

| | | |
|---------------------|--|----------------------|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การวิเคราะห์การสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้าน ที่ติดเชื้อระยะเริ่มแรกของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 | |
| ผู้เขียน | นายอนุชา ตระกูลชนะ | |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) | |
| คณะกรรมการที่ปรึกษา | อาจารย์ ดร. พัทธณี แสงทอง | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยິงมณี ตระกูลพั้ว | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาและอธิบายกลไกการติดเชื้อและการตอบสนองของร่างกายต่อภาวะการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้าน African monkey kidney cell (หรือ Vero cell) ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมระยะเริ่มแรกด้วยวิธีทางโปรตีนโอมิกส์ โดยเปรียบเทียบชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนทั้งหมดออกจากเซลล์เจ้าบ้าน จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea สารละลายบัฟเฟอร์ Nonidet P-40 (NP-40) และสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea และวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนทั้งหมดด้วย 12.5% SDS-PAGE และการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ จากผลการทดลองพบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากสามารถสกัดโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ที่มีขนาดมวลโมเลกุลระหว่าง 30 ถึง 97 kDa ได้ และปรากฏจุดโปรตีนทั้งหมดบนเจลของการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ถึง 531 จุด จากนั้นจึงศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของสารอาหารเสริมที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 โดยเลือกใช้ซีรัมจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Iron Supplemented Calf Serum Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจาก Fetal Bovine Serum เหมาะสมที่สุด เนื่องจากลักษณะสัญญาณวิทยาของ Vero cell ที่เพาะเลี้ยงมีลักษณะปกติ อัตราการเจริญเติบโตเหมาะสม และเมื่อนำเซลล์เจ้าบ้านที่มีการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 พบการเกิดผลึกได้ชัดเจน และเมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ

โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ของเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัส ในระยะเริ่มแรก โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดการทดลองของเซลล์เจ้าบ้านที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัส (กลุ่มควบคุม) และชุดการทดลองที่เซลล์เจ้าบ้านติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูชนิดที่ 2 (กลุ่มการทดลอง) และวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนของทั้ง 2 ชุดการทดลองด้วย ImageMaster™ 2D Platinum software version 5.0 พบระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดแตกต่างกัน จำนวน 39 จุดโปรตีน โดยแบ่งออกเป็นจุดโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulate) จำนวน 14 จุดโปรตีน และระดับการแสดงออกลดลง (down-regulate) จำนวน 25 จุดโปรตีน โดยมีค่า pI ระหว่าง 4.44-7.24 และมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 15.3-98.5 kDa เมื่อวิเคราะห์โปรตีนด้วย LC-MS/MS และนำมาวิเคราะห์ peptide mass fingerprint (PMF) และสืบค้นชนิดและหน้าที่ของโปรตีนในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม MASCOT ได้ชนิดของโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านเพียง 8 ชนิด ได้แก่ ไวเมนติน (vimentin) เรติคูลคาลบิน (reticulocalbin-1) แอนเนกซิน เอ4 (annexin A4) มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) 14-3-3 เบต้า/แอลฟาโปรตีน (14-3-3 protein beta/alpha) ยูบิควิติน ไทโอเอสเทอเรส แอล1 (ubiquitin thioesterase L1) และ 6-ฟอสโฟกลูโคโนแลกโตนเนส (6-phosphogluconolactonase)



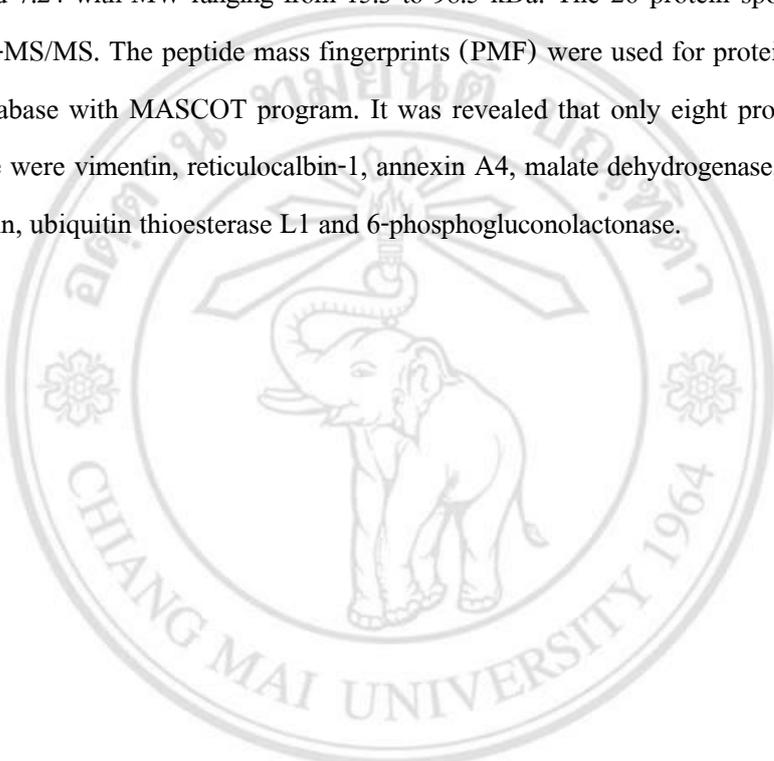
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | | |
|---------------------------|---|------------|
| Thesis Title | Analysis of Total Protein Synthesis Inside Infected Host Cell in Early Stage of Herpes Simplex Virus Type-2 | |
| Author | Mr. Anucha Trakulchana | |
| Degree | Master of Science (Biotechnology) | |
| Advisory Committee | Dr. Padchaneer Sangthong | Advisor |
| | Asst.Prof.Dr. Yingmanee Tragoolpua | Co-advisor |

ABSTRACT

Herpes simplex virus-type 2 (HSV-2) is the main cause of genital herpes worldwide including Thailand and it affects the infected individual and public health. HSVs have long been studied not only for their pathology and associated diseases but also as a model system for molecular processes and as tools for investigating important cellular regulatory proteins and pathways. Many studies have provided important information insights into our understanding. In this study, the total protein expression of African monkey kidney cell or Vero cell during early stage of HSV-2 infection was investigated using proteomic approaches. Firstly, the different protein extraction buffers were compared in term of their reproducibility and representation in the global proteome. Three types of extraction buffers were used which consisted of CHAPS-Urea-Thiourea buffer, Nonidet P-40 (NP-40) buffer and NP-40-Urea-Thiourea buffer. Total proteins from each of the extraction buffer were separated by 12.5% SDS-PAGE to determine the range of protein molecular weight (MW) and protein patterns, and followed by 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE) to investigate the reproducibility and reliability of the protein extraction buffers. It was found that CHAPS-Urea-Thiourea buffer was the suitable extraction buffer giving the observed proteins with molecular weight between 30 and 97 kDa with total of 531 spots. Secondly, the different growth media with supplemented serum were compared in term of cell growth and cell proliferation. Three types of serum were used which consisted of iron supplemented calf serum, bovine calf serum and

fetal bovine serum. It was found that fetal bovine serum was the suitable supplement serum for Vero cell growth during HSV-2 infection. The levels of total protein expression in Vero cell during early stage of HSV-2 infection were subsequently studied using 2-DE. The 2-DE gels were analyzed by ImageMaster™ 2D Platinum software version 5.0. It was revealed that thirty-nine protein spots were changed in expression levels at least 1.2 folds during HSV-2 infection. Fourteen protein spots were up-regulated and twenty-five protein spots were down-regulated. These proteins had pI between 4.44 and 7.24 with MW ranging from 15.3 to 98.5 kDa. The 26 protein spots were further analyzed by LC-MS/MS. The peptide mass fingerprints (PMF) were used for protein identification using NCBI database with MASCOT program. It was revealed that only eight protein spots were identified. There were vimentin, reticulocalbin-1, annexin A4, malate dehydrogenase, 14-3-3 protein beta/alpha protein, ubiquitin thioesterase L1 and 6-phosphogluconolactonase.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved