

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
ABSTRACT	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฐ
รายการอักษรย่อและสัญลักษณ์	ด
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ไวรัสก่อโรคเริม	3
1.3.1 ประวัติความเป็นมาของไวรัสก่อโรคเริม	3
1.3.2 โครงสร้างของไวรัสก่อโรคเริม	4
1.3.3 การเพิ่มจำนวนของไวรัสก่อโรคเริม	5
1.3.4 การติดต่อและอาการทางคลินิก	17
1.3.5 ระบาดวิทยา	19
1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford	21
1.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์	23
1.5.1 การสกัดโปรตีน	23
1.5.2 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสองมิติ	25
1.5.3 การวิเคราะห์โมเลกุลเปปไทด์ด้วยเทคนิคเมสสเปกโตรเมตรี	28
1.5.4 การระบุชนิดโปรตีน	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 2 วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย	33
2.1 อุปกรณ์เครื่องมือ สารเคมี และเชื้อไวรัส	33
2.1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์	33
2.1.2 สารเคมี	35
2.1.3 เชื้อไวรัสก่อโรคเริมและเซลล์เพาะเลี้ยง	37
2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัสก่อโรคเริม	38
2.2.1 การเพาะเลี้ยง American monkey kidney cell (Vero cell)	38
2.2.2 การเพิ่มปริมาณไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2	39
2.3 การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Hemacytometer	40
2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างเซลล์บรรจุลงใน chamber	41
2.3.2 การนับจำนวนเซลล์และการคำนวณความเข้มข้นของเซลล์	42
2.4 การหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay	43
2.5 การเลือกชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัด โปรตีน	45
2.6 การหาชนิดของซีรัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน และไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2	45
2.6.1 การเปรียบเทียบลักษณะสัญญาณวิทยายานอกของเซลล์	45
2.6.2 การเปรียบเทียบการเกาะติด และการเจริญเติบโตของไวรัสด้วย plaque titration assay	45
2.6.3 การเปรียบเทียบการแสดงออกของ โปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ	46
2.7 การสกัดและเตรียมโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม	46
2.7.1 การเก็บเซลล์	47
2.7.2 การสกัดโปรตีน	47
2.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9 การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	48
2.9.1 การเตรียมเจลพอลิอะครีลาไมด์สำหรับทำ SDS-PAGE	49
2.9.2 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	50
2.10 การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ	51
2.10.1 การแยกโปรตีนมิติที่ 1 ด้วยวิธี IEF	51
2.10.2 การแยกโปรตีนมิติที่ 2 ด้วยวิธี SDS-PAGE	53
2.11 การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงผลของโปรตีนด้วย ImageMaster™ 2D Platinum software version 5.0	56
2.12 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความแตกต่างของการแสดงออกในตัวอย่างโปรตีน	63
2.13 การกำหนดค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของจุดโปรตีนบนภาพเจลแบบ 2 มิติ	67
2.14 การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต	70
2.15 การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรีและชีวสารสนเทศ	72
บทที่ 3 ผลการทดลอง	75
3.1 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสก่อโรคริมนชนิดที่ 2 ในเซลล์เจ้าบ้าน	75
3.2 การหาปริมาณไวรัสก่อโรคริมนชนิดที่ 2 ด้วยวิธี plaque titration assay	76
3.3 การเปรียบเทียบชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคริมนชนิดที่ 2	77
3.3.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้	77
3.3.2 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนบน SDS-PAGE	78
3.3.3 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนบนเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ	79
3.4 การเปรียบเทียบชนิดของซีรัมที่เหมาะสมสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสก่อโรคริมนชนิดที่ 2 บนเซลล์เจ้าบ้าน	84
3.4.1 การวิเคราะห์ลักษณะสัญญาณวิทยายานอกของเซลล์	84
3.4.2 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของไวรัสด้วยวิธี plaque titration assay	85
3.4.3 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนบนเจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ	86

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 การเตรียมตัวอย่าง โปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคริมชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม	88
3.6 การวิเคราะห์รูปแบบ โปรตีนด้วย SDS-PAGE	89
3.7 การวิเคราะห์รูปแบบและการแสดงออกของ โปรตีนด้วยวิธีการแยกโปรตีน แบบ 2 มิติ	90
3.8 การระบุชนิดของ โปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรครชนิดที่ 2	98
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	103
เอกสารอ้างอิง	111
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	125
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส	128
ภาคผนวก ค การคำนวณหาจำนวนเซลล์และปริมาณไวรัส	137
ภาคผนวก ง การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างโปรตีน	141
ประวัติผู้เขียน	144

