



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนและการบ่งชี้ชนิดของโปรตีนในเชื้อมาลาเรียชนิด
פלציพารם สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 ที่ชักนำให้เกิดการดื้อยาไพริเมทามีน

โดย ดร. กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์ และคณะ

30 กันยายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนและการบ่งชี้ชนิดของโปรตีนในเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัม
สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 ที่ชักนำให้เกิดการดื้อยาไพริเมทามีน

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|--|--|
| 1. หัวหน้าโครงการ: ดร. กาญจนา รัชสีร์รัตนัน | วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. นักวิจัยที่ปรึกษา: ศ. ดร. เกศรา ณ บางช้าง | ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัยค้นคว้าและพัฒนา
แห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) |
| 3. นักวิจัยร่วม: ผศ.ดร. วรณา ชัยเจริญกุล | ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัยค้นคว้าและพัฒนา
แห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) |
| 4. นักวิจัยร่วม: นางสาวนภาพร ศิริพล | วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ศ.ดร. เกศรา ณ บางช้าง และ ศ. กิตติคุณ สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้ให้คำแนะนำ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆมาโดยตลอด

ผู้วิจัยขอขอบคุณวิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านการวิจัยค้นคว้าและพัฒนาแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณอาทิตย์ เทียมสุข คุณณัฐ ฐอัมมัต คุณปัทมาพรหมประดิษฐ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณ Prof. Dr. Stephen A Ward และ Dr. Gavin Laing ในการช่วยเหลือด้านการจำแนกชนิดโปรตีน

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทู่นพัฒนานักวิจัยใหม่ กองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

Abstract (ภาษาอังกฤษ)

Project Code: TRG5280033

Project Title: Comparison of protein patterns between *Plasmodium falciparum* mutant clone T9/94-M1-1 (b3) induced by pyrimethamine and the original parent clone T9/94.

Investigator : Dr. Kanchana Rungsihirunrat
College of Public Health Sciences, Chulalongkorn University.

E-mail Address: rskanchana@yahoo.com
Kanchana.r@chula.ac.th

Project Period: 15/03/2009-15/03/2012

This study aims to compare the protein patterns from the extracts of the mutant clone T9/94-M1-1(b3) induced by pyrimethamine, and the original parent clone T9/94 following separation of parasite extracts by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Parasite proteins were solubilized and separated according to their charges and sizes. The separated protein spots were then detected by silver staining and analyzed for protein density by the powerful image analysis software. Plasmodium proteins were quantified from 2D-E gel and identified by mass spectrometry. The results showed differentially expressed protein patterns (up- or down-regulation) were separated from the extracts from the two clones. A total of 223 and 134 protein spots were detected from the extracts of T9/94 and T9/94-M1-1(b3) clones, respectively. A total of 27 protein spots showed at least two-fold difference in density, some of which exhibited as high as sixty-fold difference. In conclusion, these proteins may be the molecular targets of resistance of *P. falciparum* to pyrimethamine.

Keywords : *Plasmodium falciparum*, Proteomics, Pyrimethamine, Drug resistance, Protein, Molecular target

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

รหัสโครงการ: TRG5280033

ชื่อโครงการ: การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนและการบ่งชี้ชนิดของโปรตีนในเชื้อมาลาเรียชนิด
พลาสมาสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 ที่ชักนำให้เกิดการดื้อยาไพริเมทาไมน

ชื่อนักวิจัย: ดร. กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์
วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : rskanchana@yahoo.com
Kanchana.r@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 มีนาคม 2552 ถึง 15 มีนาคม 2555

วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกของเชื้อที่สกัดจากเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสมาสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ชักนำให้เกิดการดื้อยาไพริเมทาไมน T9/94-M1-1(b3) กับสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ไวต่อยา T9/94 ด้วยวิธี 2D gel electrophoresis โปรตีนของเชื้อที่สกัดได้จะถูกละลายและแยกตามประจุและขนาด จุดของโปรตีนที่แยกได้จาก 2DE ถูกย้อมด้วยสีซิลเวอร์และตรวจวิเคราะห์ความเข้มของโปรตีนด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ โปรตีนที่สกัดได้ถูกวิเคราะห์จาก 2DE gel และบ่งชี้ชนิดของโปรตีนด้วย mass spectrophotometry ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของโปรตีนหลายจุดที่แตกต่างกัน (เพิ่มขึ้นหรือลดลง) ระหว่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ T9/94 และ T9/94-M1-1(b3) โปรตีนทั้งหมดจำนวน 223 และ 134 ถูกแยกได้จากการสกัดจากเชื้อ T9/94 และ T9/94-M1-1(b3) ตามลำดับ โปรตีนจำนวน 27 จุดมีการแสดงออกที่แตกต่างกันมากกว่า 2 เท่าและบางจุดมากกว่าถึง 60 เท่า โดยสรุป โปรตีนที่แสดงออกต่างกันนี้อาจเป็นโปรตีนเป้าหมายของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาไพริเมทาไมน

คำหลัก : *Plasmodium falciparum*, Proteomics, Pyrimethamine, Drug resistance, Protein, Molecular target.

Executive Summary

อุปสรรคสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรีย คือการดื้อต่อยาของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนายาต้านมาลาเรียชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมา รวมทั้งการค้นคว้าหาโปรตีนเป้าหมายที่จำเพาะต่อยาในเชื้อมาลาเรีย โดยมุ่งเน้นไปที่ขบวนการเมตาโบลิสมที่จำเพาะในเชื้อมาลาเรียโดยใช้กระบวนการทางโปรตีโอมิกส์ เนื่องจากเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาและเชื้อมาลาเรียที่ไวต่อยา จำเป็นต้องใช้เชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) เดียวกันเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความแตกต่างและกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยา โดยใช้เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) T9/94 มีคุณสมบัติไวต่อยาไพริเมทามิน และสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 นี้ถูกเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ (T9/94-M1-1(b3)) มีคุณสมบัติดื้อต่อยาไพริเมทามินถึง 100 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของยีน DHFR ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาไพริเมทามิน และไม่พบว่ามี gene amplification ของยีน DHFR ด้วย ดังนั้นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์นี้อาจส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนที่แสดงออกของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นเป็นโปรตีนของเชื้อที่ดื้อต่อยาไพริเมทามินมีการแสดงออกที่แตกต่างจากเชื้อมาลาเรียที่ไวต่อยาในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ โดยใช้เทคนิค two-dimension gel electrophoresis เพื่อแยกโปรตีนทั้งหมดของเชื้อภายในคราวเดียวกัน ซึ่งเทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์โปรตีนที่แยกได้โดยอาศัยคุณสมบัติ 2 ประการ คือ iso-electric point และขนาดโมเลกุลของโปรตีน ทำให้ทราบถึงรูปแบบของโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังได้รับยา เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่ไม่ได้ทดสอบด้วยยา ซึ่งอาจมีโปรตีนบางตัวถูกทำลายหรือบางตัวมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น จุดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ปรากฏในแผ่นเจลนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์และเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อ เพื่อหาลำดับกรดอะมิโนและพิสูจน์ชนิดของโปรตีน ซึ่งจะเป็นแนวทางสำคัญในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้ในอนาคต การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการแสดงออกของโปรตีนที่มีผลต่อยาไพริเมทามินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ดื้อต่อยา T9/94-M1-1(b3) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ไวต่อยา T9/94 โดยใช้ 2-Dimensional Gel Electrophoresis แล้วย้อมด้วยสี Silver และบ่งชี้ตรวจยืนยันชนิดของโปรตีนด้วย Mass Spectrometer การศึกษาถึงคุณสมบัติและการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อยาซึ่งจะเป็นเป้าหมายหนึ่งของการพัฒนารักษามาลาเรียกลุ่ม antifolates ที่มีผลต่อเชื้อดื้อยาในอนาคต

