

## บทที่ 2

### วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1 อุปกรณ์เครื่องมือ สารเคมีและเชื้อไวรัส

##### 2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
Analytical balance	A&D, GX-800	Japan
Auto pipette	DISCOVERY Comfort, Single Channel Pipette	Poland
Autoclave	Sanyo, MLS-3780	Japan
Biosafety cabinets class II	ESCO <sup>®</sup>	USA
Cell culture flask, 25 cm <sup>2</sup>	CORNING <sup>®</sup> , 3055 phenolic style cap	USA
Cell culture flask, 75 cm <sup>2</sup>	Cellstar <sup>®</sup> , 658170 red standard cap	Germany
Cell culture plate 24 wells	NUNC <sup>™</sup> , delta surface	Denmark
Cell scraper	SPL Life Sciences, 2 cm Blade Width	Korea
Centrifuge tube ขนาด 15 ml	Falcon <sup>™</sup> , Conical Tubes (Polystyrene, Sterile)	USA
CO <sub>2</sub> incubator	Shellab, 2323-2AN	USA
Compound microscope	Olympus, CX31	USA
Dry bath incubator	Major science, MD01N	Australia
Duran bottle ขนาด 250, 500 และ 1,000 ml	SCHOTT, Duran	Germany
Electrophoresis power supply	GE Healthcare, EPS601	UK
Ettan IPG Strip holder ขนาด 13 cm	GE Healthcare	UK

ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
Filter paper, 3 micron	Whatman <sup>®</sup> , Grade 6	Germany
Forcep	MIRA, 15-434	Germany
Freezer, -20 °C	SANYO, SF-C499	Japan
Freezer, -80 °C	SANYO, MPF-392	Japan
Graduated pipette	Henneberg-Sander GmbH	Germany
Hemocytometer	BOECO, BOE02	Germany
Hot air oven	Clifton, CERASTIR	UK
Hot plate stirrer	Fisher Scientific, F5A	USA
ImageMaster <sup>™</sup> 2D Platinum software	GE Healthcare, Version 5.0	UK
ImageScanner	GE Healthcare, UTA-1120	UK
Immobilized pH gradient (IPG) strip, pH 3–10 nonlinear (NL)	GE Healthcare	UK
Inverted microscope	Olympus, CKX41	USA
LabScan software	GE Healthcare, Version 5.0	UK
Membrane filter, 0.45 micron	Sartorius stedim, Polytetrafluorethylene membrane	Germany
Microcentrifuge	Eppendorf, MiniSpin <sup>®</sup> plus	Germany
Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml	Hycon plastic, E1004	Germany
Orbital shaker	Aosheng, Os-200	China
pH meter	Metrohm, 744	Switzerland
Pipetboy	HTL, Swiftpet	Poland
Pipette tip ขนาด 10, 200, 1,000 µl	QSP <sup>®</sup> , Standard	USA
Plastic UV cuvette ขนาด 1.5 ml	Plastibrand <sup>®</sup> , Semimicro	UK
Refrigerator	National, NR-A181DH	China
Rocking platform	ELMI, S 4	UK
Spectrophotometer (UV/Visible)	Thermo Electron, Genesys 20	USA
Temperature controlled centrifuge	SCIOLOGEX, D3024	USA

ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
Vacuum pump	Rocker Scientific, 400	China
Vertical electrophoresis system (10 x 10.5 cm)	GE Healthcare, miniVE	UK
Vertical electrophoresis system (18 x 16 cm)	GE Healthcare, SE 600 Ruby	UK
Vortex mixer	Bohemia, Genie-2 G-560E	USA

### 2.1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl ammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS	AMRESCO	USA
AccuGel 19:1 (40%), acrylamide to bisacrylamide stabilized solution	National diagnostics	USA
Acetic acid, glacial	QReC™	New Zealand
Agarose low EEO	Research Organics Inc.	USA
Ammonium sulfate	BIO BASIC, Inc.	Canada
Ammonium persulfate	BIO BASIC, Inc.	Canada
Bata-mercaptoethanol	Fluka	USA
Bovine calf serum	JR Scientific, Inc.	USA
Bovine serum albumin, BSA	Sigma	USA
Bromophenol blue sodium salt	ACROS	Belgium
Cocktail protease inhibitor set III, animal-free	Calbiochem®	USA
Coomassie Brilliant Blue G-250	BIO BASIC, Inc.	Canada
Coomassie Brilliant Blue R-250	BIO BASIC, Inc.	Canada
Crystal violet	Merck	Germany
Disodium hydrogen phosphate, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carlo Erba	Italy

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Dithiothreitol, DTT	BIO BASIC, Inc.	Canada
Drystrip cover fluid	GE Healthcare	UK
Ethanol (95%), CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	EMSURE <sup>®</sup>	Germany
Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA	Sigma	USA
Fetal bovine serum	Hyclone <sup>®</sup>	USA
Glycerol (87%)	QReC <sup>™</sup>	New Zealand
Glycine, NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	AppliChem GmbH	Germany
Hydrochloric acid (37%), HCl	Carlo Erba	Italy
Iodoacetamide, IAA	GE Healthcare	UK
IPG buffer, pH 3-10 NL	GE Healthcare	UK
Iron supplemented calf serum	JR Scientific, Inc.	USA
Isopropyl alcohol, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Merck	Germany
Magnesium chloride, MgCl <sub>2</sub>	Sigma	USA
Methanol, CH <sub>3</sub> OH	BHD	UK
Minimum essential medium, MEM	Hyclone <sup>®</sup>	USA
Octyl phenoxypolyethoxylethanol, NP-40	EMD Biosciences, Inc.	Germany
Penicillin/Streptomycin	Gibco <sup>®</sup>	USA
Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF	BIO BASIC, Inc.	Canada
Phosphoric acid (85%), H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	BHD	UK
Potassium chloride, KCl	Merck	Germany
Potassium dihydrogen phosphate, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carlo Erba	Italy
Protein marker, LMW calibration kit	GE Healthcare	UK
Sodium bicarbonate, NaHCO <sub>3</sub>	Sigma	USA
Sodium carboxy methylcellulose	Dipti Cellulose PVT. LTD.	India
Sodium chloride, NaCl	Merck	Germany

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Sodium dodecyl sulfate, SDS	GE Healthcare	UK
Sodium hydroxide, NaOH	Carlo Erba	Italy
Tetramethylethylenediamine, TEMED	BIO BASIC, Inc.	Canada
Thiourea	Merck	Germany
Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Trisbase	Vivantis, Inc.	USA
Trypsin-EDTA (0.5%)	Gibco®	USA
Urea, CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	AppliChem GmbH	Germany

### 2.1.3 เชื้อไวรัสก่อโรคหัดและเซลล์เพาะเลี้ยง

ชื่อเชื้อไวรัสและเซลล์เพาะเลี้ยง	แหล่งที่มา
Herpes simplex virus type 2G, HSV-2G	แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
African monkey kidney cell, Vero cell	แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

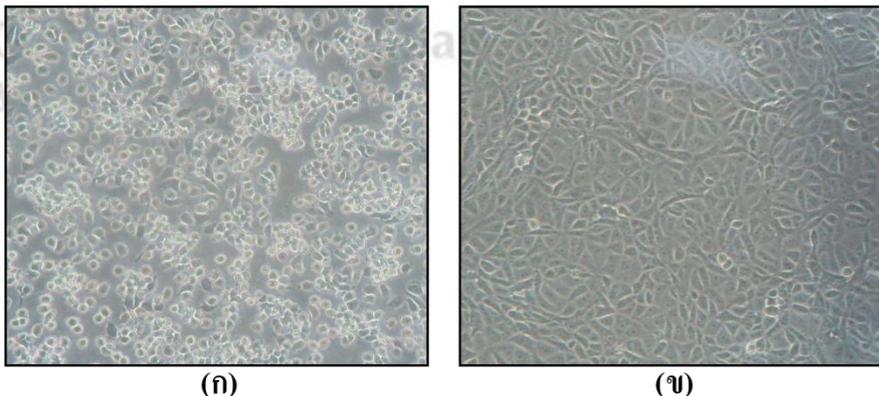
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## 2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัสก่อโรครีม

เซลล์เพาะเลี้ยงมีความสำคัญอย่างมากสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส เนื่องจากไวรัสไม่มีกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ที่ใช้สังเคราะห์สารพันธุกรรมของตนเอง การดำรงชีวิตของไวรัสต้องเข้าไปอาศัยในเซลล์สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่เรียกว่า โฮสต์เซลล์ (host cell) หรือเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อควบคุมเมแทบอลิซึมภายในเซลล์สำหรับการเพิ่มจำนวนไวรัส โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ African monkey kidney cell (Vero cell) เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสก่อโรครีมชนิดที่ 2 (herpes simplex virus type-2, HSV-2) เนื่องจาก Vero cell มีคุณสมบัติเป็น continuous cell line จึงทำให้มีความสะดวกอย่างมากในการศึกษาวิจัย (อ้อมหทัย, 2552)

### 2.2.1 การเพาะเลี้ยง African monkey kidney cell (Vero cell)

ในการทดลองให้เตรียมขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) ขนาด 25 cm<sup>2</sup> สำหรับเลี้ยง Vero cell ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ (growth medium) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 4 ml ที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำ Vero cell จาก stock ในตู้แช่แข็ง - 80°C มาอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C อย่างรวดเร็วจนผลึกน้ำแข็งละลายตัว จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ ค่อยๆ เอียงขวดไปมาเบาๆ ในแนวนอนเพื่อให้เซลล์ที่เกาะกลุ่มกันกระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ทั่วผิวภาชนะ ก่อนนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (5% CO<sub>2</sub> incubator) เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้ง และสังเกตการเจริญเติบโตของเซลล์ภายใต้กล้อง inverted microscope โดย Vero cell จะเข้าเกาะบนพื้นผิวภาชนะ และค่อยๆ แบ่งตัว โดยเกาะเรียงตัวเป็นระนาบชั้นเดียวตามพื้นผิว (monolayer) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 เมื่อเซลล์เจริญเต็มผิวภาชนะจึงถ่ายเซลล์สู่อาหารใหม่ (subculture) เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงตามต้องการ



รูปที่ 2.1 (ก) การเจริญเต็มผิวภาชนะ (monolayer) ของ Vero cell (ข) การแยกตัวออกจากกันของ Vero cell เมื่อเติม 0.1% Trypsin-EDTA

### ก) การถ่ายเซลล์สู่อาหารใหม่ (subculture)

นำ Vero cell ที่เจริญเต็มผิวบนขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ถ่ายเซลล์สู่อาหารใหม่โดยเทอาหารเดิมออกจากภาชนะจนหมด ล้างผิวเซลล์ที่เกาะบนภาชนะด้วย 1X phosphate buffer saline (1X PBS) ปริมาตร 6 ml จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการแยกเซลล์ออกจากภาชนะด้วยการย่อยด้วยทริปซิน (trypsinisation) โดยเติม 0.05% (w/v) Trypsin-EDTA ปริมาตร 0.5-1.0 ml ตั้งทิ้งไว้บน rocking platform ให้สังเกตลักษณะของ Vero cell ผ่านกล้อง inverted microscope จะพบเยื่อหุ้มเซลล์ของ Vero cell ค่อยๆ หดตัวและแยกตัวออกจากกัน เมื่อสามารถสังเกตเห็นพื้นที่ว่างระหว่างเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 2.1 จึงเทสารละลาย 0.05% (w/v) Trypsin-EDTA ทิ้ง แล้วเติม growth medium ปริมาตร 3 ml ลงไปสำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm<sup>2</sup> หรือปริมาตร 6 ml สำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm<sup>2</sup> แล้วเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่เกาะติดผิวภาชนะหลุดออกแยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่โดยใช้อัตราส่วนในการแบ่งเซลล์เท่ากับ 1:3 หรือ 1:4 ของปริมาตรทั้งหมด ปรับปริมาตรด้วย growth medium จนครบ 5 ml (ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm<sup>2</sup>) หรือ 10 ml (ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm<sup>2</sup>) แล้วเอียงขวดไปมาในแนวนอนเพื่อให้เซลล์กระจายทั่วภาชนะ ก่อนนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เซลล์จะใช้เวลาประมาณ 1-2 วันในการเจริญเติบโตจนเต็มผิวภาชนะจึงสามารถนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงไวรัส

### ข) การเพาะเลี้ยงเซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเตรียม Vero cell ที่เจริญเต็มผิวบนขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm<sup>2</sup> สำหรับถ่ายเซลล์สู่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture plate) จำนวน 24 หลุม โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย 1X PBS จากนั้นแยกเซลล์ออกจากภาชนะด้วย 0.05% (w/v) Trypsin-EDTA แล้วเติม growth medium ปริมาตร 3 ml พร้อมเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่เกาะติดผิวภาชนะหลุดออกแยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ต่อมาจึงเจือจางความเข้มข้นของเซลล์ให้เหลือประมาณ  $1 \times 10^5$  cells/ml โดยเติม growth medium จนครบปริมาตร 12 ml เขย่าไปมาเบาๆ ก่อนแบ่งเซลล์จากขวดใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด 24 หลุมๆ ละ 500  $\mu$ l เอียงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปมาเพื่อให้เซลล์กระจายทั่วหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลาประมาณ 1-2 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มผิวทั้งหมด 24 หลุมจึงสามารถนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงไวรัส

## 2.2.2 การเพิ่มปริมาณไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2

เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเซลล์จึงสามารถเพาะไวรัสลงไปในเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส โดยเตรียม Vero cell ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm<sup>2</sup> เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกและเติม maintenance medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1-2 ml ตามด้วยไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จาก stock ปริมาตร

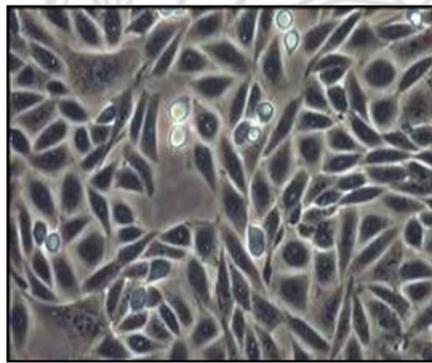
100  $\mu$ l ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องบน rocking platform เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคของไวรัสเข้าเกาะเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นให้เทอาหารเลี้ยงเซลล์รวมทั้งไวรัสที่ไม่เข้าเกาะเซลล์ทิ้งไป แล้วเติม maintenance medium ลงไปใหม่จนครบ 5 ml บ่มต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลาประมาณ 1-2 วัน โดยให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของ Vero cell หลังการติดเชื้อไวรัส (cytopathic effect, CPE) ภายใต้อุปกรณ์ inverted microscope ดังแสดงในรูปที่ 2.2 พร้อมให้คะแนนเพื่อบ่งชี้ระดับการติดเชื้อของเซลล์ดังนี้

CPE 1+ = เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างร้อยละ 25 ของเซลล์ทั้งหมด

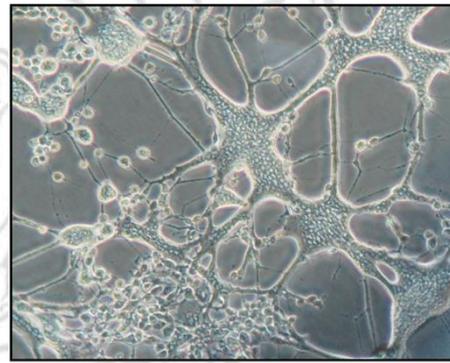
CPE 2+ = เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างร้อยละ 40 ของเซลล์ทั้งหมด

CPE 3+ = เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างร้อยละ 75 ของเซลล์ทั้งหมด

CPE 4+ = เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างร้อยละ 90 ของเซลล์ทั้งหมด โดยที่เซลล์ไม่หลุดลอกออกจากผิวภาชนะ



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.2 (ก) รูปร่างลักษณะของ Vero cell ปกติ (ข) รูปร่างลักษณะของ Vero cell ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาหลังติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูนิดที่ 2 เป็นเวลา 2 วัน

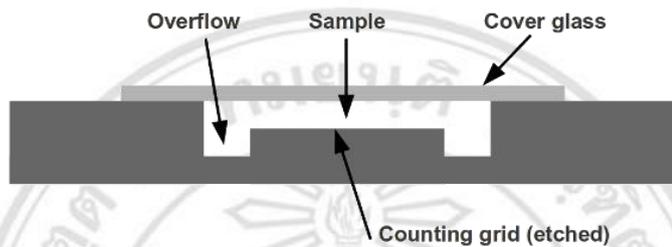
เมื่อเซลล์ติดเชื้อไวรัสทั้งหมด เซลล์จะรวมตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส เรียกว่า multinucleated giant cell ซึ่งต่อมาเซลล์เหล่านี้จะตายและหลุดออกจากผิวภาชนะที่เกาะอยู่ โดยให้เก็บขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C ก่อนที่กลุ่มเซลล์จะหลุดออกจากผิวภาชนะ (CPE 4+) แล้วค่อยนำกลับมาละลายที่อุณหภูมิห้อง (thaw) ทั้งหมด 2 ครั้ง เพื่อให้อนุภาคไวรัสแตกออกมาจากเซลล์เจ้าบ้าน หลังจากนั้นแบ่งเก็บไวรัสในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml เป็น stock ไวรัสที่อุณหภูมิ -80°C

### 2.3 การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Hemacytometer

ในการเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องทราบจำนวนของเซลล์หลังการเลี้ยง ในการทดลองนี้ใช้ hemacytometer ในการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งเป็นสไลด์กระจกขนาดเล็กประกอบด้วย 2 chambers สำหรับ

ใส่สารละลายตัวอย่างเซลล์ แต่ละ chamber จะมีตาราง (grid) ขนาดเล็กสลักอยู่บนผิวกระจกดังรูปที่ 2.4 โดยมีช่องสี่เหลี่ยมอยู่ภายใน 9 ช่อง แต่ละด้านของสี่เหลี่ยมมีความกว้างและยาว 1 mm เมื่อวางกระจก coverslip ทับลงเหนือ chamber จะเกิดเป็นห้องที่มีความหนาสูงเหนือจากพื้น 0.1 mm (รูปที่ 2.3) ทำให้สามารถทราบปริมาตรของสารละลายเหนือแต่ละช่องสี่เหลี่ยมของตารางได้อย่างแม่นยำ วิธีนี้จึงเป็นการนับจำนวนเซลล์ภายในปริมาตรที่กำหนด (McAteer and Davis, 1979; Rouge, 2002)

### Hemocytometer: side view



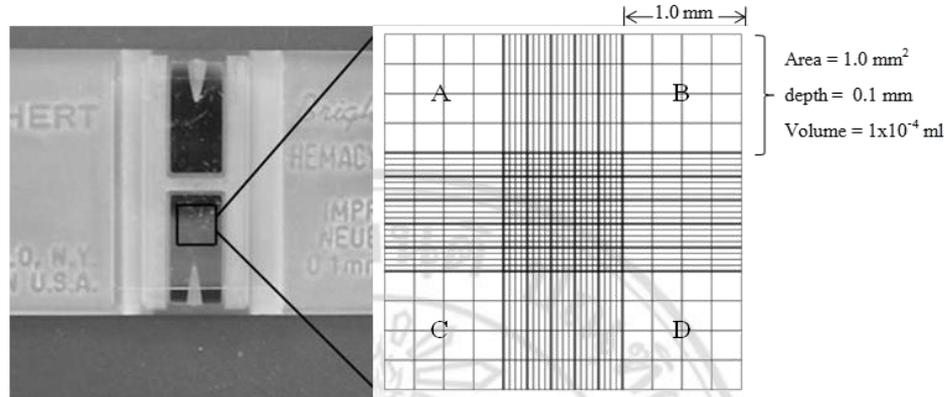
รูปที่ 2.3 องค์ประกอบของ hemocytometer (Oliver, 2004)

#### 2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างเซลล์บรรจุลงใน chamber

การเตรียมสารละลายในกรณีของ Vero cell ที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นเซลล์จะเกาะติดแน่นอยู่บนผิวภาชนะ จึงต้องแยกเซลล์ออกจากภาชนะก่อนด้วย 0.05% (w/v) Trypsin-EDTA แล้วค่อยละลาย (resuspend) เซลล์ที่หลุดออกจากภาชนะด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 3-6 ml แบ่งสารละลายเซลล์ (cell suspension) เก็บไว้ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ประมาณ 1 ml สำหรับวัดความเข้มข้นของเซลล์ ส่วนที่เหลือนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป โดยความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ที่ใช้ต้องไม่มาก หรือน้อยจนเกินไป เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์สูงอาจทำให้เซลล์อยู่ซ้อนทับกันและยากต่อการนับ จึงควรเจือจางสารละลายเซลล์ลง 1:10 1:100 หรือ 1:1000 แล้วค่อยพิจารณาค่าการเจือจาง (dilution factor) ในการคำนวณหาความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ภายหลัง ในกรณีที่เซลล์มีความเข้มข้นน้อยเกินไป เช่น นับได้เพียง 1-2 เซลล์ต่อช่องสี่เหลี่ยม จะส่งผลให้เกิดค่าการนับที่ผิดพลาดทางค่าสถิติสูง (statistical error)

ทำการบรรจุสารละลายตัวอย่างเซลล์ลงใน chamber โดยเริ่มจากวางกระจก coverslip ลงบน chamber ผสมสารละลายตัวอย่างเซลล์เบาๆ ด้วย vortex mixer ให้เซลล์กระจายตัวในสารละลายมากที่สุด เพื่อให้ผลที่แม่นยำในการตรวจวัด แล้วดูดสารละลายตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 15  $\mu$ l ใส่ใน chamber ทั้ง 2 ของ hemocytometer โดยวางปลาย pipette tip บนร่องรูปตัววีระหว่างชั้นกระจก coverslip (รูปที่ 2.4) แรงแคปิลลารี (capillary force) จะช่วยดึงสารละลายเข้าสู่ chamber ก่อนทำการนับเซลล์ให้ตั้ง hemocytometer ที่บรรจุสารละลายตัวอย่างเซลล์ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที เพื่อให้เซลล์ภายใน chamber หยุดการเคลื่อนที่

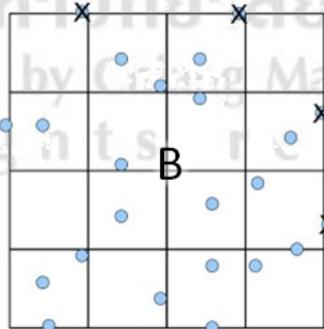
เมื่อตรวจเช็กภายใต้กล้อง compound microscope กลุ่มเซลล์จะต้องอยู่ในระนาบเดียวกันของจุดโฟกัสซึ่งช่วยให้สะดวกต่อการนับ และต้องไม่ปล่อยให้สารละลายตัวอย่างเซลล์ไว้นานเกินไปจนสารละลายแห้ง มิฉะนั้นเซลล์จะแห้งติดขอบกระจก coverslip กับ chamber ทำให้ยากต่อการนับ



รูปที่ 2.4 ภาพขยายภายใน chamber ของ hemacytometer แสดงตารางพื้นที่สำหรับนับเซลล์

### 2.3.2 การนับจำนวนเซลล์และการคำนวณความเข้มข้นของเซลล์

ตารางของ hemacytometer ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยม 9 ช่อง ( $1 \times 1 \times 0.1$  mm) แต่ละช่องจะประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็กอีก 16 ช่อง ( $0.25 \times 0.25 \times 0.1$  mm) ในกรณีของ Vero cell ซึ่งมีขนาดใหญ่จึงเลือกใช้พื้นที่บริเวณ A B C และ D (counting area) สำหรับใช้นับเซลล์ (รูปที่ 2.4) วิธีการนับเซลล์ในตารางให้นับเรียงตามช่องจากซ้ายไปขวา บนลงล่างจนครบทั้งหมด 16 ช่อง ถ้าเซลล์อยู่บนเส้นขอบนอกของพื้นที่ให้เลือกนับเพียงขอบเส้นข้างใน เพื่อหลีกเลี่ยงการนับเซลล์ซ้ำ เมื่อนับเซลล์แต่ละพื้นที่จนครบ จึงนำจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมดจากทั้ง 2 chambers มาคำนวณหาปริมาณของเซลล์



รูปที่ 2.5 แสดงตัวอย่างการนับเซลล์บนพื้นที่นับเซลล์ B โดยสมมุติให้กลุ่มเซลล์คือ จุดสีฟ้า ซึ่งอยู่บนพื้นที่ทั้งหมด 23 เซลล์ โดยมีเซลล์ที่อยู่ขอบนอกทั้งหมด 4 เซลล์ ดังนั้นจำนวนเซลล์ในพื้นที่ B ที่นับได้คือ 19 เซลล์ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Oliver, 2004)

การคำนวณความเข้มข้นของเซลล์มีขั้นตอนดังนี้

- 1) บริเวณมีพื้นที่  $0.1 \text{ mm}^2$  และมีความสูงจากพื้น chamber  $0.1 \text{ mm}$  ดังนั้นปริมาตรเนื้อ counting area คือ  $0.1 \text{ mm}^3$  หรือ  $0.1 \mu\text{l}$
- 2) หาผลรวมของจำนวนเซลล์ที่นับได้ในบริเวณพื้นที่ A B C และ D ของทั้ง 2 chambers แล้วคิดเป็นค่าเฉลี่ย โดยสมมุติให้ค่าเฉลี่ยรวมมีค่าเท่ากับ Z cells
- 3) เปรียบเทียบความเข้มข้นเซลล์ในหน่วยจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร 1 ml ( $1 \text{ ml}$  เท่ากับ  $1,000 \text{ mm}^3$ )

$$\begin{aligned}\text{ปริมาตร } 0.1 \text{ mm}^3 (0.1 \mu\text{l}) \text{ นับจำนวนเซลล์ได้} &= Z \quad \text{cells} \\ \text{ถ้าใน } 1000 \text{ mm}^3 (1 \text{ ml}) \text{ จะมีจำนวนเซลล์} &= \frac{Z \times 1000}{0.1} \quad \text{cells/ml} \\ &= Z \times 10^4 \quad \text{cells/ml}\end{aligned}$$

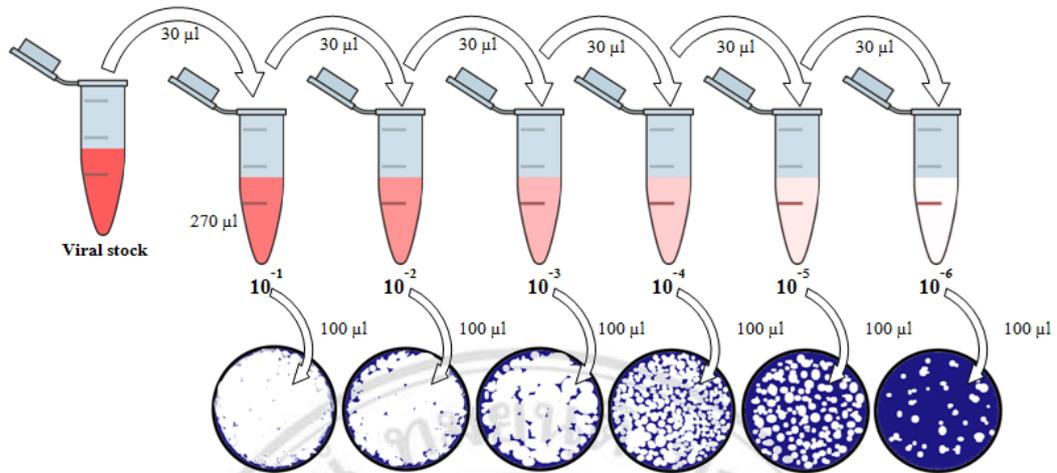
- 4) ถ้าสารละลายตัวอย่างเซลล์มีการเจือจางก่อนทำการนับเซลล์ ให้พิจารณาค่าการเจือจาง (dilution factor) มาคูณกลับเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ จึงได้สมการหาความเข้มข้นเซลล์ดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} \times 10^4 \times \text{dilution factor}}{8}$$

- 5) คำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายในภาชนะเพาะเลี้ยง โดยนำค่าความเข้มข้นที่ได้คูณกลับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดที่ใช้ละลายเซลล์ทั้งหมดออกจากภาชนะ

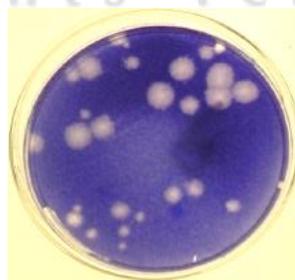
#### 2.4 การหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay

เตรียม Vero cell ที่เจริญเต็มผิวทั้งหมด 24 หลุมในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมๆ ละ  $300 \mu\text{l}$  เหลือไว้ประมาณ  $200 \mu\text{l}$  ขณะเดียวกันให้เตรียมไวรัสที่ต้องการหาปริมาณจาก stock มาเจือจางแบบ 10 เท่าลำดับส่วน (serial ten-fold dilution) ตั้งแต่  $1:10$ - $1:10^6$  ด้วย essential medium ดังแสดงในรูปที่ 2.6 แล้วเติมไวรัสแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในแต่ละหลุมของงานเพาะเลี้ยงเซลล์ หลุมละ  $100 \mu\text{l}$  โดยเรียงลำดับตามความเข้มข้นจากมากไปน้อย ต่อมานำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน rocking platform เพื่อให้อนุภาคไวรัสเข้าเกาะกับเซลล์ เมื่อบ่มเสร็จให้เติม overlay medium (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีส่วนผสมของ semi-solid agar หลุมละ  $500 \mu\text{l}$  ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละหลุมมีลักษณะคล้ายเจล การแพร่กระจายของไวรัสจึงถูกจำกัดเฉพาะเซลล์ข้างเคียงเท่านั้น จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 แต่ละอนุภาคของเซลล์จะถูกไวรัสทำลายเกิดเป็นลักษณะโซนวงกลมเรียกว่าพลาคว (plaque)



รูปที่ 2.6 การเจือจางไวรัสแบบ 10 เท่าลำดับส่วน เพื่อใช้ในการทำ plaque titration assay โดยใช้ Vero cell

หลังบ่มเป็นเวลา 3-4 วัน พลาควาจะขยายใหญ่ขึ้นเพียงพอที่สามารถเห็นด้วยตาเปล่า ให้ดูอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมทิ้งไป และล้างผิวเซลล์ด้วย 1X PBS 1 ครั้ง ก่อนย้อมสีเซลล์ด้วย 0.1% (w/v) crystal violet โดยหยดสีลงไปประมาณ 3-4 หยด พอให้ท่วมผิวเซลล์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จึงดูดสีย้อมทิ้ง สีย้อมจะช่วยให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (living cell) ซึ่งจะย้อมติดสี ขณะที่กลุ่มเซลล์ตายจากการติดเชื้อไวรัสจะย้อมไม่ติดสีปรากฏเป็นลักษณะพลาควาอย่างชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งสามารถตรวจนับปริมาณของพลาควาที่เกิดขึ้นมาคำนวณหาปริมาณไวรัสได้ โดยให้เล็กลบเฉพาะหลุมที่มีพลาควา อยู่ระหว่าง 10-100 พลาควาของแต่ละค่าความเจือจางไวรัส ยกตัวอย่างดังรูปที่ 2.7 สมมุติใช้ไวรัสที่เจือจางความเข้มข้นลง  $10^{-6}$  เท่า ปริมาตร 100 µl เติมลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ หลังบ่มและย้อมสีสามารถนับจำนวนพลาควาได้ทั้งหมด 26 พลาควา เมื่อ 1 พลาควา คิดเป็นปริมาณไวรัสเท่ากับ 1 infection unit หรือ Plaque Forming Unit ดังนั้นปริมาณไวรัส จึงมีค่าเท่ากับ  $26 \times 10^6$  PFU ต่อ 100 µl ของปริมาณไวรัสที่เติมลงไป หรือเท่ากับ  $2.6 \times 10^8$  PFU/ml โดยในแต่ละหลุมที่มีปริมาณไวรัสแตกต่างกันควรนับอย่างน้อย 2 ซ้ำ เพื่อความแม่นยำในการหาปริมาณไวรัส (Dulbecco, 1952; Dulbecco and Vogt, 1953)