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 ซอฟต์แวร์สำหรับสืบค้นชนิดโปรตีนจากฐานข้อมูล	32
ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน	48
ตารางที่ 3.1 ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด	78
ตารางที่ 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm (A_{595}) และความเข้มข้นโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายตัวอย่าง ในแต่ละชุดการทดลอง	89
ตารางที่ 3.3 ค่า pI และมวลโมเลกุลของจุดโปรตีนใน Vero cell ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก เมื่อติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2	93
ตารางที่ 3.4 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ในเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell	99
ตารางที่ 3.5 ชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 2 ในเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ในระยะแรกเริ่ม	102

สารบัญภาพ

	หน้า	
รูปที่ 1.1	โครงสร้างจีโนมของไวรัสก่อโรคเริม	4
รูปที่ 1.2	โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัสก่อโรคเริม	5
รูปที่ 1.3	การเข้าเกาะติดเซลล์เจ้าบ้านของเชื้อไวรัสก่อโรคเริม โดยอาศัยการทำงานของไกลโคโปรตีนบนชั้นเอ็นVELOP	6
รูปที่ 1.4	การหลอมรวมระหว่างส่วนเอ็นVELOPกับเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อนำเชื้อไวรัสก่อโรคเริมเข้าสู่เซลล์	7
รูปที่ 1.5	การควบคุมการแสดงออกของยีน (IE gene E gene Lgene) โดยอาศัยการทำงานของโปรตีน VP16 ICP0 ICP4 ICP22 และICP27	10
รูปที่ 1.6	ลำดับขั้นการแสดงออกของยีนในวงจรชีวิตของไวรัสก่อโรคเริม	11
รูปที่ 1.7	การจำลองดีเอ็นเอของไวรัสก่อโรคเริมแบบ Rolling circle replication	13
รูปที่ 1.8	การประกอบโครงสร้างนิวคลีโอแคปซิดของไวรัส	14
รูปที่ 1.9	การประกอบเป็นอนุภาคไวรัสก่อโรคเริมที่สมบูรณ์และเคลื่อนที่ออกจากเซลล์	15
รูปที่ 1.10	วงจรชีวิตของไวรัสก่อโรคเริมในเซลล์เจ้าบ้าน	16
รูปที่ 1.11	การแฝงตัวในปมประสาทของเชื้อไวรัสก่อโรคเริม	17
รูปที่ 1.12	การติดไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่บริเวณอวัยวะเพศ	19
รูปที่ 1.13	ปฏิกิริยาในการตรวจหาปริมาณโปรตีนของวิธี Bradford	22
รูปที่ 1.14	การเปลี่ยนแปลงประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีน ตามค่า pH ของสภาพแวดล้อมที่โปรตีนละลาย และกราฟแสดงประจุรวมของโปรตีนที่ค่า pH ต่างๆ	26
รูปที่ 1.15	การแยกโปรตีนด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งทำให้โปรตีนแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านแต่ละค่า pH จนถึงค่า pI ของตัวเอง	27
รูปที่ 1.16	การเข้าจับของ SDS กับโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนมีรูปร่างเหยียดตรงและมีประจุลบ	27
รูปที่ 1.17	การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสองมิติ โดยมิติที่หนึ่งโปรตีนถูกแยกด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง และแยกต่อในมิติที่ 2 ด้วยเทคนิคไซโตเคมีโคเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า	
รูปที่ 1.18	องค์ประกอบของเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี	29
รูปที่ 1.19	หลักการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค label (isotope) LC-MS และเทคนิค label free LC-MS	30
รูปที่ 1.20	การแตกตัวของสารตัวอย่างเป็นไอออน เมื่อใช้ MALDI เป็นส่วนผลิตไอออน	31
รูปที่ 2.1	การเจริญเต็มผิวภาชนะ (monolayer) ของ Vero cell และการแยกตัวออกจากกันของ Vero cell เมื่อเติม 0.1% Trypsin-EDTA	38
รูปที่ 2.2	รูปร่างลักษณะของ Vero cell ปกติ และรูปร่างลักษณะของ Vero cell ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง	40
รูปที่ 2.3	องค์ประกอบของ hemacytometer	41
รูปที่ 2.4	ภาพถ่ายภายใน chamber ของ hemacytometer แสดงตารางพื้นที่สำหรับนับเซลล์	42
รูปที่ 2.5	แสดงตัวอย่างการนับเซลล์บนพื้นที่นับเซลล์ B	42
รูปที่ 2.6	การเจือจางไวรัสแบบ 10 เท่าลำดับส่วน เพื่อใช้ในการทำ plaque titration assay โดยใช้ Vero cell	44
รูปที่ 2.7	ลักษณะของพลาควาที่เกิดขึ้นจากไวรัสหลังข้อมลิด้วยคริสตอลไวโอเลต	46
รูปที่ 2.8	แผนภาพแสดงการแบ่งกลุ่มการทดลองเพื่อศึกษารูปแบบโปรตีนใน Vero cell ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรคริมชนิดที่ 2 ในระยะแรกเริ่ม	48
รูปที่ 2.9	องค์ประกอบของเครื่อง miniVE vertical electrophoresis	48
รูปที่ 2.10	หน้าจอแสดงการตั้งค่าจ่ายกระแสไฟเข้าระบบบิเล็กโทรโฟริซิสของเครื่องจ่ายกระแสไฟ	50
รูปที่ 2.11	ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง	51
รูปที่ 2.12	การวาง IPG strip holder บนพื้นที่อิเล็กโทรดของเครื่อง Ettan IPGphor II	52
รูปที่ 2.13	การติดตั้งอุปกรณ์หล่อเจลของเครื่อง SE-600 Ruby	54
รูปที่ 2.14	การประกอบเครื่อง SE-600 Ruby vertical electrophoresis	55
รูปที่ 2.15	ขั้นตอนการสร้างชุดการทดลอง	57
รูปที่ 2.16	แบบแผนการวิเคราะห์ที่สร้างจากภาพเจล	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า	
รูปที่ 2.17	หน้าต่างของ Gel Display Setting	58
รูปที่ 2.18	การตั้งค่า Detection parameter เพื่อตรวจจับจุดโปรตีนภายในแผ่นเจล	59
รูปที่ 2.19	รูปร่างของจุดโปรตีนในลักษณะต่างๆ	60
รูปที่ 2.20	การแสดงตำแหน่ง landmark ที่ 46 ในแต่ละภาพเจล	61
รูปที่ 2.21	การจับคู่จุดโปรตีนของกลุ่มเจล A และ B	62
รูปที่ 2.22	การซ้อนทับกันของภาพเจลกับภาพเจลแม่แบบ โดยแสดงเส้นจับคู่ระหว่างจุดโปรตีนจากภาพเจลทั้งสอง	63
รูปที่ 2.23	หน้าต่างรายงานการวิเคราะห์	64
รูปที่ 2.24	หน้าต่างของ Refine by Value	64
รูปที่ 2.25	การคำนวณค่า Student t test ด้วย Student t-Value Calculator	66
รูปที่ 2.26	ฮิสโตแกรมของจุดโปรตีน ID 2930 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Vol และประเภทของแผ่นเจลต่างๆ	66
รูปที่ 2.27	ภาพ 3 มิติของจุดตัวอย่างโปรตีน	67
รูปที่ 2.28	ภาพขยายเจลแสดงเส้นแบ่งแวนอนและแนวตั้ง	67
รูปที่ 2.29	แผนภาพแสดงการกำหนดตำแหน่งเริ่มและสิ้นสุดของค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลบนภาพเจลแบบ 2 มิติ	68
รูปที่ 2.30	ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลที่แสดงบนภาพเจลแบบ 2 มิติ	69
รูปที่ 2.31	ภาพเจลแบบ 2 มิติที่ผ่านการกำหนดค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล	69
รูปที่ 2.32	พื้นที่ระบุข้อมูลของ TagIdent Tool เพื่อใช้วิเคราะห์ชนิดของโปรตีน	70
รูปที่ 2.33	หน้าเว็บไซต์ และพื้นที่ระบุข้อมูลของ World-2DPAGE Repository	71
รูปที่ 2.34	หน้าจอของโปรแกรม MASCOT สำหรับสืบค้นชนิดโปรตีนจากค่า PMF	72
รูปที่ 2.35	ผลการสืบค้นค่า PMF ในโปรแกรม MASCOT เพื่อหาชนิดของจุดโปรตีน	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

