



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์และการ
พัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อพิษของไอออนโลหะ
โดยวิธีโปรตีโอมิกส์

โดย ผศ.ดร.พัชรี อิศรางกูร ณ อยุธยา

ธันวาคม 2556
เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

สัญญาเลขที่
MRG5480205

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์และการ
พัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อพิษของไอออนโลหะ
โดยวิธีโปรตีนโอมิกส์

ผู้วิจัย ผศ.ดร.พัชรี อิศรางกูร ณ อยุธยา
สังกัด ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code: สัญญาเลขที่ MRG5480205
(รหัสโครงการ)

**Project Title: Investigation of cellular responses and development of biomarkers for
toxic metal ions by proteomics**

(ชื่อโครงการ) การศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์และการพัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อพิษของไอออนโลหะ
โดยวิธีโปรตีโอมิกส์

Investigator: Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya
Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Science, Thammasat
University

(ชื่อนักวิจัย): ผศ.ดร.พัชรี อิศรางกูร ณ อยุธยา
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail Address: pujonoy@hotmail.com

Project Period: 2 ปี
(ระยะเวลาโครงการ)

Abstract (บทคัดย่อ)

Mechanisms of cadmium ions toxicity in microorganisms and their responses have successfully been investigated. Proteomic profiles of *Escherichia coli* (*E. coli*) upon exposure to 0.2 mM cadmium ions were studied. In parallel, engineered cells expressing polyhistidine on the outer membrane or cytoplasmic polyhistidine were applied to prove the roles of reduction of metal uptake or intracellular metal complexation. Changes of aconitase, elongation factor-Ts, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein-disulfide isomerase were found in both control and engineered *E. coli*. Meanwhile, expression of polyhistidine on the membrane mediated down-regulation of H⁺-transporting ATPase, succinate dehydrogenase and glycerol kinase and up-regulation of Mn-SOD. Expression of cytoplasmic polyhistidine led to decreasing of Mn-SOD, succinyl-Co-A synthetase and outer membrane protein together with increased expression of glycerol kinase. Such adaptations were concluded and further compared with environmental bacteria. Bacteria from 41 sites were isolated and identified by MALDI-Biotypers. Four kinds of bacteria demonstrated high resistance against cadmium ions as follows: *Morganella morganii* (1.6 mM) ~ *Pseudomonas aeruginosa* (1.6 mM) > *Enterobacter cloacae* (0.8 mM) ~ *Aeromonas hydrophila* (0.8 mM). *Enterobacter cloacae* was selected to study the mechanism of cells in response to cadmium. Growth curves and cadmium accumulation capability of the isolated bacteria were subsequently investigated and compared with the control laboratory strains. Intracellular cadmium contents after 1-hour incubation with subtoxic doses of cadmium ions at 0.02 and 0.2 mM were determined by atomic absorption spectrophotometry. Cadmium accumulations in environmental strains were higher than those of the lab stain. 2-DE showed that many pathways e.g protein folding, protein synthesis, energy metabolism pathway and transportation were accounted for bacterial adaptation in response to cadmium. Up-regulation of the cadmium-binding proteins were observed in the highest cadmium-accumulated strain of *Enterobacter cloacae* EN01. Moreover, metal-responsive proteins were also identified and proposed as candidate biomarkers for metal monitoring and bioremediation in the future.

Keywords: cadmium stress, polyhistidine, proteomics, metal complexation, outer membrane protein, environmental bacteria

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีในการวิเคราะห์บทบาทความเป็นพิษของไอออนโลหะแคดเมียมที่มีต่อจุลชีพ รวมถึงการศึกษากการตอบสนองของจุลชีพที่มีต่อไอออนเหล่านั้นโดยอาศัยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ โดยโมเดลที่ใช้ในการศึกษาในระยะแรก คือ การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) ในสถานะที่มีไอออนของโลหะแคดเมียมความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ นอกจากนั้น เพื่อเป็นการศึกษาเปรียบเทียบกลไกการตอบสนองในเชิงลึก ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้มีการใช้เซลล์ *E. coli* ที่มีการดัดแปลงให้แสดงออกเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการจับกับไอออนโลหะที่มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีน ทั้งในลักษณะที่แสดงออกบนผิวเซลล์ (Outer membrane protein) หรือแสดงออกในไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic protein) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการดักจับไอออนไว้บริเวณผิวเซลล์เพื่อลดการผ่านเข้าสู่เซลล์ หรือใช้ในการจับกับไอออนของโลหะในลักษณะสารประกอบเชิงซ้อนภายในไซโตพลาสซึมตามลำดับ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิด อาทิ aconitase, elongation factor-Ts, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และ protein-disulfide isomerase ในเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ดัดแปลง ซึ่งพบว่า เซลล์ที่มีเปปไทด์ฮิสทีดีนบนผิวเซลล์ลดการแสดงออกของโปรตีนที่ชื่อว่า H⁺-transporting ATPase, succinate dehydrogenase และ glycerol kinase และมีการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ Mn-SOD ในขณะที่ พบมีการลดการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดนี้ ร่วมกับ succinyl-Co-A synthetase และ outer membrane protein และมีการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ glycerol kinase ในเซลล์ที่แสดงออกเปปไทด์ในไซโตพลาสซึม โดยกระบวนการปรับตัวและการตอบสนองของเซลล์เหล่านี้ถูกวิเคราะห์และสรุปผลเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบกับ การตอบสนองของแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม โดยในงานวิจัยชิ้นนี้มีการแยกแบคทีเรียจาก 41 แหล่งและชนิดของแบคทีเรียเหล่านี้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย MALDI-Biotypers ซึ่งพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิดที่มีความสามารถในการทนต่อพิษของไอออนแคดเมียมในปริมาณที่สูง ดังนี้ *Morganella morganii* และ *Pseudomonas aeruginosa* ทนได้ถึง 1.6 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ *Enterobacter cloacae* และ *Aeromonas hydrophila* ทนได้ที่ 0.8 มิลลิโมลาร์ และเมื่อทำการนำเชื้อ *Enterobacter cloacae* มาศึกษาการตอบสนองต่อโลหะแคดเมียมในรายละเอียดทั้งการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโต และศักยภาพในการดูดซับไอออนโลหะแคดเมียม (Cadmium accumulation) โดยเป็นการวิเคราะห์ปริมาณไอออนของแคดเมียมที่ถูกดูดซับและเก็บไว้ในเซลล์โดยใช้เทคนิค Atomic Absorption Spectrophotometry ภายหลังเวลา 1 ชั่วโมงในสถานะที่มีความเข้มข้นของไอออนแคดเมียมที่ 0.02 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ จากผลการวิจัยพบว่า ศักยภาพในการดูดซับโลหะของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมสูงกว่าเชื้อที่เป็นสายพันธุ์ควบคุม และจากผลการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์แสดงให้เห็นว่า มีกลไกหลายชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการม้วนตัว (protein folding), protein synthesis, energy metabolism pathway และ transportation นอกจากนั้น ยังพบมีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการจับกับไอออนโลหะแคดเมียม (Cadmium-binding proteins) ในเชื้อ *Enterobacter cloacae* สายพันธุ์ EN01 ที่มีความสามารถในการดูดซับโลหะได้สูงที่สุด ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ถูกนำมาวิเคราะห์จำแนกชนิดเพื่อประเมินศักยภาพและความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ ในลักษณะเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) การปนเปื้อนไอออนของโลหะ รวมไปถึงการใช้เซลล์เหล่านี้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมในอนาคตต่อไป

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัญหาการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมนับเป็นปัญหาระดับโลกที่ทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้เนื่องมาจาก ผลพวงของการขยายตัวทางเศรษฐกิจ ทำให้เกิดการเร่งกระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรม และการใช้สารเคมีต่างๆ ในการเกษตรกรรม ส่งผลทำให้เกิดของเสียสะสมในปริมาณที่มาก และยากต่อการกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการหลุดรอดออกสู่สิ่งแวดล้อมในรูปแบบต่างๆ และก่อให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมตามมาอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

การสะสมของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมในปริมาณที่มากเกินระดับมาตรฐาน ส่งผลกระทบที่รุนแรงต่อระบบนิเวศวิทยา ซึ่งก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในภาพรวม และมีผลต่อห่วงโซ่อาหารในทุกๆ ระดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูง เช่น โลหะแคดเมียม ซึ่งการได้รับและสัมผัสในปริมาณเพียงเล็กน้อย ก็ส่งผลต่อการเกิดพยาธิสภาพในอวัยวะต่างๆ ได้มากมาย อาทิ พิษต่อตับและไต พิษต่อระบบประสาท และสมอง ความผิดปกติในเมตาบอลิซึมต่างๆ และการเกิดมะเร็งในร่างกายมนุษย์ ในขณะที่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์น้ำ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ก็ได้รับผลความเป็นพิษในรูปแบบที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และมีผลต่ออัตราการอยู่รอดในธรรมชาติ

หากสิ่งมีชีวิตได้รับหรือสัมผัสกับไอออนของโลหะ ร่างกาย หรือเซลล์จะมีกลไกในการปรับตัวเพื่อต่อต้านพิษหรือลดความเป็นพิษของโลหะในรูปแบบหรือกลไกต่างๆ กัน อาทิ 1) การลดการนำเข้าไอออนของโลหะเข้าสู่เซลล์ (Reduce uptake), 2) การจับจำเพาะกับโลหะโดยสารหรือชีวโมเลกุลต่างๆ (Metal complexation หรือ sequestration) เพื่อทำให้ไอออนโลหะอยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษลดลง, 3) การเร่งผลักดันการนำไอออนของโลหะออกจากเซลล์ (Metal efflux) และ 4) การเปลี่ยนสถานะของไอออนโลหะบางชนิดโดยเอนไซม์ในเซลล์ (Enzymatic transformation) แต่อย่างไรก็ตาม กลไกการปรับตัวต่างๆ เหล่านี้ ตลอดจนการเลือกใช้กลไกใดในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ยังไม่เป็นที่เข้าใจที่แน่ชัด

ในขณะที่ การตรวจติดตามการปนเปื้อนของไอออนโลหะในสิ่งแวดล้อมนั้น วิธีมาตรฐานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ก็คือ Atomic absorption spectroscopy ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ก็ต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาแพง ต้องการทักษะและความเชี่ยวชาญในการดำเนินการ และต้องมีกระบวนการเตรียมตัวอย่างที่ดีก่อนการวิเคราะห์ ดังนั้น จึงมีความพยายามในการพัฒนาเครื่องมือและวิธีการอื่นๆ เพื่อช่วยในการตรวจติดตามปริมาณโลหะ อาทิ การใช้เทคนิคทางไบโอเซ็นเซอร์ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโลหะ การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรมในการสร้างเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการตอบสนอง และส่งสัญญาณทางชีวภาพในกรณีที่มีไอออนโลหะอยู่ การผลิตสารโมเลกุลเล็ก (Small molecules) ที่สามารถส่งสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์หรือสัญญาณอื่นๆ ในสถานะที่จับหรือทำปฏิกิริยากับไอออนโลหะ เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้ ก็จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะเพื่อช่วยในการตรวจวิเคราะห์สัญญาณต่างๆ ที่เกิดขึ้น

ดังนั้น ในโครงการวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่สำคัญในการศึกษาวิจัยเพื่อค้นคว้าหาองค์ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อพิษของไอออนโลหะแคดเมียมและอื่นๆ โดยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ โดยโมเดลเซลล์ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเป็นเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่เป็นเซลล์ปกติ และเซลล์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อศึกษาเปรียบเทียบการปรับตัวและการเลือกใช้กลไกพื้นฐานต่างๆ ในการต่อต้านต่อไอออนโลหะ ซึ่งองค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการตอบสนองของเซลล์ต้นแบบนี้ จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการยกระดับความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดพิษและกลไกการปรับตัวทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตได้ดีขึ้น นอกจากนั้น องค์ความรู้ที่เกิดขึ้นยังเป็นข้อมูลที่สำคัญ ที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบกับ การตอบสนองของเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม อาทิ *Pseudomonas* spp. ที่อาจนำไปสู่การบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของการปนเปื้อนในแหล่งต่างๆ และนำไปสู่การสร้างเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับไอออนโลหะเพื่อการบำบัดสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนั้น หากสามารถวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ที่มีศักยภาพในการติดตามการปนเปื้อนของไอออนโลหะได้นั้น ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นประโยชน์ที่สำคัญ ต่อการสร้าง ความแข็งแกร่งทางวิชาการ และการวิจัยของประเทศ ตลอดจนเป็นแนวทางการผลักดันให้มีการประยุกต์ใช้ฐานความรู้ และเทคโนโลยีที่เหมาะสมบนฐานการวิจัยเพื่อพึ่งพาตนเอง อันจะนำไปสู่แนวทางออกของการพัฒนาประเทศอย่างยั่งยืน

5. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 5.1 เพื่อศึกษากลไกการตอบสนองระดับเซลล์ต่อการเกิดพิษของไอออนโลหะแคดเมียมและอื่นๆ โดยอาศัยเทคนิคโปรตีโอมิกส์
- 5.2 เพื่อศึกษาและพัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) เพื่อการติดตามการปนเปื้อนของไอออนโลหะ

6. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิง

ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของไอออนของโลหะ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถทนต่อพิษของโลหะในหลากหลายรูปแบบ ทั้งนี้จากงานวิจัยนับแต่อดีตที่ผ่านมา (1) มีสมมติฐานว่า กลไกหลักในการทนต่อฤทธิ์ของไอออนโลหะในเซลล์ยูคาริโอตนั้น คือ การสร้างชีวโมเลกุลหรือสารที่จะมาจับกับโลหะ (Metal complexation หรือ sequestration) เพื่อทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเป็นพิษลดลง อาทิ มนุษย์และสัตว์สร้างโปรตีน Metallothionein เพื่อใช้ในการกำจัดพิษของไอออนโลหะ (2, 3) พืชทนต่อพิษของโลหะโดยการสร้างชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติจับกับโลหะที่เรียกว่า Phytochelatin (4) สำหรับกระบวนการป้องกันพิษในยีสต์อาศัยการสังเคราะห์สารที่มีองค์ประกอบของซัลเฟอร์ และกลูตาไธโอน (5) ในขณะที่สำหรับเซลล์โปรคาริโอตนั้น จะมีการใช้กลไกการเร่งผลักดันการนำไอออนโลหะออกจากเซลล์ (Metal efflux) (6-8) แต่อย่างไรก็ตาม กลไกการทนต่อพิษของโลหะที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และการปรับตัวของเซลล์หลายชนิดเพื่อให้อยู่รอดโดยอาศัยกลไกบางอย่างอาจมีความคล้ายคลึงกัน เนื่องจาก มีหลักฐานพบว่า การใช้กลูตาไธโอนในการจับกับโลหะก็เป็นกลไกที่มีความสำคัญในการทนต่อพิษของโลหะในแบคทีเรีย *Escherichia coli* (9) นอกจากนั้น เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดใช้กระบวนการสร้าง Biofilm เป็นกลไกในการป้องกันพิษจากโลหะ (10) ในทางตรงกันข้าม มีรายงานว่า พืชใช้กลไกในการขนส่งโลหะออกจากเซลล์ในลักษณะคล้ายกับแบคทีเรีย (11) ดังนั้น จึงยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนเกี่ยวกับผลกระทบหรือฤทธิ์ของไอออนโลหะโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีต่อกลไกการตอบสนองทางชีววิทยาระดับเซลล์

โปรตีโอมิกส์ (Proteomics) เป็นศาสตร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์และอธิบายการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ ในสภาวะที่มีสารหรือปัจจัยที่มีผลกระทบในเชิงระบบที่เกิดขึ้นกับเซลล์ ทำให้เซลล์ต้องปรับตัวหรือสนองตอบต่อสารหรือปัจจัยต่างๆ เหล่านั้น ซึ่งโปรตีโอมิกส์ก็เป็นเครื่องมือที่สำคัญที่ถูกนำมาใช้ในการอธิบายผลหรือการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อไอออนของโลหะในพืช (12) ใน *Cyanobacteria* (13) ในแบคทีเรีย (14) ในเซลล์สัตว์ (15) และในเซลล์ของมนุษย์ (16) เป็นต้น โดยในแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากงานวิจัยที่ผ่านมา จะพบว่า เซลล์แบคทีเรียจะมีการตอบสนองต่อพิษของไอออนโลหะแคดเมียมโดยมีการลดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่มีความสำคัญในเมตาบอลิซึม และการสร้างพลังงาน อาทิ Aconitase, Malic enzyme และ Enolase เป็นต้น และยังมีผลต่อการลดของกระบวนการขนส่งแบบใช้พลังงาน (Active transport) และกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis machinery) ในขณะที่ จะมีการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไรโบฟลาวิน (Riboflavin biosynthesis) ซึ่งการตอบสนองของเซลล์ต่อพิษของไอออนโลหะสังกะสีนั้นจะคล้ายคลึงกัน (14, 17) สำหรับการตอบสนองต่อไอออนโลหะทองแดงและปรอท นั้น จะมีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเข้า-ออกของโลหะ (14) สำหรับการทนต่อไอออนโลหะซิลเวอร์นั้น จะพบมีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ควบคุม Chemiosmotic efflux (18) ในการควบคุมสมดุลของไอออนโลหะเหล็กในเซลล์นั้น มีผลโดยตรงจากการควบคุมของ Outer membrane protein (19) จากข้อมูลที่เกี่ยวข้องดังกล่าว จะเห็นว่า นอกเหนือไปจากสมมติฐานที่ว่า เซลล์โปรคาริโอต จะมีกลไกการทนต่อพิษของโลหะโดยการเพิ่มประสิทธิภาพการขับออกแล้วนั้น จากการศึกษาวิจัยโดยใช้โมเดลเซลล์ *Escherichia coli* บ่งชี้ได้ว่า ยังมีการควบคุมการตอบสนองภายในไซโทพลาสซึมอีกหลายระบบ รวมทั้งบทบาทของโปรตีนบริเวณผิวเซลล์ก็ยังคงมีความสำคัญอีกด้วย ดังนั้น จุดเด่นที่สำคัญของโครงการวิจัยนี้ คือ ในเฟสแรก จะเป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ในการศึกษาบทบาทการตอบสนองต่อไอออนโลหะทั้งในเซลล์ปกติ และเซลล์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งมีการควบคุมการแสดงออกสายเปปไทด์ฮิสทีดีนซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับไอออนโลหะในไซโทพลาสซึม และเป็นปัจจัยที่ช่วยในการควบคุมสมดุลของโลหะภายในเซลล์ (20) เปรียบเทียบกับการแสดงออกของสายเปปไทด์ฮิสทีดีนบนผิวเซลล์เมมเบรน ซึ่งมีผลในการช่วยจับกับโลหะไว้ภายนอกและควบคุมปริมาณการนำเข้าสู่เซลล์ (20) เพื่อเป็นการศึกษาเปรียบเทียบ และช่วยยืนยันการปรับตัวโดยใช้กลไกต่างๆ ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น เพื่อเป็นการหาข้อสรุป และรูปแบบที่เซลล์ใช้ในการตอบสนองต่อโลหะเพื่อเป็นข้อมูล และความรู้เชิงลึกระดับโมเลกุล เพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นๆ ต่อไป และที่สำคัญข้อมูลนี้ ยังสามารถนำไปใช้ในการดัดแปลงเซลล์ให้มีคุณสมบัติในการดูดซับไอออนโลหะ (Bioremediation หรือ Bioaccumulation) เพื่อการประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมได้ในอนาคต

นอกจากนั้น เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) เพื่อเป็นตัวตรวจติดตาม เพื่อบ่งชี้การปรากฏของสารหรือปัจจัยที่มีผลกระทบดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม หรือแหล่งที่มีการปนเปื้อนต่างๆ ได้ โดยตัวอย่างงานวิจัยที่ผ่านมา บ่งชี้ว่า โปรตีโอมิกส์มีศักยภาพในการบ่งชี้ถึงความแตกต่างของรูปแบบโปรตีน (Protein profiles) ในหนูที่อยู่ในอาศัยในแหล่งที่มีมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม และต้องปรับตัวเพื่อเผชิญกับสภาวะ Oxidative stress

แบบเรื้อรังได้ ในขณะที่เทคนิคนี้ สามารถนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการหา Biomarkers จากในชีรั่มของมนุษย์ที่ต้องสัมผัสหรือได้รับผลกระทบจากสารหนู และตะกั่ว นอกจากนั้น ยังสามารถนำไปวิเคราะห์และทดสอบในพืช อาทิ หนุ่ยาทะเลจากแหล่งต่างๆ เพื่อวิเคราะห์สภาวะการปนเปื้อนจากโลหะได้อีกด้วย (21-23) แต่อย่างไรก็ตาม การนำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อไอออนของโลหะยังมีไม่มากนัก ทำให้การนำมาประยุกต์ใช้จริงยังไม่สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น ในเฟสที่ 2 ของโครงการวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่การศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองต่อไอออนของโลหะในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม อาทิ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นการง่ายต่อการสำรวจและเก็บข้อมูล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หากมีการขยายผลโดยให้ชุมชนสามารถเข้ามามีส่วนร่วมในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในระยะยาว ซึ่งเป้าหมายที่สำคัญในเฟสที่ 2 นี้ จะเป็นการวิเคราะห์รูปแบบการตอบสนอง และระดับความรุนแรงต่างๆ เมื่อเทียบกับข้อมูลในเฟสที่ 1 และเป็นการวิเคราะห์หา Biomarkers เพื่อใช้ในการบ่งชี้ถึงสภาวะการเปลี่ยนแปลงทางสิ่งแวดล้อมในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Nies DH. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid*. 1992 Jan;27(1):17-28.
2. Lee JD, Wu SM, Lu LY, Yang YT, Jeng SY. Cadmium concentration and metallothionein expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia of humans. *J Formos Med Assoc*. 2009 Jul;108(7):554-9.
3. Ghedira J, Jebali J, Bouraoui Z, Banni M, Guerbej H, Boussetta H. Metallothionein and metal levels in liver, gills and kidney of *Sparus aurata* exposed to sublethal doses of cadmium and copper. *Fish Physiol Biochem*. 2008 Dec 11; [E-Publication ahead of print].
4. Brautigam A, Schaumlöffel D, Krauss GJ, Wesenberg D. Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides-a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Anal Bioanal Chem*. 2009 Jul 10; [E-Publication ahead of print].
5. Thorsen M, Perrone GG, Kristiansson E, Traini M, Ye T, Dawes IW, et al. Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2009;10(105):105.
6. Silver S. Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene*. 1996 Nov 7;179(1):9-19.
7. Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 2003 Jun;27(2-3):313-39.
8. Silver S, Phung le T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005 Dec;32(11-12):587-605.
9. Helbig K, Bleuel C, Krauss GJ, Nies DH. Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2008 Aug;190(15):5431-8.

10. Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Dec;5(12):928-38.
11. Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma JF. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell.* 2009 Feb;21(2):655-67.
12. Kieffer P, Schroder P, Dommès J, Hoffmann L, Renaut J, Hausman JF. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J Proteomics.* 2009 Apr 13;72(3):379-96.
13. Castielli O, De la Cerda B, Navarro JA, Hervas M, De la Rosa MA. Proteomic analyses of the response of cyanobacteria to different stress conditions. *FEBS Lett.* 2009 Jun 5;583(11):1753-8.
14. Isarankura-Na-Ayudhya P, Isarankura-Na-Ayudhya C, Treeratanapaiboon L, Kasikun K, Thipkeaw K, Prachayasittikul V. Proteomic profiling of *Escherichia coli* in response to heavy metals stress. *Eur J Sci Res.* 2009 Feb 20;25:679-88.
15. Lei T, He QY, Cai Z, Zhou Y, Wang YL, Si LS, et al. Proteomic analysis of chromium cytotoxicity in cultured rat lung epithelial cells. *Proteomics.* 2008 Jun;8(12):2420-9.
16. Raghunathan VK, Grant MH, Ellis EM. Changes in protein expression associated with chronic in vitro exposure of hexavalent chromium to osteoblasts and monocytes: A proteomic approach. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Feb 20; [E-Publication ahead of print].
17. Easton JA, Thompson P, Crowder MW. Time-dependent translational response of *E. coli* to excess Zn(II). *J Biomol Tech.* 2006 Dec;17(5):303-7.
18. Lok CN, Ho CM, Chen R, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Proteomic identification of the Cus system as a major determinant of constitutive *Escherichia coli* silver resistance of chromosomal origin. *J Proteome Res.* 2008 Jun;7(6):2351-6.
19. Lin XM, Wu LN, Li H, Wang SY, Peng XX. Downregulation of Tsx and OmpW and upregulation of OmpX are required for iron homeostasis in *Escherichia coli*. *J Proteome Res.* 2008 Mar;7(3):1235-43.
20. Isarankura-Na-Ayudhya C, Suwanwong Y, Boonpangrak S, Kiatfuengfoo R, Prachayasittikul V. Co-expression of zinc binding motif and GFP as a cellular indicator of metal ions mobility. *Int J Biol Sci.* 2005;1(4):146-51.
21. Bucalossi D, Leonzio C, Casini S, Fossi MC, Marsili L, Ancora S, et al. Application of a suite of biomarkers in *Posidonia oceanica* (L.) delile to assess the ecotoxicological impact on the coastal environment. *Mar Environ Res.* 2006 Jul;62 Suppl(31):S327-31.
22. Zhai R, Su S, Lu X, Liao R, Ge X, He M, et al. Proteomic profiling in the sera of workers occupationally exposed to arsenic and lead: identification of potential biomarkers. *Biometals.* 2005 Dec;18(6):603-13.

23. Montes-Nieto R, Fuentes-Almagro CA, Bonilla-Valverde D, Prieto-Alamo MJ, Jurado J, Carrascal M, et al. Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *Proteomics*. 2007 Dec;7(23):4376-87.

รายงานผลวิจัย

เนื้อหางานวิจัยประกอบด้วย วัตถุประสงค์ วิธีทดลอง ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากลไกการตอบสนองระดับเซลล์ต่อการเกิดพิษของไอออนโลหะแคดเมียมและอื่นๆ โดยอาศัยเทคนิคโปรตีโอมิกส์
2. เพื่อศึกษาและพัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) เพื่อการติดตามการปนเปื้อนของไอออนโลหะ

ตามวัตถุประสงค์ได้ระบุระเบียบวิธีวิจัยแบ่งเป็น 2 เฟส

เฟสที่ 1 การศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อพิษของโลหะ

รายละเอียดตามเอกสารแนบที่ 1 เป็น Manuscript อยู่ระหว่างการพิจารณาตอบรับในวารสารนานาชาติชื่อ BIOMETALS จึงขอกล่าวโดยสรุปดังนี้

สรุปผลการวิจัยและวิจารณ์

โครงการวิจัยนี้จะใช้โมเดลเซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ TG1 ที่เป็นเซลล์ปกติ และเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีนที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม และอยู่บนผิวเซลล์เมมเบรน เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าการมี Metal-binding region เพื่อจับจำเพาะกับโลหะภายในเซลล์ หรือการจับโลหะไว้ที่ผิวเซลล์ เพื่อให้ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกลไกการตอบสนองต่อโลหะแตกต่างไปจากเซลล์ปกติอย่างไร

การคัดเลือกเซลล์ที่นำมาทดสอบ

โดยในโครงการวิจัยนี้ จะใช้โมเดลเซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ TG1 ที่เป็นเซลล์ปกติและเซลล์ *E.coli* ที่นำมาทดสอบรวม ได้แก่

1. TG1 host เป็น control
2. TG1/pEV208 เป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่มี vector เป็น control ของข้อ 3
3. TG1/pEVZn เป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่สามารถแสดงโปรตีนลูกผสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีน ที่อยู่บนผิวเซลล์เมมเบรน
4. TG1/pUC19 เป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่มี vector เป็น control ของข้อ 5
5. TG1/pGFP เป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่มี vector เป็น control ของข้อ 6

6. TG1/pHis6GFP เป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่สามารถแสดงโปรตีนลูกผสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีน ที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม

เซลล์ *E. coli* ทั้ง 6 ชนิดถูกนำมาทดสอบหาค่าหาความเข้มข้นของ CdCl_2 ที่มากที่สุดที่ไม่ทำให้เชื้อหยุดเจริญเติบโตคือ 0.2 mM ดังนั้น เซลล์ *E. coli* ทั้ง 6 ชนิดถูกเลี้ยงใน 0.2 mM ศึกษาหลักการปรับตัวภายใต้ความเป็นพิษของแคดเมียมโดย two-dimensional electrophoresis โปรตีนถูกแยกชนิดด้วยเทคนิค 2-DE (pI 3-10, 13 cm.) แผ่นเจลถูกย้อมด้วย Coomassie Blue จุดโปรตีนที่มีความแตกต่างกันที่สังเกตได้ชัดเจน ถูกตัดนำไปวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF ผลการทดลองพบว่า โปรตีนลูกผสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีน ที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม ของ *E. coli* (TG1/pHis6GFP) จะช่วยให้ลดความเป็นพิษของแคดเมียมภายในเซลล์ โดยจะไม่พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิด oxidative stress ซึ่งจะมีประสิทธิภาพดีกว่า โปรตีนลูกผสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีน ที่อยู่บนผิวเซลล์เมมเบรน ของ *E. coli* (TG1/pEVZn)

เฟสที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบกลไกการปรับตัวในสภาวะที่มีโลหะของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม และการพัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) เพื่อการติดตามการปนเปื้อนของไอออนโลหะในสิ่งแวดล้อม

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่างดินและน้ำ

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งที่มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนของโลหะหนักและจากแหล่งที่ไม่มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนของโลหะหนัก การเก็บตัวอย่างดิน เก็บที่ความลึกประมาณ 5-20 เซนติเมตร จากผิวดิน โดยใช้ช้อนปราศจากเชื้อตักดิน และเก็บในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ ประมาณแหล่งละ 50 g การเก็บตัวอย่างน้ำ เก็บที่ความลึกประมาณ 5-30 เซนติเมตร จากผิวน้ำ โดยหันปากภาชนะไปในทิศทางที่น้ำไหลมา ประมาณแหล่งละ 15 mL

การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจากดินและน้ำ

สำหรับตัวอย่างจากดิน ให้น้ำดิน 50 g ผสมใน Sterile Distilled Water 50 mL จนเป็นเนื้อเดียวกัน สำหรับตัวอย่างน้ำ ให้น้ำ 15 mL กรองผ่านผ้ากอซที่สะอาดเพื่อเอาเศษตะไคร่น้ำออก ปั่นแยกชั้นเชื้อแบคทีเรียออกจากตัวอย่างดินและน้ำ โดยใช้ความเร็วรอบที่ 4000 rpm, 25°C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วน Supernatant ที่ให้เหลือเพียงส่วนของ Middle Layer คือประมาณ 0.5 mL เหนือชั้นดินที่อัดแน่น (Packed Soil) โดยบริเวณนี้จะพบว่าเป็นบริเวณที่พบเชื้อแบคทีเรียอยู่มากที่สุด นำส่วนของ Middle Layer มา Streak ลงบน LB Agar

การตรวจคัดกรองความทนต่อโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรีย (Screening Test)

ทำการ Spread โลหะ Cadmium ที่ความเข้มข้น 0.4 mM และ/หรือ 0.8 mM หนักลงบน LB Agar จนแห้งสนิททั่ว plate เพื่อใช้เป็น Screening Plate ทำการ Spot เชื้อแบคทีเรียส่วนของ Middle Layer มา Streak ลงบน LB Agar ลงใน Control Plate และ Screening Plate แล้วนำไป Incubate ที่ 37°C, Overnight บันทึกผล

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ

นำเชื้อที่สามารถทนต่อโลหะแคดเมียม 0.8 mM มา streak ลงบน LB agar ที่ทำการ isolate เชื้อบันทึกลักษณะโคโลนีทั้งหมด นำไปย้อมสีแกรม บันทึกรูปร่างและการติดสีนำเชื้อไปทำ Biochemical test ได้แก่ Oxidase test, Triple sugar iron agar (TSI), Pseudo P และ Pseudo F และยืนยันผลด้วย การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้โดยเครื่อง Mass spectrometry (Biotyper)

การทดสอบความทนต่อโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรีย (Screening Test) ที่แยกแล้ว

ทำการ Spread โลหะ Cadmium หรืออื่นๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆลงบน LB Agar จนแห้งสนิททั่ว plate เพื่อใช้เป็น Screening Plate ทำการ Spot เชื้อแบคทีเรียที่ปรับ OD. เท่ากับ 0.1 ปริมาตร 4 μ l ลงบน LB Agar ลงใน Control Plate และ Screening Plate แล้วนำไป Incubate ที่ 37°C 18 ชั่วโมง บันทึกผล

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย ในภาวะที่มีโลหะหนัก

นำโคโลนีของเชื้อที่เลือก มา subculture ลงบน LB broth นำไป incubate 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4 นำเชื้อมาแบ่งใส่ Flask จำนวน 2 flasks (Control, Cd) ในอัตราส่วน 1:100 หลอดที่มี LB broth 2 ml เพื่อใช้ในการวัดค่าดูดกลืนแสงต่อไป นำ flask และหลอดทดลองไป incubate 37°C 3-4 ชั่วโมง ด้วย incubator shaker นำหลอดเชื้อที่มี LB broth 2 ml มาวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 nm เมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ให้เติม CdCl₂ ลงไปในแต่ละ flask ซึ่งจะมีความเข้มข้นสุดท้ายของ Cd เป็น 0.8 mM นำไป incubate 37°C เป็นเวลา 13-14 ชั่วโมง นำไปปั่นเพื่อเก็บเซลล์

การเตรียมเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ Atomic Absorption spectroscopy

นำเชื้อจาก flask เทลงใน centrifuge tube (15 ml) นำไปปั่นที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant ทิ้งไป ปั่นล้างเซลล์ด้วย Tris-sucrose ปริมาตร 10 ml จำนวน 5 ครั้ง โดยปั่นที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant ทิ้งไป หลังการปั่นล้างครั้งสุดท้ายให้ ผสมสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น transfer ใส่ microcentrifuge tube นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant ทิ้งไป เติม tris-sucrose ปริมาตร 1 ml ลงไปใน microcentrifuge tube นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant เก็บไว้ตรวจเช็ค cadmium ที่เหลืออยู่เหลือแต่ตะกอน นำมาปรับให้ความเข้มข้นเท่ากันคือที่ OD เท่ากับ 1 ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant ใส่ nitric acid 1 ml 18 ชั่วโมง

การเตรียมเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ Proteomics

เชื้อจาก flask ลงใน centrifuge tube (15 ml) นำไปปั่นที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant ทิ้งไป ปั่นล้างเซลล์ด้วย Tris-sucrose ปริมาตร 10 ml จำนวน 5 ครั้ง โดยปั่นที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant ทิ้งไป หลังการปั่นล้างครั้งสุดท้ายให้ ผสมสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น transfer ใส่ microcentrifuge tube นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant ทิ้งไป เติม tris-sucrose ปริมาตร 1 ml ลงไปใน microcentrifuge tube นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000

rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant เก็บไว้ตรวจเช็ค cadmium ที่เหลืออยู่เหลือ แต่ตะกอนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C

การวัดปริมาณแคดเมียมที่ถูกเก็บสะสมในเซลล์แบคทีเรีย เครื่อง Atomic Absorption Spectrometer

ตั้งค่าเครื่อง Atomic Absorption Spectrometer (Varian - SpectrAA 250 Plus) โดยให้ wavelength 228.8 nm และ 326.1 nm, Slit width 0.5 nm, concentration for 0.2 Abs 0.5 (228.8 nm) และ 200 (326.1 nm) mg/l, relative lamp intensity 40 (228.8 nm) และ 100 (326.1 nm) เตรียม Cd ความเข้มข้น 50, 100, 150 mg/l เพื่อให้เครื่องวัดค่า Abs ทำ standard curve ใช้น้ำกลั่น เป็น blank (set 0) ใส่ตัวอย่างที่เตรียมเพื่อให้เครื่องทำการวัด เครื่องจะแปลผลออกมาเป็นหน่วยความเข้มข้น mg/l ให้ ซึ่งคำนวณเปรียบเทียบกับจาก standard curve บันทึกผล

วิเคราะห์ Proteomics: 2D-PAGE

Run 1ST dimension (Isoelectric Focusing): strip ขนาด 18 เซนติเมตร pI 3-10 ถูก Rehydration ใน tray 350 µl/strip/ Sample loading and run 1st dimension 12 ชั่วโมง เปิดเครื่อง cooling ที่อุณหภูมิ 20°C โปรตีน 200-500 µg ใส่ในการ Isoelectric Focusing โดยวิธี cup loading mineral oil เติม mineral oil ด้านบนของ cup เพื่อป้องกัน sample ระเหย ปิดฝาเครื่องแล้วต่อขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง และ ตั้งค่าเครื่องดังนี้

Step	Volts	mA	Watt	Time	
1	50	2	5	600	นาที
2	300	2	5	1	นาที
3	3500	2	5	90	นาที
4	3500	2	5	300	นาที
5	500	2	5	120-240	นาที

หากยังไม่นำมา run 2nd dimension ให้เก็บที่ -70°C

Run 2ND dimension (SDS-PAGE): เตรียม 12.5% Polyacrylamide gel โดย 1 gel มี ปริมาตรประมาณ 25 ml ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ strip นำไป incubate ใน Equilibration buffer I (Equilibration buffer I เติม DTT 100 mg/10ml) นาน 15 นาที และ Equilibration buffer II (Equilibration buffer เติม IAA 250 mg/10ml) 15 นาที วาง strip บน polyacrylamide gel ในแนวนอนต่อจาก standard protein marker โดยอย่าให้มีฟองอากาศ ระหว่าง IPG strip กับ polyacrylamide gel เติม 1% Agarose gel ที่ผสมสี bromophenol blue ลงไป ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว นำแผ่น gel มาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 1XSDS running buffer ตั้งค่า กระแสไฟฟ้าและเวลาดังนี้

Step	Volts	mA	Watt	Time
1	3,500	40	200	30 นาที
2	3,500	80	200	240 นาที
3	3,500	2	200	500 ชั่วโมง (รักษา ระดับคงที่)

นำ polyacrylamide gel ใส่กล่องพลาสติก เติมสี colloidal coomassie blue ให้ท่วมเจล 24 ชม. เก็บ polyacrylamide gel ไว้ที่ 4°C หรือนำมาเก็บภาพโดย Canoscan LiDE20 scanner (Canon, USA).

การวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน โดยวิธี Peptide Mass Fingerprinting (PMF) โดยการตัดจุดของโปรตีนจากแผ่นเจลที่ย้อมสี และนำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin และนำไปวิเคราะห์ต่อยด้วย MALDI-TOF Mass Spectroscopy

ผลการทดลอง

ผลการตรวจคัดกรองความทนต่อโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรีย (Screening Test)

จากการเก็บตัวอย่าง 36 สถานที่ พบว่าเป็นตัวอย่างน้ำ 32 ตัวอย่าง ตัวอย่างดิน 34 ผลการคัดกรองเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อไอออนของโลหะหนัก Cadmium ที่ความเข้มข้น 0.8 mM พบว่า เชื้อที่สามารถทนต่อไอออนของโลหะหนัก Cadmium ที่ความเข้มข้น 0.8 mM ได้จากตัวอย่างที่เป็น ดิน จำนวน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เป็น น้ำ จำนวน 5 ตัวอย่าง

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ

พบว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นแกรมลบ รูปแท่ง (Gram negative bacilli) ส่วนน้อยพบแกรมบวก รูปแท่ง (Gram positive bacilli) และแกรมบวกรูปร่างกลม (Gram positive cocci) และเนื่องจากพบแกรมลบ เป็นส่วนใหญ่ จึงทำการทดสอบ Biochem test คร่าวๆ โดยใช้ Oxidase test, TSI, Pseudo F, Pseudo P ซึ่งให้ผลการทดสอบ ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบ Biochem test ด้วย Oxidase test, TSI, Pseudo P, Pseudo F ของ เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อไอออนของโลหะหนัก Cadmium ที่ความเข้มข้น 0.8 mM

Sample	[Cd] 0.8 mM			
	Oxidase	TSI	Pseudo P	Pseudo F
1 (Cd)	-	K/AG	-	-
2 (Cd)	+	K/N	-	-
3 (Cd)	+	K/N	+	+
4 (Cd)	-	K/AG	-	-
5 (Cd)	+	K/N	+	+
6 (Cd)	-	A/AG	-	-
7 (Cd)	+	K/N	+	+
8 (Cd)	+	K/N	+	+
9 (Cd)	+	K/N	+	+
10 (Cd)	-	A/AG	-	-
11 (Cd)	+	A/AG	-	-

ตารางที่ 2 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้โดยเครื่อง Mass spectrometry (Biotyper)

ID	Biochemical Test				MALDI-TOF/MS			
	Oxidase	TSI	Pseudo P	Pseudo F	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
1	-	K/AG	-	-	<i>Morganella morganii</i>	2.378	<i>Morganella morganii</i>	2.348
2	+	K/N	-	-	not reliable identification	1.484	not reliable identification	1.42
3	+	K/N	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.319	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.312
4	-	K/AG	-	-	<i>Morganella morganii</i>	2.665	<i>Morganella morganii</i>	2.508
5	+	K/N	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.382	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.181
6	-	A/AG	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.112	<i>Enterobacter kobei</i>	2.074
7	+	K/N	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.27
8	+	K/N	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.375	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.276
9	+	K/N	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.328	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.219
10	-	A/AG	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.122	<i>Enterobacter kobei</i>	2.099
11	/	/	/	/	<i>Aeromonas jandaei</i>	2.13	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.067
12 (เพิ่ม)	/	/	/	/	<i>Aeromonas caviae</i>	2.262	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.241

ID	Biochemical Test				MALDI-TOF/MS			
					Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
	Oxidase	TSI	Pseudo P	Pseudo F				
13 (เพิ่ม)	/	/	/	/	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.316	<i>Aeromonas caviae</i>	2.246

ความทนต่อโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรีย (Screening Test) ที่แยกแล้วระหว่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อจากห้องทดลอง

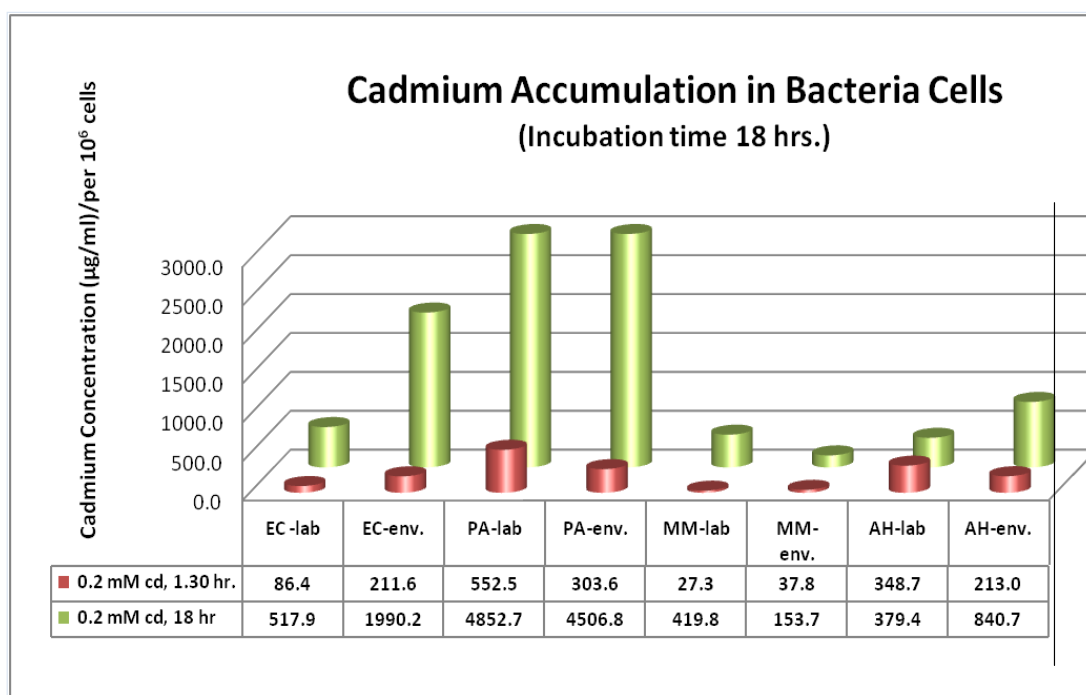
เชื้อ 4 ชนิดได้แก่ *Enterobacter cloacae* *Pseudomonas aeruginosa* *Morganella morganii* *Aeromonas hydrophila* ที่ทนต่อโลหะแคดเมียมที่ 0.8 mM โดยเลือกตัวที่มีความสามารถในการสะสมแคดเมียมของเซลล์มากที่สุด (อ้างอิงข้อมูลจาก Preliminary data) ที่ถูกเลือกมาทำการเปรียบเทียบความสามารถในความทนต่อโลหะหนักแคดเมียมของเชื้อแบคทีเรีย (Screening Test) ระหว่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อจากห้องทดลอง พบว่า ส่วนมากเชื้อในสิ่งแวดล้อมมีความสามารถในการทนต่อแคดเมียมมากกว่า ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* ตามตาราง

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นที่น้อยกว่าค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของเชื้อ ที่แยกแล้วระหว่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อจากห้องทดลอง

Bacteria	MIC (mM)
<i>Enterobacter cloacae</i> -laboratory	0.4
<i>Enterobacter cloacae</i> -environmental	0.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -laboratory	1.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -environmental	1.6
<i>Morganella morganii</i> -laboratory	0.2
<i>Morganella morganii</i> -environmental	1.6
<i>Aeromonas hydrophila</i> -laboratory	0.4
<i>Aeromonas hydrophila</i> -environmental	0.8

ความสามารถสะสมแคดเมียมของเชื้อแบคทีเรีย ที่แยกแล้วระหว่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อจากห้องทดลอง โดย *Atomic Absorption spectroscopy*

จากการทำ Atomic absorption spectroscopy พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อไอออนของโลหะหนัก Cadmium ที่ความเข้มข้น 0.2 mM มีความสามารถในการสะสม (Accumulation) ของ Cadmium ภายในเซลล์ของตัวเชื้อจุลินทรีย์ ทุกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เมื่อเทียบกับ control

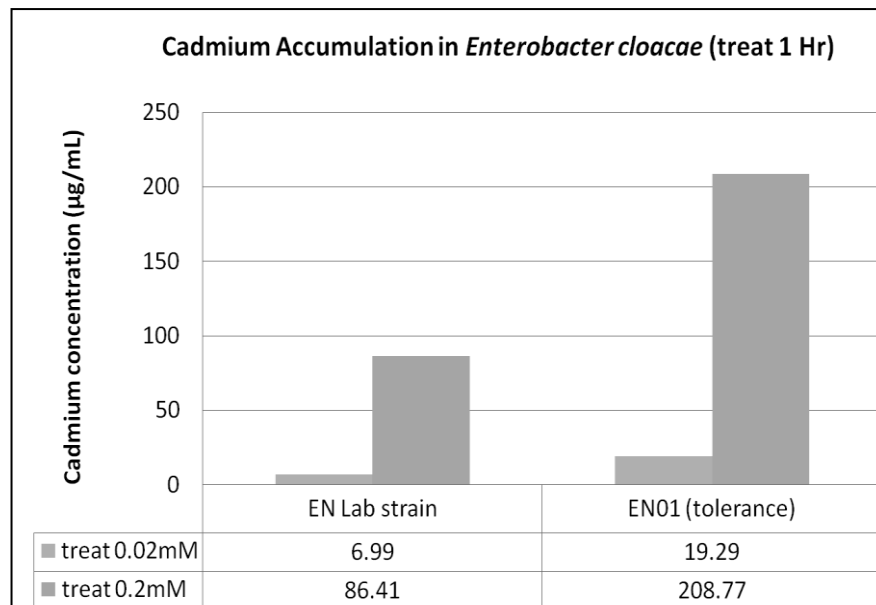


ภาพที่ 1. เปรียบเทียบความสามารถสะสมแคดเมียมของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ระหว่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อจากห้องทดลอง โดย Atomic Absorption spectroscopy

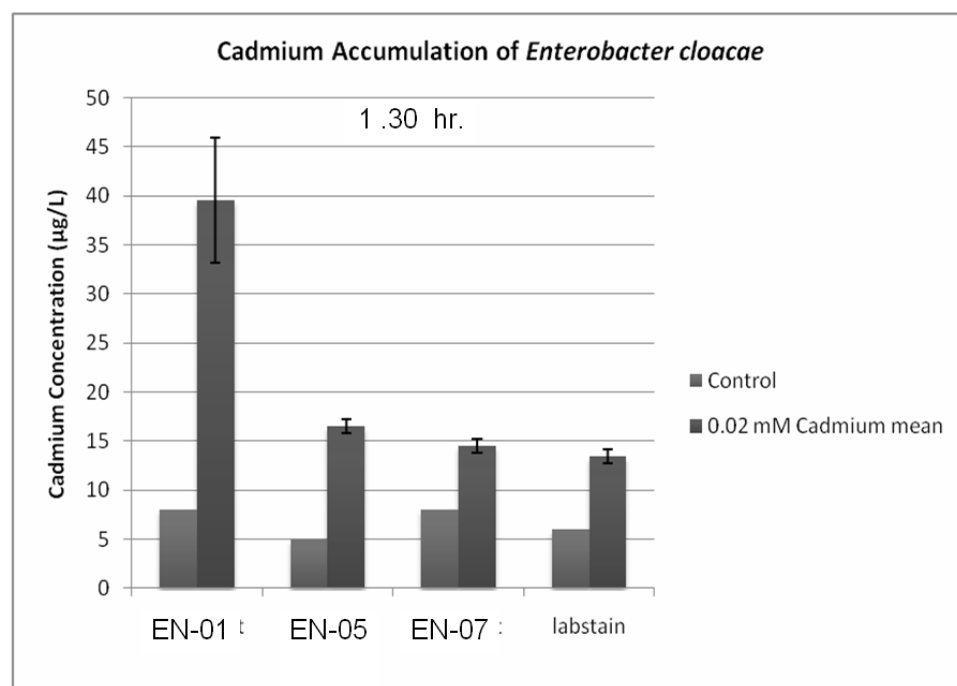
ความสามารถสะสมแคดเมียมของเชื้อแบคทีเรีย ชนิด *Enterobacter cloacae* ระหว่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อจากห้องทดลอง โดย *Atomic Absorption spectroscopy*

Enterobacter cloacae เป็นตัวอย่างในการศึกษาหาหลักการปรับตัวของแบคทีเรียต่อโลหะแคดเมียมพบว่า เมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี แคดเมียมความเข้มข้น 0.02 mM และ 0.2 mM เชื้อมีความสามารถสะสมโลหะในเซลล์ได้โดยมีระดับโลหะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยที่เซลล์ไม่ตาย (อ้างอิงข้อมูลจาก Preliminary data) (ภาพที่ 2)

(A)



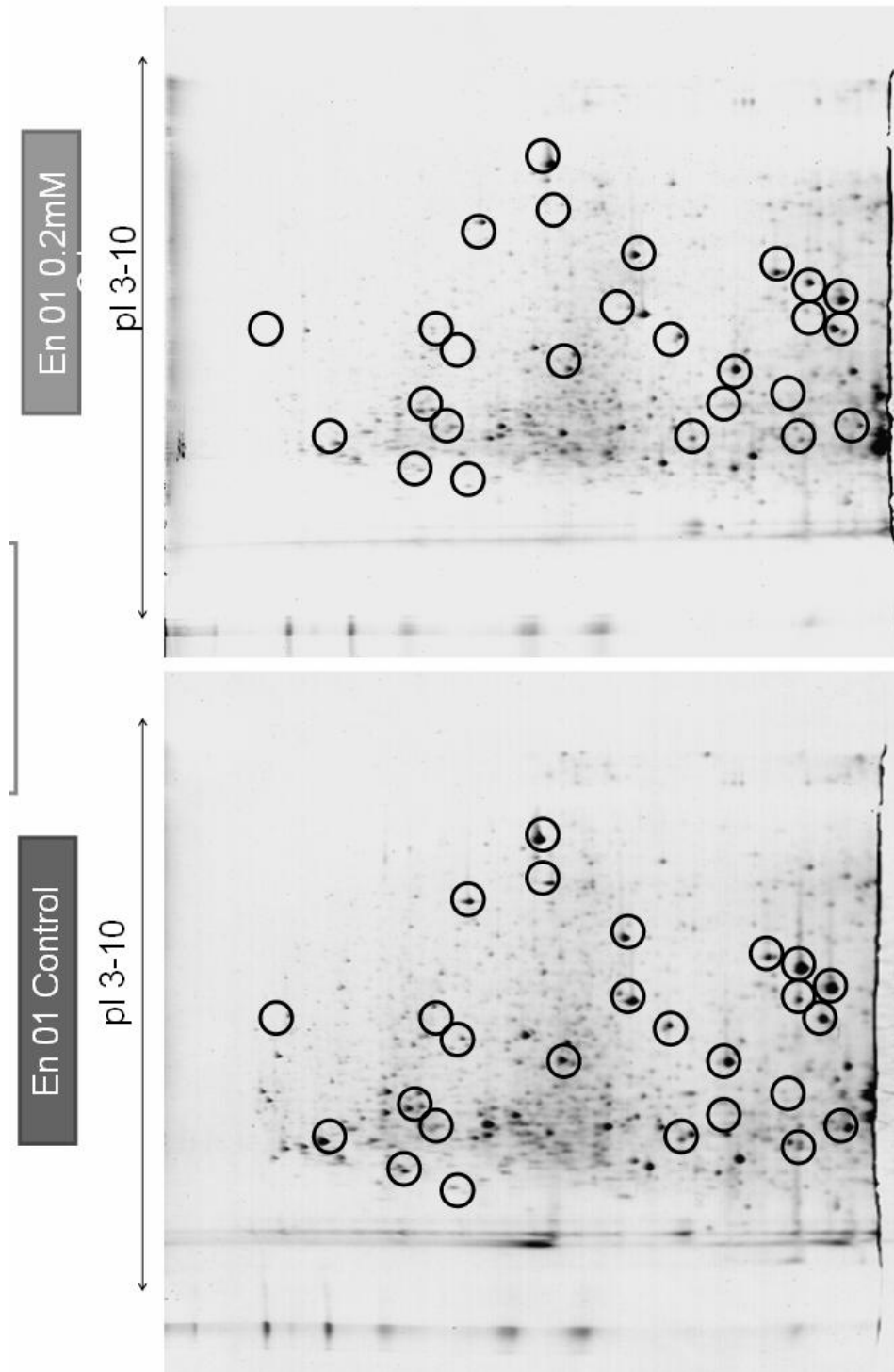
(B)



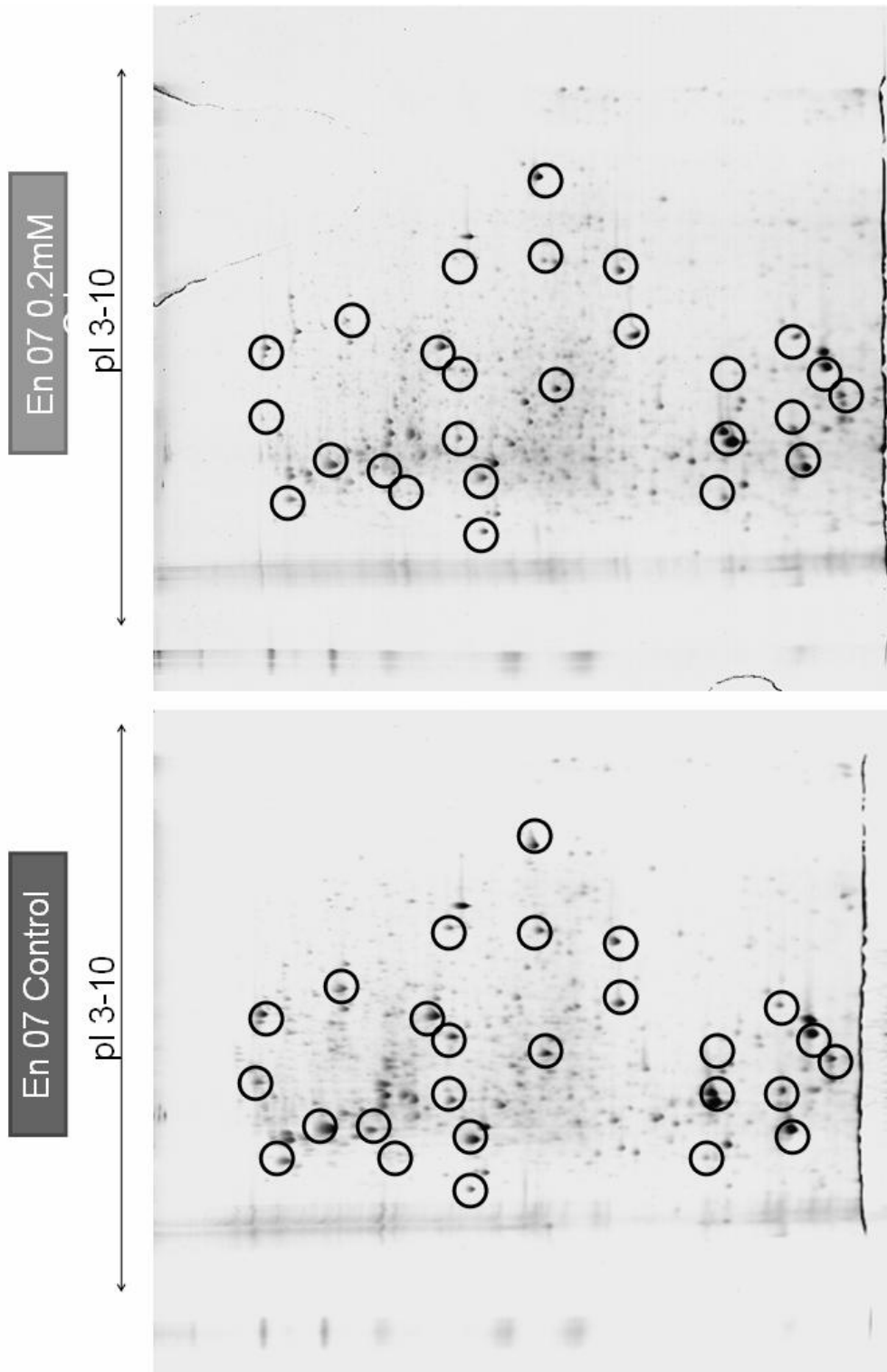
ภาพที่ 2. ความสามารถสะสมแคดเมียม ของ 10^6 cells ของเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* ระหว่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อจากห้องทดลอง โดย Atomic Absorption spectroscopy (A) เชื้ออยู่ในความเข้มข้นของแคดเมียมที่ต่างกัน (B) เชื้อที่มีค่า MIC ที่ต่างกัน

กลไกการตอบสนองต่อแคดเมียมของเชื้อ *Enterobacter cloacae*

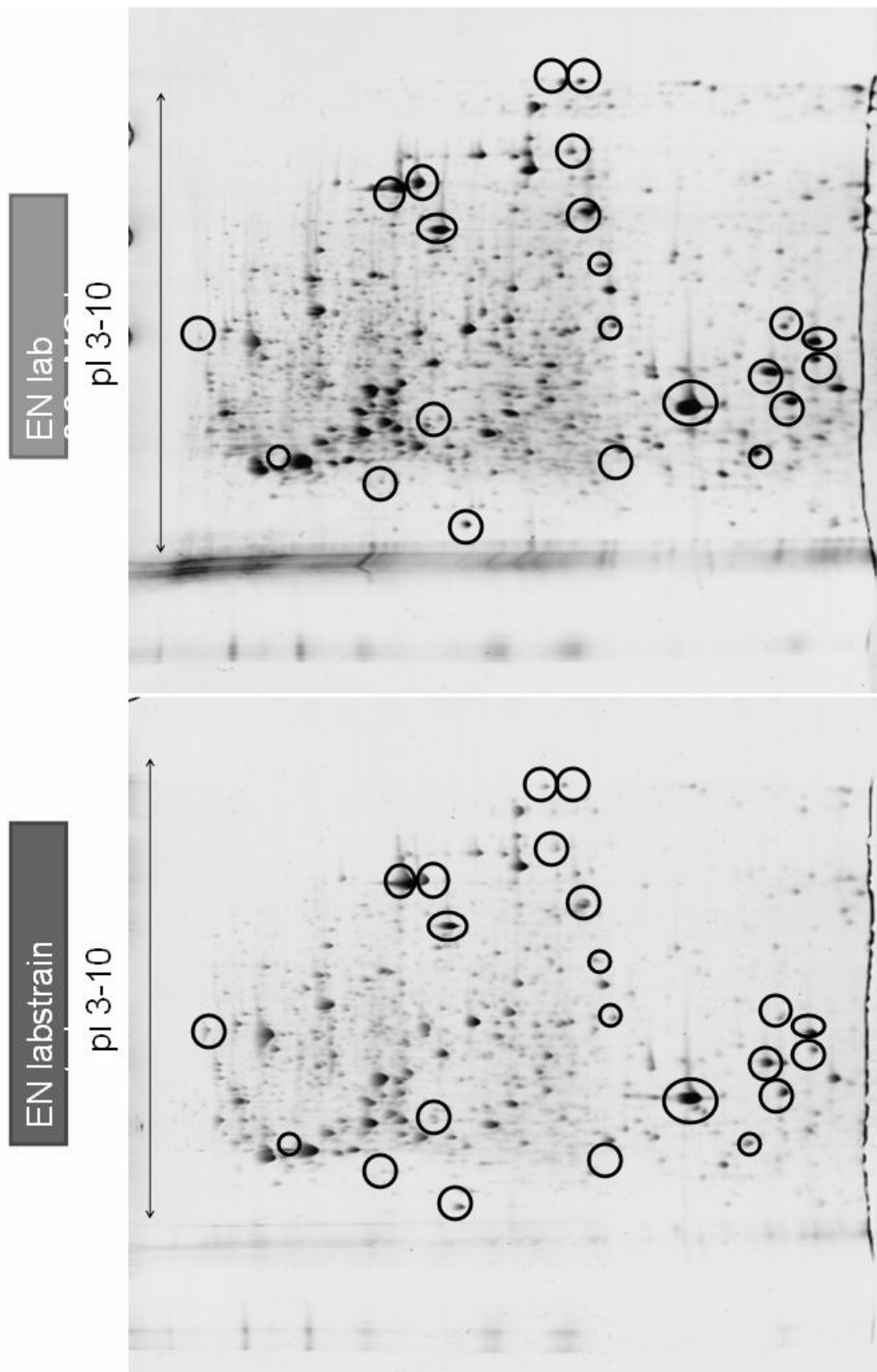
กลไกของ *Enterobacter cloacae* ที่ทนแคดเมียมได้มากที่สุดคือมี EN-01 มี MIC 0.8 mM จากสิ่งแวดล้อม EN-07 มี MIC 0.2 mM จากสิ่งแวดล้อม เทียบกับเชื้อในห้องทดลอง (EN-lab) มี MIC 0.4 mM ถูกศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อใน 0.2 mM Cd และไม่มีแคดเมียม เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยที่เชื้ออยู่ใน Stationary phase มี OD. เท่ากับ 2 โปรตีนของเชื้อถูกศึกษาการแสดงออกของโปรตีน โดย two-dimensional electrophoresis pH 3-10 ความยาว 18 เซนติเมตรพบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่ไม่ได้รับแคดเมียมกับรับแคดเมียม (n=3) จะมีความแตกต่างคือโปรตีนในกลุ่ม protein folding Protein synthesis Energy metabolism pathway Transportation ภาพที่ 3-5



ภาพที่ 3 2DE gel, pH3-10 18 เซนติเมตร ของเชื้อ *Enterobacter cloacae* จากสิ่งแวดล้อมที่มีความสามารถทนพิษแคดเมียมมากที่สุด (MIC=0.8 mM) เปรียบเทียบระหว่าง control คือไม่มีแคดเมียมและเชื้อที่ได้รับแคดเมียม 0.2 mM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระยะ Stationary stage.



ภาพที่ 4 2DE gel, pH3-10 18 เซนติเมตร ของเชื้อ *Enterobacter cloacae* จากสิ่งแวดล้อมที่มีความสามารถทนพิษแคดเมียมน้อยที่สุด (MIC=0.2 mM) เปรียบเทียบระหว่าง control คือไม่มีแคดเมียมและเชื้อที่ได้รับแคดเมียม 0.2 mM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระยะ Stationary stage.



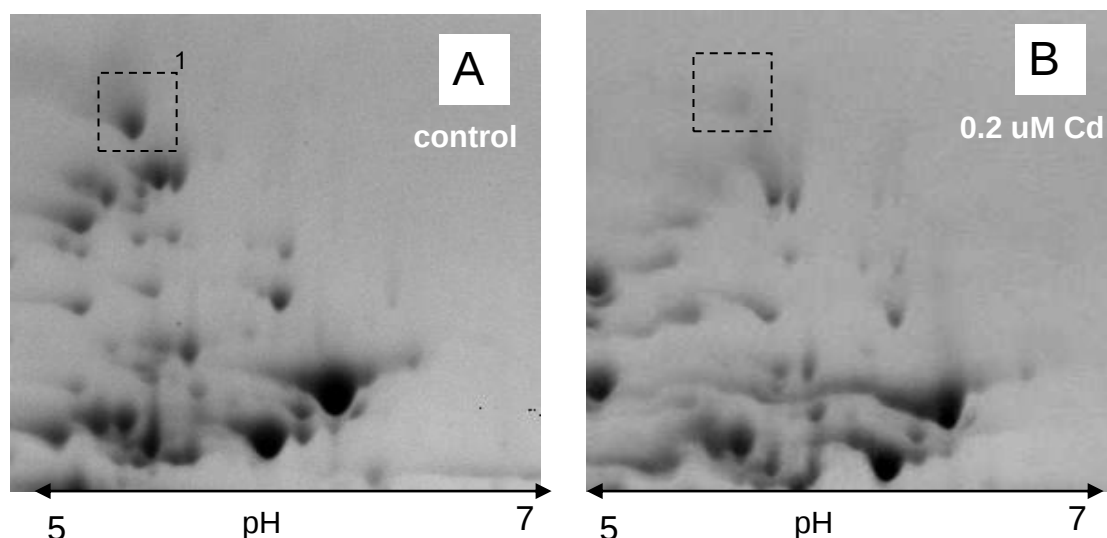
ภาพที่ 5 2DE gel, pH3-10 18 เซนติเมตร ของเชื้อ *Enterobacter cloacae* (lab stain) (MIC=0.4 mM) เปรียบเทียบระหว่าง control คือไม่มีแคดเมียมและเชื้อที่ได้รับแคดเมียม 0.2 mM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระยะ Stationary stage.

ตารางที่ 4 โปรตีนที่แสดงออกของเชื้อ *Enterobacter coacae* หลังได้รับแคดเมียม 0.2 mM ระบุชนิดโปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS

Expression	EN01: control/Cd	EN07: control/Cd	EN Lab: control/Cd
Up-regulated	-60 kDa chaperonin	-Telomerase component p80	-Elongation factor Tu -Beta-lactamase -Maltose-binding periplasmic protein
Down-regulated	-Ferrienterobactin receptor -LPS-assembly protein LptD -Malto porin -Long-chain fatty acid transport protein -Enolase -Phosphoglycerate kinase -Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein -Glucose-specific phosphotransferase enzymellA component	-ATP synthase subunit beta -Enolase -Elongation factor Tu -Fructose-bisphosphate aldolase class 1	-Aconitate hydratase 2 -60 kDa chaperonin -Beta-lactamase

จะพบว่าเชื้อสามารถสะสมแคดเมียมได้ในระยะเวลาสั้นคือ 1 ชั่วโมง จึงคาดว่าเชื้อน่าจะมีกลไกในการสะสมแคดเมียมอยู่แล้วจึงได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการแสดงออกของโปรตีนของเชื้อ EN-01 และ EN-07 ที่ไม่มีแคดเมียม พบว่ามีกลุ่มโปรตีนที่ต่างกันคือ DNA protection during starvation protein, Potassium-transporting ATPase A chain, Outer membrane protein C, G3PD fragment, Superoxide dismutase ซึ่งโปรตีนเหล่านี้อยู่ใน Energy metabolism pathway, Transportation และบางตัวมีความสามารถในการจับกับแคดเมียมได้

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับวัตถุประสงค์ที่ 2 คือเพื่อศึกษาและพัฒนาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) เพื่อการติดตามการปนเปื้อนของไอออนโลหะ ผู้วิจัยพบว่าเมื่อ treated เชื้อ *E. coli* ด้วย cadmium ที่ความเข้มข้น 0.2 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่า 1,000 เท่า ของความเข้มข้นที่ใช้ในงานวิจัยของผู้วิจัยก่อนหน้านี้คือ 0.2 mM และศึกษาการแสดงออกของโปรตีน โดยวิธี 2-dimensional gel electrophoresis และย้อมสีด้วย Coomassie Blue พบโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่ลดลงเหมือนกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งน่าจะสามารถเป็น biomarker ได้ดังภาพที่ 1 เมื่อทำการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนพบว่าเป็น aconitase อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนที่ไม่จำเพาะต่อแคดเมียมอย่างเดียว และมักจะประสบปัญหาคือมักจะติดตามดูการเปลี่ยนแปลงได้ยากเพราะอยู่ในตำแหน่งที่มักจะไม่สามารถแยกเป็นจุดเดี่ยวได้ในเจลที่ทำการวิเคราะห์ จึงไม่ทำการศึกษาต่อไป แต่ในอนาคตควรทำการหาโปรตีนกลุ่มอื่นที่น่าเป็นเป้าหมายที่ดีต่อไป



ภาพที่ 1 Proteins expression profiles of *E. coli* TG1. *E. coli* TG1 treated with (B.) and without (A.) 0.2 μM cadmium chloride. 200 μg proteins were separated according to their pI along the IPG strip pH 3-10, 13 cm.

สรุปการทดลองทั้งสองเฟส

โครงการวิจัยนี้จะใช้โมเดลเซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ TG1 ที่เป็นเซลล์ปกติ และเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนลูกลสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดินที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม และอยู่บนผิวเซลล์เมมเบรน เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าการมี Metal-binding region เพื่อจับจำเพาะกับโลหะภายในเซลล์ หรือการจับโลหะไว้ที่ผิวเซลล์ เพื่อให้ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ลดลงจากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงกลไกการตอบสนองต่อโลหะ พบโปรตีนที่มีการแสดงออกพื้นฐานเหมือนกันคือ aconitase, elongation factor-Ts, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein-disulfide isomerase ส่วนการเซลล์ *E. coli* (TG1/pHis6GFP) ที่มีโปรตีนลูกลสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดิน ที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม จะช่วยให้ลดความเป็นพิษของแคดเมียมภายในเซลล์ โดยจะไม่พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวกับการป้องกันการเกิด oxidative stress ของ *E. coli* (TG1/pHis6GFP) แต่กลับลดลง โปรตีนเหล่านี้คือ Mn-SOD, succinyl-Co-A synthetase ซึ่งถือว่าการมี โปรตีนลูกลสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดินที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมจะมีประสิทธิภาพดีกว่าโปรตีนลูกลสมที่มีสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดิน ที่อยู่บนผิวเซลล์เมมเบรน ของ *E. coli* (TG1/pEVZn)

จากการศึกษาพบว่าเชื้อในสิ่งแวดล้อมหลายชนิดที่สามารถทนต่อโลหะแคดเมียมและสามารถทนต่อโลหะหนักอื่นด้วย ทองแดง สังกะสี แต่ใช้กลไกที่ต่างกัน (อ้างอิงข้อมูลจาก Preliminary data)

Enterobacter cloacae เป็นเซลล์ที่สามารถทนทานต่อโลหะแคดเมียมได้มากเท่ากับ *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีข้อมูลสนับสนุนจากการศึกษาวิจัยอื่นๆว่าสามารถทนต่อโลหะแคดเมียมได้ จากการศึกษาเชื้อ *Enterobacter cloacae* พบว่าเมื่อใช้ วิธีโปรตีโอมิกส์เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดต่อไอออนของโลหะ พบว่า เชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมมีการปรับขึ้นพื้นฐานมีกลไกที่เหมือนกันกับในห้องปฏิบัติการคือ Energy metabolism pathway, Transportation, antioxidative proteins นอกจากนั้นพบว่าเชื้อจากสิ่งแวดล้อมมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากของโปรตีนที่มีรายงานและข้อมูลทาง bioinformatics แสดงว่าเป็นโปรตีนมีความสามารถจับกับแคดเมียมได้ ซึ่งน่าจะเป็นกลไกสำคัญในการปรับตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อม

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. ควรมีการทำ gene analysis หาข้อมูลพื้นฐานในระดับ genes ของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา
2. ควรมีนำข้อมูลที่ได้ไปทำการศึกษาการสร้างเซลล์แบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมที่มีความสามารถในการกำจัดพิษแคดเมียม และสามารถกักเก็บได้โดยมุ่งเน้นที่โปรตีนสามารถจับกับโลหะได้

ภาคผนวก

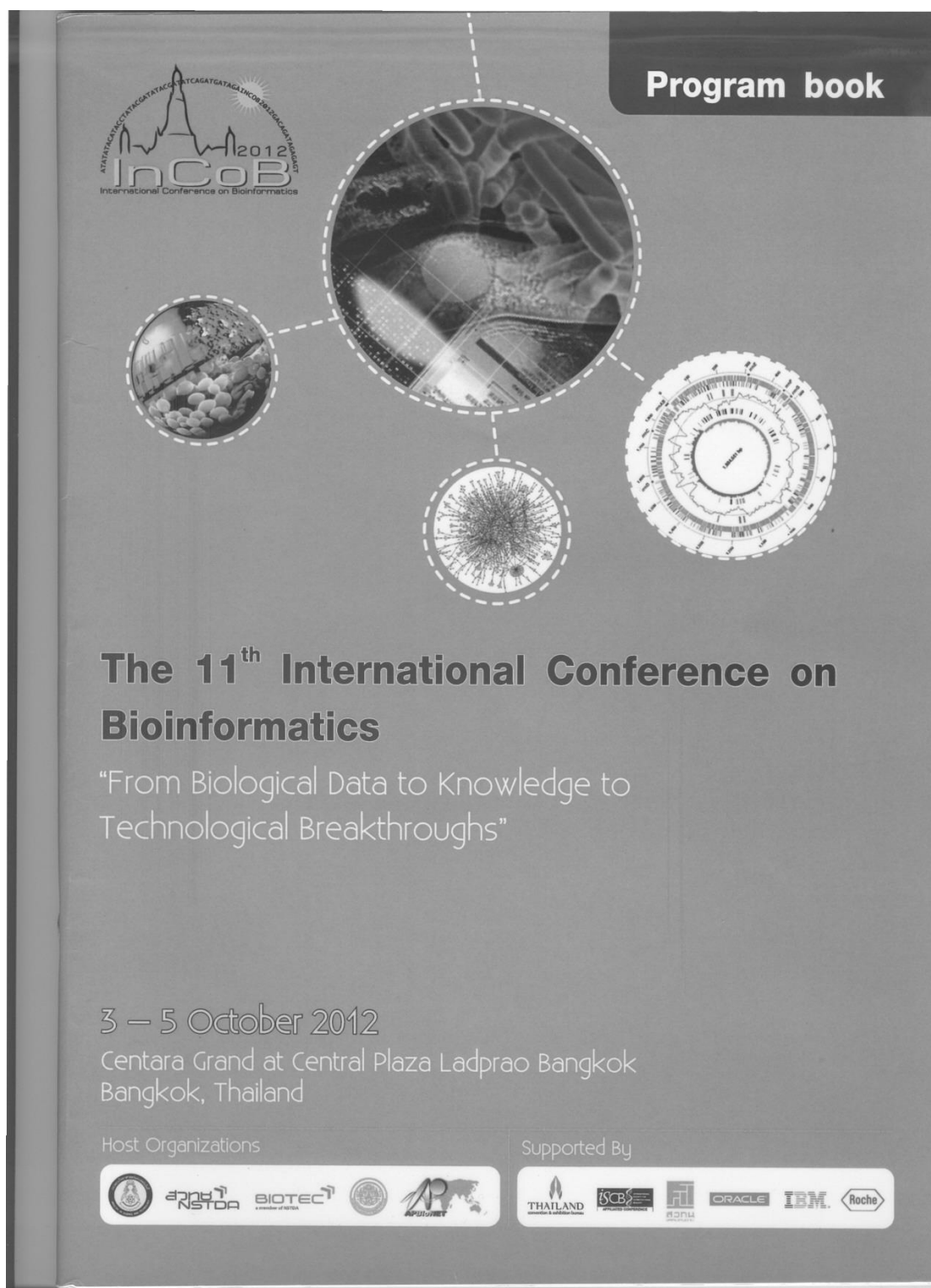
เอกสารแนบหมายเลข 3

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ตามที่แนบ)
2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1.ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ตามที่แนบ)

2.การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ





Poster No.	Session	Title
14	2	Synteny block inference using OrthoCluster-how orthologs are identified matters <i>Kingsley Chow and Tsung Fei Khang</i>
15	2	Sharing of genes in a bacterial population <i>Piyachat Udomwong and Peter Young</i>
16	2	Common and distant structural characteristics of feruloyl esterase families from <i>Aspergillus oryzae</i> <i>D.B.R.K. Gupta Udatha, Valeria Mapelli, Gianni Panagiotou and Lisbeth Olsson</i>
17	2	Predicting combinatorial regulation of transcription from motif co-occurrence <i>Alexis Vandenbon, Yutaro Kumagai, Shizuo Akira and Daron Standley</i>
18	2	Peculiar feed-forward loop network motifs in <i>Escherichia coli</i> <i>Eng Piew Kok and Tsung Fei Khang</i>
19	2	Analysis of synonymous codon usage in chloroplast genomes of different organisms <i>Babak Latif, Rasool Mohammadi Najafabadi, Mokhtar Jalali Javaran and Hamid Rajabi Memari</i>
20	2	Evolutionary-wide analysis after whole genome duplication in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Apiluck Musigka-In, Intawat Nookeaw, Goutham Vemuri and Wanwipa Vongsangnak</i>
21	2	Ordering partially assembled genomes using block-interchanges <i>Chin Lung Lu, Chi-Long Li, Wei-Yun Tsai and Hsien-Tai Chiu</i>
22	3	Proteomics signature profiling (PSP): a novel contextualization approach for cancer proteomics <i>Wilson Wen Bin Goh, Marek Sergot and Limsoon Wong</i>
23	3	PPI Site predictions with 3D probability distributions of interacting atoms <i>Ching-Tai Chen, Hung-Pin Peng, Jih-Wei Jian, Keng-Chang Tsai, Jeng-Yih Chang, Ei-Wen Yang, Jun-Bo Chen, Shinn-Ying Ho, Wen-Lian Hsu and An-Suei Yang</i>
24	3	The studies of protein profiles in response to cadmium in <i>Escherichia coli</i> <i>Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya, Nipawan Bunmee, Suchitra Sawangnual, Chadinee Thippakorn, Sittiruk Roytrakul, Chartchalerm Isarankura-Na-Ayudhya and Virapong Prachayasittikul</i>
25	3	Na ⁺ /H ⁺ antiporter (NHX1) gene expression in peanut (<i>Arachis hypogaea</i> L) and its interaction studies <i>Kandula Venkatesh, P Suravajhala, P Chakrapani, J Saraswathi, B Arunjothi, P Amareshwari and RR Anupalli</i>
26	3	Knowledge based molecular modeling of astacin metalloproteases <i>Subrata Ghosh, Ankur Chaudhuri and Sibani Chakraborty</i>

The studies of protein profiles in response to cadmium in *Escherichia coli*

Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya¹, Nipawan Bunmee¹, Suchitra Sawangnual¹, Chadinee Thippakorn², Sittiruk Roytrakul³, Chartchalerm Isarankura-Na-Ayudhya², Virapong Prachayasittikul^{2*}

¹ Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Science, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand

² Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

³ Genome Institute, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand

* Correspondence: mtvpr@mahidol.ac.th

Background

Environmental pollution by toxic metals arises as a result of industrial, agricultural and sewage disposal activities. These metal ions, particularly heavy metals, exert their toxicities to all organisms including human, animals and microorganisms. Most of the organisms attempted to adapt themselves from these metals by utilizing several cellular responses, e.g., reduction of metal uptaking process, sequestration of metal ions by biological macromolecules, transportation of metal ions out of the cells by efflux system, and transformation of toxic metals by reductase enzymes. However, the underlying mechanism of metal toleration remains not fully understood. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of metal ions (particularly cadmium ions) on cellular responses of bacteria by using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) in conjunction with peptide mass fingerprinting. Proteomic profiling of *Escherichia coli* upon exposure to toxic doses of cadmium ions was analyzed. In parallel, cells expressing metal-binding regions on the outer membrane or cytoplasm was applied in order to prove whether reduction of metal uptake or intracellular metal

complexation play significant roles in modulating cellular adaptations against toxic metal.

Results

Results revealed that exposure to cadmium ions resulted in down-regulation of enzymes involved in components in active transport. Meanwhile, adaptation of cells by up-regulating the protein energy metabolism and synthesis machinery was observed.

Conclusions

Our findings gain insights into the detailed mechanism of cellular responses against metal toxicity and explore a high feasibility to further search for a biomarker for metal monitoring in the future.

Key words: *Escherichia coli*, cadmium, 2-DE, me