รูปที่ 2.7 ลักษณะของพลาควาที่เกิดขึ้นจากไวรัสหลังย้อมสีด้วยคริสตอลไวโอเล็ต

## 2.5 การเลือกชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

ขั้นตอนของการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์ด้วยสารละลายที่เหมาะสมถือเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาการแสดงออกโปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ เพื่อให้ได้โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ที่ต้องการศึกษา ในการสกัดโปรตีนจาก Vero cell นิยมสกัดโปรตีนโดยตรงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (lysis buffer) ซึ่งมีองค์ประกอบของคิเทอร์เจนชนิดต่างๆ เพื่อทำหน้าที่ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ในการทดลองนี้ได้เตรียมตัวอย่าง Vero cell บนขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm<sup>2</sup> ที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมงในหน่วย multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 5 สำหรับเปรียบเทียบการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea (Hu *et al.*, 2010) สารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 (จิราภรณ์, 2553) และสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน โดยวิธี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟริซิส และการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ

## 2.6 การเลือกชนิดของซีรัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์เข้าบ้านและไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2

ซีรัมเป็นของเหลวที่ได้จากการแข็งตัวของเลือดสัตว์โดยมีสารชีวโมเลกุลที่มีความซับซ้อนทั้งขนาดใหญ่และเล็กเป็นองค์ประกอบ เช่น เป็นสารอาหาร ฮอร์โมน โกรทแฟกเตอร์ (growth factor) นอกจากนี้ยังเป็นสารให้ความหนืดป้องกันอันตรายกับเซลล์ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส และบัฟเฟอร์ จึงนิยมใช้ซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์กันอย่างแพร่หลาย และมีให้เลือกหลายชนิด โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ซีรัมทั้งหมด 3 ชนิด คือ Iron supplemented calf serum Bovine calf serum และ Fetal bovine serum มาทดลองเปรียบเทียบกันเพื่อหาซีรัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ดังนี้

### 2.6.1 การเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานวิทยาทายนอกของเซลล์

เตรียม growth medium จากซีรัมทั้ง 3 ชนิด (ภาคผนวก ก) มาใช้เพาะเลี้ยง Vero cell พร้อมกันในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm<sup>2</sup> หลังจากบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จึงสังเกตลักษณะพื้นฐานวิทยาทายนอกของเซลล์ผ่านกล้อง inverted microscope พร้อมบันทึกเวลาเมื่อเซลล์เจริญเต็มที่เปรียบเทียบกันระหว่างซีรัมทั้ง 3 ชนิด

### 2.6.2 การเปรียบเทียบการเกาะติด และการเจริญเติบโตของไวรัสด้วย plaque titration assay

เพาะเลี้ยง Vero cell ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ growth medium ที่เตรียมจากซีรัมทั้ง 3 ชนิด จนเซลล์เจริญเต็มผิวภาชนะทั้งหมด 24 หลุม จากนั้นนำแต่ละจานเพาะเลี้ยงมาทำ plaque titration assay ด้วยไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 โดยหลังจากข้อมลเซลล์ด้วยคริสตอลไวโอเลต ให้สังเกตลักษณะของพลา

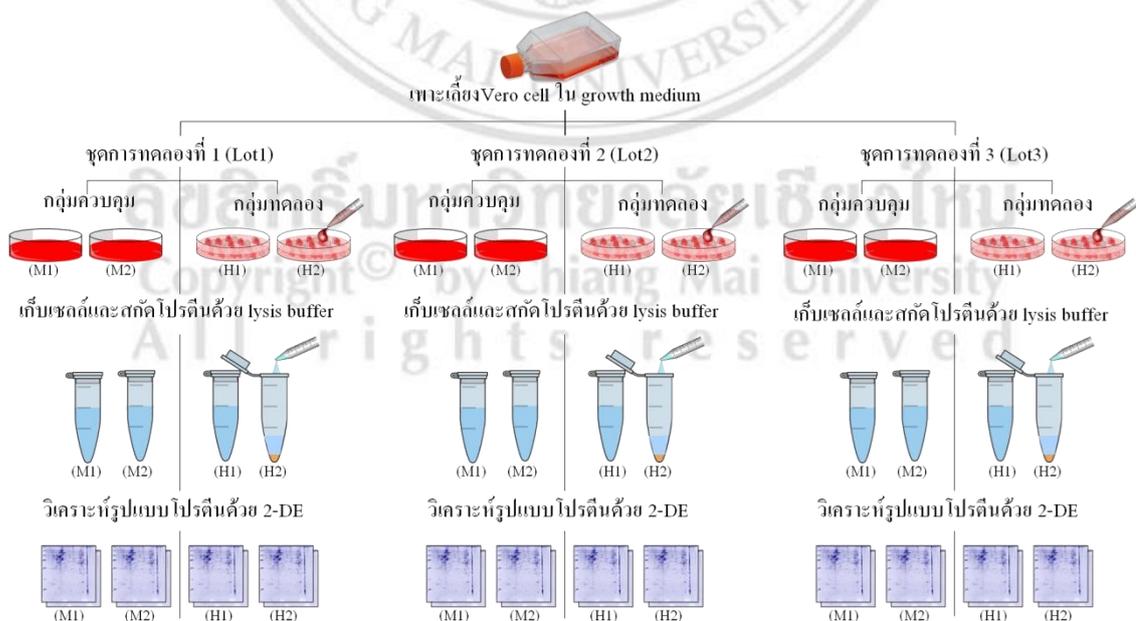
ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกัน โดยลักษณะของพลาทที่สมบูรณ์จะมีลักษณะเกิดเป็นวงกลมที่มีขอบชัดเจน ซึ่งแสดงถึงเซลล์ที่ถูกไวรัสทำลาย

### 2.6.3 การเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ

ทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยเพาะเลี้ยง Vero cell ด้วย growth medium ที่เตรียมจาก ซีรัม ทั้ง 3 ชนิด บนขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm<sup>2</sup> เติมไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 บนเซลล์เข้าบ้าน Vero cell ในหน่วย MOI เท่ากับ 5 (ภาคผนวก ค) หลังบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จึงเก็บตัวอย่างเซลล์มาสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.5 จากนั้นจึงนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน โดยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ต่อไป

### 2.7 การสกัดและเตรียมโปรตีนจากเซลล์เข้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม

เมื่อได้ชนิดซีรัมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง Vero cell ที่ติดไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 รวมไปถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนแล้ว ต่อมาจึงทำการศึกษาโปรตีนใน Vero cell ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม จึงทำการเตรียมโปรตีนโดยแบ่งกลุ่มเพาะเลี้ยง Vero cell เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (กลุ่มทดลอง) ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แผนภาพแสดงการแบ่งกลุ่มการทดลองเพื่อศึกษารูปแบบโปรตีนใน Vero cell ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม

เมื่อนำ Vero cell ทั้ง 2 กลุ่มทดลองมาเพาะเลี้ยงบนขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm<sup>2</sup> ในสภาวะการทดลองเดียวกัน เมื่อเจริญเต็มผิวภาชนะให้เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วเติม maintenance medium ปริมาตร 3 ml ลงไปแทนที่ จากนั้นเติมไวรัสก่อโรคริบชนิดที่ 2 จาก stock ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงของกลุ่มทดลองที่ติดเชื้อไวรัส ในหน่วย MOI เท่ากับ 5 สำหรับกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อให้เติมน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อในปริมาณเท่ากับปริมาณของไวรัสที่คำนวณได้ จากนั้นนำเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน rocking platform เมื่อครบเวลาให้เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเติม maintenance medium ลงไปใหม่จนครบปริมาตร 8 ml บ่มต่ออีก 6 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จึงทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปสกัดโปรตีน (Antrobus *et al.*, 2009) จากการทดลองจะทำซ้ำทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลองทำทั้งหมด 2 ซ้ำ

### 2.7.1 การเก็บเซลล์

เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และล้างเซลล์ด้วย 1X PBS ที่เย็นจัด 1 ครั้ง ต่อมาเติม 1X PBS ปริมาตร 10 ml ลงไป ขูดเซลล์ออกจากผิวของภาชนะด้วย cell scraper แล้วดูดเก็บสารละลายเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนเซลล์ (cell pellet) ด้วย 1X PBS ปริมาตร 1 ml ดูดสารละลายเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งไป เก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อใช้ในการสกัดโปรตีนต่อไป

### 2.7.2 การสกัดโปรตีน

เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดโปรตีนปริมาตร 500-1000 µl ลงในตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมสารละลาย 100X cocktail protease inhibitor และ 0.057 M PMSF จาก stock ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X และ 0.57 mM ตามลำดับ บ่มทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15-20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกกรดนิวคลีอิกและเศษเซลล์บางส่วนที่ไม่ละลายออกไป เปิดสารละลายส่วนบนที่มีโปรตีนอยู่ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนต่อไป

## 2.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

วิธี Bradford เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายร่วมกับเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) โดยปริมาณโปรตีนขึ้นอยู่กับจำนวนและองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ทำปฏิกิริยากับ Coomassie dye-based ในการทดลองนี้ทำได้โดยเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 ml แล้วเปิด

สารละลายตัวอย่างโปรตีน น้ำกลั่น และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ดังตารางที่ 2.1 จากนั้นเติมสารละลาย Bradford reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 860  $\mu$ l ลงไป และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ( $A_{595}$ ) โดยใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ในการสร้างกราฟมาตรฐาน จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐาน BSA (ภาคผนวก ง) จากความสัมพันธ์ระหว่าง  $A_{595}$  และปริมาณโปรตีน เพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีนในสารละลายตัวอย่างโปรตีน (Bradford, 1976)

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

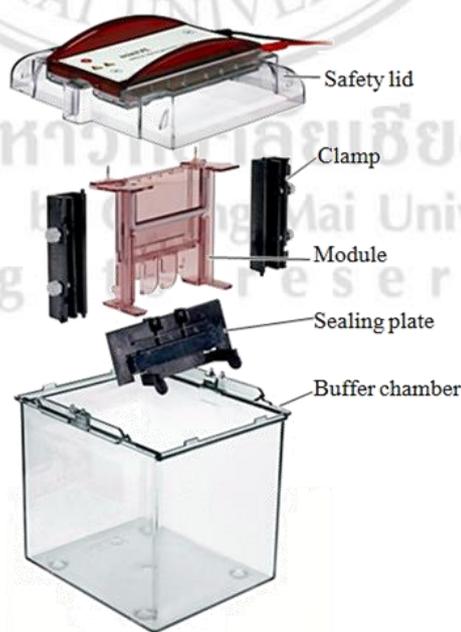
สารเคมี ( $\mu$ l)	หลอดที่							
	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (1 mg/ml)	0	2	5	10	15	20	-	-
สารละลายตัวอย่างโปรตีน	-	-	-	-	-	-	4	4
น้ำกลั่น	120	118	115	110	105	100	116	16
0.15 M NaCl	20	20	20	20	20	20	20	20
Bradford reagent	860	860	860	860	860	860	860	860

## 2.9 การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส หรือ SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยอาศัยหลักการแยกโปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติโดยมีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต หรือ SDS เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นดิเทอร์เจนที่มีประจุลบ โดยสายของโปรตีนทุกสายจะมีประจุลบจึงทำให้โปรตีนเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกในการแยกด้วยสนามไฟฟ้า โดยอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล สามารถตรวจสอบการแยกโปรตีนที่ปรากฏเป็นแถบโปรตีนเมื่อย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละสายโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน นอกจากนั้นเทคนิค SDS-PAGE ยังใช้ตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีน และความเหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดโปรตีนทั้งหมดออกจากเซลล์ เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมด (total protein expression) รวมไปถึงใช้ตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (Amersham Biosciences, 1998) โดยมีขั้นตอนดังนี้

### 2.9.1 การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์สำหรับทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบอุปกรณ์เครื่อง miniVE ดังแสดงในรูปที่ 2.9 สำหรับเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ ขนาด  $10 \times 10.5 \text{ cm}^2$  ความหนา 1 mm โดยมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากประกบกระจกเว้า และกระจกตรงเข้าด้วยกัน โดยมีค้ำสปะเซอร์ (spacer) คั่นกลาง วางคู่กระจกลงใน electrophoresis module โดยให้กระจกเว้าอยู่ด้านใน จัดขอบกระจกทั้งสองให้เรียบเท่ากันก่อนประกบเข้ากับแคลมป์ (clamp) ทั้งสองด้าน พร้อมหมุนสลักเกลียวบนแคลมป์ จนกระทั่งตัวแคลมป์ทั้งคู่ติดแน่นกับกระจกพอดี จากนั้นยก sealing plate ด้านล่างขึ้นเพื่อปิดด้านล่างของกระจก จะทำให้เกิดเป็นช่องว่างระหว่างกระจกสำหรับใช้เตรียมเจล แล้วเปิดสารละลาย 12.5% (w/v) acrylamide ปริมาตร 6 ml ที่เตรียมไว้ใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองโดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ และปิดผิวหน้าเจลทันทีด้วย 70% (v/v) ethanol เพื่อให้ผิวเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที เมื่อเจลแข็งตัวให้เท ethanol ที่ปิดผิวหน้าเจลทิ้งไปพร้อมซับผิวหน้าเจลให้แห้งด้วยกระดาษกรอง ไล่หวีเสียบ (comb) แทรกลงเหนือผิวเจลที่แข็งตัว แล้วเปิดสารละลาย 5% (w/v) acrylamide ลงไปในช่องว่างที่เหลือ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที จึงดึงหวีเสียบออกจากเจลที่แข็งตัว ซึ่งจะทำให้เกิดช่องลักษณะคล้ายซี่ฟันสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีนบนเจล (sample well) จากนั้นล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น แล้วปลดล็อก sealing plate จาก electrophoresis module ก่อนนำมาวางประกอบใน buffer chamber และเติมสารละลาย 1X SDS electrophoresis (ภาคผนวก ข) ในช่องว่างของ module (ให้ท่วมขอบบนของกระจกด้านใน) และใน chamber โดยให้ปริมาตรของบัฟเฟอร์อยู่เหนือขีดบอกระดับต่ำสุด (Min) จึงพร้อมสำหรับการแยกโปรตีน



รูปที่ 2.9 องค์ประกอบของเครื่อง miniVE vertical electrophoresis (ที่มา: ดัดแปลงจาก Hoefer, Inc., 2012)

## 2.9.2 การแยกโปรตีนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีน 10-15  $\mu\text{g}$  ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 ml ละลายด้วย 3X sample (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 3:1 ปรับปริมาตรเป็น 20  $\mu\text{l}$  ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C บนเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (dry bath incubator) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสทั้งหมดใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่างที่มีสารละลาย 1X SDS electrophoresis ท่วมอยู่ โดยเว้นช่องใส่ตัวอย่างไว้ 1 ช่องสำหรับใส่ low molecular weight (LMW) protein marker ปริมาตร 1.5  $\mu\text{l}$  สำหรับช่องใส่ตัวอย่างที่ว่างอยู่ให้ใส่สารละลาย 3X sample ปริมาตร 20  $\mu\text{l}$  ลงไปให้ครบทุกช่อง จากนั้นตรวจสอบขั้วกระแสไฟของ module ว่าแห้งสนิทก่อนปิดฝา (safety lid) ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply) และตั้งโปรแกรมทำอิเล็กโทรโฟรีซิสดังต่อไปนี้

**Step 1:** Current 10 mA/gel 0:15 Hr

**Step 2:** Current 20 mA/gel 1:30 Hr

**Max** 600 V, 100 W



**รูปที่ 2.10** หน้าจอแสดงการตั้งค่าจ่ายกระแสไฟเข้าระบบอิเล็กโทรโฟรีซิสของเครื่องจ่ายกระแสไฟ

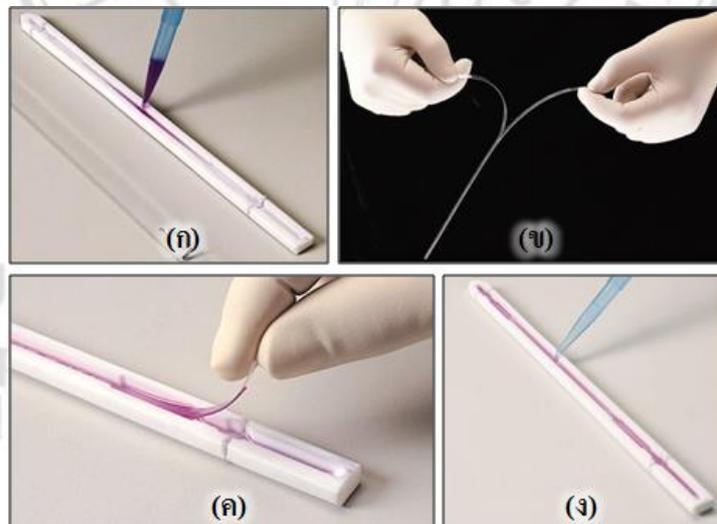
กดปุ่ม run เพื่อเริ่มการจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยระหว่างการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ให้สังเกตแถบสีของ tracking dye ที่วิ่งผ่านเจลจากขั้วลบ (cathode) สู่ขั้วบวก (anode) เมื่อแถบสีของ tracking dye เคลื่อนที่ห่างจากขอบล่างของเจล ประมาณ 0.5 cm จึงกดปุ่ม Stop บนเครื่องจ่ายกระแสไฟเพื่อหยุดการให้กระแสไฟ จากนั้นนำเจลออกจากแผ่นกระจกของเครื่อง miniVE แฉลงในสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250 ภายในภาชนะที่เตรียมไว้ วางบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า ที่ตั้งความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเนื้อเจลกลายเป็นสีน้ำเงินเข้มทึบทั้งเจล แล้วล้างสีส่วนเกินออกจากเนื้อเจลด้วยสารละลายชะสีย้อม (ภาคผนวก ข) ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยแช่ทิ้งไว้ครั้งละประมาณ 3 ชั่วโมง (ในกรณีที่มีโปรตีนอยู่จะเห็นเป็นแถบโปรตีนที่ติดสีบนเนื้อเจลอย่างเด่นชัด และบริเวณไม่มีโปรตีน สีจะถูกชะล้างออกไปจนกลายเป็นพื้นเจลใส) แล้วจึงบันทึกภาพเจลผ่านเครื่อง ImageScanner

## 2.10 การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ

เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรอมนชนิดที่ 2 ด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ หรือ 2-DE ซึ่งเป็นการรวมเทคนิคระหว่างไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่งและโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสเข้าด้วยกัน โดยมีติแรกโปรตีนจะถูกแยกโดยอาศัยความแตกต่างของค่าจุดไอโซอิเล็กทริก หรือ pI ในตัวกลาง pH gradient gel หลังจากนั้นจึงแยกโปรตีนอีกครั้งในมิติที่สองด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟริซิส ซึ่งอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล (Amersham Biosciences, 2000; Amersham Biosciences, 2003; Görg, 2004) โดยมีขั้นตอนดังนี้

### 2.10.1 การแยกโปรตีนมิติที่ 1 ด้วยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง

เตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนสำหรับทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง ปริมาตร 250  $\mu$ l ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างโปรตีน 200  $\mu$ g 20 mM DTT 0.5% (v/v) IPG buffer ในสารละลาย rehydration (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 วินาที ปิเปิดสารละลายทั้งหมดลงไป IPG strip holder ขนาด 13 cm จากขวับวกไปยังซ้าย (รูปที่ 2.11) โดยไม่ให้มีฟองอากาศ



**รูปที่ 2.11** ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง ได้แก่ (ก) การปิเปิดตัวอย่างโปรตีนในสารละลาย rehydration ลงใน IPG strip holder (ข) ลอกฟิล์มพลาสติกจาก IPG strip (ค) แขน้ IPG strip ในสารละลาย rehydration โดยคว่ำหน้าเจลวางลงใน IPG strip holder (ง) เติม Drystrip cover fluid ตามความยาวของ IPG strip (Görg, 2004)

ต่อมาเตรียม IPG strip pH 3-10 NL ขนาด 13 cm โดยลอกฟิล์มพลาสติกออกจากเนื้อเจล จากนั้นใช้ฟอร์เซป (forcep) หรือนิ้วมือจับปลาย strip ด้านขั้วลบ แล้วคว่ำหน้าเจลวางลงใน IPG strip holder ตามตำแหน่งขั้วไฟฟ้า โดยให้ปลาย strip ขั้วบวกสัมผัสกับสารละลายก่อน แรงดึงดูดผิวของน้ำในสารละลายจะช่วยให้วาง strip ไปทางขั้วลบได้ง่ายขึ้น และไม่เกิดฟองอากาศใต้ strip ในกรณีที่มีฟองอากาศอยู่ให้ใช้ฟอร์เซปค่อยๆ กดไล่ฟองอากาศออกไป จากนั้นปิดผิวหน้า strip ด้วย Drystrip cover fluid ปริมาตร 900  $\mu$ l เพื่อป้องกันการระเหยและตกผลึกของยูเรียระหว่างการทดลอง แล้วปิดฝาพลาสติกลงบน IPG strip holder นำไปวางบนเครื่อง Ettan IPGphor II (รูปที่ 2.12) ตรวจสอบตำแหน่งอิเล็กโทรดขั้วบวกและขั้วลบ ของ IPG strip holder ให้อยู่ตรงกับแผ่นทองแดงขั้วบวกและขั้วลบที่ระบุไว้ ก่อนวาง lid adaptor ลงบน IPG strip holder พร้อมปิดฝาเครื่อง แล้วตั้งโปรแกรมระบบอิเล็กทรอนิกส์ โพรโทคอล ดังนี้

Prot#NO.	13 cm pH 3-10 NL		
Rehydration	12:00 Hr @ 20°C		
IEF @ 20°C	50 $\mu$ A/strip		
	2 strip 5 steps		
S1 Step and hold	120 V	240	Vhr
S2 Step and hold	500 V	500	Vhr
S3 Gradient	1,000 V	800	Vhr
S4 Gradient	8,000 V	11,300	Vhr
S5 Step and hold	5,000 V	4,400	Vhr
Total			17,240 Vhr



รูปที่ 2.12 การวาง IPG strip holder บนพื้นที่อิเล็กโทรดของเครื่อง Ettan IPGphor II

เริ่มทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งโดยกดปุ่ม Start หน้าจอเครื่อง IPGphor II จะปรากฏข้อความแสดงการเข้าโหมด rehydration ของสารละลายใน IPG strip holder เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โปรตีนในสารละลาย rehydration จะค่อยๆ ซึมเข้าสู่เนื้อเจลของ IPG strip (rehydrate) ภายใต้ความต่างศักย์ต่ำที่ 50 V ที่อุณหภูมิ 20°C หลังครบเวลาเครื่องจะเปลี่ยนเข้าสู่โหมด focusing โดยดำเนินผ่านขั้นตอนการให้ความต่างศักย์ต่างๆ ที่ตั้งค่าบนเครื่อง ภายใต้สภาวะ pH gradient และอิทธิพลของสนามแม่เหล็กไฟฟ้า โปรตีนภายในเจลจะค่อยๆ เคลื่อนที่และสูญเสียประจุระหว่างทางจนกว่าประจุสุทธิจะมีค่าเท่ากับศูนย์ หรือตามค่า pI ของมัน ซึ่งสามารถสังเกตเห็นการเคลื่อนที่นี้ได้จากแถบสี bromophenol blue (tracking dye) ที่เคลื่อนที่เข้าหาขั้วอิเล็กโทรด เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง หน้าจอเครื่อง IPGphor II จะปรากฏข้อความดังนี้

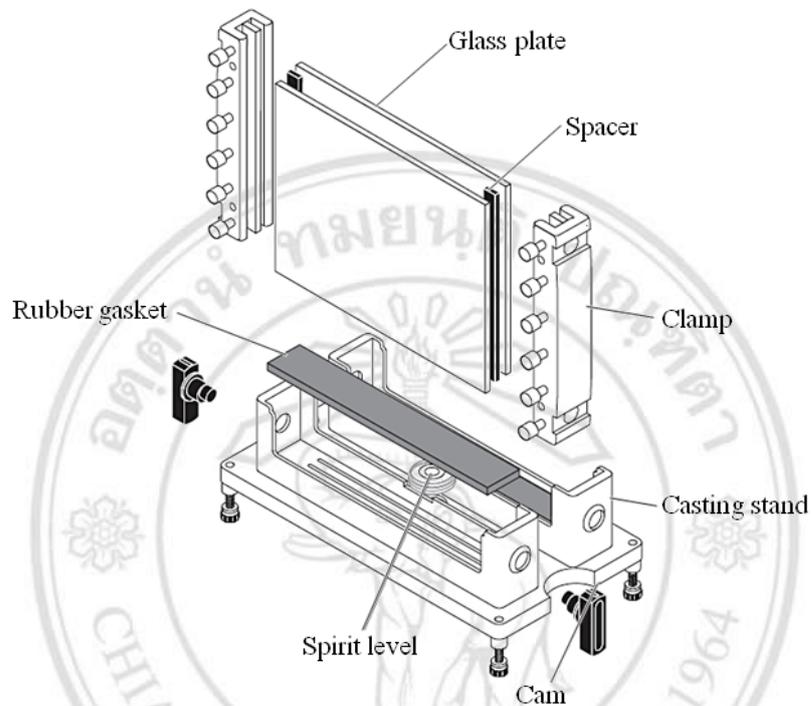
Run ended at			
8,000 V	17243 VHrs	Total	
28 $\mu$ A	5:33 Hrs	Total	
Press STOP to reset			

ต่อมากดปุ่ม Stop เปิดฝาเครื่องเพื่อนำ strip holder ออกจากเครื่อง ใช้ฟอ์เซปจับปลาย IPG strip ออกจาก strip holder แล้วนำไปล้าง Drystrip cover fluid ออกด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นจึงนำไป equilibrate IPG strip หรือเลือกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ในหลอดทดลองที่ปิดสนิท จนกว่าจะทำการทดลอง ซึ่งในขั้นตอนการ equilibrate IPG strip ทำได้โดยเตรียมหลอดทดลองขนาด 15 ml จำนวน 2 หลอด หลอดที่ 1 บรรจุ DTT 0.06 g หลอดที่ 2 บรรจุ IAA 0.075 g แล้วเติมสารละลาย SDS equilibrium (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 ml ลงไปในแต่ละหลอดทดลอง เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่อง vortex mixer จะได้ความเข้มข้นภายในหลอดทดลองเป็น 2% (w/v) DTT และ 2.5% (w/v) IAA ตามลำดับ นำ IPG strip มาบ่มในหลอดที่ 1 โดยให้หันด้านพลาสติกแนบกับข้างหลอดด้านใน แล้ววางบนเครื่อง rocking platform เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ย้าย strip มาใส่ในหลอดที่ 2 และบ่มต่ออีก 15 นาที จากนั้นจึงนำ strip มาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเพื่อทำการแยกโปรตีนในมิติที่ 2 ต่อไป

## 2.10.2 การแยกโปรตีนมิติที่ 2 ด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟริซิส

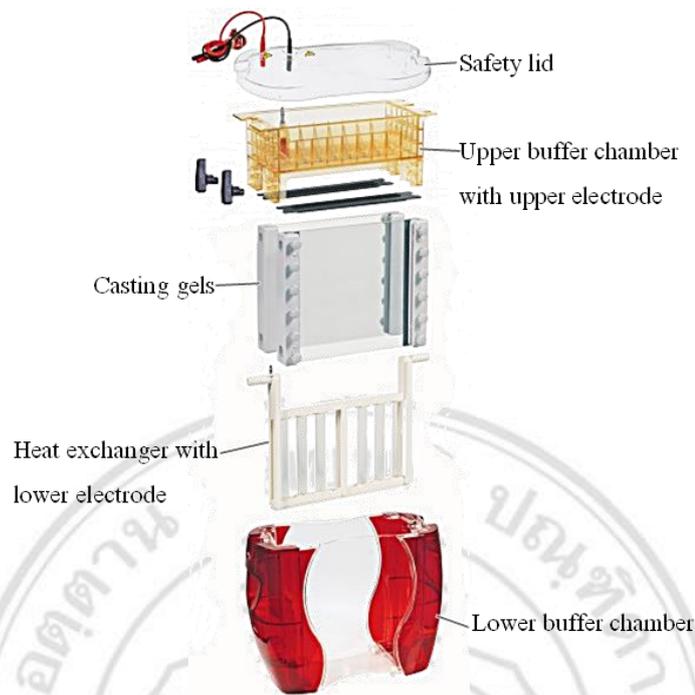
ติดตั้งอุปกรณ์หล่อเจลของเครื่อง SE-600 Ruby (รูปที่ 2.13) สำหรับเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ขนาด 16 x 18 cm<sup>2</sup> ความหนา 1.5 mm โดยเริ่มจากประกบแผ่นกระจกเข้าด้วยกันซึ่งมีคูสเปเซอร์กั้นกลาง ตั้งกระจกขึ้นพร้อมจัดขอบกระจกทั้งสองให้เท่ากัน ก่อนยึดเข้ากับแคลมป์ทั้งสองด้านและหมุนสลักเกลียวจนกระทั่งแคลมป์ทั้งคู่ติดแน่นกับกระจกพอดี วางแคลมป์ที่ประกอบเรียบร้อยแล้วบนแผ่นยาง

(rubber gasket) ของ casting stand ใส่เกลียวล็อก (cam) เข้าช่องในแต่ละข้างของ casting stand แล้วหมุนเกลียวขึ้นประมาณ 90 องศา เพื่อเพิ่มแรงกดกระจกที่แผ่นยางทำให้ด้านล่างของกระจกปิดสนิทเกิดเป็นช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกสำหรับใช้เตรียมเจล



รูปที่ 2.13 การติดตั้งอุปกรณ์หล่อเจลของเครื่อง SE-600 Ruby (Amersham Biosciences, 2000)

จากนั้นเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ โดยปีเปตสารละลาย 12.5% (w/v) acrylamide ใต้ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองจนระดับของสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบกระจกด้านบนประมาณ 5 mm ปิดผิวหน้าเจลทันทีด้วย 70% (v/v) ethanol เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาทีจนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วเท 70% (v/v) ethanol ที่พร้อมซับผิวเจลให้แห้งด้วยกระดาษกรอง ต่อมาใช้ฟอรัเซปจับปลาย IPG strip ที่ได้จากขั้นตอน 2.10.1 วางชิดขนานกับบนผิวเจล โดยให้หัวของ IPG strip ชิดขอบด้านขวามือเว้นช่องว่างด้านซ้ายสำหรับใส่ LMW protein marker โดยปีเปต LMW protein marker ปริมาตร 3  $\mu$ l ลงบนกระดาษกรอง (ขนาด 3x3 mm<sup>2</sup>) หลังทิ้งไว้จนแห้ง จึงวางกระดาษกรองลงที่ช่องว่างข้างต้น จากนั้นให้ปิดผิวหน้า IPG strip ด้วยสารละลาย 0.5% (w/v) agarose (ภาคผนวก ข) และตั้งทิ้งไว้จนชั้น agarose แข็งตัว แล้วจึงทำการประกอบส่วน casting gel เข้ากับอุปกรณ์ SE-600 Ruby vertical electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 2.14 เพื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิส



รูปที่ 2.14 การประกอบเครื่อง SE-600 Ruby vertical electrophoresis (Amersham Biosciences, 2000)

การติดตั้งเครื่อง SE-600 Ruby เริ่มต้นจากการเตรียม upper buffer chamber ชั้นแรกให้ปลด ล็อค casting gel ออกจาก casting stand โดยคลายเกลียวล็อคทั้งหมดออก แล้วนำ upper buffer chamber สวมลงบน casting gel ล็อคอุปกรณ์เข้าด้วยกัน โดยใส่เกลียวล็อคเข้าในแต่ละช่องของ upper chamber และ หมุนเกลียวลงในแนวตั้งที่ 180 องศา ต่อมาเตรียม lower buffer chamber โดยวาง magnetic bar ลงใน lower chamber ที่บรรจุสารละลาย 1X SDS electrophoresis ปริมาตร 4 ลิตร นำ lower chamber วางบน magnetic stirrer พร้อมกับติดตั้ง heat exchanger ลงเหนือ chamber ตั้งอุณหภูมิบนเครื่อง thermostatic circulator ให้ ความเย็นกับบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 14.5 °C ต่อจากนั้นจึงนำส่วนของ upper buffer chamber ประกอบเข้ากับ lower buffer chamber แล้วเติมสารละลาย 1X SDS electrophoresis ปริมาตร 600 ml ใส่ใน upper chamber สุดท้ายจึงปิดฝาเครื่อง และต่อขั้วไฟฟ้าบนฝาเครื่องเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟพร้อมตั้งค่าโปรแกรมทำ อิเล็กโทรโฟรีซิสดังต่อไปนี้

<p><b>Step 1:</b> Current 15 mA/gel 0:15 Hr</p> <p><b>Step 2:</b> Current 40 mA/gel 2:10 Hr</p> <p>Max 600 V 100 W</p>
--

เริ่มการจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยกดปุ่ม Run ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสให้สังเกตการ เคลื่อนที่ของ tracking dye เมื่อ tracking dye เคลื่อนที่ห่างจากขอบล่างของเจล ประมาณ 0.5 cm จึงหยุด การจ่ายกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำเจลออกจากแผ่นกระจกของเครื่อง SE-600 Ruby แच्छงในสารละลาย

fixation (ภาคผนวก ข) ในภาชนะที่เตรียมไว้ แล้ววางบ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาให้เทสารละลาย fixation ออกจากภาชนะ เดิมสารละลายสีเขียว Coomassie Brilliant Blue G-250 ลงไปแทนที่พอท่วมเจล แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าอีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังบ่มเสร็จให้นำเจลมาล้างสีออกด้วยน้ำปราศจากไอออน โดยแช่ทิ้งไว้ประมาณ 18-20 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำ 2-3 ครั้ง) หรือจนกระทั่งจุดโปรตีนปรากฏชัดเจน และพื้นหลังค่อนข้างใสจึงนำเจลไปสแกนบันทึกภาพเจลผ่านเครื่อง ImageScanner เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนต่อไป

## 2.11 การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนด้วย ImageMaster™ 2D Platinum software version 5.0

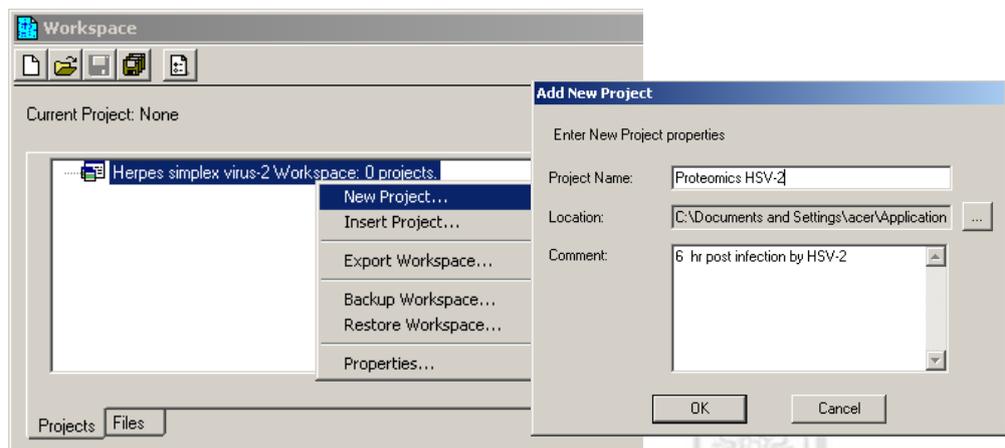
การตรวจจับจุดโปรตีนและการจับคู่โปรตีนบนภาพเจล เป็นขั้นตอนที่สำคัญก่อนการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน เนื่องจากการตรวจจับที่ไม่มีประสิทธิภาพ และการจับคู่โปรตีนที่ผิดพลาดส่งผลโดยตรงกับผลการวิเคราะห์ ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ไม่ถูกต้อง และไม่น่าเชื่อถือ ในการทดลองได้เลือกใช้โปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum software version 5.0 (Swiss institute of bioinformatics, 2003; อภิญา, 2551) ในการวิเคราะห์ ซึ่งมีขั้นตอนการใช้โปรแกรมดังนี้

### ก) การสร้างแบบแผนการวิเคราะห์ (Create workspace)

เพื่อวิเคราะห์หาจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน (มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลง) ระหว่างกลุ่มการทดลอง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อไวรัส (mock) และกลุ่มทดลองที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (HSV-2 infected) จึงนำภาพเจลจากทั้ง 2 กลุ่มการทดลองมาสร้างแบบแผนการวิเคราะห์ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

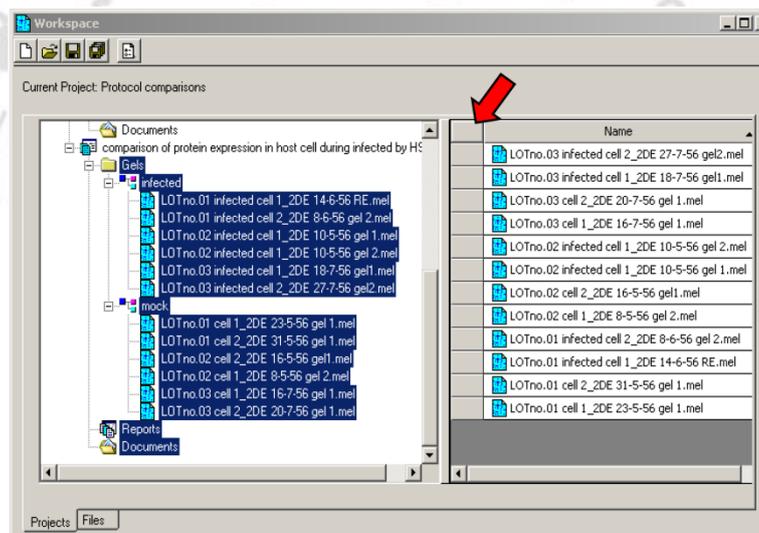
- 1) เข้าโปรแกรม ImageMaster เพื่อเปิดหน้าต่างของโปรแกรม
- 2) เปิดภาพเจลทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยใช้เมนู **File** คำสั่ง **Import** ตามด้วย **Images** แล้วจะปรากฏหน้าต่างของ **Import Image** เลือกค่า **Reduction factor** เท่ากับ 1 และ **File format** เป็น **TIFF** แล้วกด **OK** แล้วเลือกภาพเจลที่ต้องการการวิเคราะห์
- 3) สร้างแบบแผนการวิเคราะห์ (workspace) โดยใช้คำสั่ง ไอคอน 
- 4) สร้างชุดการทดลอง (project) โดยคลิกขวาที่ **Image Master Workspace** บนหน้าต่างของ **Workspace** แล้วเลือก **New Project** จากนั้นตั้งชื่อชุดการทดลอง ในหน้าต่างที่กำหนดเพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง ตามรูปที่ 2.15

- 5) สร้างกลุ่มทดลอง (class) ในชุดการทดลอง โดยกดคลิกขวาที่ชื่อ **project** แล้วเลือก **Add New class** จากนั้นตั้งชื่อของ class ลงในหน้าต่างของ **Create Class** ที่ปรากฏขึ้น แล้วเลือกภาพเจลในรูปของไฟล์ .mel ใส่งลงในแต่ละกลุ่มทดลอง โดยคลิกขวาที่ชื่อ **class** เลือก **Add** ตามด้วย **Gel From Disk** กำหนดให้ชุดการทดลองที่สร้างขึ้นใช้สำหรับการวิเคราะห์ โดยกดคลิกขวาที่ชื่อ **project** แล้วเลือก **Set As Active Project**



รูปที่ 2.15 ขั้นตอนการสร้างชุดการทดลอง

- 6) เลือกภาพเจลทั้งหมด โดยคลิกซ้ายที่มุมซ้ายบนของตารางภาพเจลตามลูกศรในรูปที่ 2.16 จากนั้นคลิกขวาเลือก **Open** เพื่อเปิดภาพเจลในชุดการทดลองที่ต้องการวิเคราะห์
- 7) ใช้คำสั่งไอคอน  เพื่อจัดเก็บแบบแผนการวิเคราะห์ ที่สร้างขึ้น



รูปที่ 2.16 แบบแผนการวิเคราะห์ที่สร้างจากภาพเจล

ข) การปรับความแตกต่างระหว่างจุดโปรตีนและพื้นหลัง (Adjust contrast)

การปรับเปลี่ยนหรือเคลื่อนย้ายภาพเจลสามารถทำได้ทีละภาพ หรือพร้อมกัน โดยใช้คำสั่งไอคอนบนแถบเครื่องมือดังนี้



Hand tool: ใช้สำหรับเลื่อนภาพเจลไปยังตำแหน่งต่างๆ ที่ต้องการ

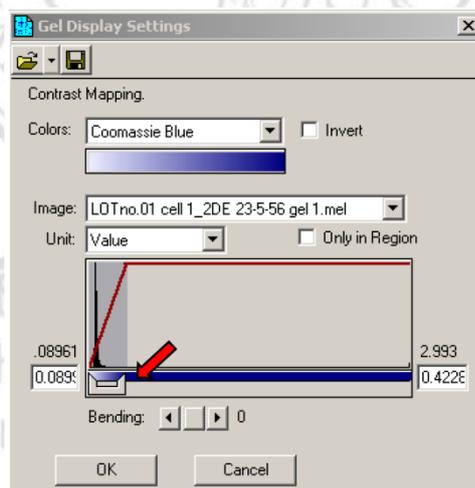


Magnify tool: ใช้สำหรับย่อขยายภาพเจล โดยคลิกซ้ายเพื่อขยายภาพ และคลิกขวาเพื่อย่อภาพ



Region tool: ใช้สำหรับกำหนดพื้นที่ในภาพเจลที่ต้องการทำงาน

การปรับความแตกต่างระหว่างจุดโปรตีนและพื้นหลัง ทำได้โดยใช้เมนู **View** คำสั่ง **Adjust Contrast** แล้วเลือก **Current** จะปรากฏหน้าต่างของ **Gel Display Setting** ดังแสดงในรูปที่ 2.17 สามารถใช้เครื่องมือบน gel display setting ปรับเปลี่ยนค่าต่างๆ เพื่อให้ภาพเจลมีลักษณะที่สะดวกต่อการวิเคราะห์ โดยใช้คำสั่ง Bending หรือลากแถบเครื่องมือตามลูกศรดังแสดงในรูปที่ 2.17 เพื่อปรับความคมชัดของภาพเจล (ลดสีของพื้นหลังพร้อมเพิ่มความเข้มของจุดโปรตีนบนภาพ) จากนั้นกด **OK** สีของภาพเจลจะเปลี่ยนไปตามที่ตั้งค่าไว้ เมื่อได้ภาพเจลตามที่ต้องการแล้วไปที่เมนู **File** คำสั่ง **Save** แล้วเลือก **All Changes** เพื่อจัดเก็บภาพเจลที่ได้ตั้งค่าไว้

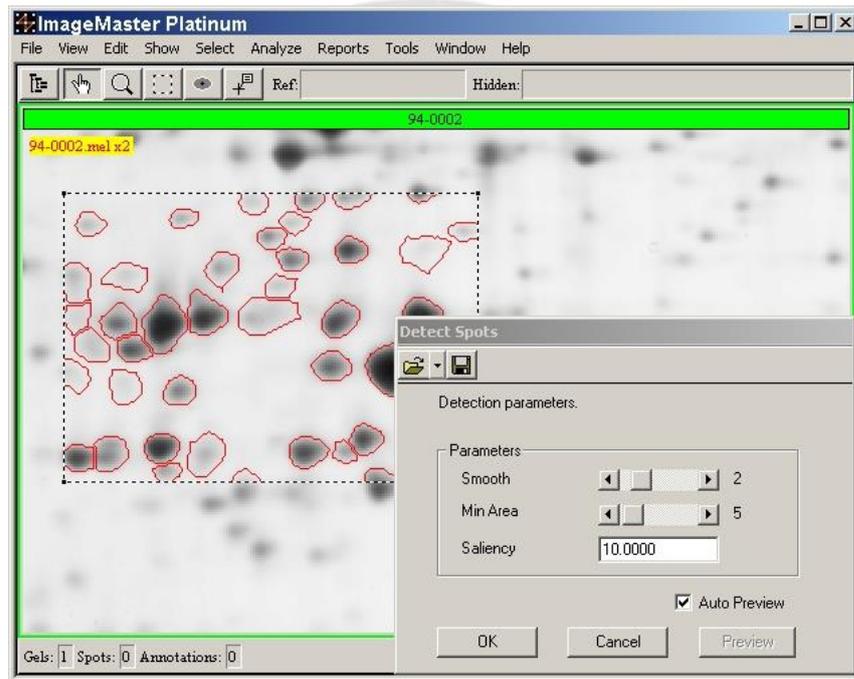


รูปที่ 2.17 หน้าต่างของ Gel Display Setting

ค) การตรวจหาจุดโปรตีนบนภาพเจล (Spot detection)

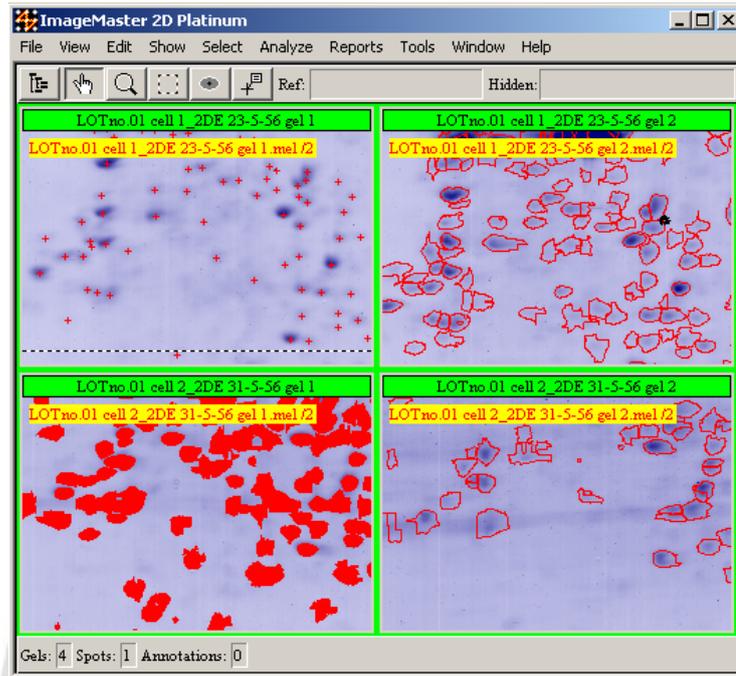
เลือกภาพเจลทั้งหมดที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วไปที่เมนู **Edit** คำสั่ง **Spots** เลือก **Auto-Detect** ตามด้วย **Current** จะปรากฏหน้าต่างของ **Detect Spot** โดยมี detection parameter ให้ตั้งค่าทั้งหมด 3 ค่า (รูปที่ 2.18) ได้แก่

- 1) **Saliency:** เป็นค่าความเข้มต่ำสุดที่ใช้ตรวจจับจุดโปรตีน ยกตัวอย่างเช่น ตั้งค่าไว้ที่ 10 ดังนั้นจุดโปรตีนที่มีความเข้มน้อยกว่า 10 จะไม่ถูกตรวจพบ
- 2) **Min Area:** เป็นค่าที่ช่วยกรองจุดเล็กๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนออกไป เช่น จุดที่เกิดจากฝุ่นละออง หรือหยดน้ำที่มักเกิดขึ้นบนแผ่นเจล
- 3) **Smooth:** เป็นค่าที่ใช้ในการปรับขอบของจุดโปรตีนให้มีความขรุขระตามสภาพจริง หรือให้มีความราบเรียบขึ้น



รูปที่ 2.18 การตั้งค่า Detection parameter เพื่อตรวจจับจุดโปรตีนภายในแผ่นเจล (Swiss institute of bioinformatics, 2003)

ในการทดลองนี้ตั้งค่า Detection parameter ของ Smooth Min area และ Saliency เท่ากับ 3 5 และ 9 ตามลำดับ จุดโปรตีนต่างๆ บนภาพเจลจะถูกตรวจพบตามค่าที่ตั้งไว้ และหากต้องการเปลี่ยนรูปร่างของจุดโปรตีน สามารถใช้เมนู **Show** คำสั่ง **Spots** แล้วเลือก **Shape** ตามด้วยรูปร่างของจุดโปรตีนที่ต้องการ เช่น กากบาท (Crossed) ทำขอบล้อมรอบจุด (Outlined) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.19 เมื่อปรับค่า parameter ต่างๆ จนได้รูปร่างของจุดโปรตีนที่ต้องการจึงใช้เมนู **File** คำสั่ง **Save-> All changes** เพื่อจัดเก็บจุดโปรตีนบนภาพเจลที่ได้ตั้งค่าไว้



รูปที่ 2.19 รูปร่างของจุดโปรตีนในลักษณะต่างๆ

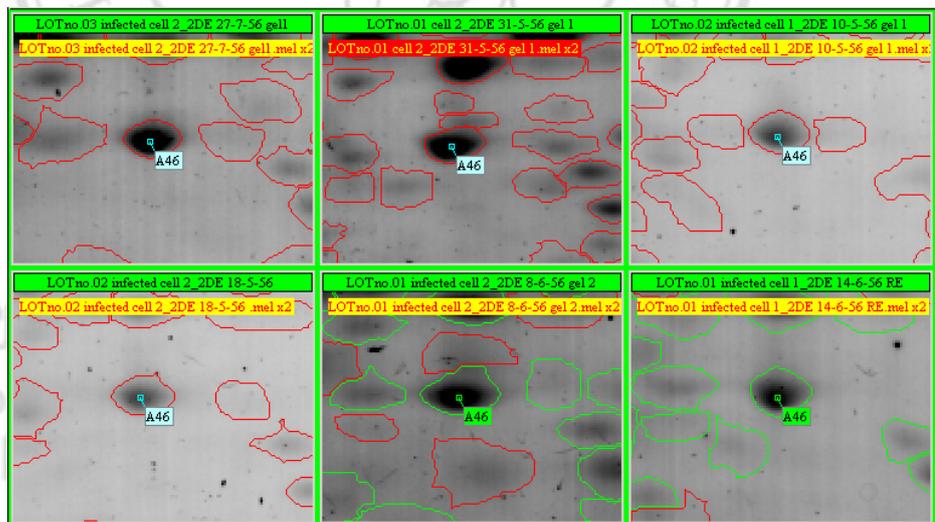
ง) การปรับแก้ไขจุดโปรตีนที่ได้ (Spot editing)

จุดโปรตีนบนภาพเจลสามารถปรับแก้ไขได้โดยใช้คำสั่งไอคอน  แล้วเลือกจุดโปรตีนที่ต้องการแก้ไข จากนั้นคลิกขวาเลือก Spots ตามด้วย Edit และ Edit enabled รูปไอคอนจะเปลี่ยนเป็น  จึงสามารถปรับแก้ไขจุดโปรตีนโดยใช้วิธีการต่างๆ ต่อไปนี้

- 1) **Split:** การตัดแยกจุดโปรตีนออกจากกันเป็น 2 spot ด้วยการคลิกขวา แล้วลากเส้นตัดที่จุดโปรตีน
- 2) **Grow:** การขยายขนาดเส้นขอบของจุดโปรตีน ด้วยการคลิกซ้ายวาดขยายเส้นขอบโปรตีนจากขอบเส้นเดิม
- 3) **Reduce:** การลดขนาดเส้นขอบของจุดโปรตีน ด้วยการคลิกซ้ายวาดตัดเส้นโปรตีนเดิมให้ขนาดเล็กลง
- 4) **Merge:** การรวมจุดโปรตีนตั้งแต่สองจุดเข้าด้วยกัน ด้วยการคลิกซ้ายเลือกจุดที่ 1 แล้ววาดเส้นเชื่อมจากภายในจุดที่ 1 ไปยังภายในจุดที่ 2 เป็นวงรอบทั้ง 2 จุด
- 5) **Delete:** การลบจุดที่ไม่ใช่จุดโปรตีนออกไป ด้วยการคลิกขวาเลือก Spots ตามด้วย Edit และ Delete
- 6) **Add:** การเพิ่มจุดโปรตีนในกรณีที่ไม่พบโปรตีนไม่ตรวจจับ โดย double คลิกบริเวณตำแหน่งเจลที่ต้องการและกำหนดครีสมิของจุดโปรตีน

จ) การจับคู่จุดโปรตีนของแต่ละภาพเจลกับภาพเจลแม่แบบ (Gel matching)

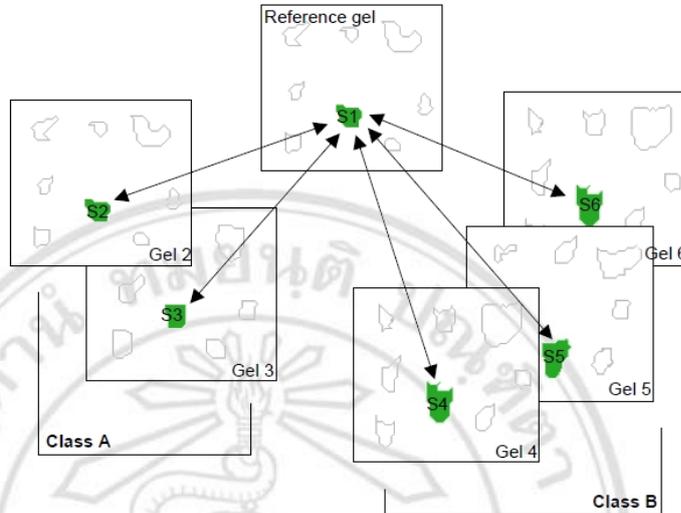
- 1) สร้างตำแหน่ง landmark คือการสร้างจุดสังเกตของโปรตีนที่มีปรากฏเด่นชัดในทุกๆ ภาพเจล เพื่อให้ง่ายต่อการจับคู่จุดโปรตีนนำภาพเจลมาซ้อนกัน ซึ่งทำได้ดังขั้นตอนต่อไปนี้
  - 1.1) ใช้คำสั่งไอคอน  แล้วกด Ctrl พร้อมกับคลิกซ้าย เลือกจุดโปรตีนเดียวกันที่มีอยู่ในทุกภาพเจล โดยควรเลือกเป็นจุดที่มีลักษณะกลม และอยู่ห่างจากจุดอื่นๆ
  - 1.2) คลิกขวาเลือก **Annotations** ตามด้วย **Edit** และ **Add label**
  - 1.3) เลือกชนิดของ Annotation เป็น **Landmark** ในหน้าต่างของ **Add Label** ที่ปรากฏขึ้น
  - 1.4) ตั้งชื่อเป็น A1 แล้วกด **OK** จะได้ตำแหน่ง landmark ตำแหน่งที่ 1 ในทุกๆ ภาพเจล ยกตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 2.20
  - 1.5) สร้างตำแหน่ง landmark เพิ่มประมาณ 15-30 ตำแหน่งโดยเลือกตำแหน่งของ landmark ให้กระจายทั่วภาพเจล



รูปที่ 2.20 การแสดงตำแหน่ง landmark ที่ 46 ในแต่ละภาพเจล

- 2) กำหนดภาพเจลแม่แบบ (reference gel) จากแต่ละกลุ่มทดลอง โดยใช้ภาพเจลที่มีจุดโปรตีนมากที่สุดจากแต่ละกลุ่มภาพ จากนั้นคลิกซ้ายลากเจลแม่แบบลงในส่วนของ reference zone Ref:

- 3) จับคู่จุดโปรตีนบนภาพเจลกับเจลแม่แบบโดยคลิกเลือกภาพเจลที่ต้องการจับคู่แล้วใช้เมนู **Edit** คำสั่ง **Pairs** เลือก **Auto-Match Gels** ภาพเจลทั้งหมดที่เลือกจะถูกจับคู่จุดโปรตีนกับเจลแม่แบบเป็นคู่ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.21

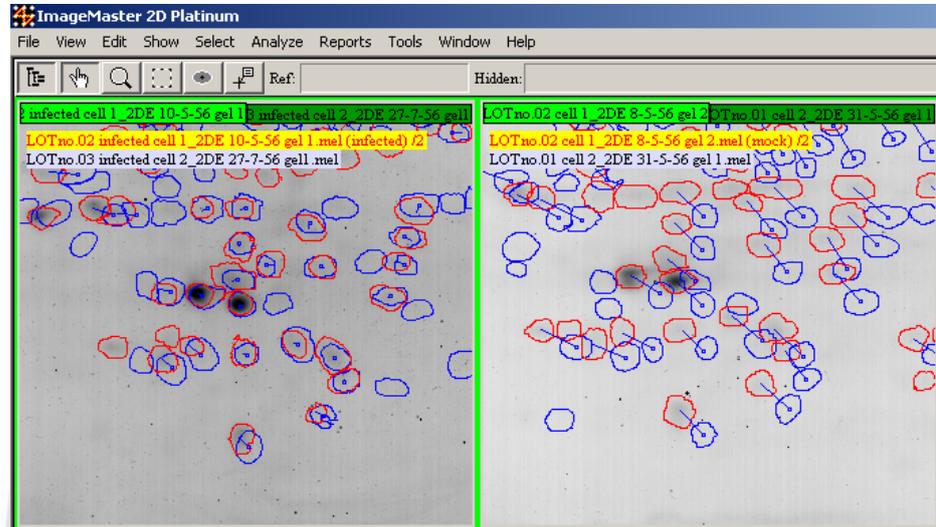


รูปที่ 2.21 การจับคู่จุดโปรตีนของกลุ่มเจล A และ B โดยลูกศรแสดงการจับคู่ของจุดโปรตีน S2 S3 S4 S5 และ S6 กับจุดโปรตีน S1 ในเจลแม่แบบ (Swiss institute of bioinformatics, 2003)

ฉ) ตรวจสอบและแก้ไขจุดโปรตีนที่จับคู่ผิด

- 1) ทำ stacking gel หรือการนำภาพเจลมาซ้อนกันกับเจลแม่แบบ โดยกด **Ctrl** พร้อมคลิกภาพเจลแม่แบบและเจลที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้นใช้เมนู **View** คำสั่ง **Stack** เลือก **Selected gels**
- 2) ใช้เมนู **View** คำสั่ง **Stack** เลือก **Show Pairs** ทำให้สามารถมองเห็นเส้นการจับคู่ (vector) ระหว่างจุดโปรตีนในภาพเจลที่เลือกกับภาพเจลแม่แบบ (รูปที่ 2.22) โดยให้พิจารณาเส้นที่เชื่อมจุดโปรตีนแต่ละคู่ว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกันหรือไม่ หากมีบางเส้นไม่เป็นไปทางเดียวกันกับเส้นอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นจุดโปรตีนที่จับคู่ผิด ควรจะมีการแก้ไขให้ถูกต้อง
- 3) การแก้ไขจุดโปรตีนที่จับคู่ผิดมี 2 ขั้นตอนดังต่อไปนี้
  - 3.1) ลบจุดโปรตีนที่จับคู่ผิด โดยกด **Ctrl** พร้อมคลิกเลือกจุดโปรตีนคู่่นั้น แล้วคลิกขวาไปที่ **Pairs** เลือก **Edit** ตามด้วย **Delete**
  - 3.2) เพิ่มจุดโปรตีนที่ไม่ถูกจับคู่กัน โดยกด **Ctrl** พร้อมคลิกเลือกจุดโปรตีนคู่่นั้น แล้วคลิกขวาไปที่ **Pairs** เลือก **Edit** ตามด้วย **Add**

- 4) ตรวจสอบการจับคู่ของภาพเจลอื่นกับภาพเจลแม่แบบจนครบทุกภาพ และเมื่อแน่ใจว่าแก้ไขจุดโปรตีนทุกคู่ให้จับคู่กันอย่างถูกต้องแล้ว ใช้เมนู **File** คำสั่ง **Save-> All changes** เพื่อจัดเก็บภาพเจลทั้งหมด



รูปที่ 2.22 การซ้อนทับกันของภาพเจล (สีแดง) กับภาพเจลแม่แบบ (สีน้ำเงิน) โดยแสดงเส้นจับคู่ระหว่างจุดโปรตีนจากภาพเจลทั้งสอง

## 2.12 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความแตกต่างของการแสดงออกในตัวอย่างโปรตีน

ใช้โปรแกรม ImageMaster 2D Platinum software version 5.0 เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนบนเจลพอลิอะคริลาไมด์โดยเลือกภาพเจลในชุดการทดลองเดียวกันจากแบบแผนการวิเคราะห์ แล้วใช้เมนู **Select** คำสั่ง **Groups** เลือก **All** เพื่อเลือกกลุ่มของจุดโปรตีนทั้งหมดที่ถูกจับคู่กัน (Armitage and Berry, 1987; Swiss institute of bioinformatics, 2003; อภิญา, 2551) จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1) สร้างรายงานการวิเคราะห์ โดยใช้เมนู **Analyze** คำสั่ง **Classes Report** จะปรากฏหน้าต่าง **Classes Report** แล้วเลือกค่าการรายงานผลเป็นร้อยละปริมาณของจุดโปรตีน หรือ %Vol จากนั้นกด **OK** จะปรากฏหน้าต่างการตั้งค่าทางสถิติของ Central tendency และ Dispersion ให้ตั้งค่าเป็น Mean และ Mean squared deviation เท่ากับ 100% แล้วกด **OK** อีกครั้ง หน้าต่างรายงานการวิเคราะห์ก็จะปรากฏขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2.23

Classes Report

Report on Classes (%Vol).  
The chosen statistics are Mean (100%) and M.S.D.

	Group ID	Max	infected	mock
1	1408	0.580238	0.467024	0.580238
2	1410	0.00572009	0.00572009	0.00332913
3	1416	0.0158580	0	0.0158580
4	1419	0.0291737	0.0142633	0.0291737
5	1420	0.0101452	0	0.0101452
6	1421	0.0100521	0	0.0100521
7	1422	0.0142993	0	0.0142993
8	1424	0.00648748	0	0.00648748
9	1425	0.0259599	0.0259599	0.00616011

รูปที่ 2.23 หน้าต่างรายงานการวิเคราะห์ที่ประกอบด้วย 4 คอลัมน์ ได้แก่ หมายเลขของจุดโปรตีนอ้างอิงจากภาพเจลแม่แบบ (Group ID) ค่าเฉลี่ยของจุดโปรตีนจากทั้ง 2 กลุ่มทดลองซึ่งแสดงในรูปแบบของ %Vol และค่าสูงสุดของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่ม (Max)

2) คัดกรองจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันด้วยการกำหนดอัตราส่วนความแตกต่างของจุดโปรตีนในกลุ่มทดลองและตรวจสอบค่าทางสถิติ (Student t test) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.1) กำหนดอัตราส่วนความแตกต่างของจุดโปรตีนในกลุ่มทดลองโดยเริ่มจากเปลี่ยนค่าการแสดงผลในช่อง displayed value เป็น **Ratio** ดังแสดงในรูปที่ 2.23 เพื่อแสดงผลเป็นอัตราส่วน จากนั้นเลือกใช้คำสั่งไอคอน  ตามด้วย **Refine Selection** เลือกค่า Max และกด **OK** หน้าต่างของ Refine by Value จะปรากฏขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2.24 ให้คลิกเลือกเครื่องหมาย  $\geq$  และกำหนดค่าลงในช่องว่างเท่ากับ 1.2 ซึ่งหมายถึง จุดโปรตีนที่มีความแตกต่างของ %Vol มากกว่าหรือเท่ากับ 1.2 เท่าขึ้นไป เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มการทดลอง จะถูกตรวจพบแสดงเป็นแถบสีเขียว จากนั้นเลือกใช้ไอคอนคำสั่ง  ตามด้วย **Report From Selection** เพื่อเลือกเอาเฉพาะจุดโปรตีนที่ถูกตรวจพบ มาสร้างเป็นรายงานการวิเคราะห์อันใหม่

Refine by Value

Only keep selected the rows for which the 'Max' value verifies :

$\geq$

$\leq$

OK Cancel

รูปที่ 2.24 หน้าต่างของ Refine by Value

2.2) ตรวจสอบค่าทางสถิติด้วย Student t test โดยเลือกจุดโปรตีนจากรายงานการวิเคราะห์ที่ได้ในขั้นตอน 2.1 แล้วไปที่เมนู **Analyze** คำสั่ง **statistical test** เลือกค่าการรายงานผลเป็น % Vol แล้วกด **ok** จะปรากฏหน้าต่างใหม่เกิดขึ้นให้เลือกค่าเป็น two-sample t-test แล้วหน้าต่างรายงานค่า Student t-test ของแต่ละจุดโปรตีนจะปรากฏขึ้น ต่อมาให้คำนวณค่า Student t-value ด้วยโปรแกรม Student t-Value Calculator โดยเข้าไปที่เว็บไซต์ <http://www.danielsoper.com/statcalc3/> จะปรากฏหน้าต่างของโปรแกรมดังแสดงในรูปที่ 2.25

**Student t-Value Calculator**

Tweet +1 Recommend 184

This calculator will tell you the Student t-value for a given probability and (one-tail) and two-tailed probabilities will be returned.

Please supply the necessary parameter values, and then click 'Calculate!'.

Degrees of freedom:

Probability level:

**Calculate!**

t-value (right-tail): **2.13184679**

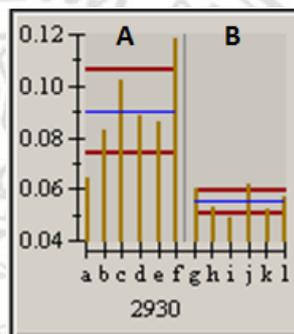
t-value (two-tailed): **+/- 2.77644511**

รูปที่ 2.25 การคำนวณค่า Student t test ด้วย Student t-Value Calculator (Soper, 2015)

โดยมีตัวแปรที่ใช้ในการคำนวณ คือ degree of freedom และ Probability level (P value) ยกตัวอย่างเช่น ในการทดลองมี 2 กลุ่มการทดลอง โดยแต่ละกลุ่มมีตัวอย่างภาพเจลทั้งหมด 3 ซ้ำ ( $N_1$  กับ  $N_2$  เท่ากับ 3) นำจำนวนกลุ่มตัวอย่างมาคำนวณค่า degree of freedom ( $N_1+N_2-2$ ) ได้ค่าเท่ากับ 4 ส่วนค่า P value จะกำหนดไว้คงที่เท่ากับ 0.05 หลังกคคำนวณได้ค่า Student t value เท่ากับ 2.776 ดังนั้นจุดโปรตีนที่มีค่า Student t value มากกว่าหรือเท่ากับ 2.776 จึงถือว่ามีค่า P value น้อยกว่า 0.05 ซึ่งหมายถึงจุดโปรตีนจากทั้งสองกลุ่มการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้นจึงคลิกเลือกจุดโปรตีนที่มีค่า Student t value มากกว่าหรือเท่ากับ 2.776 จากรายงาน แล้วเลือก **Report From Selection** เพื่อสร้างรายงานการวิเคราะห์อันใหม่

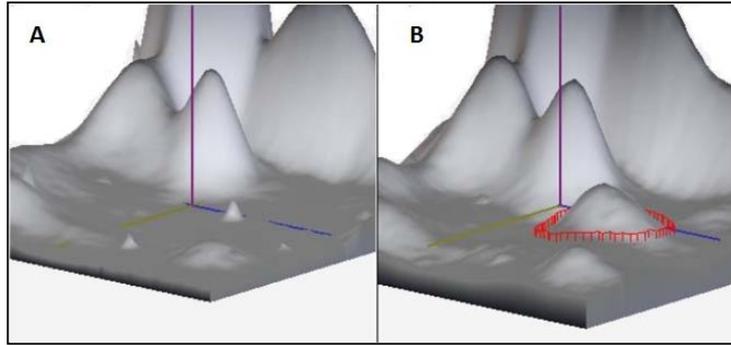
3) ตรวจสอบว่าจุดโปรตีนนั้นมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันจริงหรือไม่โดยใช้ข้อมูลกราฟฮิสโตแกรมและภาพ 3 มิติของจุดโปรตีนควบคู่กัน ซึ่งจุดโปรตีนในแต่ละกลุ่มทดลองควรมี %Vol ที่ใกล้เคียงกันและมีความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มทดลอง จึงจะถือว่าจุดโปรตีนคู่ นั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

3.1) สร้างฮิสโตแกรมจากจุดโปรตีนต่างๆ โดยคลิกเลือกจุดโปรตีนทั้งหมดจากรายงานการวิเคราะห์ แล้วใช้คำสั่งไอคอน  ตามด้วย **Classes histograms** จะปรากฏหน้าต่างฮิสโตแกรมของจุดโปรตีนต่างๆ ดังเช่นตัวอย่างในรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.26 ฮิสโตแกรมของจุดโปรตีน ID 2930 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Vol (แกน X) และประเภทของแผ่นเจลต่างๆ ที่ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง (A และ B) ด้วยเส้นสีเทาตรงกลาง (แกน Y) ส่วนเส้นสีฟ้าแสดงถึงค่าเฉลี่ยของ %Vol (mean value) และเส้นสีแดงแสดงถึงการกระจายตัวของค่า %Vol (dispersion interval) โดยฮิสโตแกรมนี้มีความหมายว่า กลุ่มการทดลอง A มีการแสดงออกของโปรตีน ID 2930 มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลอง B โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

3.2) สร้างภาพ 3 มิติของจุดโปรตีนเพื่อคุณลักษณะและสิ่งแวดล้อมรอบข้างของจุดโปรตีน โดยเลือกจุดโปรตีนที่ต้องการแล้วไปที่เมนู **Reports** เลือก **3D View** จะปรากฏภาพ 3 มิติของจุดโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 2.27

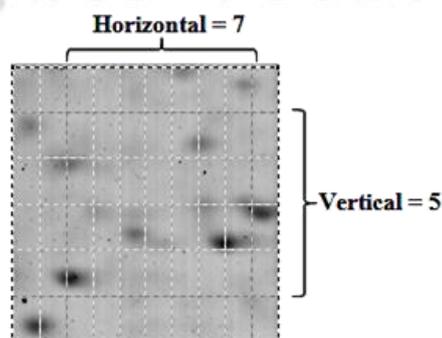


รูปที่ 2.27 ภาพ 3 มิติของจุดตัวอย่างโปรตีน แสดงให้เห็นว่าจุดโปรตีนในกลุ่มทดลอง A มีการแสดงออกมากกว่ากลุ่มทดลอง B

หลังจากพิจารณาจุดโปรตีนทั้งหมดพร้อมเลือกจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างแท้จริง ให้คลิกเลือก **Report From Selection** เพื่อสร้างรายงานใหม่ที่มีเฉพาะจุดโปรตีนที่เลือก จัดเก็บรายงานการวิเคราะห์โดยกดไอคอน  จากนั้นใช้เมนู **Edit** คำสั่ง **Annotations** เลือก **Add label** แล้วสร้าง **Set: Picked** ของจุดโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ เพื่อเป็นเครื่องหมายว่าจุดโปรตีนในภาพเจลนั้นจะถูกตัดไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรีต่อไป

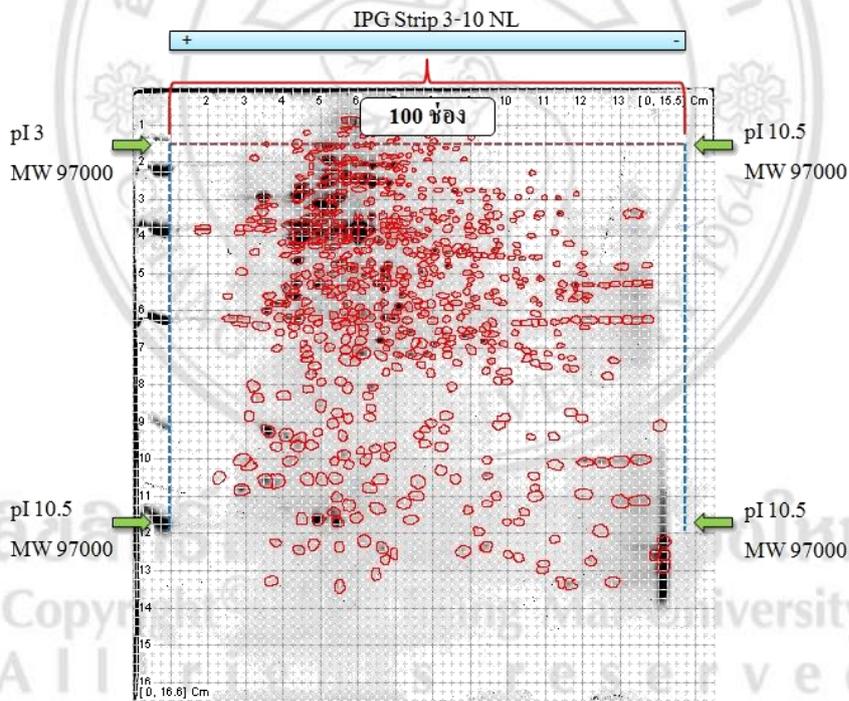
### 2.13 การกำหนดค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของจุดโปรตีนบนภาพเจลแบบ 2 มิติ

หลังจากวิเคราะห์ภาพเจลเพื่อหาจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันแล้ว สามารถหาค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล โดยการประมาณของจุดโปรตีนเหล่านั้นด้วยโปรแกรม ImageMaster เริ่มจากการเลือกภาพเจลที่ต้องการ โดยเปิดจากแบบแผนการวิเคราะห์ที่สร้างขึ้นในขั้นตอน 2.12 แล้วใช้เมนู **View** คำสั่ง **Grid Lines** เลือก **Show** จะปรากฏหน้าต่างของ Grid เลือกตั้งค่าหน่วยของเส้นตาราง (grid units) เป็นเซนติเมตร (cm) และจำนวนช่องย่อย (number subdivisions) ของเส้นแนวนอน (horizontal) และแนวตั้ง (vertical) เป็น 7 และ 5 ช่องตามลำดับ จากนั้นกด OK จะได้ภาพเจลที่มีเส้นแบ่งตารางดังแสดงในรูปที่ 2.28 (Swiss institute of bioinformatics, 2003; อภิญา, 2551)



รูปที่ 2.28 ภาพขยายเจลแสดงเส้นแบ่งแนวนอน (horizontal) และแนวตั้ง (vertical)

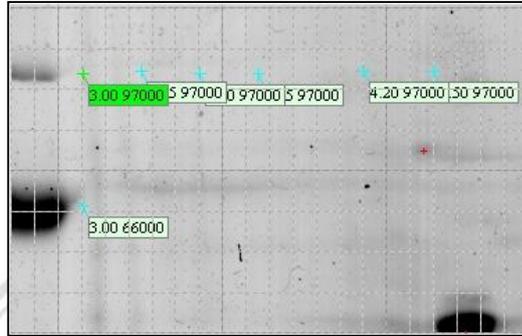
สำหรับเส้นแบ่งตารางข้อย่นั้น การกำหนดจำนวนช่องในแนวตั้งและแนวนอนอาจแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับขนาดของแต่ละภาพเจล แต่ควรกำหนดให้มีจำนวนช่องในแนวตั้งเป็น 100 ช่อง นับจากจุดวาง ขั้วบวกไปยังขั้วลบของ IPG strip (รูปที่ 2.29 แนวเส้นประสีแดง) ส่วนจำนวนช่องในแนวนอน ควรปรับ เส้นแบ่งตารางให้ตรงกับแถบของ protein marker เพื่อสะดวกต่อการอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุล ต่อมา กำหนดตำแหน่งขอบเขตเริ่มและสิ้นสุดของค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลบนภาพเจลทั้ง 4 ด้าน ดังแสดงใน รูปที่ 2.29 โดยกดไอคอน  แล้ว double click ตรงตำแหน่งลูกศรสีเขียวชี้บนมุมซ้ายของภาพเจล จะ ปรากฏหน้าต่างต่าง Create Annotation by Click เลือกค่า pI\_MW แล้วกด OK จากนั้นพิมพ์ค่า pI และ น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 3 เคาะเว้นช่องตามด้วย 97000 แล้วจึงกำหนดค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลอีก 3 มุม ที่เหลือในทำนองเดียวกัน จากนั้นเริ่มกำหนดค่า pI ในช่วงระหว่าง 3-10 โดยอ้างอิงกราฟมาตรฐานการ ประมาณค่า pI (Amersham pharmacia biotech, 2004) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความยาว ของภาพเจล (แกน X) และค่า pH 3-10 NL (แกน Y)



รูปที่ 2.29 แผนภาพการกำหนดตำแหน่งเริ่มและสิ้นสุดของค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลบนภาพเจลแบบ 2 มิติ

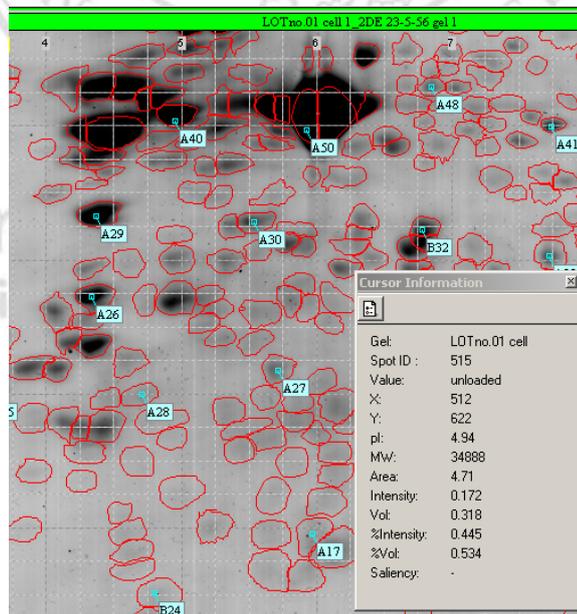
ตัวอย่างเช่น ที่ pH 4 ตรงกับร้อยละ 10 ความยาวของภาพเจล จึงกำหนดค่า pI\_MW เป็น 4 97000 ในเส้นแบ่งตารางช่องที่ 10 จากทั้งหมด 100 ช่อง บนแนวเส้นประสีแดง โดยนับจากจุดเริ่มต้น ที่กำหนดไว้คือ 3 97000 (pI 3 มวลโมเลกุล 97,000 Da) แล้วจึงกำหนดค่า pI ที่เหลือในทำนองเดียวกัน ต่อมาในส่วนของการกำหนดค่าน้ำหนักโมเลกุลให้กำหนดบนแนวเส้นประสีฟ้าทั้งสองบนภาพเจล โดยกำหนดเป็นแนวเดียวกับแถบ protein marker ที่ปรากฏด้านซ้ายของภาพเจลดังแสดงในรูปที่ 2.30

เมื่อเสร็จสิ้นการตั้งค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของจุดโปรตีนบนภาพเจลดังกล่าว จึงเปิดภาพเจลอันใหม่ และเริ่มกำหนดค่า pI กับน้ำหนักโมเลกุลอีกครั้ง ทำเช่นนี้ในทุกภาพเจลที่อยู่ในกลุ่มของการวิเคราะห์ เพื่อหาค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของจุดโปรตีนเดียวกัน



รูปที่ 2.30 ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลที่แสดงบนภาพเจลแบบ 2 มิติ

การอ่านค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของจุดโปรตีนบนภาพเจลแบบ 2 มิติ ทำได้โดยการสร้างหน้าต่าง Cursor Information โดยไปที่เมนู **Window** คำสั่ง **Information** จากนั้นจะปรากฏหน้าต่างข้อมูลขึ้น สามารถนำ cursor ซึ่งไปยังจุดโปรตีนที่ต้องการก็จะปรากฏข้อมูลต่างๆ ของจุดโปรตีนนั้นรวมทั้งค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลดังรูปที่ 2.31 หรือจะสร้างรายงานข้อมูลของจุดโปรตีน โดยการคลิกเลือกจุดโปรตีนไปที่เมนู **Report** ตามด้วยคำสั่ง **spots** ก็จะปรากฏรายงานข้อมูลของจุดโปรตีนที่เลือกดังกล่าว



รูปที่ 2.31 ภาพเจลแบบ 2 มิติที่ผ่านการกำหนดค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล แสดงตำแหน่งจุดโปรตีนที่ชี้โดย cursor ซึ่งปรากฏเป็นกรอบหน้าต่างแสดงข้อมูลของจุดโปรตีน ID 515 ที่มีค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4.91 และ 34,888 Dalton ตามลำดับ

## 2.14 การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนโดยพื้นฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต

นำข้อมูลค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันมาใช้วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต ExPaSy Server ของ Swiss Institute of Bioinformatics ดังนี้ (Gasteiger *et al.*, 1999)

1) ใช้ข้อมูลจาก TagIdent Tool (ที่มา: <http://www.expasy.org/tools/tagident.html>) โดยมีข้อมูลให้ระบุในหน้าเว็บไซต์ (รูปที่ 2.32) ดังนี้

- 1.1) ค่า pI ต่ำสุดและสูงสุด
- 1.2) ค่าน้ำหนักโมเลกุลและเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักโมเลกุลที่ยอมรับได้
- 1.3) สายพันธุ์หรือหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิต (species classification) โดยการทดลองนี้ใช้ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 และเซลล์เจ้าบ้านเป็น Vero cell จึงระบุสายพันธุ์เป็น Human herpes virus 2 และ African green monkey ตามลำดับ
- 1.4) Keyword เมื่อต้องการระบุรายละเอียดเช่น ระบุชื่อของโปรตีนที่ต้องการค้นหา

จากนั้นคลิกเลือก Display only the sequences matching the tag ในส่วนของ Tagging เลือกชนิดฐานข้อมูลเป็น UniprotKB/Swiss-Port แล้วจึงกด **Start TagIdent** เพื่อประมวลผลข้อมูล เว็บไซต์จะแสดงข้อมูลเป็นจำนวนและชนิดโปรตีนที่ตรวจพบพร้อมทั้งค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล ให้เลือกชนิดของโปรตีนที่สอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลอง และคลิกที่ชื่อของโปรตีน หน้าเว็บจะปรากฏรายละเอียดข้อมูลของโปรตีนชนิดนั้น เช่น ชื่อโปรตีน ชื่อยีน ความยาวของกรดอะมิโน (sequence length) บทบาทและหน้าที่ (function) เป็นต้น

Name of your query (optional):   
pI range: min  max   
Mw (in Daltons, *not* kD):   
Mw range (in percent): 20  %

Check for protein sequences  with cysteines in reduced form (-SH)  with cysteines oxidized (-S-S-)

Organism name or classification or NCBI\_TaxID (e.g. homo sapiens, eukaryota, 9606):

Keyword from KW lines (for search in Swiss-Prot only):

รูปที่ 2.32 พื้นที่ระบุข้อมูลของ TagIdent Tool เพื่อใช้วิเคราะห์ชนิดของโปรตีน (ExPaSy, 2010)

2) ใช้ข้อมูลจาก World-2DPAGE Repository โดยคลิกที่ **pI และ MW range** บนแถบเครื่องมือด้านซ้าย จะปรากฏหน้าเว็บไซต์ดังรูปที่ 2.33 (ที่มา: <http://world-2dpage.expasy.org/repository/>) แล้วให้ระบุข้อมูลดังนี้ (Hooglanda *et al.*, 2008)

- 1) ค่า pI ต่ำสุดและสูงสุด
- 2) น้ำหนักโมเลกุลต่ำสุดและสูงสุด
- 3) Limit to map หรือข้อมูลแผ่นเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ของสัตว์สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีในฐานข้อมูล การทดลองให้ระบุเป็น 0026--Homo sapiens (Human)

จากนั้นคลิกเลือก Accession number ในส่วนของ sort by: แล้วจึงกด **Execute query** เพื่อประมวลผลข้อมูล เว็บไซต์จะแสดงข้อมูล Accession number ID Spot ID pI และ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่างๆ ที่ตรวจพบบนแผ่นเจล จากนั้นเพื่อดูชนิดของโปรตีนให้คลิกที่ Accession number ID จะปรากฏรายละเอียดข้อมูลต่างๆ เช่น ชื่อโปรตีน ชื่อยีน อนุกรมวิธาน (taxonomy) เป็นต้น

**World-2DPAGE Repository**

**Search by**

- [accession number]
- [description, ID or gene]
- [author names]
- [spot ID / serial number]
- [identification methods]
- [pI / Mw range]
- [combined fields]

**Maps**

- [experimental info]
- [protein list]
- [graphical interface]

**World-2DPAGE Repository [All]**

**Search proteins by pI/Mw range**

**pI Range:**

min.  max.  (has no effect on SDS/1-D maps)

**Mw Range (kDaltons):**

min.  max.

Limit to Map:

-- or type a map exact name:

--  display maps names from currently selected remote interfaces

\* time consuming

รูปที่ 2.33 หน้าเว็บไซต์และพื้นที่ระบุข้อมูลของ World-2DPAGE Repository (ExPaSy, 2011)

## 2.15 การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรีและชีวสารสนเทศ

จากบรรดาจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลจากการวิเคราะห์โปรตีนในภาพเจลแบบ 2 มิติ จากการทดลองข้อ 2.12 ให้เลือกจุดโปรตีนที่สนใจเหล่านั้นมาวิเคราะห์หาชนิดโปรตีนด้วยวิธี ESI - Ion Trap Mass Spectrometry ที่ภาควิชาเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ประกอบด้วยเส้นกราฟของแมสสเปกตรัม (mass spectrum) และค่า peptide mass fingerprints (PMF) ของโปรตีนแต่ละจุด จากนั้นนำค่า PMF ของจุดโปรตีนมาเทียบกับค่า PMF ของโปรตีนในฐานข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT โดยเข้าไปที่เว็บไซต์ <http://www.matrixscience.com> แล้วคลิกเลือก **Mascot database search** ที่แถบเมนู ตามด้วย **Perform search** ในช่อง **MS/MS Ions Search** จะปรากฏหน้าต่างของโปรแกรม MASCOT MS/MS Ions Search ดังรูปที่ 2.34

### MASCOT MS/MS Ions Search

The screenshot shows the MASCOT MS/MS Ions Search web interface. The form is organized into several sections:

- Personal Information:** Fields for "Your name" and "Email".
- Search Parameters:** "Search title" field, "Database(s)" dropdown menu (with options: Environmental\_EST, SwissProt, NCBIInr, contaminants, cRAP), "Enzyme" dropdown menu (Trypsin), "Allow up to" dropdown menu (3 missed cleavages), and "Quantitation" dropdown menu (None).
- Taxonomy:** "Taxonomy" dropdown menu (Other viruses).
- Modifications:** "Fixed modifications" dropdown menu (Carbamidomethyl (C)), "Variable modifications" dropdown menu (Oxidation (M)), and a "Display all modifications" checkbox.
- Tolerance and Charge:** "Peptide tol." field (1.2 Da), "# 13C" field (0), "MS/MS tol." field (0.6 Da), and "Peptide charge" dropdown menu (2+).
- Search Options:** "Monoisotopic" radio buttons (Average selected), "Data file" field (เลือกไฟล์), "Data format" dropdown menu (Mascot generic), "Instrument" dropdown menu (Default), "Decoy" checkbox, "Precursor" field (m/z), "Error tolerant" checkbox, and "Report top" dropdown menu (AUTO hits).
- Buttons:** "Start Search ..." and "Reset Form".

รูปที่ 2.34 หน้าจอของโปรแกรม MASCOT สำหรับสืบค้นชนิดโปรตีนจากค่า PMF

จากหน้าต่างของโปรแกรม MASCOT MS/MS Iron Serch ในภาพ 2.34 ให้เติมหรือเลือกข้อมูลในแต่ละส่วนที่จำเป็นต่อการสืบค้นดังนี้

**Your name:** พิมพ์ชื่อของผู้ใช้งาน

**Email:** พิมพ์อีเมลของผู้ใช้งาน

**Database:** เลือกฐานข้อมูลเป็น NCBI หรือ SwissProt

**Taxonomy:** เลือกเป็น Other primates หรือ Other viruses

**Enzyme:** เลือก Trypsin เนื่องจากใช้เอนไซม์ทริปซินในการย่อยโปรตีนให้กลายเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ สำหรับทำแมสสเปกโตรเมทรี

**Allow up to:** เลือก (3) คือกำหนดให้มีความผิดพลาดในการตัดสายเปปไทด์ได้เพียง 3 ตำแหน่ง

**Fixed modification:** เลือก Carbamidomethyl (C) เนื่องจากในขั้นตอน equilibrate IPG strip ด้วย iodoacetamide จะทำให้เกิดการดัดแปลงกรดอะมิโน cysteine เป็น S-carbamidomethyl cysteine

**Variable modifications:** เลือก Oxidation (M) เนื่องจากในขั้นตอนการย่อยสายเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน กรดอะมิโน methionine อาจถูกออกซิไดซ์อยู่ในรูปของ oxidized methionine

**Peptide tol ±:** กำหนดให้เป็น 1.2 Da

**MS/MS tol ±:** กำหนดให้เป็น 0.6 Da

**Peptide charge:** กำหนดเป็น 2+ และเลือก Monoisotopic อันเป็นรูปแบบของ mass spectrum ที่ได้จากการวิเคราะห์

**Data file:** เลือกไฟล์ของจุดโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์

**Instrument:** เลือก ESI-TRAP

หลังจากเติมหรือเลือกข้อมูลต่างๆ จนครบแล้วให้กด **Start Search** เพื่อให้โปรแกรมทำการสืบค้น ซึ่งแสดงตัวอย่างผลการสืบค้นดังรูปที่ 2.35

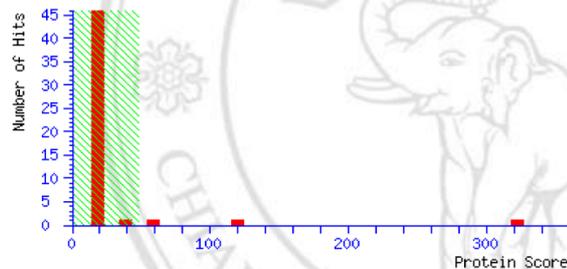
# MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : padchane  
 Email : padchaneel@hotmail.com  
 Search title :  
 MS data file : 1852.mgf  
 Database : NCBI nr 20140323 (38032689 sequences; 13525028931 residues)  
 Taxonomy : Other primates (336577 sequences)  
 Timestamp : 31 Mar 2014 at 04:06:42 GMT

Protein hits :  
[gi|296206637](#) PREDICTED: alpha-enolase isoform 1 [Callithrix jacchus]  
[gi|297273950](#) PREDICTED: beta-enolase-like, partial [Macaca mulatta]  
[gi|410050747](#) PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: N-acetylgalactosamine-6-sulfatase [Pan troglodytes]

## Mascot Score Histogram

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Individual ions scores  $> 48$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



รูปที่ 2.35 ผลการสืบค้นค่า PMF ในโปรแกรม MASCOT เพื่อหาชนิดของจุดโปรตีน

ผลการสืบค้นจะแสดงชนิดโปรตีนจากฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับจุดโปรตีนที่สนใจ ซึ่งจะแสดงความใกล้เคียงกับโปรตีนที่สืบค้นตามค่าคะแนน (MASCOT score) โดยถ้าโปรตีนชนิดนั้นมีค่าคะแนนสูงกว่าค่าต่ำสุดที่ยอมรับได้ แสดงว่าโปรตีนชนิดนั้นมีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่สืบค้นอย่างมีนัยสำคัญ ยกตัวอย่างเช่น ผลการสืบค้นในรูปที่ 2.35 ได้ชนิดโปรตีนที่มีความใกล้เคียงกับจุดโปรตีนทั้งหมด 3 ชนิด คือ alpha-enolase beta-enolase และ N-acetylgalactosamine-6-sulfatase พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิด Callithrix jacchus Macaca mulatta และ Pan troglodytes ตามลำดับ โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิด มีค่าคะแนน (Mascot score) สูงกว่าค่าคะแนนสูงสุดที่ยอมรับได้ (48) ต่อจากนั้นให้คลิกที่ Accession number ของโปรตีนภายในหน้าต่างเพื่อดูข้อมูลของโปรตีนในฐานข้อมูล ได้แก่ ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ร้อยละของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลอนุกรมวิธาน บทบาทและหน้าที่ของโปรตีน เป็นต้น