บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้านขณะติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ด้วยวิธีทางโปรติโอมิกส์ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เจ้าบ้าน เพื่ออธิบายถึงกลไกการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัส และเพื่อเข้าใจและได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชนิดของโปรตีนที่ตอบสนองต่อภาวะการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในระยะเริ่มแรก

การตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (HSV-2G) บนเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของอนุภาคไวรัสในการก่อโรคจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของ Vero cell (CPE) ภายหลังการติดเชื้อไวรัสเป็นเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 24 ชั่วโมง โดยให้ระดับความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงลักษณะ CPE จากไม่มีการเปลี่ยนแปลง (CPE 0+) ไปถึงมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าร้อยละ 90 ของ Vero cell ทั้งหมดในขวดเพาะเลี้ยง (CPE 4+) พบว่าหลังจากเซลล์เจ้าบ้านติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะ CPE บน Vero cell แสดงระดับความรุนแรงที่ CPE 1+ และเกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาอย่างรวดเร็ว ภายใน 24 ชั่วโมง อนุภาคไวรัสก่อโรคเริมจะเข้าทำลาย Vero cell ทั้งหมด ซึ่งแสดงระดับความรุนแรงที่ CPE 4+ จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่เลือกมาทดลองมีประสิทธิภาพในการก่อโรคบนเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell โดยมีปริมาณไวรัสเท่ากับ 41×10^{-7} PFU/ml หลังตรวจวัดด้วยวิธี plaque titration assay

ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโปรตีนถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีโปรติโอมิกส์ เพื่อให้ได้โปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ที่ต้องการศึกษา จึงเลือกวิธีการสกัดโปรตีนโดยตรงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (lysis buffer) เนื่องจากมีขั้นตอนการสกัดโปรตีนไม่ยุ่งยาก ไม่มีรุนแรง และมีความเหมาะสมต่อตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง (Görg, 2004) อย่างไรก็ตามสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดโปรตีนจากตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงมีหลากหลายชนิด และมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้จึงเลือกเปรียบเทียบการสกัดโปรตีนจาก Vero cell ที่

ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea สารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 และสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea ซึ่งมีความแตกต่างขององค์ประกอบของสารดีเทอร์เจน (CHAPS และ NP-40) และสารแปลงสภาพ (urea และ thiourea) เป็นหลัก เมื่อนำสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดไปใช้ในการสกัดโปรตีน พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea ให้ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้สูงที่สุดเท่ากับ 2.85 µg/µl เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์อื่นๆ เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด จึงนำโปรตีนไปแยกตามน้ำหนักโมเลกุลบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซีส พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงแถบโปรตีนที่มีรูปแบบคล้ายคลึงกันในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10-170 kDa (รูปที่ 3.3) เมื่อนำโปรตีนมาวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบสองมิติ ทำให้เห็นความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนที่ชัดเจนยิ่งขึ้น (รูปที่ 3.4) พบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 แสดงจำนวนจุดโปรตีนบนภาพเจลน้อยที่สุดเท่ากับ 159 จุด เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea ที่มีจำนวน 682 จุด และ NP-40-Urea-Thiourea ที่มีจำนวน 600 จุด และเพื่อวิเคราะห์ความแม่นยำของผลการทดลองซ้ำ จึงนำค่า %Vol ของจุดโปรตีนบนภาพเจลที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดมาเขียนกราฟการกระจาย ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Vol ของกลุ่มจุดโปรตีนจากการทดลอง 2 ซ้ำ (รูปที่ 3.6) จากกราฟพบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เข้าใกล้ 1 โดยโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ต่ำที่สุด (Corr = 0.864) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดจากสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea (Corr = 0.909) และ NP-40-Urea-Thiourea (Corr = 0.990) ตามลำดับ ทำให้ทราบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดมีความแม่นยำของการให้ผลการทดลองซ้ำ และความน่าเชื่อถือสูง

จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรตีน เพื่อใช้วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้าน ภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เนื่องจากมีคุณสมบัติละลายโปรตีนภายในเซลล์ได้สูง โดยสามารถแสดงจำนวนจุดโปรตีนบนเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ สูงที่สุด ทั้งนี้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซีส และการแยกโปรตีนแบบแบบสองมิติจะทำภายใต้สภาวะเสียสภาพของโปรตีน ดังนั้นการใส่สารแปลงสภาพจำพวก chaotropic agent เช่น urea และ thiourea ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์จึงช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจาก urea และ thiourea จะเข้าทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในสายพอลิเพปไทด์ของโปรตีนเหล่านั้นให้อยู่ในรูปโครงสร้างลำดับที่หนึ่ง และช่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลายส่วนของโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำให้ละลายได้ในสารละลาย (Musante *et al*.,1998; Rabilloud, 1998) นอกจากนั้นการเติมสารดีเทอร์เจนชนิดที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ (zwitterionic detergent) หรือดีเทอร์เจนชนิดไร้ประจุ (nonionic detergent) ภายในสารละลายบัฟเฟอร์มีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายโปรตีน เนื่องจากมีคุณสมบัติแอมฟิฟาติก (amphiphatic) สามารถเข้าไปแทรกตัวเพื่อลดแรงพันธะไฮโดรฟอบิก ที่จับกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อละลายโมเลกุลของโปรตีนและช่วยป้องกันการจับกันระหว่างโปรตีนเนื่องจากสภาพความมีขั่วต่ำ โดยทั่วไปดีเทอร์เจนที่นิยมใช้ในการสกัดโปรตีนจะเป็นดีเทอร์เจนชนิดไร้ประจุเช่น NP-40 และ Triton X-100 (O'Farrell, 1975) แต่ต่อมาพบว่าดีเทอร์เจนชนิดที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบเช่น CHAPS ที่ความเข้มข้นระหว่าง 2-4% (w/v) สามารถละลายโปรตีนได้หลากหลายและมีประสิทธิภาพในการละลายโปรตีนมากกว่าดีเทอร์เจนชนิดไร้ประจุ (Perdew *et al*., 1983) ดังนั้นสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ urea thiourea และ CHAPS จึงมีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเซลล์ และช่วยให้โปรตีนที่ได้แสดงรูปแบบโปรตีนที่ชัดเจน และมีความละเอียดสูงบนเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ

ปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการคือ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยต้องมีคุณสมบัติในการรักษาระดับ pH และ ออสโมลาริตี (osmolarity) ที่จำเป็นต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ รวมถึงสารอาหารและพลังงานที่จำเป็นต่อเซลล์ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว วิตามิน กรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมัน เปปไทด์ และโปรตีน อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์มักมีการเติมซีรัม (serum) ที่ได้จากการแข็งตัวของเลือดสัตว์ลงไปเพิ่มเติม เนื่องจากซีรัมมีองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์ เช่น ฮอร์โมน โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) และโปรตีน นอกจากนั้นยังเป็นสารให้ความหนืดป้องกันอันตรายกับเซลล์ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส และบัฟเฟอร์ ที่ช่วยรักษาสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต (Davis, 1994) เพื่อหาชนิดซีรัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell และเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในงานวิจัยนี้จึงเลือกเปรียบเทียบซีรัมทั้งหมด 3 ชนิด สำหรับใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย Iron supplemented calf serum Bovine calf serum และ Fetal bovine serum โดย Fetal bovine serum เป็นซีรัมที่นำมาจากตัวอ่อนในท้องแม่วัว ซึ่งนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ส่วน Bovine calf serum และ Iron supplemented calf serum เป็นซีรัมที่ได้จากลูกวัวอายุตั้งแต่ 2 สัปดาห์ ถึง 12 เดือน โดย Iron supplemented calf serum จะมีการเติมธาตุเหล็กและโปรตีนทรานสเฟอริน (transferrin) เพิ่มเติมเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ (กัลยาณี และ นวลอนงค์, 2550; Oberly *et al.,* 1990) เมื่อนำอาหารที่เตรียมจากซีรัมทั้ง 3 ชนิด มาเพาะเลี้ยง Vero cell เปรียบเทียบกัน พบว่าภายหลังการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 29 ชั่วโมง Vero cell ที่เลี้ยงด้วย Fetal Bovine Serum จะเพิ่มจำนวนเซลล์จนเต็มผิวภาชนะทั้งหมด ขณะที่ Vero cell ที่เลี้ยงใน Iron Supplemented Calf Serum และ Bovine Calf Serum ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์นานถึง 36 ชั่วโมง จึงจะเต็มผิวภาชนะ โดย Vero cell ในอาหารเพาะเลี้ยงจากซีรัมทั้ง 3 ชนิด แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน เซลล์มีลักษณะเป็นรูปกระสวยที่ยึดติดกันเป็นกลุ่มและเรียงตัวเป็นระนาบบนพื้นภาชนะ (รูปที่ 3.7) ซึ่งแสดงถึงการเจริญเติบโตปกติและมีสุขภาพดีของ Vero cell จากนั้นเพื่อศึกษาผลของชนิดของซีรัมที่ใช้เพาะเลี้ยง Vero cell ต่อการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จึงทำ plaque titration assay โดยเติมไวรัสลงบน Vero cell ที่เลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงจากซีรัมทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถสังเกตลักษณะของพลาคเป็นวงกลมขนาดใหญ่ได้ด้วยตาเปล่าใน Vero cell ที่เลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของการก่อโรคของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 แต่พลาคที่ปรากฏบน Vero cell ที่เลี้ยงด้วย Iron Supplemented Calf Serum มีลักษณะเป็นวงกลมขนาดเล็ก ขอบเขตไม่ชัดเจน คล้ายคลึงกับพลาคที่เกิดจากการก่อโรคด้วยไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ซึ่งมีระดับความรุนแรงที่ต่ำกว่าไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (รูปที่ 3.8) จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า Iron Supplemented Calf Serum ไม่เหมาะสมสำหรับใช้เพาะเลี้ยงไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ทั้งนี้อาจเป็นผลจากธาตุเหล็กที่มีปริมาณสูงเป็นองค์ประกอบในซีรัม มีส่วนช่วยในการยับยั้งการก่อโรคของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 โดยมีรายงานว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมทั้งชนิดที่ 1 และ 2 สามารถกลับมาแสดงอาการของโรคซ้ำได้แตกต่างกัน ตั้งแต่รุนแรงจนถึงไม่แสดงอาการของโรค โดยผู้ติดเชื้อที่มีแผลของโรคเริมปรากฏจะแสดงระดับของโปรตีนเฟอร์ริติน (ferritin) ต่ำกว่าผู้ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งโปรตีนเฟอร์ริตินเป็นแหล่งเก็บสะสมของธาตุเหล็กประมาณร้อยละ 27-30 ของร่างกาย ดังนั้นกลไกการยับยั้งการก่อโรคของไวรัสก่อโรคเริมจึงมีความสัมพันธ์กับระดับของธาตุเหล็กในร่างกาย (Lamey and Biagioni, 1995) โดยพบว่าไวรัสก่อโรคเริมใช้เอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (ribonucleotide reductase) สำหรับใช้ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไอออนธาตุเหล็กเป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) ในการเร่งปฏิกริยาของเอมไซม์ ในขณะที่ระบบภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ (ที-ลิมโฟไซท์ และ บี-ลิมโฟไซท์) ก็สามารถเข้าจับกับไอออนของธาตุเหล็ก เพื่อเข้าต่อสู้กับเชื้อไวรัสได้เช่นกัน (Gennero *et al.,* 2010) ดังนั้นหากมีปริมาณของธาตุเหล็กเพียงพอ ก็จะช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ให้สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมได้

จากผลการทดลองข้างต้นยังไม่อาจให้ข้อสรุปได้ว่าซีรัมชนิดใดระหว่าง Bovine Calf Serum และFetal Bovine Serum เป็นซีรัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell และเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เพื่อศึกษาผลของซีรัมที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อการแสดงออกรูปแบบโปรตีนทั้งหมดในเซลล์เจ้าบ้าน และพิจารณาเลือกชนิดของซีรัมที่เหมาะสมสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ จึงนำตัวอย่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วย Bovine Calf Serum และ Fetal Bovine Serum มาสกัดโปรตีนและวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ พบว่าโปรตีนจากตัวอย่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วย Fetal Bovine Serum แสดงจำนวนจุดโปรตีนบนภาพเจลเท่ากับ 682 จุด (รูปที่ 3.9) ซึ่งมากกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนจุดโปรตีนจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน Bovine Calf Serum (406 จุด) จากผลการทดลองข้างต้นจึงสรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจาก Fetal Bovine Serum เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell และเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เนื่องจาก Vero cell ที่เพาะเลี้ยงแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาที่มีการเจริญปกติ อัตราการเจริญเติบโตเหมาะสม โดยไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 สามารถเจริญภายในเซลล์และเกิดเป็นลักษณะของพลาคได้ชัดเจน เมื่อนำตัวอย่างเซลล์ไปสกัดโปรตีนและวิเคราะห์ด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ สามารถแสดงจำนวนจุดโปรตีนสูง และมีรูปแบบโปรตีนที่ชัดเจน ดังนั้นในการทดลองวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้าน ภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จึงเลือกใช้ Fetal Bovine Serum ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้าน ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม จึงทำการวิเคราะห์โปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ Vero cell ที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส ด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-โพลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซีส (รูปที่ 3.10) และวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ (รูปที่ 3.11) พบว่าโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 และ Vero cell ที่ไม่ได้รับเชื้อส่วนใหญ่มีการแสดงออกของโปรตีนอยู่ในช่วง pI 4 ถึง 8 และช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 14.4 ถึง 97.0 kDa โดยไม่พบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีน เมื่อวิเคราะห์จุดโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum software version 5.0 พบว่ามีโปรตีนทั้งหมด 39 จุด ภายในเซลล์เจ้าบ้านที่มีการแสดงออกเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 โดยแบ่งออกเป็นจุดโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นจำนวน 14 จุด และระดับการแสดงออกลดลงจำนวน 25 จุด ซึ่งมีค่า pI อยู่ในช่วงระหว่าง 4.44-7.24 และน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 15.3-98.5 (ตารางที่ 3.3) จากนั้นได้เลือกจุดโปรตีนทั้งหมด 26 จุด ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรีเพื่อระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีน เมื่อนำค่า peptide mass fingerprint (PMF) ที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูลของ NCBI และ Swissprot ด้วยโปรแกรม MASCOT แล้วพิจารณาเลือกจุดโปรตีนจากค่า MASCOT score ค่าร้อยละของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล และความใกล้เคียงของค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากฐานข้อมูลและการทดลอง พบว่าสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 8 จุด จากทั้งหมด 26 จุด (ตารางที่ 3.5) โดยเป็นจุดโปรตีนที่มีการแสดงเพิ่มขึ้นจำนวน 4 จุด ได้แก่ แอลฟาอีโนเลส (alpha enolase) ไวเมนติน (vimentin) มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) และ ยูบิควิติน ไทโอเอสเทอเรส แอล 1 (Ubiquitin thioesterase L1) และเป็นจุดโปรตีนที่มีการแสดงลดลงจำนวน4 จุด ได้แก่ เรติคูโลคอลบิน-1 (reticulocalbin-1) แอนเนอซิน เอ4 (annexin A4) 14-3-3 เบต้า/แอลฟาโปรตีน (14-3-3 protein beta/alpha) และ ฟอสโฟกลูโคโนแลคโทเนส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(6-phosphogluconolactonase) ซึ่งเป็นโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านที่มีการแสดงออกทั้งหมด โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) แอลฟาอีโนเลส (alpha enolase) เป็นโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 6.69 และน้ำหนักโมเลกุล 47.43 kDa เป็นโปรตีนที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิด *Callithrix jacchus* โดยโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ดังกล่าวเป็นหน่วยย่อยของอีนอลเลส (enolase) หรือเรียกอีกชื่อว่า ฟอสโฟไพรูเวตไฮเดรเตส (phosphopyruvate hydratase) ซึ่งจัดอยู่ในประเภทเมแทลโลเอนไซม์ (metalloenzyme) ที่ต้องอาศัยการจับของแมกนีเซียมไอออนเพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ โดยแอลฟาอีโนเลสจะเร่งปฏิกิริยาดึงน้ำออกจากโมเลกุลของ 2-ฟอสโฟกลีเซอเรต (2-phosphoglycerate) เพื่อเปลี่ยนไปเป็นฟอสโฟอีนอลไพรูเวต (phosphoenolpyruvate) ในวิถีไกลโคลิซีส (glycolysis pathway) ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่มีความสำคัญ ในขณะเดียวกันแอลฟาอีโนเลสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับเพื่อรักษาระบบน้ำตาลกลูโคส หรือเก็บสะสมไกลโคเจนไว้เป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ โดยพบว่าอีนอลเลสมีการแสดงออกอยู่ในทุกส่วนของเนื้อเยื่อที่เกิดกระบวนการหายใจ หากขาดแอลฟาอีนอลเลสจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต และการทนต่อสภาวะขาดออกซิเจนของเซลล์ (Kang *et al*., 2008; Sugahara *et al*.,1992) ซึ่งนอกจากนี้แอลฟาอีนอลเลสทำหน้าที่คล้ายรีเซปเตอร์ และตัวกระตุ้นบนผิวของเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) เซลล์เยื่อบุผิว และเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) โดยพบว่าแอลฟาอีนอลเลสที่ผิวของเซลล์สามารถเหนี่ยวนำการเข้าจับของแอนติบอดี หรือแม้แต่พลาสมิโนเจน (plasminogen) ซึ่งเป็นกลไกที่ใช้ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย ในกรณีเมื่อเนื้อเยื่อได้รับการบาดเจ็บ (Seweryn *et al*., 2007)

2) ไวเมนติน (vimentin) เป็นโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น มีค่า pI เท่ากับ 5.06 และน้ำหนักโมเลกุล 53.68 kDa พบในมนุษย์ (*Homo sapiens*) โดยโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนเส้นใยขนาดกลาง (intermediate filament protein) ระหว่างไมโครทูบูลและไมโครฟิลาเมนท์ ทำหน้าที่เป็นโครงร่างของเซลล์ (cytoskeleton) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งยึดเหนี่ยวออร์กาเนลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ นิวเคลียส เอ็นโดพลาสมิกเรติคิวลัม และไมโทคอนเดรีย ให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม ทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ นอกจากนั้นมีความสำคัญมากในเซลล์สัตว์ที่ไม่มีผนังเซลล์ และยังมีบทบาทเป็นโปรตีนสื่อสารระหว่างเซลล์ (Challa and Stefanovic, 2011)

3) มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) เป็นโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น มีค่า pI เท่ากับ 8.03 และน้ำหนักโมเลกุล 40.38 kDa พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิด *Macaca mulatta* โดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ให้อิเล็กตรอนแก่ NAD^+ เพื่อเปลี่ยนเป็น NADH ในวัฏจักรเครปส์ ซึ่งวัฏจักรนี้ประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้นตอนด้วยกัน แต่ละขั้นตอนอาศัยการเร่งของเอนไซม์ที่จำเพาะสำหรับแต่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละปฏิกิริยา แอซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) ที่เข้าสู่วัฏจักรเครปส์จะรวมกับออกซาโลแอซิเตตเกิดเป็นซิเตรต และทำปฏิกิริยาต่อไปอีก 8 ขั้นตอน จนได้ออกซาโลแอซิเตตกลับคืนมา สารที่เข้าทำปฏิกิริยาทุกตัว รวมทั้งผลิตผลของปฏิกิริยาทุกตัวในวัฏจักรเครปส์ล้วนเป็นกรดด้วยกันทั้งนั้น ปฏิกิริยาส่วนใหญ่ของวัฏจักรเครปส์เป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ทำให้ได้สารพลังงานสูง NADH และ $FADH_2$ออกมา ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสร้าง ATP โดยวิธีออกซิเดทีฟฟอสโฟริเลชันต่อไป วัฏจักรเครปส์เองสามารถสร้าง ATP โดยวิธีฟอสโฟริเลชันระดับซับสเตรตได้เช่นเดียวกับวิถีไกลโคลิซีส (Minárik *et al*.,2002)