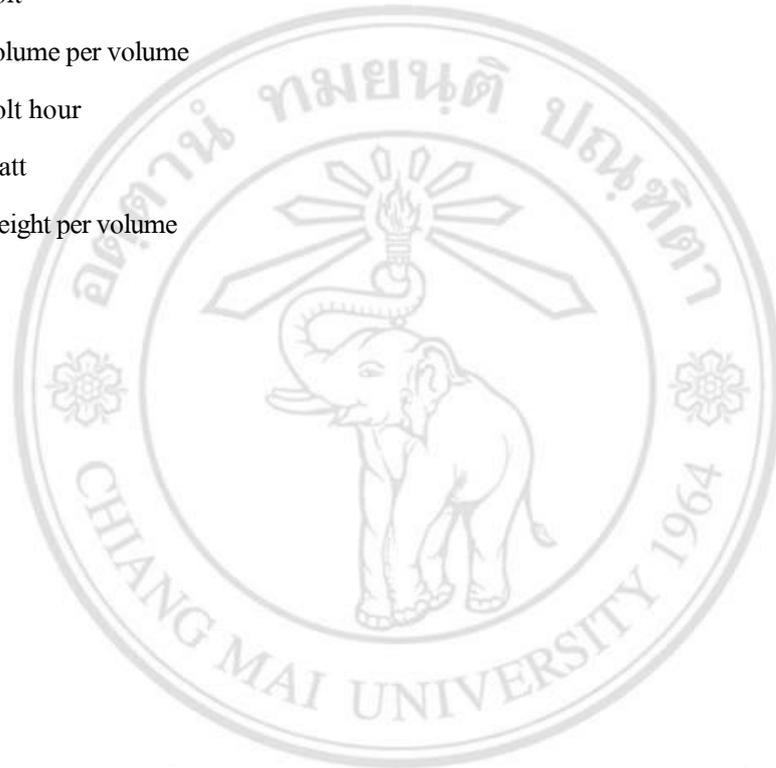
	หน้า	
รูปที่ 3.1	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของ Vero cell ภายหลังจากติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เป็นเวลา 0 6 12 และ 24 ชั่วโมง	75
รูปที่ 3.2	ลักษณะพลาสมบน Vero cell ที่เกิดขึ้นหลังจากการก่อโรคด้วยไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เมื่อเจือจางไวรัสตั้งแต่ 1×10^{-1} ถึง 1×10^{-6} เท่า	77
รูปที่ 3.3	12.5% SDS-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ	79
รูปที่ 3.4	เจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ของรูปแบบโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2	80
รูปที่ 3.5	แผนภาพแสดงการเปรียบเทียบจำนวนจุดโปรตีนของ Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ภายหลังจากสกัดโดยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ	81
รูปที่ 3.6	กราฟการกระจายแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Vol ของจุดโปรตีนบนภาพเจล 2 การทดลองซ้ำที่สกัดโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ	82
รูปที่ 3.7	ลักษณะสัณฐานวิทยาของ Vero cell ที่เจริญเติบโตใน growth medium ชนิดต่างๆ	85
รูปที่ 3.8	ลักษณะพลาสมของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 บน Vero cell ซึ่งเพาะเลี้ยงใน growth medium ชนิดต่างๆ	86
รูปที่ 3.9	เจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ของตัวอย่างโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่เพาะเลี้ยงใน growth medium ชนิดต่างๆ	87
รูปที่ 3.10	12.5% SDS-PAGE ของโปรตีนจาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เปรียบเทียบกับโปรตีนจาก Vero cell ที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2	90
รูปที่ 3.11	เจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ ของโปรตีนจากกลุ่ม Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เปรียบเทียบกับโปรตีนในกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อ	91
รูปที่ 3.12	เจลแยกโปรตีนแบบ 2 มิติ แสดงรูปแบบของจุดโปรตีนของ Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อ	92

รายการอักษรย่อและสัญลักษณ์

A	Absorbance
BSA	Bovine serum albumin
C	Degree Celsius
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propane sulfonate
cm	Centimetre
cm ²	Square centimetre
CPE	Cytopathic effect
Da	Dalton
DAN	Diazoacetylnorleucine methyl ester
2-DE	Two-dimensional gel electrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
E	Early
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ESI	Electrospray ionization
g	Gram
µg	Microgram
Hr	Hour
HSV	Herpes simplex virus
IAA	Iodoacetamide
ICP	Infected cell polypeptide
IE	Immediate early
IEF	Isoelectric focusing

IPG	Immobilized pH gradients
kDa	Kilodalton
μ A	Microampere
μ l	Microlitre
L	Late
LC	Liquid chromatography
LMW	Low molecular weight
M	Molarity
mA	Milliampere
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
mg	Milligram
ml	Millilitre
mm	Millimetre
mm ²	Square millimetre
mm ³	Cubic millimetre
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Mass spectrometry
MW	Molecular weight
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NL	Non-linear
NP-40	Octyl phenoxy polyethoxyethanol
Ori	Origin of DNA replication
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFU	Plaque forming unit
pI	Isoelectric point
PMF	Peptide mass fingerprint
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
psi	Pound per square inch
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TOF	Time-of-flight
UL	Unique long region
US	Unique short region
UV	Ultraviolet
V	Volt
v/v	Volume per volume
Vhr	Volt hour
W	Watt
w/v	Weight per volume



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved