปริมาณโปรตีนตัวอย่างสำหรับทำ IEF

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีนสำหรับทำ IEF ได้เลือกการคำนวณปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Dermacoccus abyssi* ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมเกลือ 5% ในการทดลองครั้งที่ 1

1. การคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง

จากการตรวจวัดปริมาณของโปรตีนโดยใช้ 2D Quan kit ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่ 480 nm (A_{480}) ดังตาราง ผ-ค1

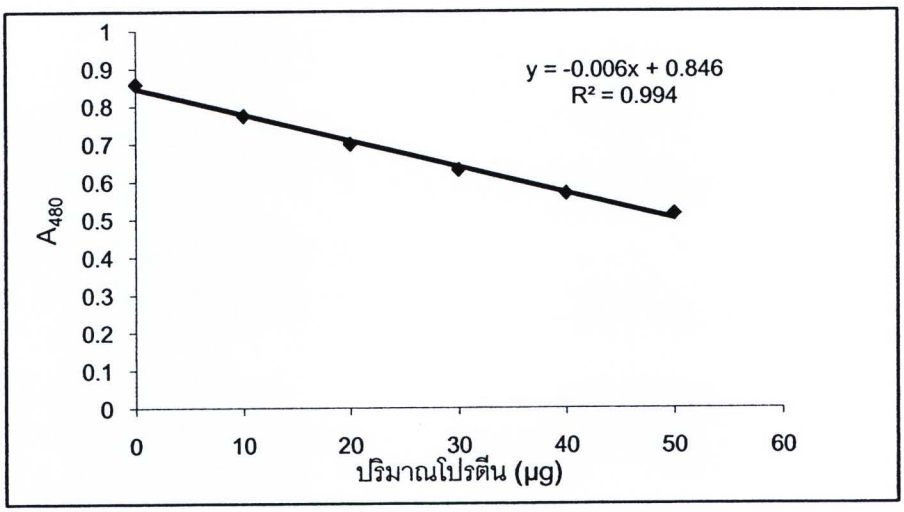
ตาราง ผ-ค1 ค่า A_{480} และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA

	หลอดที่					
	1	2	3	4	5	6
ปริมาตร 2 mg/ml BSA (µl)	0	5	10	15	20	25
ปริมาณโปรตีน BSA (µg)	0	10	20	30	40	50
A_{480}	0.8585	0.7745	0.6992	0.631	0.5692	0.5144

ตาราง ผ-ค2 ค่า A_{480} และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่างจากเชื้อแบคทีเรีย *D. abyssi* กลุ่ม ควบคุม (หลอดที่ 7-8) และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมเกลือ 5% (หลอดที่ 9-10)

	หลอดที่			
	7	8	9	10
ปริมาตรของโปรตีนตัวอย่าง (µl)	2	4	2	4
A_{480}	0.8141	0.7645	0.6503	0.4633

จากตาราง ผ-ค1 นำค่า A_{480} และปริมาณของโปรตีน BSA มาสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนได้ดังแสดงในรูป ผ-ค1



รูป ผ-ค1 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า A_{480} กับปริมาณโปรตีน BSA

การคำนวณปริมาณโปรตีนในกลุ่มควบคุม

จากสมการของกราฟมาตรฐาน $y = -0.006x + 0.846$; $R^2 = 0.994$

หลอดที่ 7: ใช้โปรตีนปริมาตร 2 µl และมีค่า A_{480} เท่ากับ 0.8141

แทนค่าลงในสมการของกราฟมาตรฐาน

ดังนั้นจะมีปริมาณโปรตีน = 4.652174 µg/2µl

= 2.326087 µg/µl

หลอดที่ 8: ใช้โปรตีนปริมาตร 2 µl และมีค่า A_{480} เท่ากับ 0.7645

แทนค่าลงในสมการของกราฟมาตรฐาน

ดังนั้นจะมีปริมาณโปรตีน = 11.84058 µg/4µl

= 2.960145 µg/µl

ดังนั้นปริมาณโปรตีนโดยเฉลี่ยในกลุ่มควบคุม = (2.326087 + 2.960145)/2µg/µl

= 2.643116 µg/µl

สำหรับหลอดที่ 9 และ 10 ใช้วิธีคำนวณในทำนองเดียวกัน

ได้ปริมาณโปรตีนโดยเฉลี่ยในกลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารที่เติมเกลือ 5%= 14.03442 µg/µl

2. การคำนวณหาปริมาตรของสารละลายโปรตีนตัวอย่างสำหรับทำ IEF

การทำ IEF โดยใช้ IPG strip 4-7 L ขนาด 7 cm ต้องการโปรตีนปริมาณ 60 µg

กลุ่มควบคุม: ได้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 2.643116 µg/µl

มีโปรตีน	2.643116	µg	ในสารละลายปริมาตร	1	µl
ต้องการโปรตีน	60	µg	จะต้องใช้สารละลายปริมาตร	22.70	µl

กลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารที่เติมเกลือ 5%: ได้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 14.03442 µg/µl

มีโปรตีน	2.643116	µg	ในสารละลายปริมาตร	1	µl
ต้องการโปรตีน	60	µg	จะต้องใช้สารละลายปริมาตร	4.28	µl

3. การเตรียมปริมาตรของโปรตีนตัวอย่างและองค์ประกอบอื่นๆสำหรับทำ IEF

ในการทำ IEF โดยใช้ IPG strip 4-7 L ขนาด 7 cm กำหนดให้ปริมาตรของสารละลายโดยรวมเท่ากับ 125 µl ซึ่งประกอบด้วยสาร ในปริมาตรและความเข้มข้น ดังแสดงในตารางผ-ค3

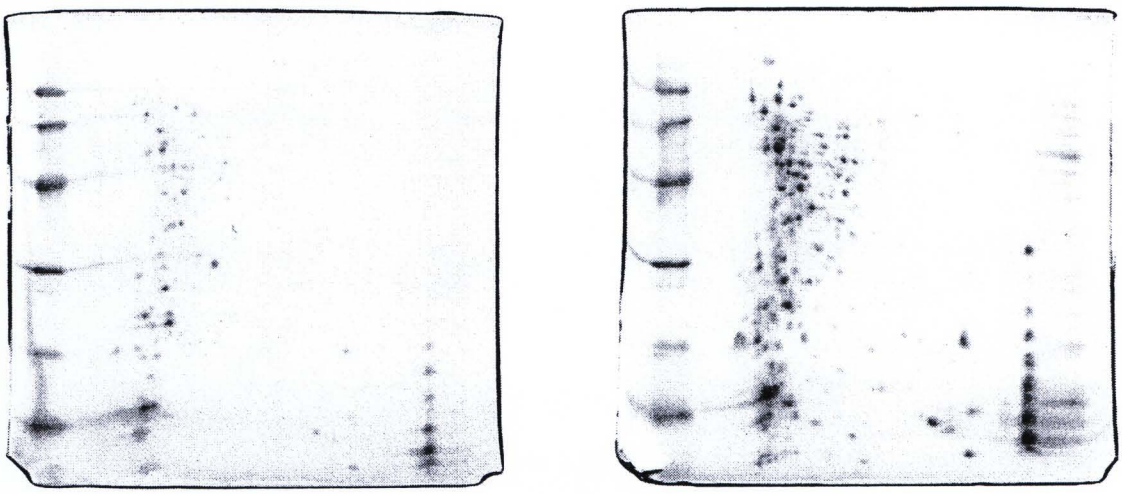
ตาราง ผ-ค3 ปริมาตรขององค์ประกอบต่างๆในสารละลายสำหรับทำ IEF

องค์ประกอบของสารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรของสารละลาย (µl)	
		กลุ่มควบคุม	กลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารที่เติมเกลือ 5%
สารละลายโปรตีนตัวอย่าง	48 ng/µl	22.70	4.28
Rehydration stock solution	-	96.3	114.72
0.5 M stock DTT	20mM	5	5
100% stock IPG buffer	0.8% v/v	1	1

ภาพเจล 2DE ของโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อ *Dermacoccus abyssi* ที่ตอบสนองต่อสภาวะที่มีเกลือและไม่มีเกลือ

2DE จากการใช้ IPG strip pH 3-10 NLของโปรตีนที่สกัดได้จาก *Dermacoccus abyssi*

รูปเจล 2DE ของโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Dermacoccus abyssi* ที่เลี้ยงใน NB medium ที่ไม่เติมเกลือ และ เลี้ยงใน NB medium ที่เติมเกลือ 5% ได้จากนำโปรตีนที่สกัดได้มาทำ IEF โดยใช้ IPG strip pH 3-10 NL ขนาด 7 cm ตามด้วยการทำ SDS-PAGE จากนั้นย้อมสีด้วยวิธี Coomassie blue staining ก่อนจะบันทึกภาพเจลให้อยู่ในรูปข้อมูลดิจิตอลด้วยเครื่อง ImageScanner

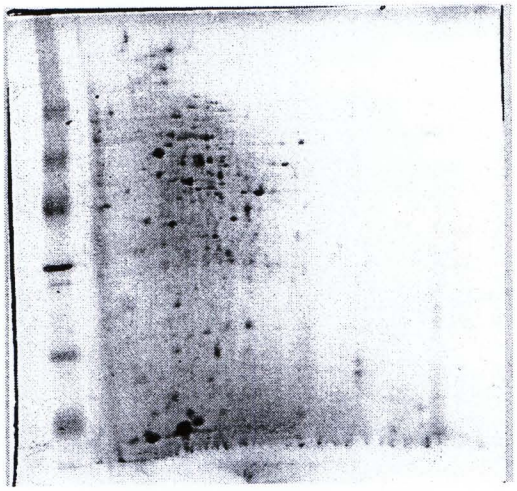


ก ข

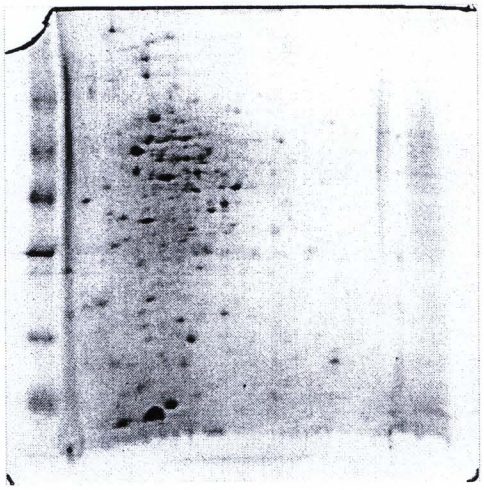
รูป ผ-ง1 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน *D. abyssi* ที่เลี้ยงใน NB ที่ไม่ได้เติมเกลือ (ก) เปรียบเทียบกับ *D. abyssi* ที่เลี้ยงใน NB ที่เติมเกลือ (ข)

2DE จากการใช้ IPG strip pH 4-7 L ของโปรตีนที่สกัดได้จาก *Dermacoccus abyssi*

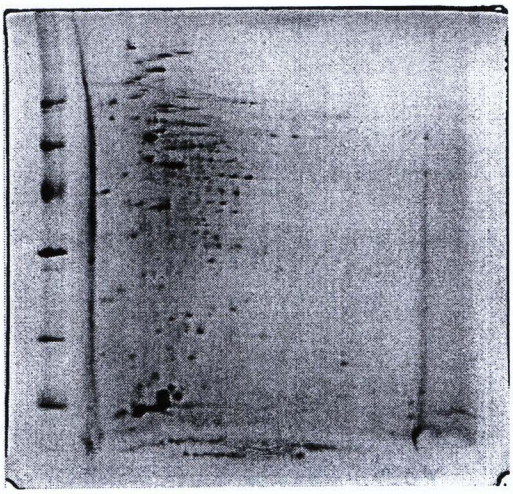
รูปเจล 2DE ของโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Dermacoccus abyssi* ที่เลี้ยงใน NB medium ที่ไม่เติมเกลือ และ เลี้ยงใน NB medium ที่เติมเกลือ 5% ได้จากนำโปรตีนที่สกัดได้มาทำ IEF โดยใช้ IPG strip pH 4-7 L ขนาด 7 cm ตามด้วยการทำ SDS-PAGE จากนั้นย้อมสีด้วยวิธี Coomassie blue staining ก่อนจะบันทึกภาพเจลให้อยู่ในรูปข้อมูลดิจิตอลด้วยเครื่อง ImageScanner



ก

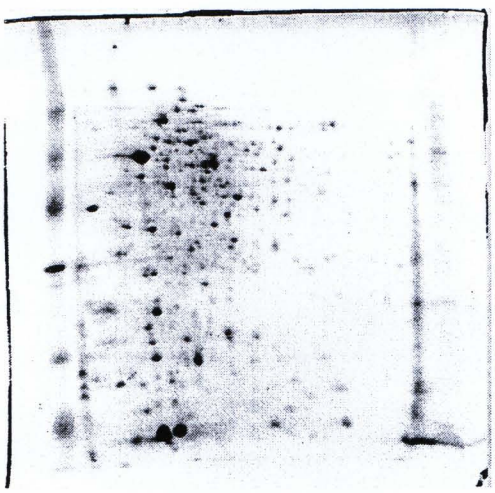


ข

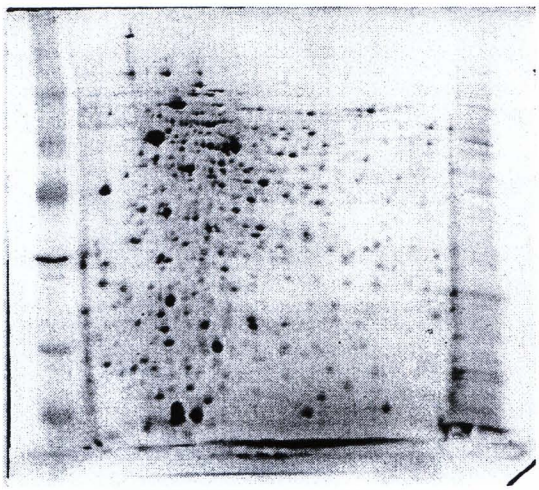


ค

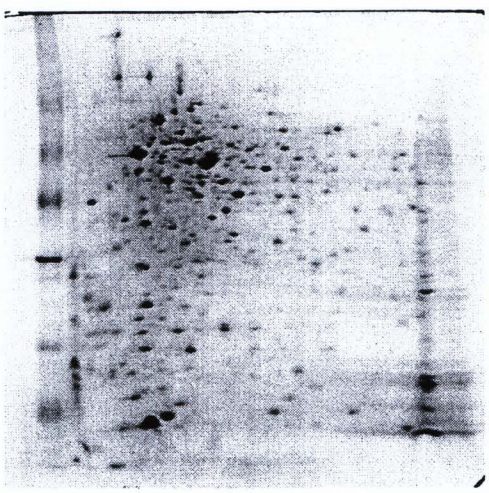
รูป ผ-ง2 ภาพเจล 2DE ของโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *D. abyssi* ในกลุ่มควบคุม ที่ไม่เติมเกลือ ในการทดลองครั้งที่ 1(ก) 2(ข) และ 3(ค)



ก



ข



ค

รูป ผ-ง3 ภาพเจล 2DE ของโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *D. abyssi* ในกลุ่มทดลองที่เติมเกลือ 5% ในการทดลองครั้งที่ 1(ก) 2(ข) และ 3(ค)

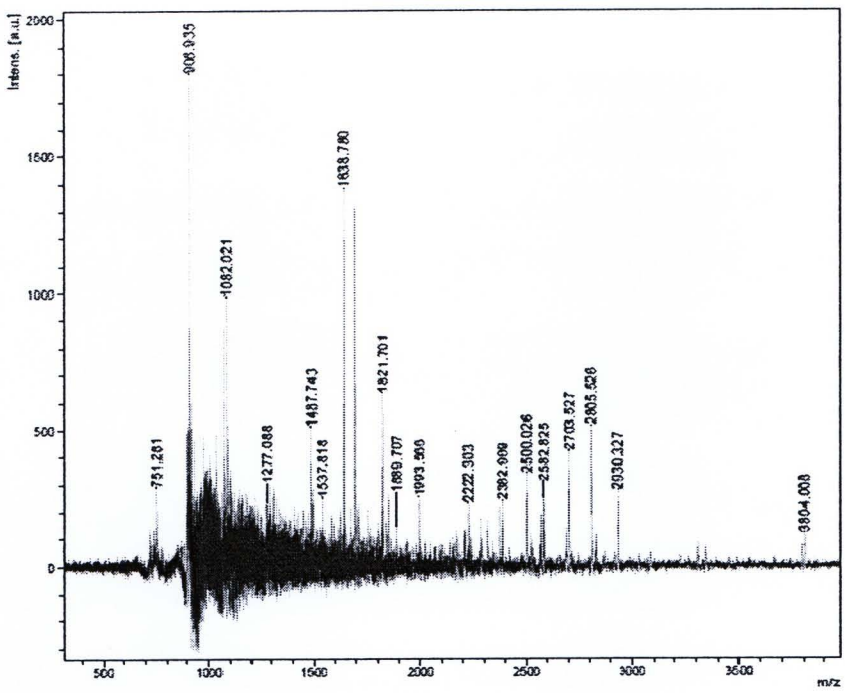
ภาคผนวก จ

Mass spectrum PMF

เมื่อนำจุดโปรตีนทั้ง 12 จุดวิเคราะห์ชนิดด้วยวิธี MALDI-TOF MS ได้ผลการวิเคราะห์ในรูปของ mass spectrum และค่า peptide mass fingerprint (PMF) จากนั้นนำค่า PMF ไปสืบค้นในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อหาโปรตีนในฐานข้อมูลที่มีค่า PMF ใกล้เคียงกับค่าที่นำไปสืบค้นมากที่สุด รูป ผ-จ1-12 แสดงข้อมูลของ mass spectrum, PMF และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจุดที่ 1-12 ตามลำดับ โดยที่

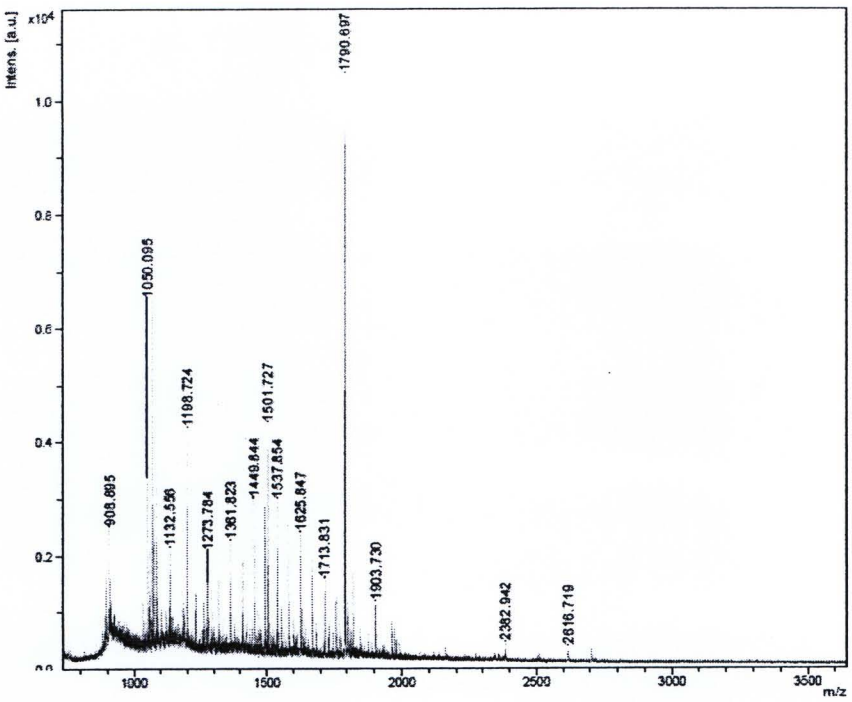
- แสดง mass spectrum ของโปรตีนโดยมีแกน y เป็นค่าความเข้มข้นของสัญญาณจากไอออนที่เข้าสู่เครื่องตรวจวัด (intensity) และแกน x เป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z)

- แสดงค่า PMF ที่อ่านได้จาก mass spectrum



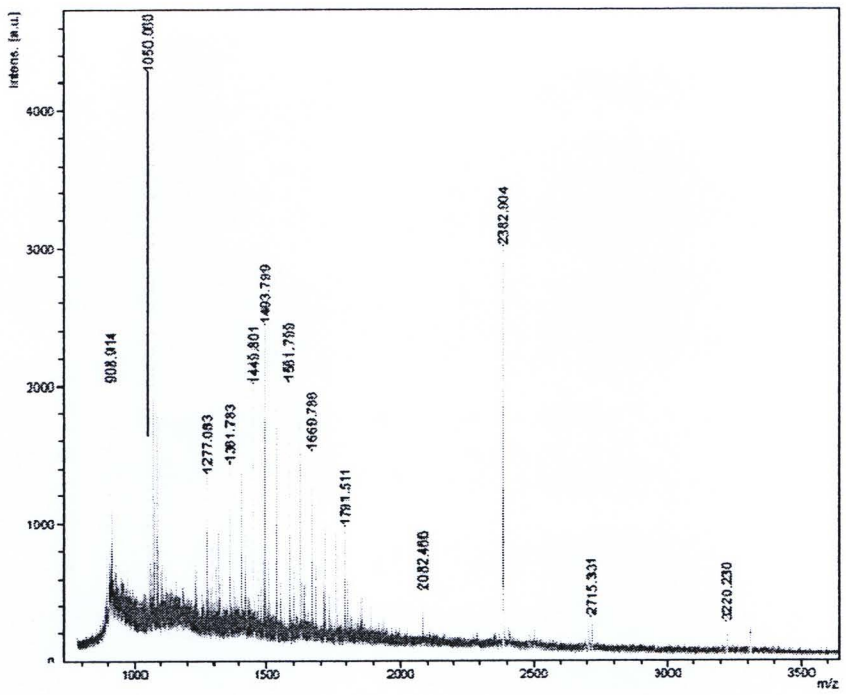
รูป ผ-จ1 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 1 (spot ID 699):

718.6164	1277.088	1816.574	2382.969	3790.318
751.2815	1487.743	1821.701	2500.026	3804.008
896.2579	1493.802	1851.66	2564.918	
908.9345	1537.818	1889.707	2568.778	
912.3712	1625.845	1993.566	2582.825	
1036.506	1638.78	2222.303	2689.659	
1066.016	1669.819	2285.264	2703.527	



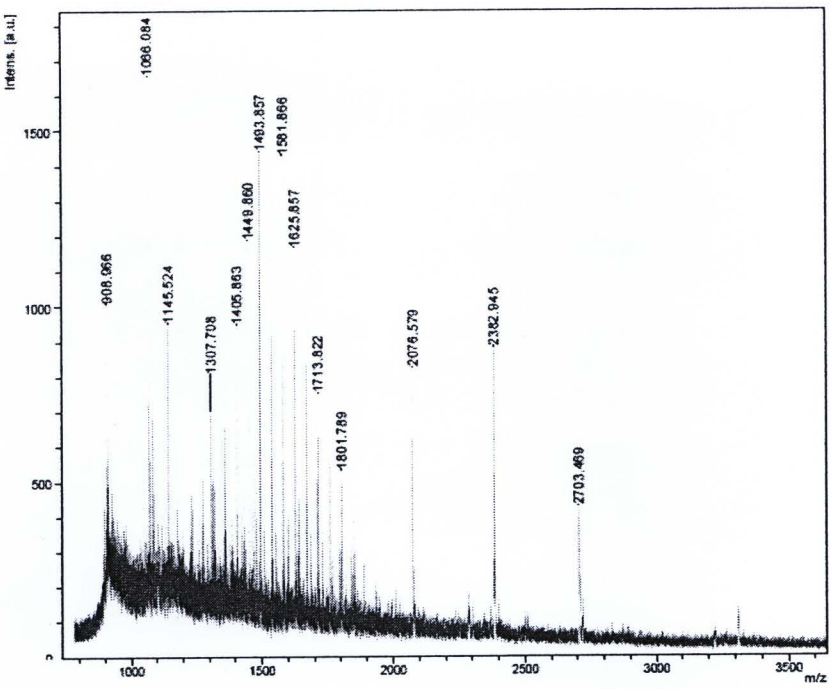
รูป ผ-จ2 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 2 (spot ID 709):

908.8953	1181.618	1361.823	1581.854	1757.795	1962.513
912.2932	1198.724	1405.836	1625.847	1790.697	2382.942
1050.095	1229.756	1449.844	1631.683	1801.744	2616.719
1056.096	1261.147	1493.849	1669.84	1819.55	
1120.38	1273.784	1501.727	1713.831	1845.745	
1132.556	1317.808	1537.854	1730.785	1903.73	



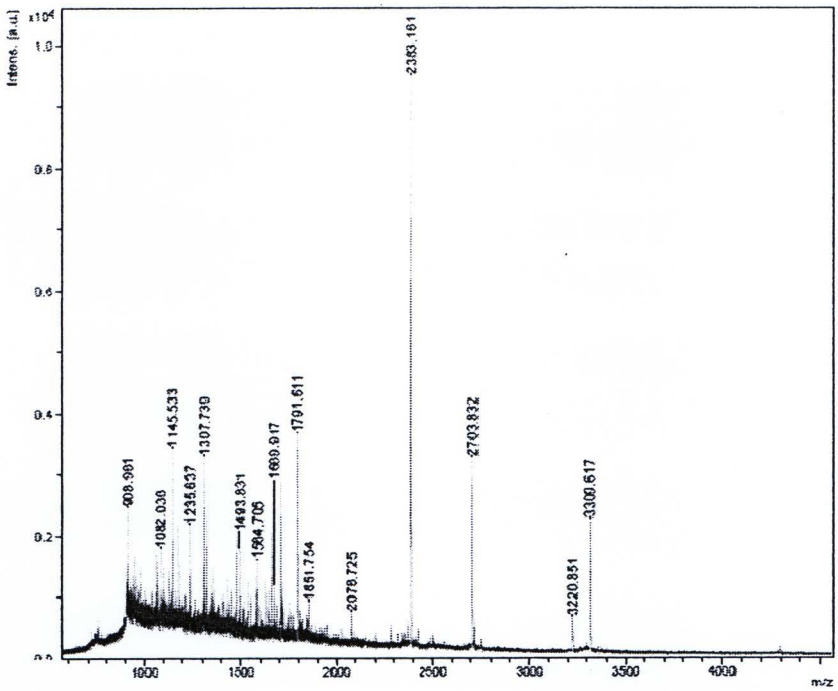
รูปที่ ผ-จ3 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 3 (spot ID 799):

908.9136	1449.801	1669.786	2082.466
1050.06	1489.716	1713.77	2382.904
1277.083	1493.799	1757.745	2715.331
1317.765	1537.807	1791.511	3220.23
1361.783	1581.799	1801.733	
1405.797	1625.793	1845.698	



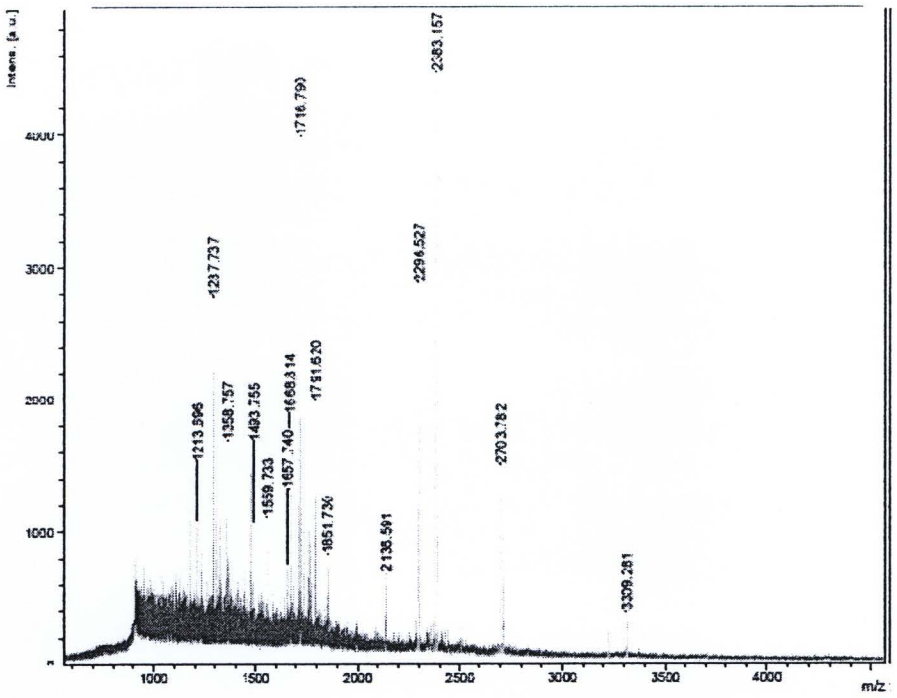
รูปที่ ผ-จ4 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 4 (spot ID 892):

908.966	1317.828	1449.86	1669.848	2076.579
1066.084	1320.628	1493.857	1707.634	2382.945
1072.066	1358.696	1537.869	1713.822	2703.469
1145.524	1361.852	1579.799	1757.809	2715.397



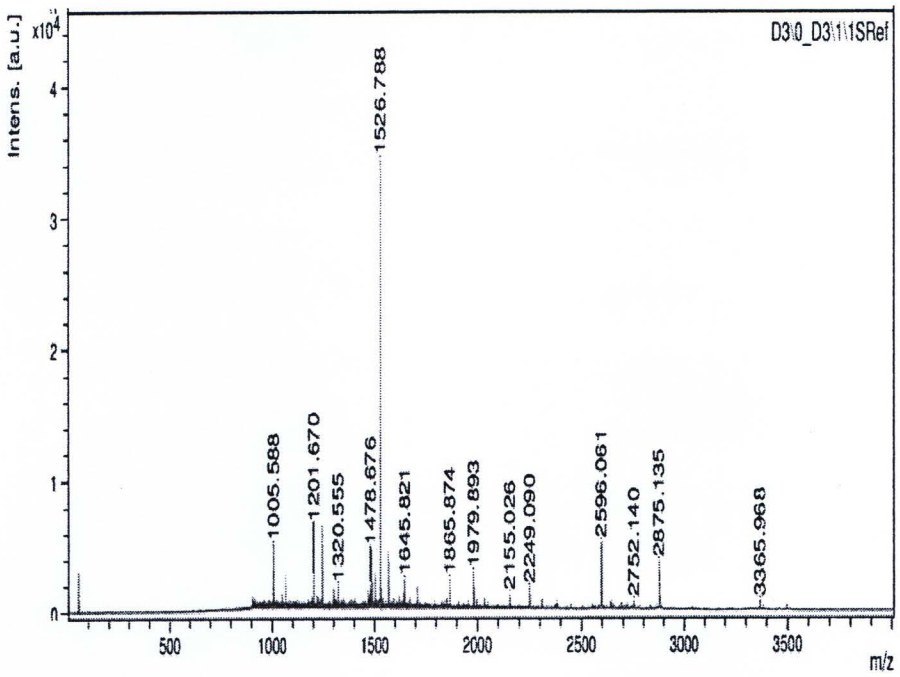
รูปที่ ผ-จ5 ข้อมูล PMFของโปรตีนจุดที่ 5 (spot ID 896):

908.9614	1307.739	1581.926	1851.754	3220.851
948.4254	1320.651	1584.705	2076.725	
1082.036	1358.724	1625.917	2368.364	
1125.585	1429.79	1669.917	2383.161	
1145.533	1493.831	1707.701	2703.832	
1235.637	1537.917	1791.611	2715.722	



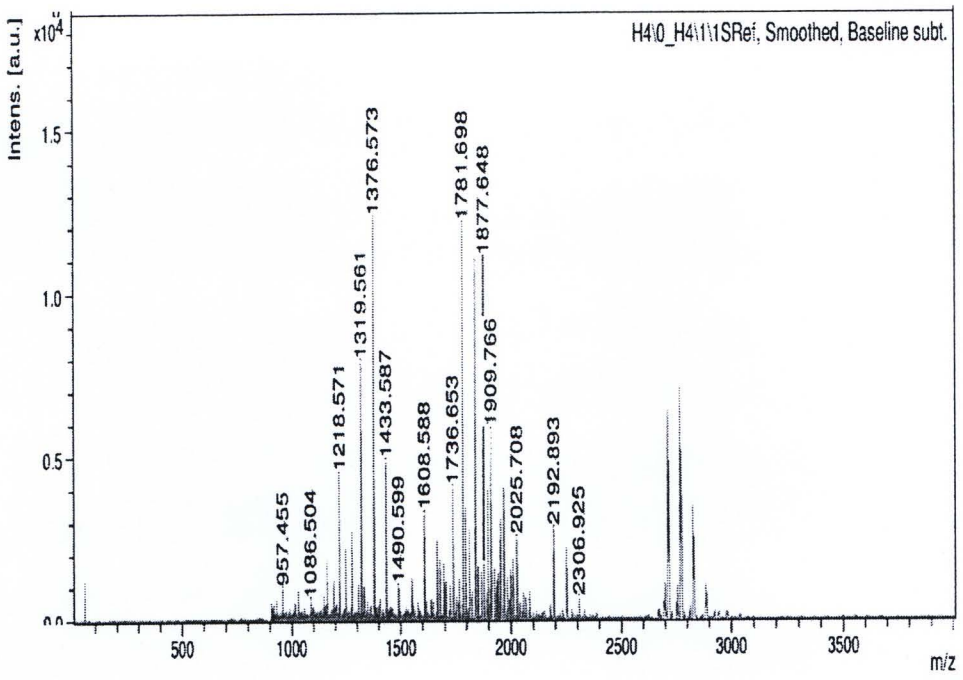
รูปที่ ผ-จ6 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 6 (spot ID 957):

1005.533	1366.762	1640.915
1175.684	1383.781	1707.767
1213.705	1493.91	1791.687
1307.763	1537.926	2383.261
1320.717	1581.96	2703.863
1330.888	1625.928	2715.79



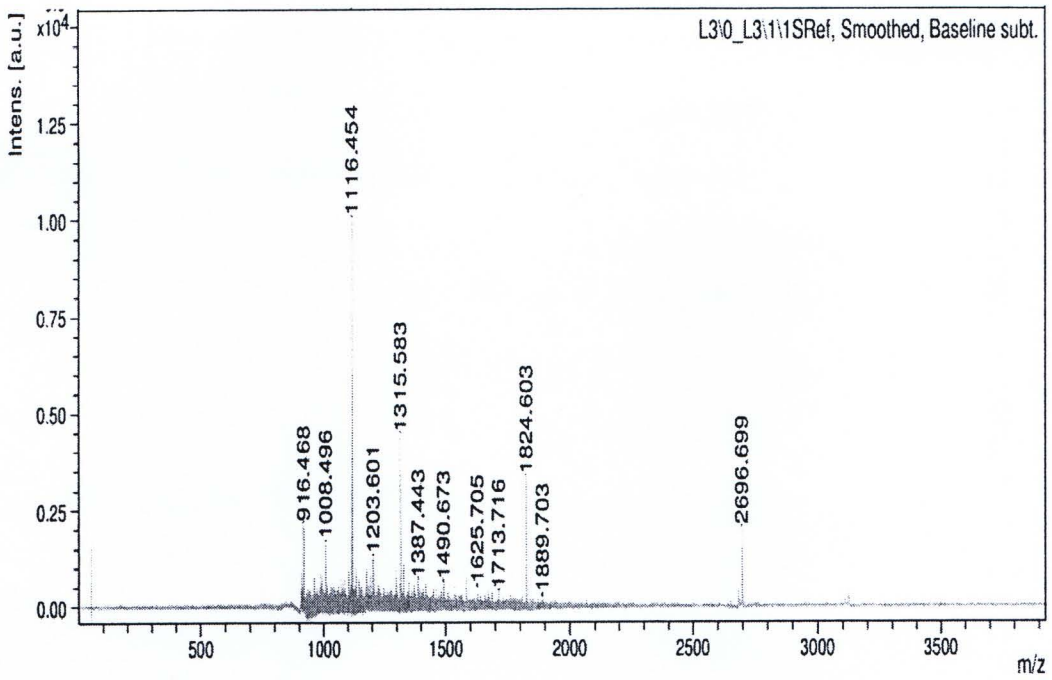
รูปที่ ผ-จ7 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 7 (spot ID 972):

1213.696	1493.755	1716.79	2296.527
1287.737	1559.733	1759.769	2383.157
1307.728	1657.74	1765.651	2703.782
1320.667	1668.814	1791.62	2715.67
1350.738	1686.864	1851.73	3309.281
1358.757	1707.7	2136.591	



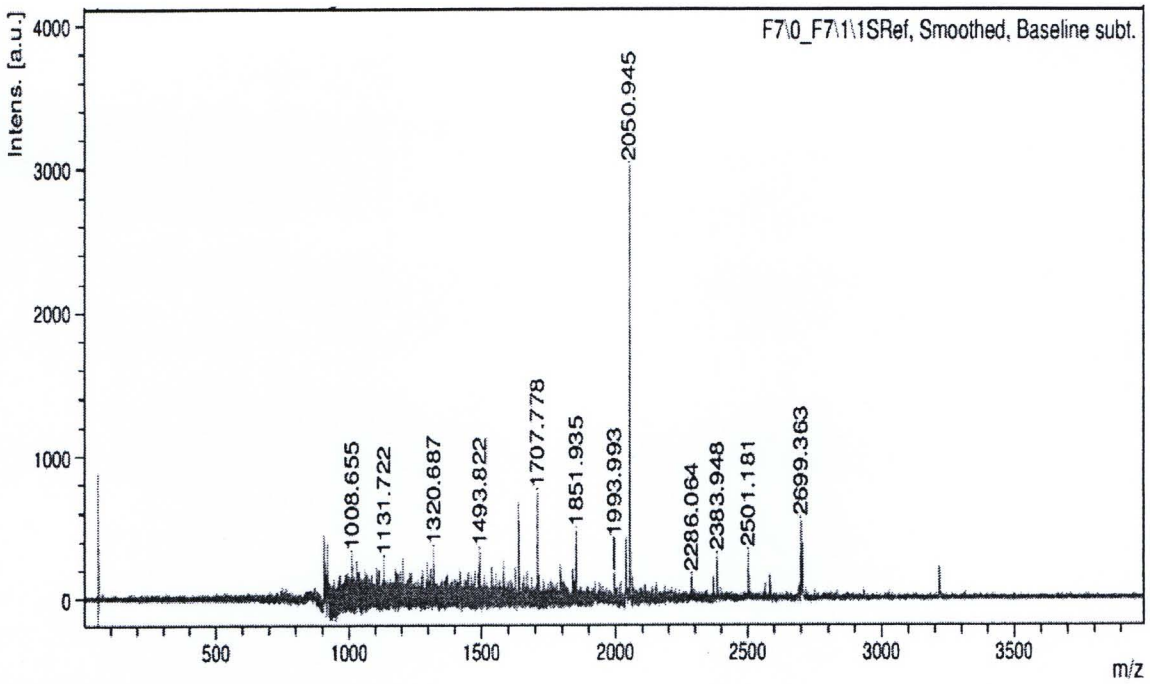
รูปที่ ผ-จ8 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 8 (spot ID 677):

916.5021	1319.6	1614.715	1781.761	1925.755	2025.816
930.4288	1332.645	1647.726	1793.73	1934.764	2066.009
957.4623	1347.607	1665.655	1809.77	1937.884	2174.994
1029.516	1376.614	1679.695	1821.727	1941.772	2193.02
1086.54	1390.657	1695.71	1838.776	1951.825	2232.02
1161.587	1404.62	1704.761	1850.736	1966.856	2250.026
1191.528	1433.63	1707.669	1866.779	1968.755	2307.039
1218.617	1490.648	1722.67	1877.716	1982.816	2982.909
1248.543	1551.618	1736.713	1892.83	1998.811	
1275.631	1579.639	1761.809	1895.798	2008.87	
1305.564	1608.64	1764.705	1910.846	2023.931	



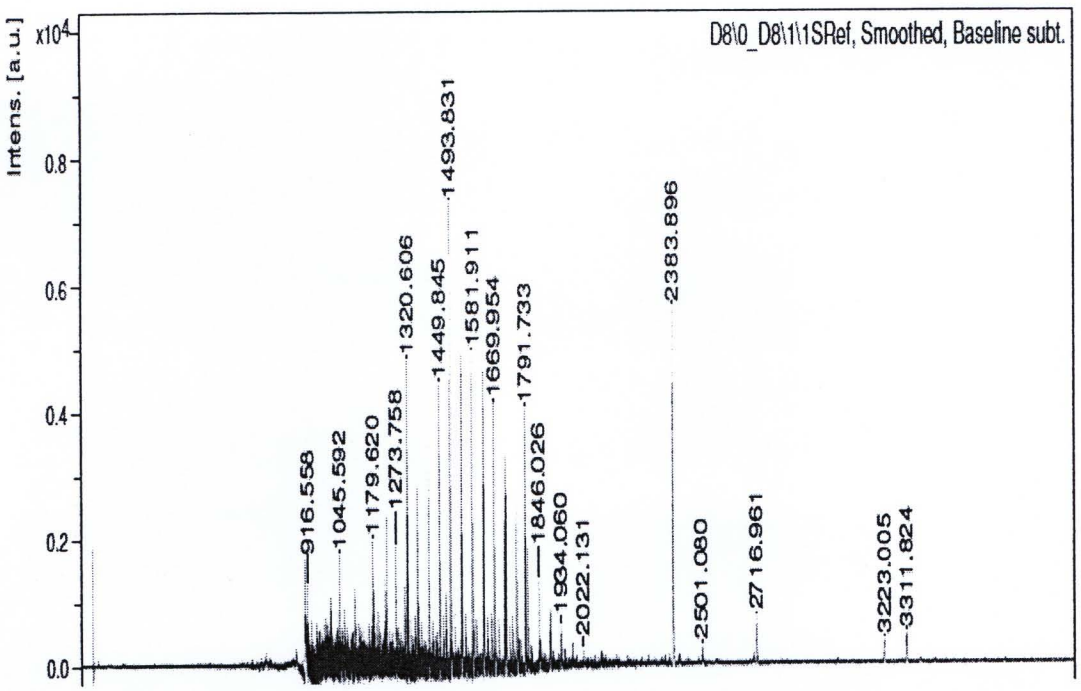
รูปที่ ผ-จ9 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 9 (spot ID 1084):

	1295.59	2682.483
906.4642		
	1315.548	2696.713
916.4383		
	1328.52	3106.637
1008.466		
	1377.471	3121.022
1101.519		
	1387.361	
1115.388		
	1416.556	
1116.423		
	1490.627	
1131.525		
	1806.571	
1144.445		
	1824.587	
1175.571		
	1838.609	
1193.546		
	1940.586	
1203.562		



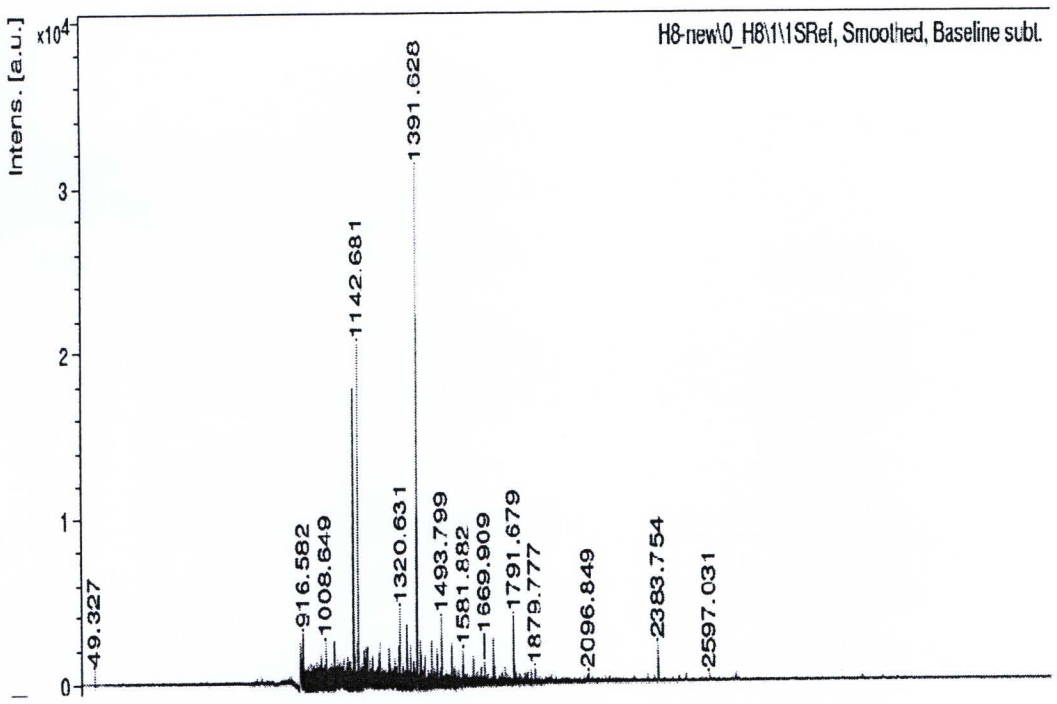
รูปที่ ผ-จ10 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 10 (spot ID 1133):

	1707.828	2150.087
916.559		
	1747.857	2286.131
1008.646		
	1791.799	2369.055
1101.723		
	1838.982	2384.014
1179.639		
	1851.992	2501.278
1307.743		
	1922.487	2566.296
1320.653		
	1940.995	2584.222
1475.807		
	1994.036	2691.338
1487.824		
	2037.243	2699.542
1493.846		
	2051.016	2705.181
1638.916		
	2063.045	3213.597
1657.872		



รูปที่ ผ-จ11 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 11 (spot ID 1174)

916.559	1707.828	2150.087
1008.646	1747.857	2286.131
1101.723	1791.799	2369.055
1179.639	1838.982	2384.014
1307.743	1851.992	2501.278
1320.653	1922.487	2566.296
1475.807	1940.995	2584.222
1487.824	1994.036	2691.338
1493.846	2037.243	2699.542
1638.916	2051.016	2705.181
1657.872	2063.045	3213.597



รูปที่ ผ-จ12 ข้อมูล PMF ของโปรตีนจุดที่ 12 (spot ID 1204)

916.5388	1581.94	1863.832	2597.211
1008.594	1625.953	1879.83	
1125.636	1638.872	1993.923	
1131.72	1669.964	2150.963	
1142.661	1708.773	2166.952	
1193.737	1713.981	2182.977	
1391.626	1758.011	2341.072	
1405.808	1791.727	2383.877	
1449.823	1827.584	2469.14	
1493.833	1851.892	2584.114	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล นายโกวิทย์ อ่อนนุ่ม

วัน เดือน ปี เกิด 9 กันยายน 2527

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมตอนปลาย
โรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัยพิษณุโลก
ปีการศึกษา 2545
สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ปีการศึกษา 2549

ผลงานวิจัย

- Siriwong, N., Onnoom, K. and Chukeatirote E. 2007. Potential Use of Fungal Metabolites to Control Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Khon Kaen University, Nong Khai Campus Nong Khai Thailand. pp 154.

- Onnoom, K., Pathom-aree, W., Lomthaisong, K.S. and Niamsup, H. 2009. Salt Tolerant Ability of Bacteria *Dermacoccus abyssi* Isolated from Mariana Trench. The 21st Annual Meeting and International Conference of The Thai Society for Biotechnology, Queen Sirikit National Convention Center Bangkok Thailand. pp 182.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การนำเสนอผลงาน 24-25 September 2009.Salt Tolerant Ability of Bacteria *Dermacoccus abyssi* Isolated from Mariana Trench. [Poster presentation] The 21st Annual Meeting and International Conference of The Thai Society for Biotechnology, Queen Sirikit National Convention Center Bangkok Thailand.