4) ยูบิควิติน ไทโอเอสเทอเรส (Ubiquitin thioesterase) เป็นโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น มีค่า pI เท่ากับ 5.32 และน้ำหนักโมเลกุล 25.08 kDa พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิด (*Macaca fascicularis*)โดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase)ในการเข้าตัดโมเลกุลยูบิควิติน (ubiquitin) ที่ตำแหน่งปลาย C (C terminal) เพื่อแยกโปรตีนออกจากยูบิควิติน ดังนั้นจึงมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมระดับของโปรตีน โดยการป้องกันการย่อยสลายโปรตีน ผ่านวิถีโปรติโอโซมยูบิควิติน ubiquitin proteosome pathway (Mevissen *et al*., 2013)

5) เรติคูโลคอลบิน-1 (reticulocalbin-1) เป็นโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกลดลง มีค่า pI เท่ากับ 4.86 และน้ำหนักโมเลกุล 38.87 kDa พบในมนุษย์ (*Homo sapiens*) โดยโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่จับกับแคลเซียมไอออน (calcium binding proteins) เพื่อทำหน้าที่ควบคุมระดับแคลเซียมไอออนภายในรูเมนของเอ็นโดพลาสมิกเรติคิวลัม (Ozawa, 1995)

6) แอนเนอซิน เอ4 (annexin A4) จุดโปรตีนจุดที่ 17 (spot ID 2183) เป็นโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกลดลง มีค่า pI เท่ากับ 5.84 และน้ำหนักโมเลกุล 36.26 kDa พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิด *Pan troglodytes* และเป็นโปรตีนประเภทฟอสโฟลิพิดที่เชื่อมต่อกับโปรตีน (phospholipid binding proteins) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารผ่านเอกโซไซโทซิส (exocytosis) และวิถีเอนโดไซโทซิส (endocytosis pathways) โดยการช่วยหลอมรวมชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (Satoh *et al*., 1997)

7) 14-3-3 เบต้า/แอลฟาโปรตีน (14-3-3 protein beta/alpha) เป็นโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกลดลง มีค่า pI เท่ากับ 4.76 และน้ำหนักโมเลกุล 28.18 kDa พบในมนุษย์ (*Homo sapiens*) โดยโปรตีนทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณ (signaling protein) และจะมีการแสดงออกของโปรตีนนี้ในเซลล์ยูคาริโอต โดยสามารถเข้าจับกับโมเลกุลส่งสัญญาณอื่นๆ ได้หลายชนิด ได้แก่ kinases phosphatases และ transmembrane receptors (Jang *et al*., 2009)

8) 6-ฟอสโฟกลูโคโนแลคโทเนส (6-phosphogluconolactonase) เป็นโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกลดลง มีค่า pI เท่ากับ 5.32 และน้ำหนักโมเลกุล 25.08 kDa พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Macaca mulatta เป็นเอนไซม์ในวิถีเพนโตสฟอสเฟต pentose phosphate pathway ทำหน้าที่เปลี่ยน 6-ฟอสโฟกลูโคโนแลคโทน (6-phosphogluconolactone) ไปเป็น 6-ฟอสโฟกลูโคโนเนท (6-phospho gluconate) (Collard *et al*., 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved