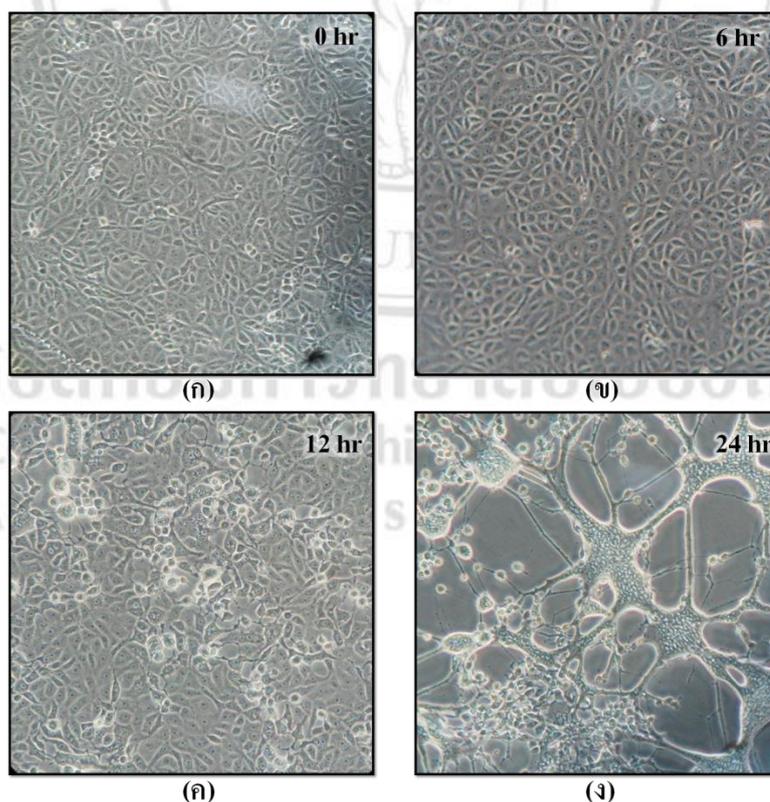


บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในเซลล์เจ้าบ้าน

ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 สายพันธุ์ G (HSV-2G) ในเซลล์เจ้าบ้าน ดังขั้นตอนการทดลอง 2.2.2 และสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (Cytopathic effect หรือ CPE) เป็นเวลา 0 ถึง 24 ชั่วโมง แสดงผลการทดลองในรูปที่ 3.1

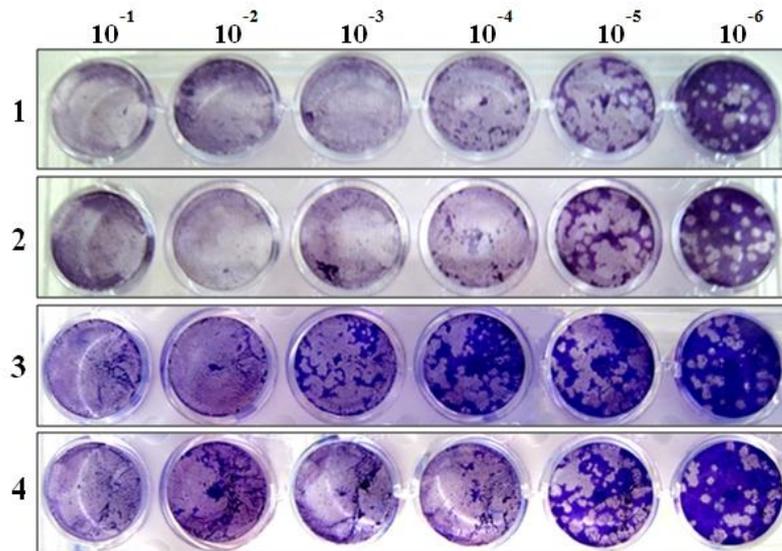


รูปที่ 3.1 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของ Vero cell ภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นเวลา 0 6 12 และ 24 ชั่วโมง (ก) ถึง (ง) โดยสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 200 เท่า

จากผลการทดลองพบว่าภายหลังจากเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เซลล์เจ้าบ้านมีการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตและลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเซลล์เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และไม่พบการแสดงลักษณะ CPE ในระยะ 6 ชั่วโมงแรก แต่ลักษณะ CPE ของ Vero cell ปรากฏขึ้นชัดเจนภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะ CPE ประมาณร้อยละ 25 ของเซลล์ทั้งหมด (CPE 1+) และพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเชื้อหุ้มเซลล์ที่สะท้อนแสงเด่นชัด รวมถึงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เปลี่ยนจากรูปกระสวย (spindle-shaped) เป็นเซลล์ลักษณะกลมโต ผิวไม่เรียบแบนเมื่อเทียบกับเซลล์รอบข้าง ซึ่งเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่รุนแรงในระยะแรก ลักษณะ CPE ดังกล่าวจะแพร่กระจายไปยังเซลล์รอบข้างอย่างรวดเร็ว ภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะพบ Vero cell แสดงลักษณะ CPE ในระดับ 4+ (คิดเป็นร้อยละ 100 ของเซลล์ทั้งหมด) โดยกลุ่มเซลล์ทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยากลายเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของเซลล์เจ้าบ้านหลายๆ เซลล์ และภายในประกอบด้วยนิวเคลียสขนาดเล็กๆ จำนวนมาก จากผลการทดลองข้างต้นเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่เลือกมาใช้มีประสิทธิภาพในการก่อโรคบนเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell จากนั้นจึงนำเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ดังกล่าวไปตรวจหาปริมาณไวรัสเริ่มต้นด้วยวิธี plaque titration assay เพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

3.2 การหาปริมาณไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ด้วยวิธี plaque titration assay

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 บนเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell จะต้องกำหนดอัตราส่วนระหว่างจำนวนเซลล์เจ้าบ้านต่ออนุภาคไวรัสที่แน่นอนเพื่อใช้ในการแต่ละการทดลอง โดยอนุภาคไวรัสอาจลดจำนวนลงเนื่องจากหลายปัจจัย อาทิ อุณหภูมิ สิ่งแวดล้อม และระยะเวลาในการเก็บรักษา ซึ่งปริมาณอนุภาคไวรัสที่ลดลงอาจส่งผลถึงการทดลองต่อไปได้ ดังนั้นเพื่อทราบปริมาณไวรัสที่แน่นอนก่อนใช้ในการแต่ละการทดลอง ต้องนำเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จาก stock มาตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี plaque titration assay ดังขั้นตอนทดลองที่ 2.4 โดยทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.2 จากผลการทดลองพบว่าหลังจากย้อมเซลล์ด้วยคริสตอลไวโอเลต สามารถนับจำนวนพลาควบน Vero cell ที่เติมไวรัสเจือจาง 1×10^6 เท่า ได้เท่ากับ 42 38 40 และ 44 พลาคว คิดเป็นค่าเฉลี่ย 41 พลาคว ดังนั้นเมื่อคำนวณปริมาณไวรัสจึงมีค่าเท่ากับ 41×10^{-7} PFU/ml (ภาคผนวก ค) จากนั้นจึงนำปริมาณไวรัสที่คำนวณได้ไปใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 3.2 ลักษณะพลาควอน Vero cell ที่เกิดขึ้นหลังจากการก่อโรคด้วยไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 เมื่อเจือจางไวรัสตั้งแต่ 1×10^{-1} ถึง 1×10^{-6} เท่า (ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง)

3.3 การเปรียบเทียบหาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีในการสกัดโปรตีนที่เหมาะสมกับ Vero cell คือ การสกัดโปรตีนโดยตรงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (lysis buffer) เพื่อให้โปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จาก Vero cell อยู่ในสภาวะใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติของโปรตีนภายในเซลล์มากที่สุด รวมทั้งลดขั้นตอนที่ใช้สกัดโปรตีนลง ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการสกัดสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ดังนั้นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต้องมีคุณสมบัติละลายโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ได้ รวมทั้งแสดงรูปแบบโปรตีนบนเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์มีหลากหลายชนิด และมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น ดีเทอร์เจนท์ บัฟเฟอร์ และสารอินทรีย์ เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับสกัดโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 จึงทดลองใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันจำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea สารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 และสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea ดังขั้นตอนทดลองที่ 2.5

3.3.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้

ในการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างโปรตีนให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเพียงพอสำหรับใช้วิเคราะห์ต่อด้วยวิธีแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ในการสกัดโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ที่มีจำนวนเซลล์ 1×10^6 cells/flask ตามวิธีการทดลองข้อ 2.7.2 ปริมาตร

ของสารละลายบัฟเฟอร์จะขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนของเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell โดยจะใช้ปริมาตรให้น้อยที่สุดที่ทำให้ตะกอนเซลล์ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากการทดลองพบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดใช้ปริมาณบัฟเฟอร์แตกต่างกัน โดยการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea ใช้ปริมาณบัฟเฟอร์สูงที่สุดเท่ากับ 1200 μ l เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 และ NP-40-Urea-Thiourea ใช้ปริมาณบัฟเฟอร์เพียง 700 μ l จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford ดังวิธีในขั้นตอนที่ 2.8 ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด

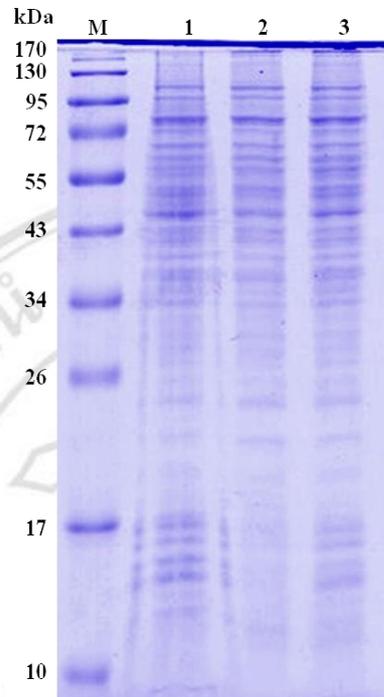
ชนิดของบัฟเฟอร์	ปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ (μ l)	ความเข้มข้นของโปรตีน (μ g/ μ l)	ปริมาณโปรตีน (mg)
CHAPS-Urea-Thiourea	1,200	1.02 \pm 0.08	1.22 \pm 0.10
NP-40	700	1.80 \pm 0.02	1.26 \pm 0.02
NP-40-Urea-Thiourea	700	2.85 \pm 0.08	2.00 \pm 0.05

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.1 พบว่าเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea ในการสกัดโปรตีน จะให้ความเข้มข้นของโปรตีนสูงที่สุดเท่ากับ 2.85 μ g/ μ l เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 (1.80 μ g/ μ l) และสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea (1.02 μ g/ μ l) จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ไปตรวจสอบรูปแบบโปรตีน และความถูกต้องของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

3.3.2 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด โดยพิจารณาขนาดโมเลกุลของโปรตีน รวมทั้งตรวจสอบความถูกต้องของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โดยนำสารละลายตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด มาแยกโปรตีนบนร้อยละ 12.5 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส หรือ 12.5% SDS-PAGE ขนาด 10 x 10.5 cm² ดังแสดงในขั้นตอน 2.9 ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.3 จากรูปที่ 3.3 พบว่าสารละลายตัวอย่างโปรตีนที่สกัดเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด ได้แถบโปรตีนที่มีรูปแบบโปรตีนที่คล้ายคลึงกันในช่วงน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนระหว่าง 10-170 kDa แต่พบบางแถบของโปรตีนที่แตกต่างกันในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10-17 kDa เมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea และ NP-40-Urea-Thiourea ในการสกัดโปรตีนอย่างเด่นชัด เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 เพียงอย่างเดียว หากพิจารณาถึงความถูกต้องในการวิเคราะห์หาปริมาณ

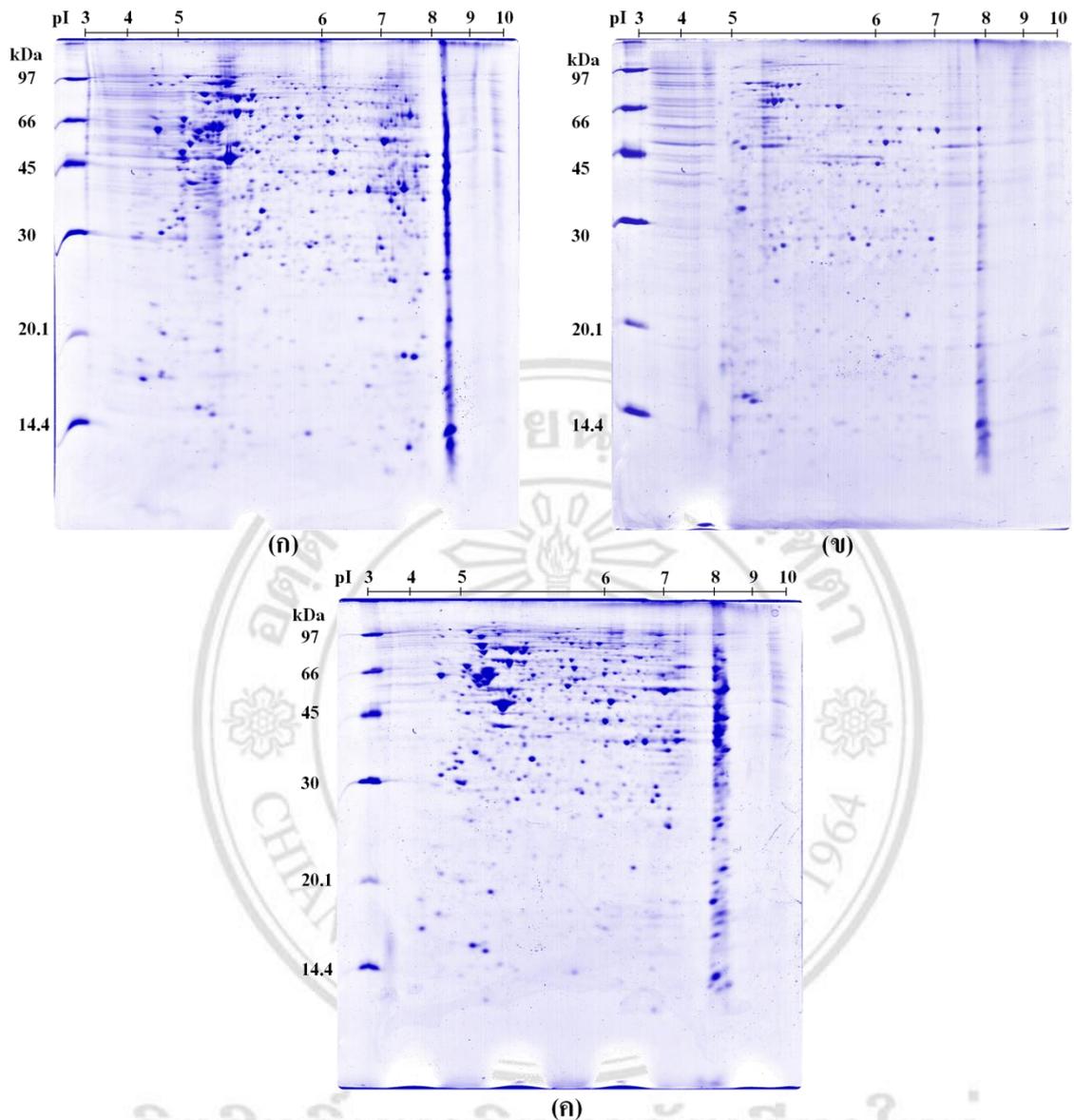
โปรตีน พบว่าปริมาณ โปรตีนที่ปรากฏบน 12.5% SDS-PAGE มีความเข้มของแต่ละแถบ โปรตีน ใกล้เคียงกัน ดังนั้นปริมาณ โปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford จึงมีความถูกต้อง และสามารถนำ สารละลายตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการสกัดไปวิเคราะห์ห้ด้วยวิธีแยกโปรตีนแบบ 2 มิติต่อไป



รูปที่ 3.3 12.5% SDS-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรณินชนิดที่ 2 โดยใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea (Lane 1) สารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 (Lane 2) สารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea (Lane 3) ในการสกัด โปรตีน โดยเทียบกับ LMW protein marker (Lane M)

3.3.3 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนบนเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ

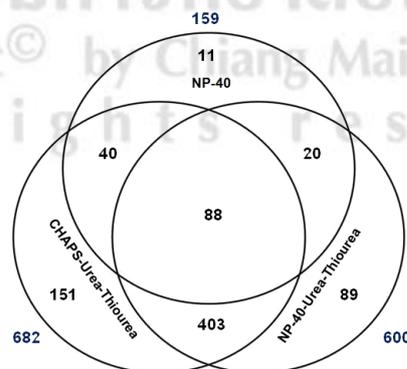
เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด ตามค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีน จึงนำสารละลายตัวอย่างโปรตีนปริมาณ 200 μ g ที่สกัด ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดมาวิเคราะห์ด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ดังขั้นตอนที่ 2.10 โดยทำ การทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.4 จากรูปที่ 3.4 พบโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงรูปแบบโปรตีนที่คล้ายคลึงบนภาพเจลในช่วงค่า pI เป็นกรด (pI 4.0-7.0) และเบส (pI 8.0-10.0) โดยโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดสามารถแยกโปรตีนตามค่า pI ได้ดี ในช่วงค่า pI ระหว่าง 4.0-8.0 โดยจะปรากฏเป็นจุดโปรตีนบนภาพเจลที่มีจำนวนและขนาดแตกต่างกัน โดยช่วง pI ระหว่าง 8.0-9.0 จะไม่สามารถแยกโปรตีนตามค่า pI ได้สมบูรณ์ และปรากฏเป็นแถบของ โปรตีนยาวตามแนวนอน (horizontal streaking) และแนวตั้ง (vertical streaking) บนภาพเจล



รูปที่ 3.4 เจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ของรูปแบบโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เมื่อสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิด (ก) CHAPS-Urea-Thiourea (ข) NP-40 (ค) NP-40-Urea-Thiourea

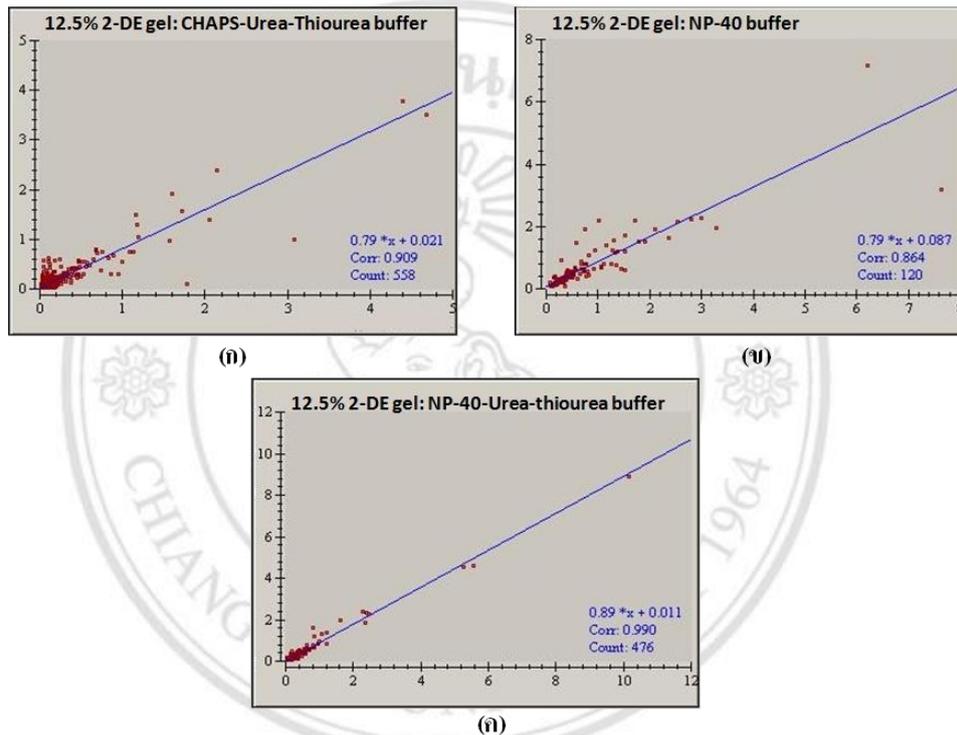
เมื่อสังเกตจำนวนจุดโปรตีนและความเข้มของจุดโปรตีนบนภาพเจลในช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ พบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea และ NP-40-Urea-Thiourea มีจำนวนจุดโปรตีนและความเข้มโปรตีนใกล้เคียงกัน ซึ่งมีจำนวนมากกว่าจุดโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 โดยสามารถแบ่งบริเวณที่ใช้เปรียบเทียบออกเป็น 2 ช่วงของน้ำหนักโมเลกุล บริเวณแรกคือ ช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 45.0-97.0 kDa ซึ่งเป็นบริเวณที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนสูง โปรตีนที่สกัดจากสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea และ NP-40-Urea-Thiourea จะปรากฏจำนวน

จุดโปรตีนจำนวนมากและมีความเข้มของจุดโปรตีนมากบนภาพเจล แต่โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 แสดงจำนวนจุดโปรตีนน้อยกว่า และมีความเข้มของจุดโปรตีนต่ำกว่า ในบริเวณที่สองคือ ช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 14.4 - 20.1 kDa เป็นบริเวณที่ระดับการแสดงออกโปรตีนค่อนข้างต่ำ ทำให้การแสดงจำนวนจุดโปรตีนและความเข้มของจุดโปรตีนที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก มีเพียงบางจุดโปรตีนที่ปรากฏเฉพาะในภาพเจลของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea และ NP-40-Urea-Thiourea ในขณะที่โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 ไม่พบจุดโปรตีนที่บริเวณเดียวกันหรือปรากฏเพียงจุดโปรตีนที่มีความเข้มของจุดโปรตีนต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 3.3 โดยโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 แสดงแถบโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10 และ 17 kDa เพียงเล็กน้อย และเมื่อวิเคราะห์จำนวนจุดโปรตีนทั้งหมดจากภาพเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum software version 5.0 พบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 802 จุด (ดังรูปที่ 3.5) โดยโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 แสดงจำนวนจุดโปรตีนน้อยที่สุดเท่ากับ 159 ± 11 จุด เมื่อเปรียบเทียบกับ โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea ที่มีจำนวน 682 ± 37 จุด และ NP-40-Urea-Thiourea ที่มีจำนวน 600 ± 110 จุด เมื่อนำเจลแบบ 2 มิติทั้งหมดมาเปรียบเทียบพบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงจุดโปรตีนที่มีค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกันจำนวน 88 จุด และเป็นจุดโปรตีนที่แตกต่างกันในแต่ละวิธีการสกัดจำนวน 251 จุด โดยการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea แสดงจำนวนจุดโปรตีนที่แตกต่างกับวิธีอื่นมากที่สุดถึง 151 จุด โดยจุดโปรตีนที่พบเฉพาะในวิธีการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 และ NP-40-Urea-Thiourea มีเพียง 89 และ 11 จุด ตามลำดับ และพบว่าการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea แสดงจุดโปรตีนที่ซ้ำกับวิธีสกัดอื่นๆ มากที่สุดถึง 443 จุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดโปรตีนของสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea (423 จุด) และ NP-40 (60 จุด)



รูปที่ 3.5 แผนภาพแสดงการเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนของ Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคริบซิมชนิดที่ 2 ภายหลังจากสกัดโดยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea สารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 และสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea

เพื่อวิเคราะห์ความแม่นยำของผลการทดลองซ้ำ (reproducibility) ของสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดในการสกัดโปรตีน เมื่อเขียนกราฟการกระจาย (scatter graph) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Vol ของกลุ่มจุดโปรตีนจากการทดลอง 2 ซ้ำ โดย %Vol คือ ปริมาตรของจุดโปรตีนที่สนใจต่อปริมาตรโดยรวมของจุดโปรตีนทั้งหมด กำหนดให้แกน X คือ %Vol ของจุดโปรตีนในการทดลองที่ 1 แกน Y คือ %Vol ของจุดโปรตีนในการทดลองที่ 2 ของแต่ละชุดการทดลอง จะได้กราฟแสดงการกระจายของจุดโปรตีนจากแต่ละการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 กราฟการกระจายแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Vol ของจุดโปรตีนบนภาพเจล 2 การทดลองซ้ำที่สกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิด (ก) CHAPS-Urea-Thiourea buffer (ข) NP-40 buffer (ค) NP-40-Urea-Thiourea buffer

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, Corr) และค่าจำนวนจุดโปรตีนที่จับคู่กันบนภาพเจล (Count) ที่ได้จากกราฟการกระจาย โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นค่าที่ใช้วัดระดับความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของจุดโปรตีนระหว่าง 2 การทดลองซ้ำ โดยจะมีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง 1 หากค่าเข้าใกล้ 1 แสดงถึงกลุ่มจุดโปรตีนระหว่าง 2 การทดลองซ้ำ มีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงมาก ในทางตรงข้ามหากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่าเข้าใกล้ 0 หรือติดลบ จะแสดงถึงกลุ่มจุดโปรตีนทั้งสองการทดลองซ้ำมีความสัมพันธ์กันในทางตรงข้าม หรืออาจไม่พบจุดโปรตีนชนิดเดียวกันในระหว่างการทดลองซ้ำนั้น ดังนั้นการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดที่ให้ค่า

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง จะมีความแม่นยำของผลการทดลองซ้ำ และความน่าเชื่อถือสูง ในการนับจำนวนจุดโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดยังสามารถนับได้จากจำนวนจุดโปรตีนที่จับคู่กันบนภาพเจล (Count) หากจำนวนจุดโปรตีนที่จับคู่กันมาก แสดงถึงการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดนั้นมีความสามารถสกัดโปรตีนออกจากเซลล์ได้ดี จากผลการทดลองพบว่าการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เข้าใกล้ 1 โดยการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ต่ำที่สุด (Corr = 0.864) เมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea (Corr = 0.909) และ NP-40-Urea-Thiourea (Corr = 0.990) ตามลำดับ นอกจากนี้จำนวนจุดโปรตีนที่จับคู่กันบนภาพเจลที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดยังมีความแตกต่างกัน โดยการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 แสดงจำนวนโปรตีนที่จับคู่กันต่ำที่สุด 120 คู่ เมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea (476 คู่) และ CHAPS-Urea-Thiourea (558 คู่)

จากผลการทดลองเปรียบเทียบการสกัดโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้น พบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea มีความเข้มข้นโปรตีนต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 และ NP-40-Urea-Thiourea โปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด ปราศจากการปนเปื้อนของสารรบกวน จากรูปแบบโปรตีนบน 12.5% SDS-PAGE มีโปรตีนเพียงช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่ำระหว่าง 10-17 kDa เมื่อใช้การสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea เปรียบเทียบกับการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดอื่น เมื่อพิจารณารูปแบบโปรตีนบนภาพเจลที่มีจำนวนจุดโปรตีน และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เพื่อระบุความแม่นยำในการให้ผลการทดลองซ้ำ แล้วพบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดโปรตีน เพื่อใช้วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เข้าบ้านหลังจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ต่อไป

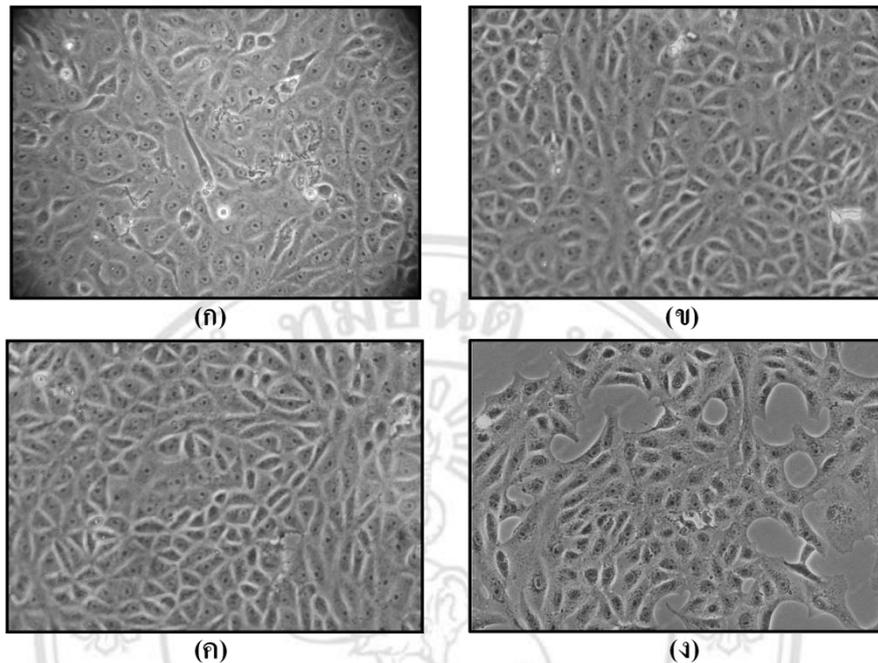
3.4 การเปรียบเทียบชนิดของซีรัมที่เหมาะสมสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูชนิดที่ 2 บน เซลล์เจ้าบ้าน

ปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ (growth medium) ที่มีองค์ประกอบของสารอาหารเสริม (supplemented nutrient) ที่เอื้ออำนวยให้เซลล์เจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวน หากปราศจากสารอาหารเสริมหรือเลือกใช้ประเภทสารอาหารที่ไม่เหมาะสมกับชนิดของเซลล์ อาจส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยงเจริญเติบโตช้าหรือผิดปกติได้ ซีรัมที่ได้จากเลือดของสัตว์เป็นอาหารเสริมที่ได้รับการนิยมนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ และมีความหลากหลายของชนิดซีรัมในปัจจุบัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกเปรียบเทียบซีรัมทั้งหมด 3 ชนิด สำหรับใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell และเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูชนิดที่ 2 ดังวิธีการทดลองขั้นตอน 2.6 ซึ่งประกอบด้วย Iron Supplemented Calf Serum Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum เพื่อเปรียบเทียบหาชนิดของซีรัมที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

3.4.1 การวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานวิทยายานอกของเซลล์

เพื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานวิทยายานอกของ Vero cell ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากซีรัมทั้ง 3 ชนิด เมื่อติดตามการเจริญเติบโตของ Vero cell ในภาชนะผ่านกล้อง inverted microscope ดังวิธีการทดลองขั้นตอน 2.6.1 พบว่าเซลล์ที่ลอยตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะเข้าเกาะพื้นภาชนะภายในเวลา 1 ชั่วโมง และเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะทั้งหมดจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้มตามระยะเวลาและการเจริญเติบโตของเซลล์ เซลล์เดี่ยวๆ จะยึดติดกลายเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียงตัวเป็นระนาบบนพื้นภาชนะ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น จะพบว่าเซลล์ที่มีรูปร่างกระสวยจะมีขนาดใหญ่ขึ้น ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 29 ชั่วโมง พบว่า Vero cell ที่เลี้ยงใน Fetal Bovine Serum จะเพิ่มจำนวนเซลล์จนเต็มผิวภาชนะทั้งหมด ได้เร็วกว่า Vero cell ที่เลี้ยงใน Iron Supplemented Calf Serum และ Bovine Calf Serum ซึ่งต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์นานถึง 36 ชั่วโมง จึงจะเต็มผิวภาชนะ เมื่อสังเกตลักษณะพื้นฐานวิทยายานอกของ Vero cell ที่เจริญเต็มผิวภาชนะในอาหารเพาะเลี้ยงจากซีรัมทั้ง 3 ชนิด จะมีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกัน (ดังแสดงในรูปที่ 3.7) เซลล์เรียบแบนติดผิวภาชนะ ขอบเซลล์ยกนูนเล็กน้อยปรากฏเป็นการสะท้อนแสงที่เยื่อหุ้มเซลล์ ภายในประกอบด้วยนิวเคลียสขนาดเล็ก เซลล์มีสีเทาอ่อน ซึ่งเป็นการแสดงลักษณะของเซลล์ที่เจริญเติบโตปกติ ในกรณีที่เซลล์เจริญเติบโตผิดปกติ อาจมีสาเหตุได้หลายประการเช่น การเสื่อมสภาพของเซลล์ การปนเปื้อนหรือความเป็นพิษของอาหารเลี้ยง เซลล์จากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น โดยเซลล์จะมีลักษณะหดเล็ก เยื่อหุ้มเซลล์ขรุขระและสะท้อนแสงได้น้อย ภายใต้อาไมบ์เม็ดแกรนูลเล็กๆ

จำนวนมาก ทำให้สีของเซลล์เข้มกว่าปกติ การยึดเกาะระหว่างเซลล์ข้างเคียงและพื้นผิวน้อย ซึ่งจะทำให้เซลล์มีอายุสั้นและตาย โดยจะหลุดลอยออกไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เจริญเป็นปกติ

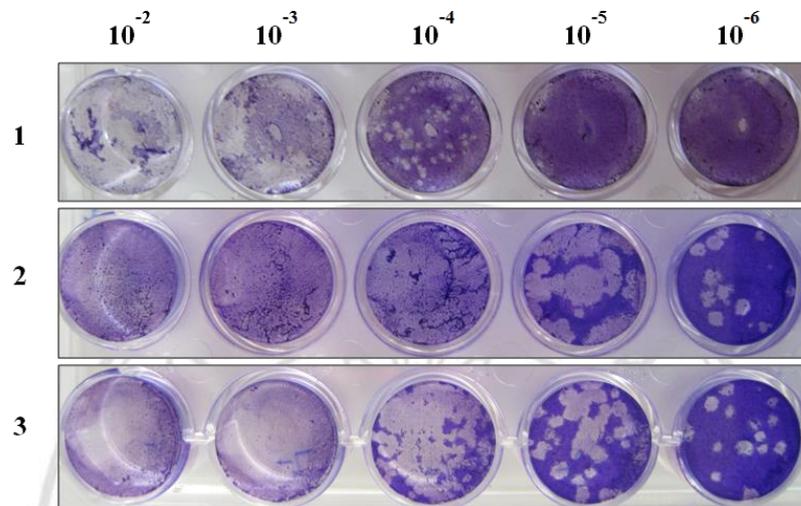


รูปที่ 3.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ Vero cell ที่เจริญปกติในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี (ก) Iron Supplemented Calf Serum (ข) Bovine Calf Serum และ (ค) Fetal Bovine Serum เป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับ (ง) Vero ที่เจริญผิดปกติเนื่องจากการปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการเตรียมเซลล์

3.4.2 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของไวรัสด้วยวิธี plaque titration assay

ไวรัสสามารถเจริญแพร่พันธุ์อนุภาคไวรัสใหม่ได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับเซลล์เจ้าบ้านที่ไวรัสเข้าไปอาศัยเป็นสำคัญ ในงานวิจัยนี้จึงทดลองเติมไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 บนเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ที่เพาะเลี้ยงด้วยซีรัมที่แตกต่างกัน 3 ชนิด โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง เมื่อสังเกตลักษณะพลาไคที่เกิดขึ้นจากไวรัสด้วยวิธี plaque titration assay ดังวิธีการทดลองในขั้นตอน 2.4 และศึกษาผลของชนิดของซีรัมที่ใช้เพาะเลี้ยง Vero cell ต่อการเพิ่มจำนวนอนุภาค ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเจือจางไวรัส $1:1 \times 10^6$ เท่า ลักษณะของพลาไคที่ปรากฏขึ้นบน monolayer ของ Vero cell ที่เลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยจะสังเกตเป็นวงกลมขนาดใหญ่ได้ด้วยตาเปล่า (ดังรูปที่ 3.8) ซึ่งเป็นการแสดงความรุนแรงที่เป็นลักษณะจำเพาะในการก่อโรคของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 แต่ไม่พบลักษณะของพลาไคบน Vero cell ที่เลี้ยงด้วย Iron Supplemented Calf Serum เมื่อเจือจางอนุภาคไวรัส $1:1 \times 10^4$ เท่า ถึงปรากฏเป็นพลาไคที่มีลักษณะเป็นวงกลมขนาดเล็กขอบเขตไม่ชัดเจน ซึ่งขนาดพลาไคที่เล็กลงจะคล้ายคลึงกับพลาไคที่เกิดจากการก่อโรคด้วยไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ซึ่งมีระดับความรุนแรงที่ต่ำกว่าไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จากผลการทดลองจึงพบว่า

Iron Supplemented Calf Serum ไม่เหมาะสมสำหรับใช้เพาะเลี้ยงไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จากนั้นทำการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของ Vero cell ที่เลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum ด้วยวิธี 2-DE ต่อไป

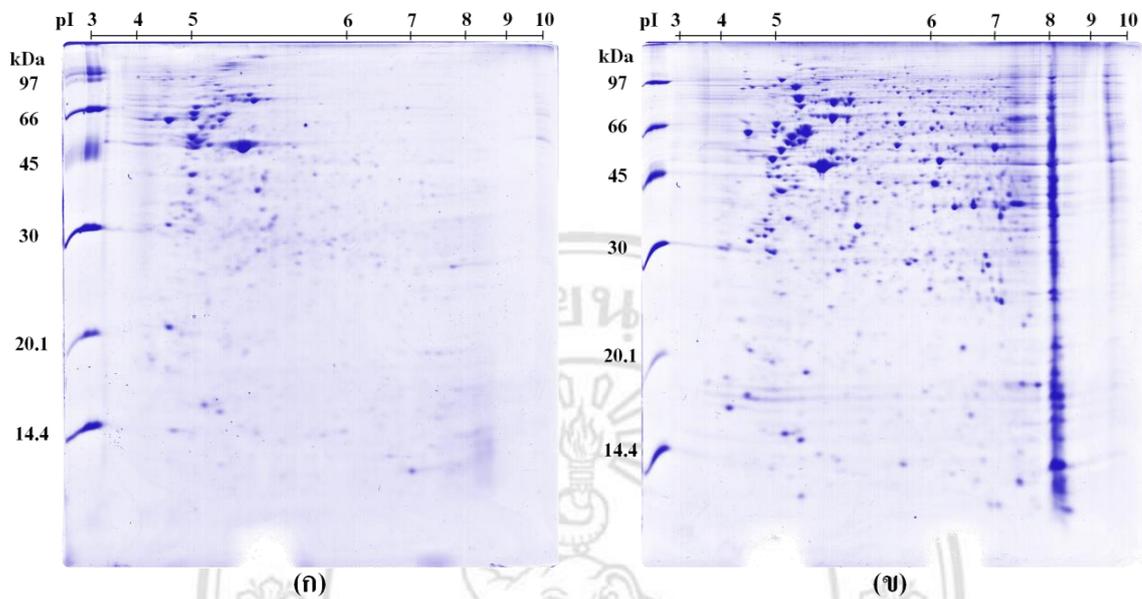


รูปที่ 3.8 ลักษณะพลาของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 บน Vero cell ซึ่งเพาะเลี้ยงใน growth medium ที่มี (1) Iron Supplemented Calf Serum (2) Bovine Calf Serum และ (3) Fetal Bovine Serum เป็นองค์ประกอบ

3.4.3 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนบนเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ

จากผลการทดลองเปรียบเทียบหาชนิดซีรัมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 บนเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell พบว่า Vero cell ที่เพาะเลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum ให้ผลการทดลองที่ดีใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาจากลักษณะพื้นฐานวิทยาของ Vero cell ที่เจริญเติบโตและลักษณะพลาที่เกิดขึ้นจากการก่อโรคด้วยไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เมื่อนำตัวอย่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum มาสกัดโปรตีนและวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ดังวิธีการทดลองในขั้นตอน 2.6.3 โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อเปรียบเทียบผลของซีรัมที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อการแสดงออกรูปแบบโปรตีนทั้งหมดในเซลล์เจ้าบ้าน และพิจารณาเลือกชนิดของซีรัมที่เหมาะสมสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell และเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ต่อไป จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum ภายหลังสกัดโปรตีนด้วย CHAPS-Urea-Thiourea buffer ให้ปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน มีค่าเท่ากับ 1.24 ± 0.06 mg และ 1.22 ± 0.10 mg ต่อจำนวนเซลล์ 4×10^6 cells เมื่อนำสารละลายตัวอย่างโปรตีน 200 μ g มาแยกโปรตีนตามค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.9 จากผลการทดลองพบว่ารูปแบบของตัวอย่าง

เซลล์ที่เลี้ยงใน Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum ปรากฏจำนวนจุดโปรตีนทั้งหมด 406 ± 72 และ 682 ± 37 จุด ตามลำดับ



รูปที่ 3.9 เจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ของตัวอย่างโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคริมชนิดที่ 2 ที่เพาะเลี้ยงใน growth medium ที่มี (ก) Bovine Calf Serum และ (ข) Fetal Bovine Serum เป็นองค์ประกอบ

เมื่อเปรียบเทียบภาพเจลระหว่างโปรตีนจากตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วยซีรัมทั้ง 2 ชนิด จะพบความแตกต่างของรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดในแต่ละช่วง pI และน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็นทั้งหมด 3 บริเวณดังนี้

1) ช่วงน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนขนาดใหญ่ (25.0-97.0 kDa) ระหว่างค่า pI 4.0-5.7

โปรตีนจากตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วยซีรัมทั้ง 2 ชนิดมีระดับการแสดงออกโปรตีนสูง ในภาพเจลบริเวณนี้มีรูปแบบโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มของจุดโปรตีนที่แสดงออก ซึ่งจุดโปรตีนจากตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วย Fetal Bovine Serum แสดงระดับความเข้มมากกว่าตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum ในหลายๆ จุดโปรตีน

2) ช่วงน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนขนาดใหญ่ (25.0-97.0 kDa) ระหว่างค่า pI 5.7-8.0

ในบริเวณนี้จะสังเกตเห็นความแตกต่างของการแสดงออกโปรตีนอย่างเห็นได้ชัด โดยพบจำนวนจุดโปรตีนจากตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วย Fetal Bovine Serum มากกว่าตัวอย่างโปรตีนจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum

3) ช่วงน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็ก (14.0-25.0 kDa) ระหว่างค่า pI 4.0-8.0

โปรตีนจากตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วยซีรัมทั้ง 2 ชนิด มีระดับการแสดงออกของโปรตีนต่ำในภาพเจลบริเวณนี้ โดยแสดงรูปแบบโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน แต่ยังมี ความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของจุด โปรตีนบางจุดจากตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum ซึ่งมีระดับความเข้มของจุดโปรตีนน้อยกว่าจุดโปรตีนจาก ตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วย Fetal Bovine Serum

จากการทดลองเปรียบเทียบชนิดซีรัมทั้ง 3 ชนิดข้างต้น พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจาก Fetal Bovine Serum เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell และเชื้อไวรัสก่อโรค เริมชนิดที่ 2 เนื่องจาก Vero cell ที่เพาะเลี้ยงแสดงลักษณะสัญญาณวิทยาที่มีการเจริญปกติ อัตราการ เจริญเติบโตเหมาะสม เมื่อนำไปก่อโรคด้วยไวรัสก่อโรคชนิดที่ 2 ไวรัสสามารถเจริญบนเซลล์และเกิด เป็นลักษณะของพลาไคได้ชัดเจน นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างเซลล์ไปสกัดโปรตีนและวิเคราะห์ด้วย วิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ได้รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดบนภาพเจลที่ดีคือ จำนวน จุดโปรตีนค่อนข้างมาก จุดโปรตีนมีรูปร่างกลมและมีระดับความเข้มสูง ทำให้ได้รูปแบบโปรตีนที่ได้ ชัดเจน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ Fetal Bovine Serum ในการเพาะเลี้ยง Vero cell และ ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2

3.5 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม

เพื่อทำการศึกษาโปรตีนใน Vero cell ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ใน ระยะแรกเริ่ม ได้เตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนโดยแบ่งกลุ่มเพาะเลี้ยง Vero cell ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (กลุ่มทดลอง) ดังวิธีการทดลองขั้นตอน 2.7 โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละชุดการทดลอง จากการ ทดลองพบว่าหลังนำตัวอย่างเซลล์ในแต่ละชุดการทดลองมาสกัดโปรตีนและหาความเข้มข้นโปรตีน ได้ความเข้มข้นของโปรตีนใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงระหว่าง 1.64-2.79 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นจึงนำโปรตีนที่สกัดได้ไปตรวจสอบรูปแบบโปรตีนและความถูกต้องของปริมาณโปรตีนด้วย โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

ตารางที่ 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm (A_{595}) และความเข้มข้น โปรตีนที่สกัดได้จาก สารละลายตัวอย่าง ในแต่ละชุดการทดลอง

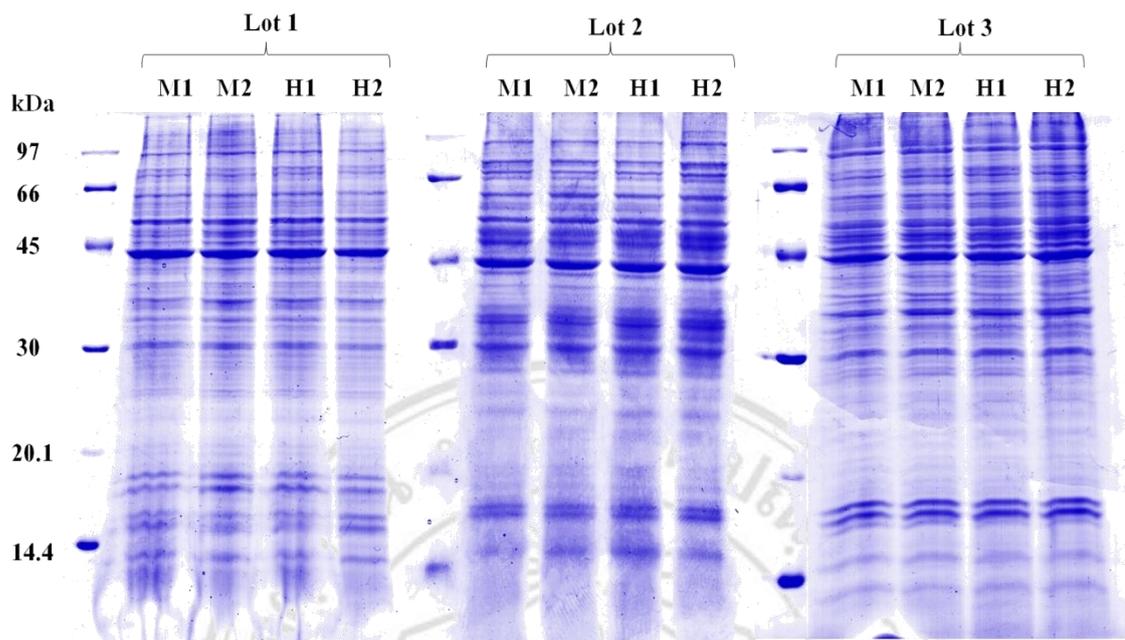
ชุดการทดลอง (Lot)	สารละลายตัวอย่าง โปรตีน	ความเข้มข้น โปรตีน \pm SD ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	M1 Lot1	1.64 \pm 0.16
	M2 Lot1	2.53 \pm 0.01
	H1 Lot1	1.80 \pm 0.05
	H2 Lot1	2.69 \pm 0.04
2	M1 Lot2	2.02 \pm 0.05
	M2 Lot2	2.38 \pm 0.03
	H1 Lot2	2.47 \pm 0.02
	H2 Lot2	2.79 \pm 0.02
3	M1 Lot3	1.94 \pm 0.03
	M2 Lot3	2.53 \pm 0.02
	H1 Lot3	2.39 \pm 0.05
	H2 Lot3	2.35 \pm 0.08

หมายเหตุ M คือ โปรตีนจาก Vero cell ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูชนิดที่ 2

H คือ โปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูชนิดที่ 2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

3.6 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

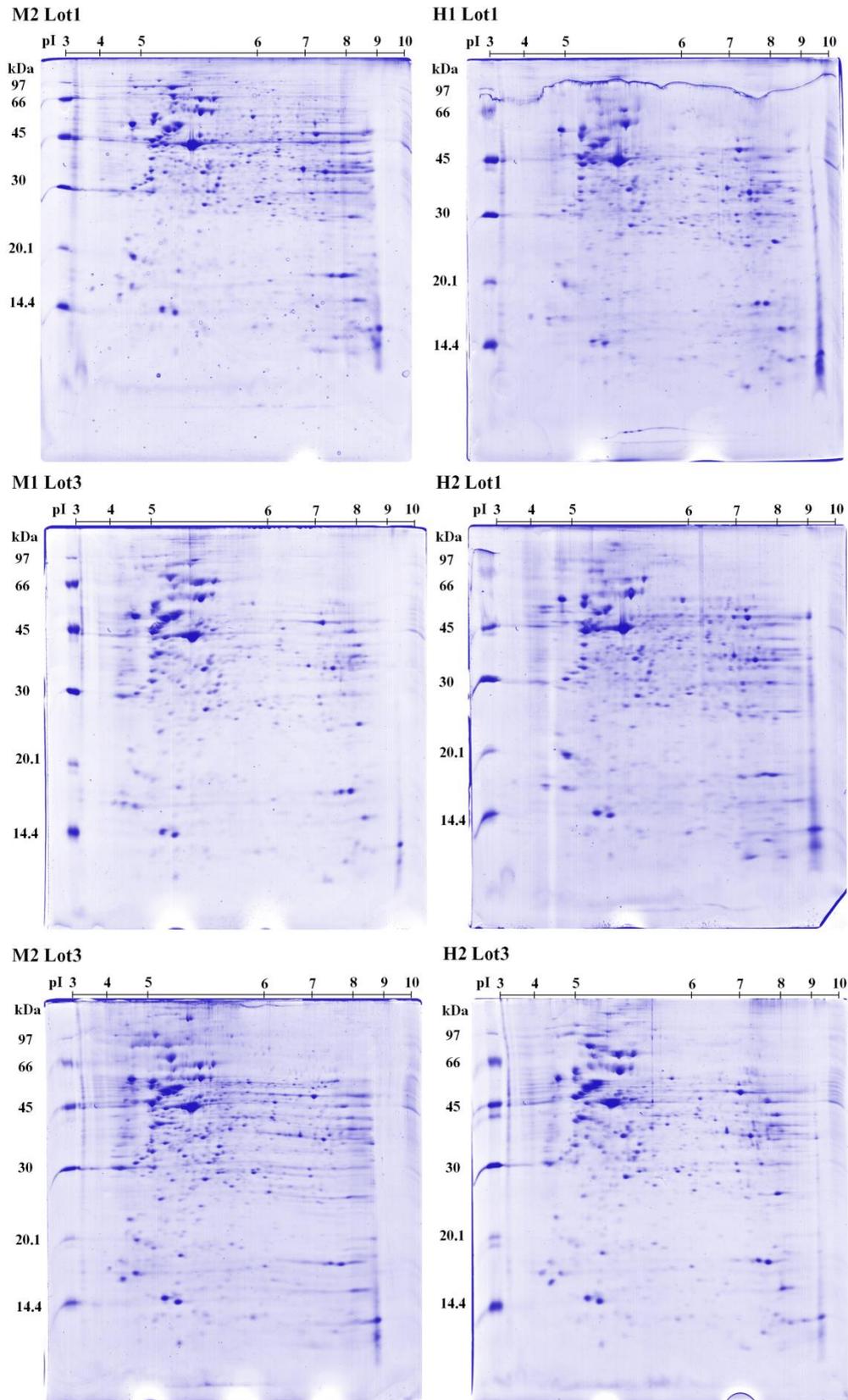
เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่มตามน้ำหนักโมเลกุล โดยนำสารละลายตัวอย่างโปรตีนปริมาณ 15 μg จากแต่ละกลุ่มการทดลองมาแยกบน 12.5% SDS-PAGE ขนาด 10 \times 10.5 cm^2 ดังวิธีการทดลองในขั้นตอน 2.9 ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.10 พบว่าหลังย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 แถบสีโปรตีนในแต่ละชุดการทดลองมีระดับความเข้มและรูปแบบใกล้เคียงกัน ช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 14.4-97.0 kDa ดังนั้นตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการสกัดมีปริมาณโปรตีนที่ปรากฏบนเจลใกล้เคียงกันและมีความแม่นยำของผลการทดลองซ้ำทั้ง 3 ชุดการทดลอง เพื่อต้องการทราบความแตกต่างรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดที่เกิดขึ้นจึงนำตัวอย่างโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มการทดลองไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ต่อไป



รูปที่ 3.10 12.5% SDS-PAGE ของ (H) โปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เปรียบเทียบกับ (M) โปรตีนจาก Vero cell ที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 โดยใช้ LMW protein เป็น marker

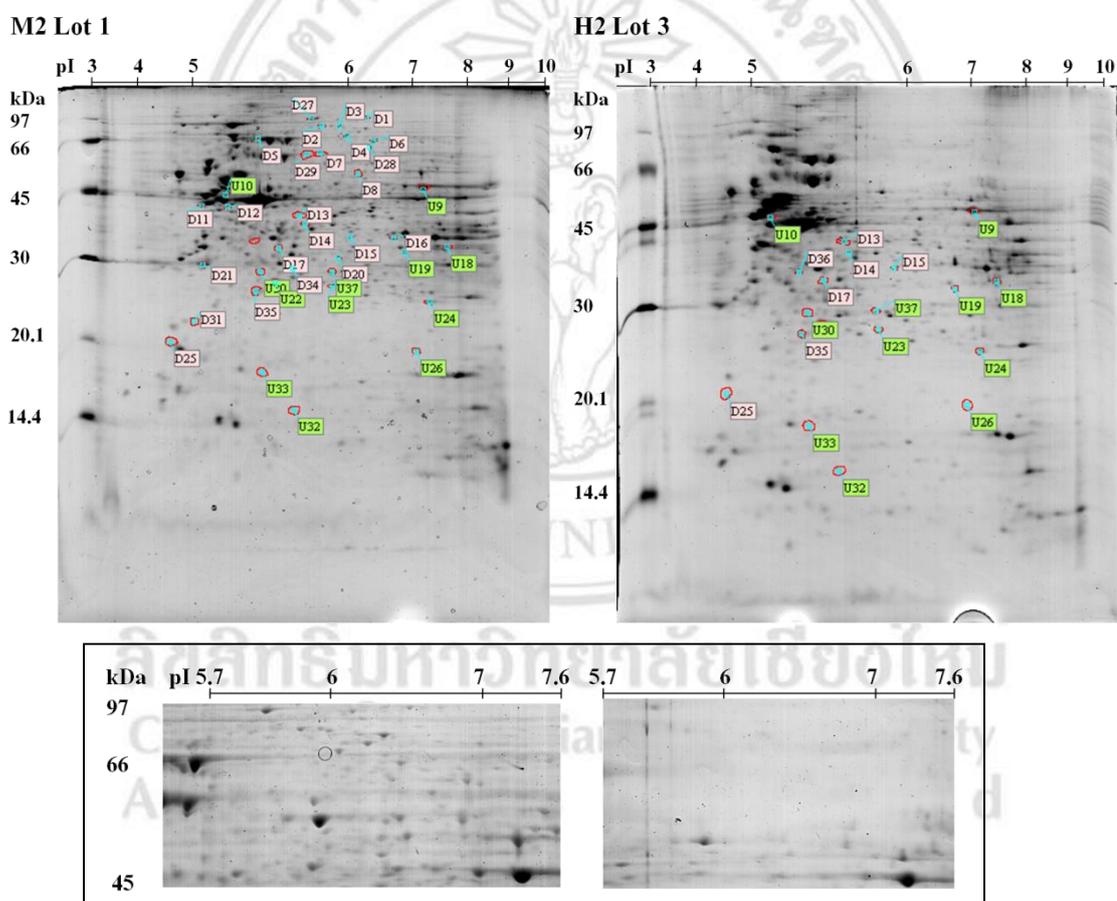
3.7 การวิเคราะห์รูปแบบและการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ

เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่มตามค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน เมื่อนำตัวอย่างโปรตีนปริมาณ 200 μg จากแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ดังวิธีการทดลองในขั้นตอน 2.10 โดยแต่ละตัวอย่างโปรตีนจะทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ได้ผลการทดลองเป็นภาพเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ทั้งหมด 24 ภาพ จากผลการทดลองพบว่ารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดของกลุ่มตัวอย่างโปรตีนทั้ง 2 กลุ่ม มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันระหว่างช่วง pI 4 ถึง 8 และช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 14.4 ถึง 97.0 kDa โดยในแต่ละภาพเจลของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ติดเชื้อไวรัสมีจำนวนจุดโปรตีนเฉลี่ยที่ 859 ± 241 และ 795 ± 93 จุด ตามลำดับ (ดังรูปที่ 3.11) ในการระบุจุดโปรตีนที่ปรากฏขึ้นบนภาพเจลทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดที่ต่างจากกัน จึงต้องวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของจุดโปรตีนต่างๆ บนภาพเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum software version 5.0 ดังวิธีการทดลองในขั้นตอน 2.11 ต่อไป



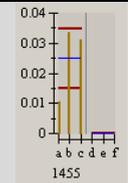
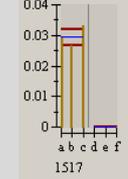
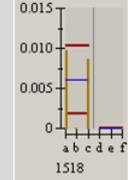
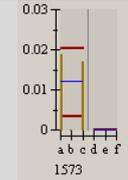
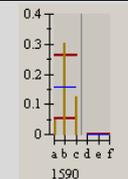
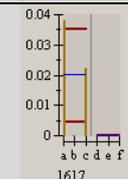
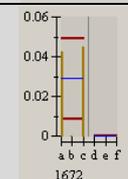
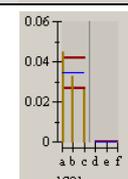
รูปที่ 3.11 เจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ของ (H)โปรตีนจากกลุ่ม Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิด
ที่ 2 เปรียบเทียบกับ (M)โปรตีนในกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อ

กำหนดให้ภาพเจล M2 Lot1 และ H2 Lot3 เป็นภาพเจลอ้างอิง (reference gel) ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ติดเชื้อไวรัสชนิดที่ 2 ตามลำดับ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับภาพเจลอื่น เนื่องจากภาพเจลทั้ง 2 แสดงจุดโปรตีนจำนวนมากที่สุดของแต่ละชุดทดลอง ซึ่งมีจำนวน 1,169 และ 932 จุดโปรตีนตามลำดับ จากนั้นจึงเปรียบเทียบจุดโปรตีนระหว่างกลุ่มภาพเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum software version 5.0 โดยพิจารณาจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างของ %Vol มากกว่า 1.2 เท่า จากการทดลองพบว่ามีจุดโปรตีนที่แสดงความแตกต่างของ % Vol ทั้งหมด 39 จุดโปรตีน โดยแบ่งออกเป็นจุดโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulate) จำนวน 14 จุด และระดับการแสดงออกลดลง (down-regulate) จำนวน 25 จุด ซึ่งมีค่า pI อยู่ในช่วงระหว่าง 4.44-7.24 และน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 15.3-98.5 ดังแสดงในรูปที่ 3.12 และตารางที่ 3.3

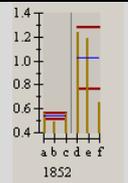
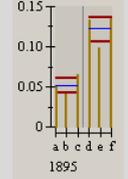
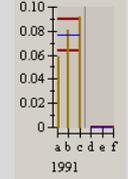
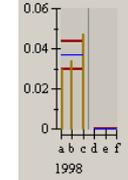
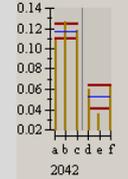
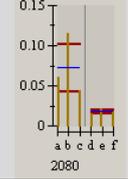
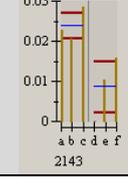
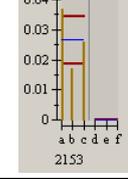


รูปที่ 3.12 เจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ แสดงรูปแบบของจุดโปรตีนของ Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคริบชนิดที่ 2 (H2 Lot2) ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อ (M2 Lot1) โดย (U) ฉลากสีเขียว และ (D) ฉลากสีชมพู ใช้ระบุตำแหน่งจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ

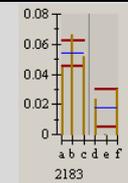
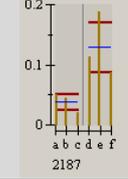
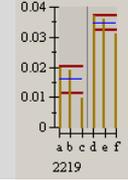
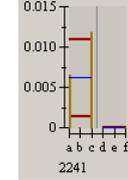
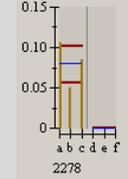
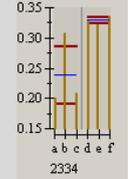
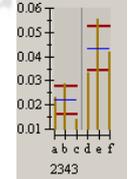
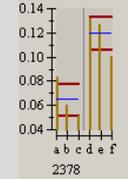
ตารางที่ 3.3 ค่า pI และมวลโมเลกุลของจุดโปรตีนใน Vero cell ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการ แสดงออก เมื่อติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2

Spots NO.	Spot ID	pI	molecular mass (Da)	Volume ratio (กลุ่มควบคุม:กลุ่มทดลอง)	Histogram
D1	1455	6.11 ± 0.04	$98,499 \pm 2,203$	1.00 : -1.00	
D2	1517	5.81 ± 0.03	$86,689 \pm 2,203$	1.00 : -1.00	
D3	1518	5.92 ± 0.03	$86,333 \pm 83$	1.00 : -1.00	
D4	1573	5.97 ± 0.03	$73,872 \pm 19$	1.00 : -1.00	
D5	1590	5.41 ± 0.04	$66,536 \pm 3,350$	1.00 : -1.00	
D6	1617	6.13 ± 0.04	$65,775 \pm 4,025$	1.00 : -1.00	
D7	1672	5.82 ± 0.02	$59,692 \pm 1,926$	1.00 : -1.00	
D8	1781	6.02 ± 0.03	$52,536 \pm 923$	1.00 : -1.00	

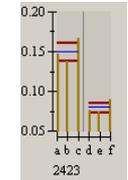
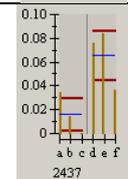
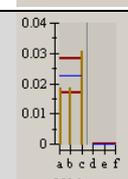
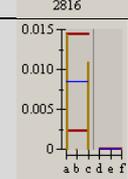
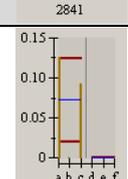
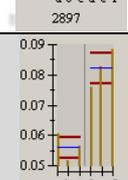
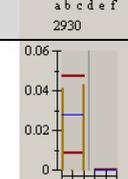
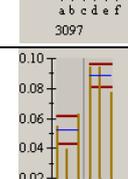
ตารางที่ 3.3 ค่า pI และมวลโมเลกุลของจุดโปรตีนใน Vero cell ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการ แสดงออก เมื่อติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (ต่อ)

Spots NO.	Spot ID	pI	molecular mass (Da)	Volume ratio (กลุ่มควบคุม:กลุ่มทดลอง)	Histogram
U9	1852	6.71 ± 0.07	$48,040 \pm 1,198$	-1.34 : 1.34	
U10	1895	5.12 ± 0.06	$46198 \pm 1,267$	-1.71 : 1.71	
D11	1991	4.87 ± 0.04	$42,130 \pm 1,140$	1.00 : -1.00	
D12	1998	5.14 ± 0.05	$41,840 \pm 945$	1.00 : -1.00	
D13	2042	5.65 ± 0.04	$41,025 \pm 1,136$	1.69 : -1.69	
D14	2080	5.69 ± 0.04	$38,936 \pm 1,136$	2.03 : -2.03	
D15	2143	5.96 ± 0.03	$35,614 \pm 970$	2.03 : -2.03	
D16	2153	6.30 ± 0.04	$35,060 \pm 1,192$	1.00 : -1.00	

ตารางที่ 3.3 ค่า pI และมวลโมเลกุลของจุดโปรตีนใน Vero cell ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการ แสดงออก เมื่อติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (ต่อ)

Spots NO.	Spot ID	pI	molecular mass (Da)	Volume ratio (กลุ่มควบคุม:กลุ่มทดลอง)	Histogram
D17	2183	5.54 ± 0.02	33,579 ± 986	1.46 : -1.46	
U18	2187	7.24 ± 0.12	33,350 ± 616	-1.67 : 1.67	
U19	2219	6.39 ± 0.04	32,106 ± 586	-1.55 : 1.55	
D20	2241	5.91 ± 0.03	31,106 ± 586	1.00 : -1.00	
D21	2278	4.86 ± 0.06	29,349 ± 506	1.00 : -1.00	
U22	2334	5.53 ± 0.02	27,475 ± 560	-1.12 : 1.12	
U23	2343	5.87 ± 0.03	26,859 ± 556	-1.22 : 1.22	
U24	2378	6.82 ± 0.09	24,486 ± 346	-1.35 : 1.35	

ตารางที่ 3.3 ค่า pI และมวลโมเลกุลของจุดโปรตีนใน Vero cell ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการ แสดงออก เมื่อติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (ต่อ)

Spots NO.	Spot ID	pI	molecular mass (Da)	Volume ratio (กลุ่มควบคุม:กลุ่มทดลอง)	Histogram
D25	2423	4.44 ± 0.04	$20,477 \pm 379$	1.59 : -1.59	
U26	2437	6.60 ± 0.07	$19,426 \pm 358$	-1.49 : 1.49	
D27	2816	5.75 ± 0.04	$97964 \pm 1,669$	1.00 : -1.00	
D28	2841	6.11 ± 0.04	$62,574 \pm 1,669$	1.00 : -1.00	
D29	2897	5.74 ± 0.02	$59,275 \pm 1,772$	1.00 : -1.00	
U30	2930	5.44 ± 0.04	$28,682 \pm 596$	-1.29 : 1.29	
D31	3097	4.79 ± 0.01	$22,373 \pm 769$	1.00 : -1.00	
U32	3113	5.63 ± 0.04	$15,356 \pm 308$	-1.30 : 1.30	

ตารางที่ 3.3 ค่า pI และมวลโมเลกุลของจุดโปรตีนใน Vero cell ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการ แสดงออก เมื่อติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (ต่อ)

Spots NO.	Spot ID	pI	molecular mass (Da)	Volume ratio (กลุ่มควบคุม:กลุ่มทดลอง)	Histogram
U33	3116	5.46 ± 0.04	$18,057 \pm 473$	-1.31 : 1.31	
D34	3168	5.62 ± 0.03	$29,509 \pm 1,088$	1.00 : -1.00	
D35	3225	5.39 ± 0.05	$26,239 \pm 528$	1.17 : -1.17	
D36	3244	5.38 ± 0.05	$34,692 \pm 906$	1.73 : -1.73	
U37	3278	5.86 ± 0.03	$28,956 \pm 635$	-1.51 : 1.51	
U38	558	6.26 ± 0.04	$41,313 \pm 205$	-1.00 : 1.00	
U39	635	5.30 ± 0.05	$37,101 \pm 531$	-1.00 : 1.00	

หมายเหตุ a b c คือ จุดโปรตีนของกลุ่มควบคุม
 d e f คือ จุดโปรตีนของกลุ่มทดลอง
 ช่องทึบ คือ จุดโปรตีนที่เลือกสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี

3.8 การระบุชนิดของโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคชนิดที่ 2

การวิเคราะห์หาชนิดและหน้าที่ของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรีและชีวสารสนเทศศาสตร์นั้นได้เลือกจุดโปรตีนจากภาพเจลทั้งหมด 26 จุด โดยพิจารณาจากขนาด ความคมชัด และระดับการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ซึ่งเป็นจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจำนวน 8 จุด และจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง 18 จุด เมื่อนำจุดโปรตีนทั้งหมด 26 จุด ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี และนำค่า peptide mass fingerprint (PMF) ที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูลของ NCBI และ Swissprot โดยใช้โปรแกรม MASCOT ได้ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.4 จากข้อมูลในตารางที่ 3.4 พบว่าสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 8 จุด จากทั้งหมด 26 จุด โดยจุดโปรตีนที่นำไปวิเคราะห์มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในฐานข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นจุดโปรตีนที่มีการแสดงเพิ่มขึ้นจำนวน 4 จุด ได้แก่ แอลฟาอีโนเลส (alpha enolase) ไวเมนติน (vimentin) มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) และ ยูบิกวิติน ไทโอเอสเทอร์เอส แอล 1 (Ubiquitin thioesterase L1) และเป็นจุดโปรตีนที่มีการแสดงลดลงจำนวน 4 จุด ได้แก่ เรติคูลโลคาลบิน-1 (reticulocalbin-1) แอนเนกซิน เอ4 (annexin A4) 14-3-3 เบต้า/แอลฟาโปรตีน (14-3-3 protein beta/alpha) และ ฟอสโฟกลูโคนแลกโตนเอส (6-phosphogluconolactonase) ดังแสดงในตารางที่ 3.5 ซึ่งเป็นโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านที่มีการแสดงออกทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.4 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคชนิดที่ 2 ในเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell

Spot NO.	Spot ID	Accession No. ¹	Name of protein	Taxonomy		Score ²	Cov ³	pI and molecular mass (kDa) ⁴			
								Theoretical		Experimental	
D1	1455	gi 11118618	pol protein	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	Virus	44	2	6.11	98.5	8.98	41.16
D2	1517	gi 496527714	envelope protein, partial	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	Virus	36	1	5.81	86.7	9.29	52.17
D3	1518	gi 390464985	period circadian protein homolog 2	<i>Callithrix jacchus</i>	Other primates	32	0	5.92	86.3	5.97	139.91
D4	1573	gi 544484430	uncharacterized protein LOC102123815	<i>Macaca fascicularis</i>	Other primates	36	2	5.97	73.9	9.40	39.13
D5	1590	gi 395734324	ventricular zone-expressed PH domain-containing protein	<i>Pongo abelii</i>	Other primates	33	1	5.41	66.5	8.49	65.97
D6	1617	gi 544484430	uncharacterized protein LOC102123815	<i>Macaca fascicularis</i>	Other primates	36	2	6.13	65.8	9.40	39.13
D7	1672	gi 544484430	uncharacterized protein LOC102123815	<i>Macaca fascicularis</i>	Other primates	36	2	5.82	69.7	9.40	39.13
D8	1781	NA	NA	-	-	-	-	6.02	52.5	-	-
U9	1852	gi 296206637	alpha-enolase isoform 1	<i>Callithrix jacchus</i>	Other primates	322	15	6.71	48.0	6.69	47.43
U10	1895	gi 62414289	vimentin	<i>Homo sapiens</i>	Other primates	239	13	5.12	46.2	5.06	53.68
D11	1991	gi 4506455	reticulocalbin-1 precursor	<i>Homo sapiens</i>	Other primates	89	4	4.87	42.1	4.86	38.87
D12	1998	NA	NA	-	-	-	-	5.14	41.84	-	-
D13	2042	gi 403255496	four-jointed box protein 1	<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	Other primates	35	1	5.65	41.0	9.28	56.97
D14	2080	gi 544484430	uncharacterized protein LOC102123815	<i>Macaca fascicularis</i>	Other primates	40	2	5.69	38.9	9.40	39.13
D15	2143	gi 395739696	LOW QUALITY PROTEIN: tRNA methyltransferase 112 homolog	<i>Pongo abelii</i>	Other primates	35	4	5.96	35.6	5.66	24.99

ตารางที่ 3.4 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรื้อรังชนิดที่ 2 ในเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell (ต่อ)

Spot NO.	Spot ID	Accession No. ¹	Name of protein	Taxonomy		Score ²	Cov ³	pI and molecular mass (kDa) ⁴			
								Theoretical		Experimental	
D16	2153	NA	NA	-	-	-	-	6.30	35.1	-	-
D17	2183	gi 114577902	annexin A4 isoform 5	<i>Pan troglodytes</i>	Other primates	57	3	5.54	33.6	5.84	36.26
U18	2187	gi 109066259	malate dehydrogenase, mitochondrial-like	<i>Macaca mulatta</i>	Other primates	99	8	7.24	33.4	8.03	40.38
U19	2219	gi 442736236	cathepsin	<i>Achaea janata granulovirus</i>	Virus	39	2	6.39	32.1	5.26	38.80
D20	2241	NA	NA	-	-	-	-	5.91	31.1	-	-
D21	2278	gi 4507949	14-3-3 protein beta/alpha	<i>Homo sapiens</i>	Other primates	58	4	4.86	29.3	4.76	28.18
U22	2334	gi 62287856	Ubiquitin thioesterase L1	<i>Macaca fascicularis</i>	Other primates	265	34	5.53	27.5	5.32	25.08
U23	2343	NA	NA	-	-	-	-	5.87	26.9	-	-
U24	2378	gi 13604688	pol protein	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	Virus	35	2	6.82	24.5	9.11	37.50
D25	2423	NA	NA	-	-	-	-	4.44	20.5	-	-
U26	2437	NA	NA	-	-	-	-	6.60	19.4	-	-
D27	2816	gi 544484430	uncharacterized protein LOC102123815	<i>Macaca fascicularis</i>	Other primates	37	2	5.75	98.0	9.40	38.56
D28	2841	gi 395757099	cell division cycle protein 27 homolog	<i>Pongo abelii</i>	Other primates	33	3	6.11	62.6	8.63	35.15
D29	2897	NA	NA	-	-	-	-	5.74	59.3	-	-
U30	2930	gi 66395216	ORF001	<i>Staphylococcus phage 187</i>	Virus	55	0	5.44	28.7	9.76	112.27
D31	3097	NA	NA	-	-	-	-	4.79	22.4	-	-
U32	3113	NA	NA	-	-	-	-	5.63	15.4	-	-
U33	3116	NA	NA	-	-	-	-	5.46	18.1	-	-

ตารางที่ 3.4 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคริมชนิดที่ 2 ในเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell (ต่อ)

Spot NO.	Spot ID	Accession No. ¹	Name of protein	Taxonomy		Score ²	Cov ³	pI and molecular mass (kDa) ⁴			
								Theoretical		Experimenta l	
D34	3168	gi 297276453	6-phosphogluconolactonase-like	<i>Macaca mulatta</i>	Other primates	80	16	5.62	29.5	6.44	24.23
D35	3225	gi 296212759	uncharacterized protein C12orf45	<i>Callithrix jacchus</i>	Other primates	44	9	5.39	26.2	4.91	20.23
D36	3244	gi 114553926	spermidine synthase isoform 3	<i>Pan troglodytes</i>	Other primates	33	3	5.38	34.7	5.42	34.37
U37	3278	NA	NA	-	-	-	-	5.86	29.0	-	-
U38	558	gi 283979019	envelope glycoprotein	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	Virus	36	25	6.26	41.3	11.51	3.98
U39	635	NA	NA	-	-	-	-	5.30	37.1	-	-

¹ Accession number ของโปรตีนจากฐานข้อมูลของ NCBI และ SwissProt

² MASCOT score ของโปรตีนที่สืบค้นได้ โดยคะแนนต่ำสุดที่ยอมรับได้ ($p < 0.05$) สำหรับการสืบค้นโปรตีนของไวรัสและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในฐานข้อมูล NCBI คือ 52 48 ตามลำดับ

³ ร้อยละของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล

⁴ ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนที่คำนวณได้จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในฐานข้อมูล (theoretical) และคำนวณจากตำแหน่งของจุดโปรตีนในภาพเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster (experimental)

NA คือ not analyzed

ตารางที่ 3.5 ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคริมนชนิดที่ 2 ในเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ในระยะแรกเริ่ม

Spot NO.	Spot ID	Accession No. ¹	Name of protein	Taxonomy		Score ¹	Cov ²	pI and molecular mass (kDa) ⁴			
								Theoretical		Experimental	
U9	1852	gi 296206637	alpha-enolase isoform 1	<i>Callithrix jacchus</i>	Other primates	322	15	6.71	48.0	6.69	47.43
U10	1895	gi 62414289	vimentin	<i>Homo sapiens</i>	Other primates	239	13	5.12	46.2	5.06	53.68
D11	1991	gi 4506455	reticulocalbin-1 precursor	<i>Homo sapiens</i>	Other primates	89	4	4.87	42.1	4.86	38.87
D17	2183	gi 114577902	annexin A4 isoform 5	<i>Pan troglodytes</i>	Other primates	57	3	5.54	33.6	5.84	36.26
U18	2187	gi 109066259	malate dehydrogenase, mitochondrial-like	<i>Macaca mulatta</i>	Other primates	99	8	7.24	33.4	8.03	40.38
D21	2278	gi 4507949	14-3-3 protein beta/alpha	<i>Homo sapiens</i>	Other primates	58	4	4.86	29.3	4.76	28.18
U22	2334	gi 62287856	Ubiquitin thioesterase L1	<i>Macaca fascicularis</i>	Other primates	265	34	5.53	27.5	5.32	25.08
D34	3168	gi 297276453	6-phosphogluconolactonase-like	<i>Macaca mulatta</i>	Other primates	80	16	5.62	29.5	6.44	24.23

¹ Accession number ของโปรตีนจากฐานข้อมูลของ NCBI และ SwissProt

² MASCOT score ของโปรตีนที่สืบค้นได้ โดยคะแนนต่ำสุดที่ยอมรับได้ ($p < 0.05$) สำหรับการสืบค้นโปรตีนของไวรัสและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในฐานข้อมูล NCBI คือ 52.48 ตามลำดับ

³ ร้อยละของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล

⁴ ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนที่คำนวณได้จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในฐานข้อมูล (theoretical) และคำนวณจากตำแหน่งของจุดโปรตีนในภาพเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster (experimental)