บทนำ

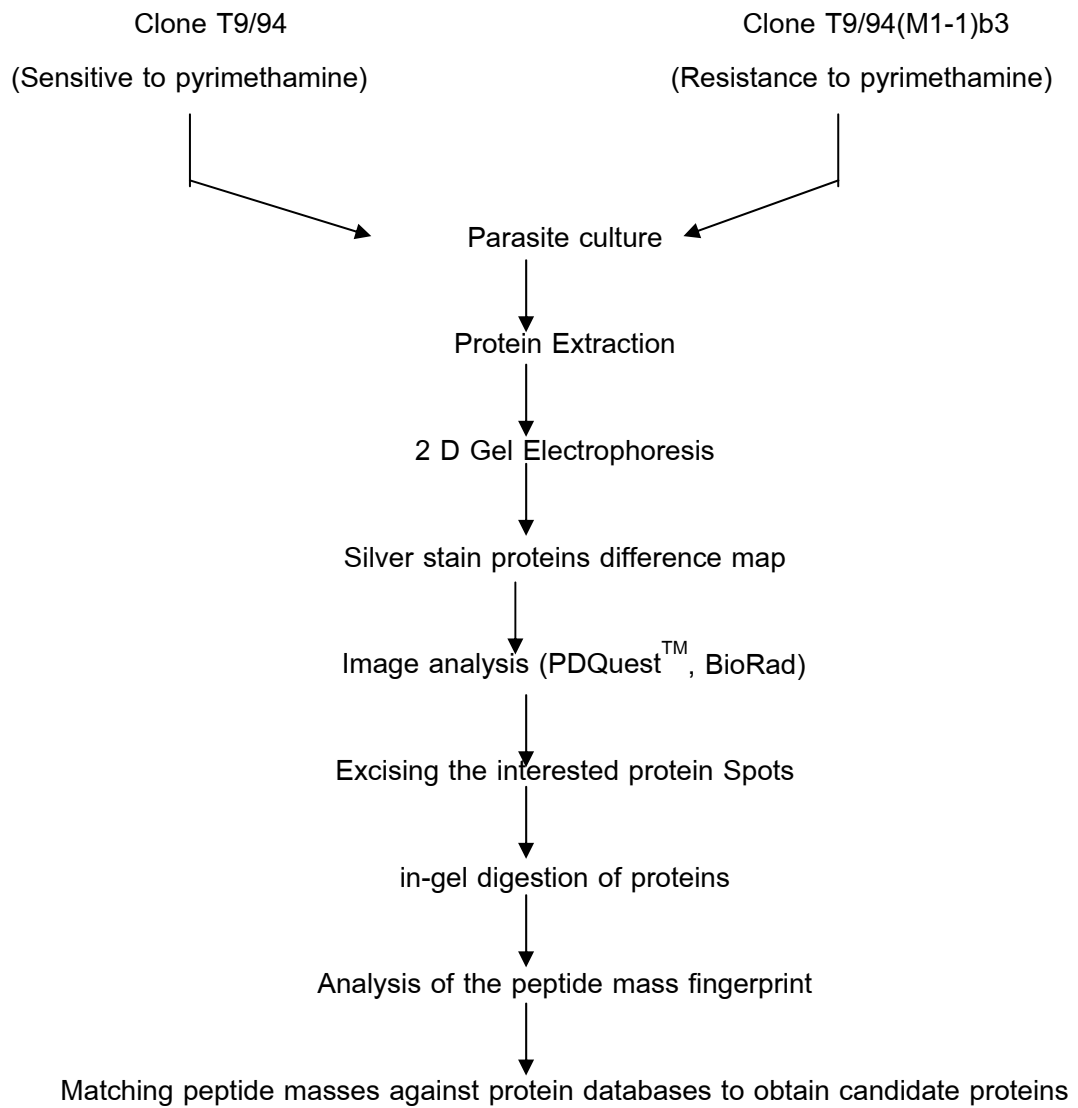
มาลาเรียเป็นโรคสำคัญชนิดหนึ่งที่เกิดปัญหาทางสุขภาพโดยเฉพาะประชาชนที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนและร้อนชื้น (Guerra *et al.*, 2006) อุปสรรคสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรีย คือการติดต่อยาของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนายาต้านมาลาเรียชนิดใหม่ๆ ขึ้นมา รวมทั้งการค้นคว้าหาโปรตีนเป้าหมายที่จำเพาะต่อยาในเชื้อมาลาเรีย โดยมุ่งเน้นไปที่ขบวนการเมตาโบลิซึมที่จำเพาะในเชื้อมาลาเรียโดยใช้กระบวนการทางโปรตีโอมิกส์ (Florens *et al.*, 2002) เนื่องจากเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่ติดต่อยาและเชื้อมาลาเรียที่ไวต่อยาจำเป็นต้องใช้เชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) เดียวกันเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความแตกต่างและกลไกที่ทำให้เกิดการติดต่อยา ฝ่ายศูนย์วิจัยมาลาเรียสามารถทำการชักนำให้เชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์เกิดการติดต่อยาในหลอดทดลองที่ระดับความเข้มข้นของยาไพริเมทาซีนต่างกัน จากการศึกษาของไทยทอง และคณะ (Thaithong *et al.*, 1992) ได้ทำการชักนำให้เชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) T9/94 ที่มีคุณสมบัติไวต่อยาไพริเมทาซีนให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สาร mutagen พบว่าสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 ที่เหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ (T9/94-M1-1(b3)) มีคุณสมบัติติดต่อยาไพริเมทาซีนถึง 100 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 และจากการศึกษาลำดับเบสของยีน DHFR (Bzik *et al.*, 1987, Gregson *et al.*, 2005, Plowe *et al.*, 1995) ซึ่งเกี่ยวข้องการติดต่อยาไพริเมทาซีน พบว่าสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่กลายพันธุ์ T9/94-M1-1(b3) มีลำดับกรดอะมิโนของยีน DHFR เหมือนกับสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 ทุกประการ โดยไม่พบว่ามี mutation ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ลำดับ 16, 51, 59, 108 และ 164 และไม่พบว่ามี gene amplification ของยีน DHFR ด้วย ดังนั้นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีอาจส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนที่แสดงออกของ เชื้อมาลาเรีย ซึ่งโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นเป็นโปรตีนของเชื้อที่ติดต่อยาไพริเมทาซีนมีการแสดงออกที่แตกต่างจากเชื้อมาลาเรียที่ไวต่อยาในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ

เทคนิค two-dimension gel electrophoresis ถูกนำมาใช้เพื่อแยกโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ได้ภายในคราวเดียวกัน (Washburn *et al.*, 2001) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์โปรตีนที่แยกได้โดยอาศัยคุณสมบัติ 2 ประการ คือ iso-electric point และขนาดโมเลกุลของโปรตีน ทำให้ทราบถึงรูปแบบของโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังได้รับยา เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่ไม่ได้ทดสอบด้วยยา ซึ่งอาจมีโปรตีนบางตัวถูกทำลายหรือบางตัวมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น จุดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ปรากฏในแผ่นเจลนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์และเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่แตกต่างกัน (Prieto *et al.*, 2008) นอกจากนี้สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อเพื่อหาลำดับกรดอะมิโนและพิสูจน์ชนิดของโปรตีน ซึ่งจะเป็นแนวทางสำคัญในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้ในอนาคต

ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการแสดงออกของโปรตีนที่มีผลต่อยาไพริเมธามีนในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ดื้อต่อยา T9/94-M1-1(b3) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ไวต่อยา T9/94 โดยใช้ 2-Dimensional Gel Electrophoresis แล้วย้อมด้วยสี Silver และบ่งชี้ตรวจยืนยันชนิดของโปรตีนด้วย Mass Spectrometer การศึกษาถึงคุณสมบัติและการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อยาซึ่งจะเป็นเป้าหมายหนึ่งของการพัฒนารักษามาลาเรียกลุ่ม antifolates ที่มีผลต่อเชื้อดื้อยาในอนาคต

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนวิจัยโดยสังเขป



การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยาไพริเมทามีนและทำการชักนำให้สายพันธุ์ดังกล่าวให้เกิดการติดต่อยาไพริเมทามีนขึ้น ให้ชื่อว่าสายพันธุ์ T9/94-M1-1(b3) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี ของ Trager (Trager and Jensen, 1976) โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อและเลือดใหม่ทุกๆ 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนให้เพียงพอต่อการศึกษาวิจัย ก่อนทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีน ได้นำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบคุณสมบัติ โดยทดสอบความไวของเชื้อต่อยาไพริเมทามีนในหลอดทดลอง และหาลำดับเบสของจีน DHFR ก่อนเพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติตามที่ต้องการเพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนต่อไป

การทำให้เชื้ออยู่ในระยะวงแหวน

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง โดยจะทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เชื้อเป็นประจำทุกวัน เมื่อเชื้อเจริญประมาณ 2 % เชื้อจะถูกทำให้อยู่ในระยะเดียวกัน โดยการ synchronization ด้วยสาร 5% sorbitol ทำให้เชื้ออยู่ในระยะวงแหวน (ring stage)

การสกัดโปรตีนจากเชื้อมาลาเรีย

เมื่อเชื้ออยู่ในระยะเดียวกันแล้ว (ring stage) เลี้ยงต่อจนได้เชื้อประมาณ 5% โดยจะเลี้ยงประมาณ 5 flasks (75 cm²) เพื่อให้โปรตีนมีปริมาณเพียงพอต่อการศึกษา โดยทำการสกัดโปรตีนของเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 และ T9/94-M1-1(b3) โดยทำให้เม็ดเลือดแดงแตกก่อนด้วยสาร 10% saponin (in water) ประมาณ 10 นาที จากนั้นปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 xg (4°C) เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 50 mM Tris pH 7.5 อย่างน้อย 3 ครั้งหรือจนกว่าจะใส เติม Rehydration buffer (25 mg DTT, 1x IPG Buffer, 1x Protease inhibitor) 700 ไมโครลิตร นำไป sonicate เพื่อทำให้เซลล์แตก โดยใช้ amplitude 21% เป็นเวลา 6 วินาที และหยุดพักอย่างน้อย 20 วินาที จำนวน 3-5 รอบ จากนั้นนำไปปั่นแยกส่วนใสที่ 17,000xg 60 นาที นำไปเก็บที่ -80°C

การวัดปริมาณโปรตีน

หาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้ ด้วยวิธี Brad-Ford โดยเตรียมโปรตีนมาตรฐานเพื่อสร้าง standard curve (BSA as standard) เจือจางตัวอย่างที่ 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 และเตรียมสาร working Brad-Ford reagent ในอัตราส่วน 1:5 ปิเปตต์ตัวอย่าง 4 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate และเติมสาร

working Brad-Ford reagent 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการ เพื่อใช้ในการศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธี 2D gel electrophoresis

Protein Rehydration

เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ใน 125 ไมโครลิตร (use rehydration buffer) แล้วปิเปตต์ลงใน rehydration chamber จากนั้นค่อยๆ วาง IPG strip, non linear, pH 3-10 ลงบนตัวอย่างโดยให้หน้าเจลคว่ำ (ต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดฟอง) แล้วจึงปิเปตต์ mineral oil ให้ท่วมใน chamber ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน

Isoelectric focusing

นำกระดาษ electrode wick มาวางบนปลายทั้งสองด้านของ focusing tray และหยดน้ำกลั่น 8 ไมโครลิตรลงบนกระดาษ จากนั้นนำ IPG strip ที่ทำ rehydration เสร็จแล้วมาวางโดยให้หน้าเจลคว่ำ และปลายด้าน + หันไปทางซ้ายบวก จึงปิเปตต์ mineral oil ให้ท่วมใน chamber แล้วจึงทำการ focusing โดยใช้ condition ดังนี้

	V	Time	Volt-hour	Ramp
Step 1	250	15 min	-	rapid
Step 2	4,000	1 hr	-	slow
Step 3	4,000		10,000	rapid

เมื่อโปรตีนผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดย Isoelectric focusing จากนั้นนำมาแยกต่อด้วย SDS-PAGE

SDS-PAGE

เตรียม 12% acrylamide gel (10 มิลลิลิตร -2 เจล) ดังนี้

water	30% Acry:Bis	Gel buffer (1.5 mM)	10% SDS
3.4	4.0	2.5	0.1 มิลลิลิตร

จากนั้นเติม 10% APS (fresh) 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน Cast เจล ขนาด 7 เซนติเมตร เมื่อเจลแข็งแล้ว นำ IPG strip ไปล้างใน Equilibrium buffer I (Tris HCL 50 mM pH 8.8, 6M Urea, 30% Glycerol v/v, 2% SDS, 100 mg DTT, trace of Bromphenol blue) 10 นาที จากนั้นล้างต่อใน Equilibrium buffer II (Tris HCL 50 mM pH 8.8, 6M Urea, 30% Glycerol v/v, 2% SDS, 450 mg Iodoacetamid, trace of Bromphenol blue) เป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นล้างใน 1x SDS running buffer อีก 10 นาที

นำ IPG-strip ไปวางบนผิวหน้าของ acrylamide gel โดยหันด้านเจลออก และให้ด้าน pH 3 อยู่ ที่ขั้วบวก (ระวังไม่ให้เกิดฟอง ควรจะให้หน้าเจลแนบสนิทกัน) ใส่ protein marker ด้านขั้วบวก จากนั้น ปิดทับด้วย 1% agarose เริ่มให้กระแสไฟ โดยตั้งความต่างศักย์ที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้ว ปรับเป็น 200 โวลต์ จนสุดปลายเจล

การย้อมสี Silver (Silver stain Plus kit, Biorad)

สารเคมีที่ต้องเตรียมมีดังต่อไปนี้

- Fixative solution: methanol 50%, acetic acid 10%, deionized water 30% Fixative enhancer 10%
- Development accelerator solution: development accelerator reagent 2.5 g, deionized water 47.5 ml
- Silver solution: deionized water 35 ml, Silver complex solution 5 ml, Reduction moderator solution 5 ml, Image develop reagent 5ml, add development accelerator solution 50 ml
- Stop solution: 5% acetic acid, deionized water 95%

นำเจลมาแช่ในสารละลาย fixative solution เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ รอบละ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Silver solution ให้พอท่วมเจล รอจนเห็นจุดโปรตีนประมาณ 20 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย stop solution 15 นาที เก็บเจลไว้ในน้ำกลั่น แช่ในตู้เย็น 4°C

วิเคราะห์เจล

นำแผ่นเจลไปสแกนด้วยเครื่อง densitometer แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PDQuest® (Biorad) เพื่อวิเคราะห์โปรตีนที่มีความแตกต่างกัน

การตัดจุดโปรตีนและย่อยด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน

เลือกจุด (spot) โปรตีนที่ต้องการ โดยวางเจลที่จะตัดลงบนกระดาษตัดที่สะอาด (กระดาษที่ใช้ตัดต้องสะอาด เทน้ำกลั่น MS grade ไว้บนกระดาษ เพื่อป้องกันไม่ให้เจลติดกระดาษ) ใช้ pipette ที่ตัดปลายค่อยๆ ตัดจุดโปรตีนออกมาใส่ Eppendorf tube ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ปิดเตตต์น้ำส่วนเกินออกให้หมด แล้วจึงเติม Dehydrate solution (Acetonitrile : 100 mM Ammonium Bicarbonate; 1:1) 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาค่อยๆ ปิดเตตต์สารละลายทิ้งไป จากนั้นเติมสาร acetonitrile 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาค่อยๆ ปิดเตตต์สารละลายทิ้งไป เติมสารละลายทริปซินให้ท่วมชิ้นเจล นำไป incubate ที่ 37°C ทั้งคืน

นำ tube ไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที ปิดเตตต์สารมาใส่ tube ขนาด 0.6 มิลลิเมตร เติมสารละลาย Acetonitrile: 100 mM Ammonium Bicarbonate; 2:1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ใน tube เก่า (ที่มีชิ้นเจลอยู่) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที ปิดเตตต์ส่วนน้ำมาใส่ใน tube ที่เก็บสารน้ำไว้ นำไป lyophilize ด้วยเครื่อง Vacuum Spin นานประมาณ 3 ชั่วโมง เก็บไว้ที่ -80°C

Mass Spectrometry analysis

ภายหลังจากนำ spots ของโปรตีนที่สนใจมาย่อยเอ็นไซม์ทริปซินแล้ว นำส่วนของเปปไทด์ที่ได้มาศึกษาต่อโดยใช้เทคนิค Mass Spectrometry โดยนำตัวอย่างมาเติมสารละลาย 5% Formic acid in 50% Acetonitrile 6.6 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น MS grade 13.4 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 13,000 rpm 20 นาที เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปเข้าเครื่อง Mass Spectrometry

วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง Orbitrap/LTQ VELOS (Thermo) และนำไปค้นหาลำดับของโปรตีนโดยเทียบกับ malaria database ซึ่งจะใช้เปรียบเทียบน้ำหนักของเปปไทด์ที่วิเคราะห์ได้กับน้ำหนักของเปปไทด์ที่คำนวณได้ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

ผลการทดลอง

จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาไพริเมทามีนในหลอดทดลองพบว่า เชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพาร์มสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 มีความไวต่อยาที่ MIC 5×10^{-8} M ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ T9/94-M1-1(b3) มีความไวต่อยาที่ MIC 1×10^{-6} M ซึ่งมีคุณสมบัติต่อยาไพริเมทามีนถึง 500 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94 และเมื่อนำเชื้อดังกล่าวมีสกัดสารพันธุกรรม และทำการเพิ่มปริมาณยีน DHFR ด้วยวิธี PCR และนำไปศึกษาลำดับเบสของยีน DHFR ด้วยวิธี sequencing พบว่าเชื้อทั้งสองตัวนี้มีลำดับกรดอะมิโนของยีน DHFR เหมือนกันทุกประการ โดยเฉพาะตำแหน่ง V16, N51, C59, T108 และ I164 และไม่พบว่ามี gene amplification ของยีนดังกล่าวด้วย เมื่อทดสอบคุณสมบัติของเชื้อดังกล่าวแล้วและพบว่ามีคุณสมบัติตามที่ต้องการ จึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเพื่อใช้ในการศึกษารูปแบบของโปรตีนต่อไป

การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี 2D gel electrophoresis

จากการทดลองทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี 2D gel electrophoresis หลังจากย้อมด้วยสี silver แล้ว พบว่า จำนวนจุด (spot) ของโปรตีนที่ได้มีปริมาณน้อย และมีบางส่วนที่แยกได้ไม่ค่อยดีและจะเห็นเป็นแถบ (streak) ของโปรตีน ทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนสภาวะในการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าใหม่ เพื่อให้แยกได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังได้เพิ่มปริมาณของโปรตีนที่ใช้จาก 50 μ g เป็น 100 μ g และพบว่าได้จำนวนจุดโปรตีนเพิ่มขึ้นจากเดิม นอกจากนี้จะต้องปรับเปลี่ยนช่วง pH ของ strip ที่ใช้ จาก Broad range pH 3-10 ให้เป็น narrow range pH 4-7 เนื่องจากพบว่าโปรตีนมีการกระจายตัวอยู่ทางด้านซ้ายของเจลมากกว่าตรงกลางเจล (รูปที่ 1) เพื่อให้แยกได้ดียิ่งขึ้น พบว่าจากการใช้ narrow range pH 4-7 พบจุดของโปรตีนเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 2) ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากมีจุดของโปรตีนน้อยเกินไป จึงกลับมาใช้ Broad range pH 3-10 ตามเดิม แต่มีการปรับเปลี่ยน condition โดยเพิ่มเวลาในการทำ Isoelectric focusing เพิ่มขึ้น และกำจัด insoluble protein ออกให้ได้มากที่สุด พบว่าได้จุดของโปรตีนมากขึ้น และส่วนที่เป็นแถบของโปรตีนก็ลดลงไปเล็กน้อย (รูปที่ 3-4) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับระหว่าง T9/94 และ T9/94-M1-1(b3) ได้ผลดังรูปที่ 5



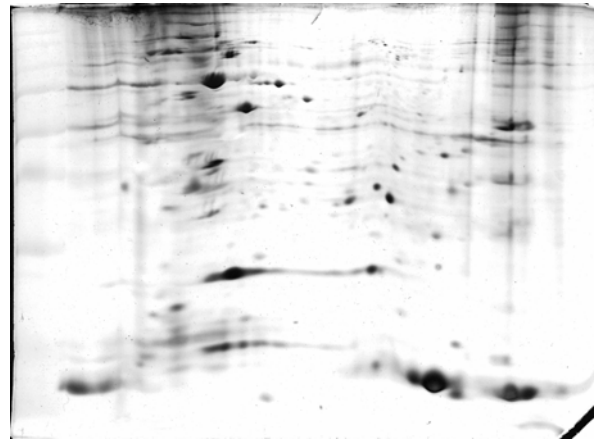
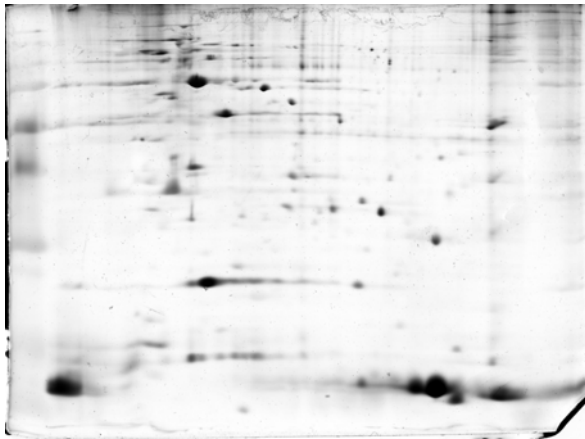
pH 3 → 10

รูปที่ 1 แสดงรูปแบบโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่ย้อมด้วยสี silver (broad range pH 3-10 strip)
จะเห็นว่า โปรตีนส่วนใหญ่มีการกระจายตัวอยู่ในบริเวณที่ pH เป็นกรด

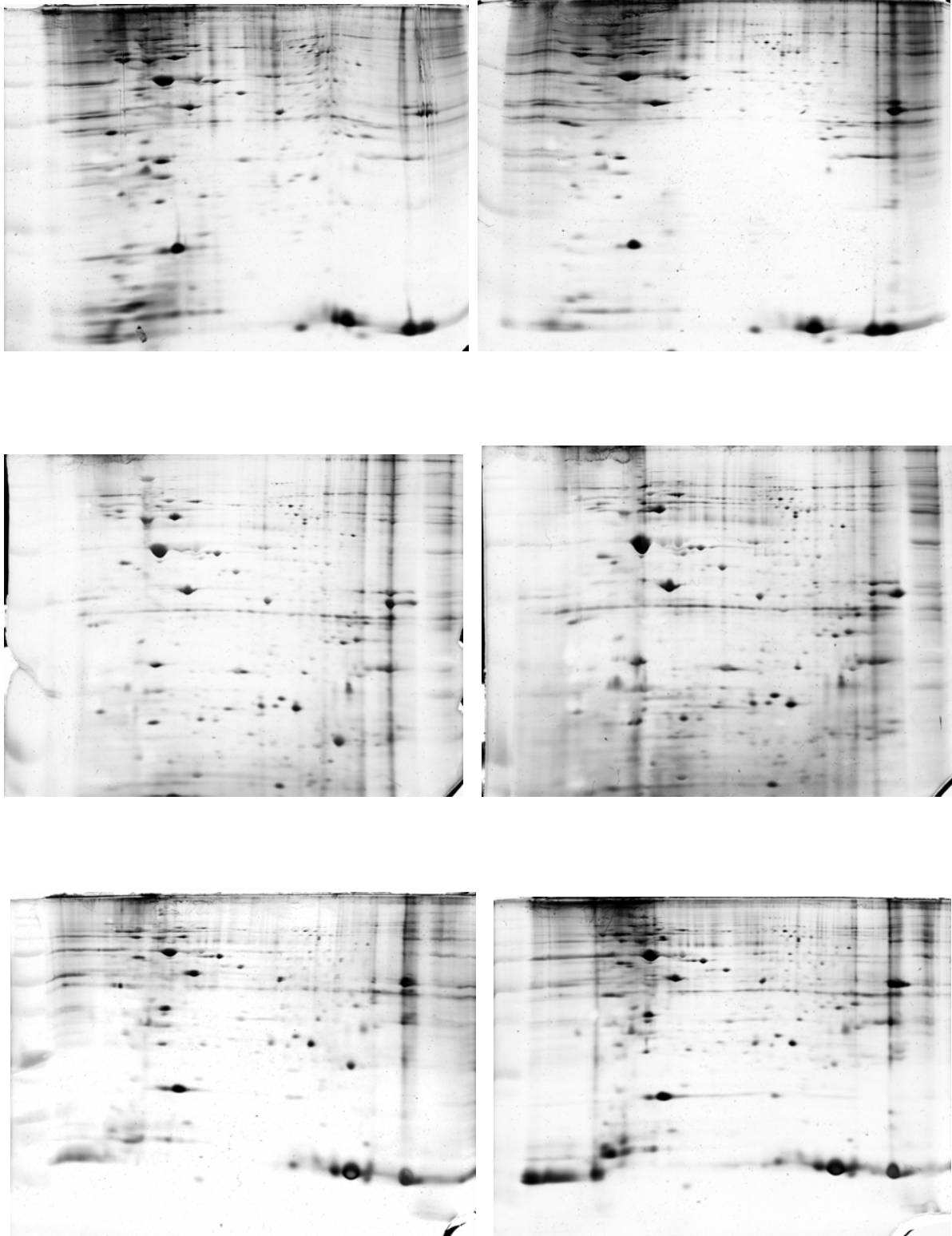


pH 4 → 7

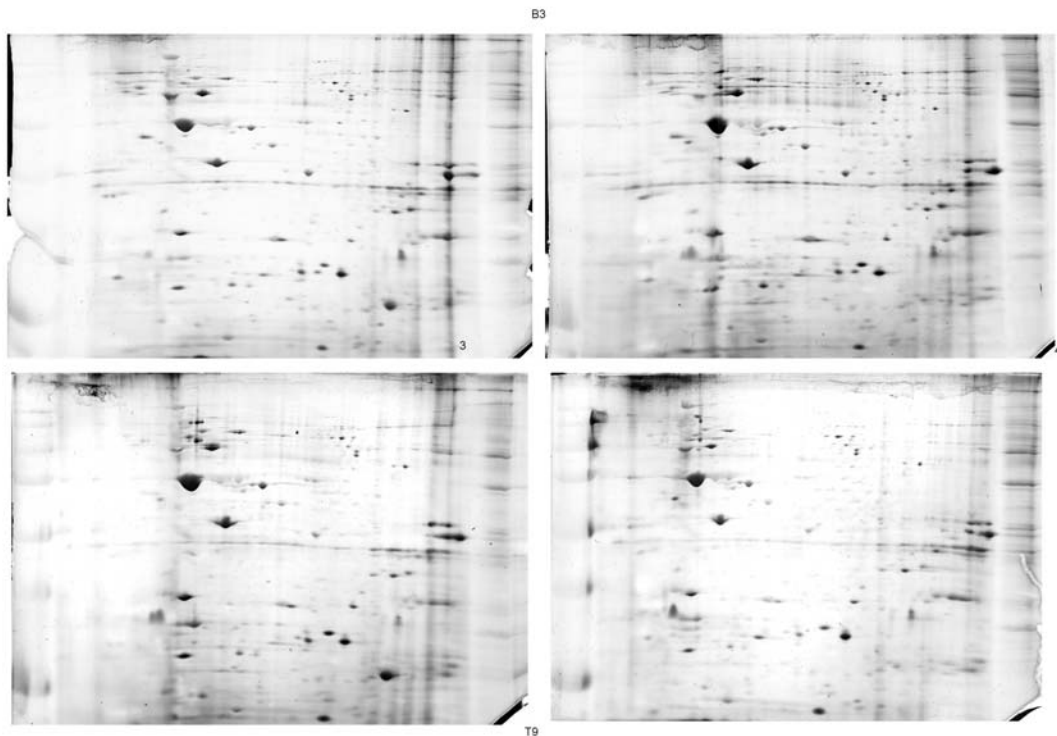
รูปที่ 2 แสดงรูปแบบโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่ย้อมด้วยสี silver (narrow range pH 4-7 strip)



รูปที่ 3 รูปแบบโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย T9/94 เมื่อแยกด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี silver
(Broad range pH 3-10 strip)

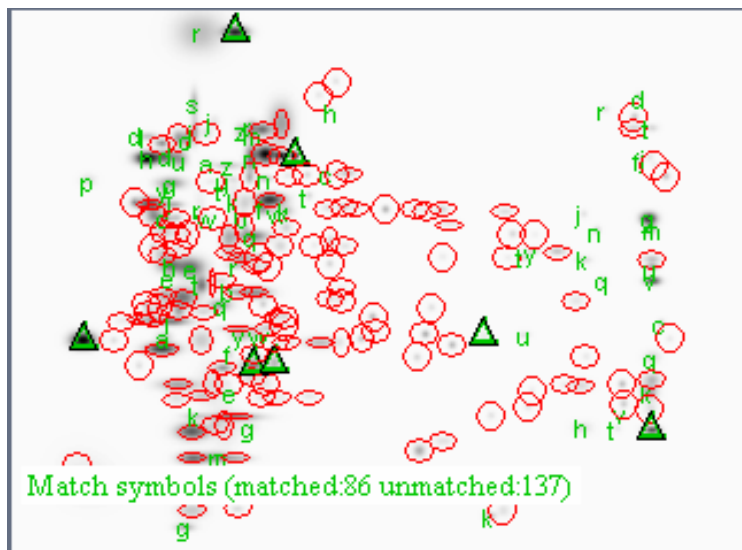


รูปที่ 4 รูปแบบโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย T9/94-M1-1(b3) เมื่อแยกด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี silver (Broad range pH 3-10 strip)



รูปที่ 5 รูปแบบโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย T9/94 (รูปล่าง) และ T9/94-M1-1(b3) (รูปบน) เมื่อแยกด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี silver (Broad range pH 3-10 strip)

เมื่อทำการวิเคราะห์จุดของโปรตีน โดยนำเจลที่มีการปรับเปลี่ยนสภาวะให้เหมาะสมแล้ว มาทำการ scan เพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มที่ไวต่อยากับกลุ่มที่ดื้อต่อยาด้วยโปรแกรม PDQuest® (Bio-Rad) เพื่อให้ได้ master gel ซึ่งเป็นตัวแทนของข้อมูลในแต่ละกลุ่มแล้ว จึงนำ master gel ของทั้ง 2 กลุ่มมาเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันต่อไป เมื่อทำการวิเคราะห์ master gel ของเชื้อมาลาเรียทั้งสองกลุ่มด้วยโปรแกรม PDQuest® (**รูปที่ 5**) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนบนเจลของเชื้อมาลาเรียทั้ง 2 กลุ่มพบว่าจำนวนจุดโปรตีนของ กลุ่ม T9/94 และ T9/94-M1-1(b3) มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (**ตารางที่ 1**)



T9/94 vs T9/94-M1-1(b3)

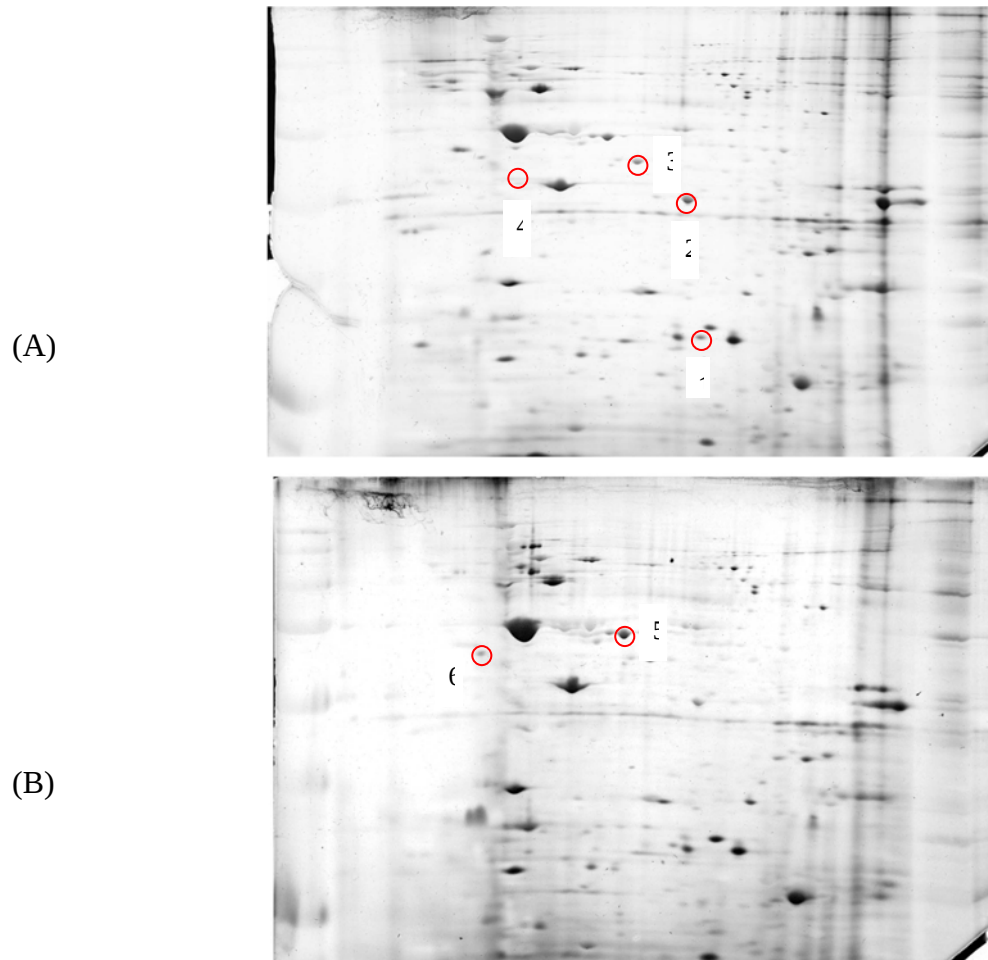
รูปที่ 5. การวิเคราะห์ Master gel ด้วยโปรแกรม PDQuest® ของเชื้อมาลาเรีย T9/94 และ T9/94-M1-1(b3)

ตารางที่ 1 . การเปรียบเทียบโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย T9/94 และ T9/94 M1-1 (b3) ที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน

Spot ID	T9/94	T9/94 M1-1 b3	(T9/94)/(T9/94 M1-1 b3)	Spot ID	T9/94	T9/94 M1-1 b3	(T9/94)/(T9/94 M1-1 b3)
SSP2005	1138890.13	345776.219	3.293720237	SSP4405	379744.156	257991.719	1.471923818
SSP2107	1153592.88	1492589	0.772880465	SSP4505	728346.813	155737.1414	4.676770143
SSP2108	403003.5	510445.969	0.789512553	SSP5003	67481.4141	771323.813	0.087487788
SSP2305	104756.281	152304.406	0.687808605	SSP33600	126669.016	12334.2734	10.26967799
SSP2306	12230.5869	91532.9531	0.133619494	SSP5005	55040.7031	12334.2734	4.462419578
SSP2404	517608.813	483472.031	1.070607563	SSP5108	171893.828	12334.2734	13.93627516
SSP2405	66350.4375	12334.2734	5.37935518	SSP5109	1058591	929660.125	1.138686033
SSP2406	18135.8828	136625.813	0.132741262	SSP5110	1061230	1136251.25	0.93397477
SSP3003	116490.258	256353.953	0.454411787	SSP5111	940969.813	661619.438	1.42222214
SSP3004	460683.156	303854.844	1.51612905	SSP5202	84446.0078	795451.25	0.106161135
SSP3005	102164.594	143633.609	0.711286131	SSP5305	297069	129651.008	2.291297265
SSP3104	23750.4414	12334.2734	1.925564695	SSP5407	133744.344	12334.2734	10.84330951
SSP3105	822594.625	569256.563	1.445033186	SSP5408	277842.469	198228.563	1.401626813
SSP3306	975653	2030036.38	0.480608628	SSP5409	73136.2734	206070.578	0.354908857
SSP3307	1970596.38	1681607.75	1.17185258	SSP5410	16210.6182	55571.2305	0.291708822
SSP3408	476516.781	12334.2734	38.63355104	SSP5411	675945.063	408002.313	1.656718703
SSP3409	710007.188	663085.438	1.070762751	SSP5412	78414.1563	108364.547	0.723614489
SSP3410	392070.75	12334.2734	31.78709741	SSP5413	151927.422	103640.156	1.465912711
SSP3510	263893.781	12334.2734	21.39516228	SSP5503	36630.4141	514767.5	0.071159143
SSP3511	1074047.75	464307.219	2.313226472	SSP6004	799221.188	80394.0391	9.941299093
SSP3512	770946.813	625952.75	1.231637393	SSP6106	595269	553050.125	1.076338243
SSP4003	718545.063	560486.813	1.282001728	SSP6107	496874.281	557296.625	0.891579562
SSP4004	250699.094	453520.313	0.552784708	SSP6108	126099.852	115207.727	1.094543355

SSP4005	73513.2656	12334.2734	5.960080762	SSP6205	897992.875	6016677.813	0.149250617
SSP4006	117621.227	12334.2734	9.536129384	SSP6305	220539.797	140917.438	1.565028432
SSP4007	49008.8438	12334.2734	3.97338718	SSP6306	12334.2734	107442.469	0.114798864
SSP4107	303583.938	306426.563	0.990723307	SSP6307	107442.469	249945.109	0.429864259
SSP4108	132323.875	194904.406	0.678916797	SSP6401	244290.25	121115.477	2.017002749
SSP4109	65219.4648	12334.2734	5.287661679	SSP6404	42599.9961	779774.75	0.054631156
SSP4110	27143.3613	235996.438	0.115015979	SSP6505	309886.688	436717.438	0.709581668
SSP4111	50893.8008	12334.2734	4.126209883	SSP7103	631460.125	804002.938	0.785395295
SSP4112	753.9822	12334.2734	0.061129033	SSP7104	238258.391	12334.2734	19.31677556
SSP4114	207.7056	12334.2734	0.016839711	SSP7206	779617.625	195658.391	3.98458569
SSP4310	38155	333573.781	0.114382491	SSP7207	436555.719	575665.438	0.758349712
SSP4311	211115.031	103872.344	2.032446972	SSP7304	949263.625	733247.75	1.294601484
SSP4313	306493.781	12334.2734	24.84895308	SSP7403	43454.6719	12334.2734	3.523083241
SSP4314	68812.7578	105528.398	0.652078105	SSP8102	227325.641	12334.2734	18.43040393
SSP4315	770472.875	12334.2734	62.46601239	SSP8305	834281.375	222424.766	3.750847489
SSP4317	131031.43	271253.719	0.483058557	SSP8306	883290.188	993140.563	0.889390909
SSP4319	123907.43	275181.844	0.450274728				

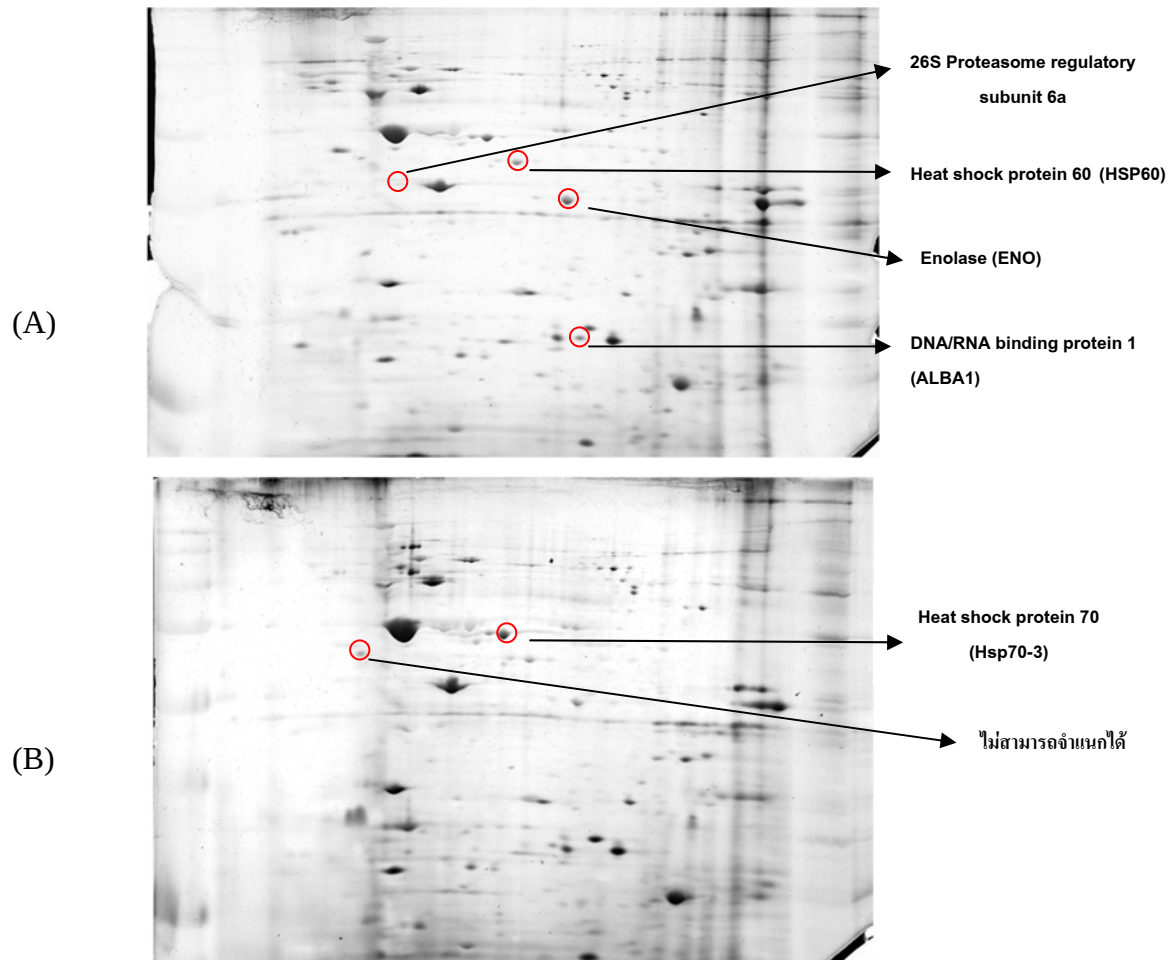
จาก Master gel ของ T9/94 และ T9/94 M1-1 (b3) เมื่อตัดเอาบางจุดของโปรตีนที่มีการแสดงออกที่ต่างกัน (in gel digestion) เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย Mass spectrometry (รูปที่ 6) เปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีนจากฐานข้อมูล **PlasmoDB (version 9)** พบว่าได้ผลผลิตโปรตีนดังแสดงใน ตารางที่ 2



รูปที่ 6. การเปรียบเทียบ Master gel ของเชื้อมาลาเรีย T9/94-M1-1(b3) (A) และ T9/94 (B) เมื่อแยกด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี silver และคัดเลือกโปรตีนบางจุดเพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย Mass spectrometry

ตารางที่ 2 การจำแนกโปรตีนบางตัวด้วย Mass spectrometry จาก 2D-E gel

Spot number	Coverage	Mw (kDa)	Calc. pI	Score	Protein Product	Up/Down regulate
B3 SSP4112	8.47	27.2	10.58	7.05	DNA/RNA binding protein 1 (ALBA1)	Down
B3 SSP4317	32.29	48.6	6.60	107.67	Enolase (ENO)	Down
B3 SSP4319	39.48	62.5	7.12	147.18	Heat shock protein 60 (HSP60)	Down
B3 SSP2306	12.98	49.5	5.19	62.03	26S Proteasome regulatory subunit 6a	Down
T9 SSP4005	38.16	73.3	6.84	199	Heat shock protein 70 (Hsp70-3)	Up



รูปที่ 6. การเปรียบเทียบ Master gel ของเชื้อมาลาเรีย T9/94-M1-1(b3) (A) และ T9/94 (B) เมื่อแยกด้วย 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี silver และคัดเลือกโปรตีนบางจุดเพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย Mass spectrometry

บทวิจารณ์

การศึกษาโปรตีน (Proteomics) เป็นการศึกษาการทำงานของสิ่งมีชีวิต แตกต่างจากการศึกษาทาง genomics ซึ่งเป็นการศึกษาข้อมูลพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าสิ่งมีชีวิตนั้นมีการทำงานอย่างไร เนื่องจากโปรตีนจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น เวลา ระยะการเจริญเติบโต และสภาวะทั้งภายในและภายนอกเซลล์ การศึกษาโปรตีโอมิกส์จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกและระบุชนิดของโปรตีนต่างๆว่ามีการเปลี่ยนแปลง การค้นหาหน้าที่และ pathway ที่เกี่ยวข้องของโปรตีน รวมถึงปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน

การแยกโปรตีนด้วยวิธี 2D gel electrophoresis ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถแยกโปรตีนได้ครั้งละมากๆ ซึ่งแตกต่างวิธีดั้งเดิมที่ใช้ column chromatography ที่สามารถแยกโปรตีนครั้งละชนิดและใช้เวลานาน นอกจากนี้เทคนิค 2D gel electrophoresis ยังสามารถศึกษาความแตกต่างของโปรตีนของเซลล์ที่อยู่ในภาวะปกติกับเซลล์ที่ผิดปกติหรือเกิดโรค (Cash, 2003; Washburn *et al.*, 2001) ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่มีประโยชน์นำไปสู่การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป สามารถระบุชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Mass spectrometry ต่อไป เนื่องจากการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเชื้อมาลาเรียมีค่อนข้างจำกัด (Cooper *et al.*, 2004, Makanga *et al.*, 2005, Prieto *et al.*, 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ภายหลังจากแยกโปรตีนด้วยวิธี 2D gel electrophoresis แล้ว นำโปรตีนที่ได้มาย่อยเป็นชิ้นเล็กๆด้วยเอนไซม์ แล้วสกัดเปปไทด์ที่ได้ออกมา นำไปศึกษาต่อด้วยเครื่อง Mass spectrometry นำ spectrum ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลมาลาเรีย ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลของโปรตีนจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนในการสกัดโปรตีนจากเชื้อมาลาเรียมีความยุ่งยากเนื่องจากโปรตีนมีขนาดใหญ่และมีการปนเปื้อนจากสารฮิโมโกลบินและสารอื่นๆเช่น thiourea ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการขั้นตอนการทำ 2 DE ทำให้เกิดเป็น smear และโปรตีนไม่แยกจากกัน (Sims *et al.*, 2006) มีรายงานว่าประสิทธิภาพของการแยกโปรตีนของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี 2D-E ค่อนข้างต่ำ ขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับเปลี่ยนขั้นตอนการสกัดเพื่อกำจัดเมมเบรนโปรตีนบางตัวที่ไม่ละลายรวมทั้งโปรตีนจาก host ซึ่งจะเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการแยกโปรตีน (Pantumthong *et al.*, 2006, Prieto *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนจากเม็ดเลือดแดง (Johnson *et al.*, 2004) ดังนั้น การเตรียมตัวอย่างในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีการแยกส่วนของเม็ดเลือดแดงออก โดยใช้สาร saponin ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก คงเหลือเพียงเชื้อมาลาเรีย ในขั้นตอนต่อไปจะปั่นล้างจนไม่เหลือสีของเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นการกำจัดโปรตีนของเม็ดเลือดแดง และจากผลการศึกษาวิจัยไม่พบโปรตีนจากเม็ดเลือดแดงเลย นอกจากนี้ในกระบวนการสกัดโปรตีนนั้น เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ในเชื้อมาลาเรียเป็น non soluble proteins และ transmembrane proteins จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้อาหารละลายที่เป็น strong buffer (ประกอบไปด้วย urea และ thiourea) ซึ่งสารเหล่านี้รับกระบวนการแยกโปรตีน โดยเฉพาะสาร urea จะทำให้เกิด streak ในการแยก (ดังจะเห็นได้จากรูปเจล) อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นจะต้องใช้สารนี้ในการละลายโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย

จากการเลือกจุดของโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเชื้อ T9/94-M1-1(b3) และ T9/94 จำนวน 6 จุดจากจำนวนโปรตีนทั้งหมดของเชื้อมาลาเรียจาก 2D-E gel เพื่อนำไปจำแนกชนิดของโปรตีนด้วย Mass spectrometry พบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกที่ต่างกันใน T9/94-M1-1(b3) ได้แก่ DNA/RNA binding protein 1 (ALBA1), Enolase (ENO), Heat shock protein 60 (HSP60), 26S Proteasome regulatory subunit 6a และในเชื้อ T9/94 ได้แก่ Heat shock protein 70 (Hsp70-3) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 27 ถึง 73 kDa และมีค่า pI ตั้งแต่ 5-10 จากการศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกที่ต่างกันในเชื้อมาลาเรียที่ทดสอบด้วยยาไพริเมทามีนเปรียบเทียบกับไม่ได้เชื้อที่ไม่ได้ทดสอบโดยการติดสารไอโซโทปที่ต่างกันพบว่ามีโปรตีนบางตัวที่มีการแสดงออกที่ลดลง ได้แก่ heat shock protein HSP-72, enolase, PMT และ actin-I ในเชื้อที่ได้รับการทดสอบด้วยยาไพริเมทามีน (Nirmalan *et al.*, 2004, Sim *et al.*, 2006) DNA/RNA binding protein 1 (ALBA1) นั้นเป็นโปรตีนที่จับกับปลายของโครโมโซม ซึ่งมีความจำเพาะกับ TARE6 (Telomere-Associated Repetitive Elements 6) บริเวณ subtelomeric region โดยโปรตีนนี้จะมีความสัมพันธ์การ histone deacetylase การเปลี่ยนแปลงโปรตีนนี้แสดงให้เห็นว่าการดื้อต่อยาไพริเมทามีนนั้น เชื้อมาลาเรียนอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลง binding site ของเอนไซม์ dihydrofolate reductase แล้วนั้น ยังมีการเปลี่ยนแปลงโปรตีน binding อื่นๆ ด้วย การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน 26S Proteasome regulatory subunit 6a ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับ ATPase family associated with various cellular activities (AAA) แสดงให้เห็นว่าการที่เชื้อมาลาเรียปรับตัวให้ดื้อต่อยาไพริเมทามีนนั้น จำเป็นที่จะต้องอาศัย ATP และ กระบวนการต่างๆ ในเซลล์เพื่อ maintain การดื้อยา สำหรับโปรตีน Heat shock (Hsp) ในเชื้อมาลาเรียประกอบไปด้วย Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 และอื่นๆ จำนวนมาก หน้าที่ของโปรตีนนี้ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ รวมทั้งกระบวนการ protein folding, assembly และ protein translocation ซึ่งภาวะ pyrimethamine drug pressure ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน Heat shock 60 และ 70 ของเชื้อมาลาเรียเปลี่ยนแปลงไป เอนไซม์ enolase สามารถพบได้ทุกกระยะ เอนไซม์นี้จะพบใน cytoplasm, nucleus, food vacuole, cytoskeleton และ plasma membrane ซึ่งเอนไซม์นี้มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการ glycolytic อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์นี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานในการ maintain การดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย

การศึกษาโปรตีนในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึง protein pattern ของเชื้อมาลาเรียที่มีสายพันธุ์เดียวกัน แต่ได้รับการกดดันให้ดื้อยา โดยพบว่าถึงแม้จะมีการรายงานว่าการดื้อยา pyrimethamine จะทำให้ enzyme binding เปลี่ยนไป ทำให้ยาไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ ทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลง แต่จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าระดับการดื้อยาของเชื้อกับการกลายพันธุ์ (mutation) มีความสัมพันธ์กันน้อยมาก และผลจากการศึกษารูปแบบโปรตีนในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรียเพื่อให้ดื้อต่อยา pyrimethamine นั้น มีกระบวนการหลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของ protein binding และ heat shock protein เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Guerra CA, Snow RW, Hay SI, 2006. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol.* 22: 353–358.

Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates III, J.R., Carucci, D.J., 2002. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature.* 419: 520–526.

Thaithong S, Chan SW, Songsomboob S, Wilairat P, Seesod N, Sueblinwong T, Goman M, Ridley R, Beale G. 1992. Pyrimethamine resistance mutations in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52: 149-158.

Bzik DJ, Li WB, Horii T, and Inselburg J. 1987. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 8360-8364.

Gregson AL and Plowe CV. 2005. Mechanism of resistance of malaria parasite to antifolates. *Pharmacol Rev.* 57: 117-145.

Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O and Wellems TE. 1995. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 52: 565-568.

Washburn MP, Wolters D, Yates JR. 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19: 242-247.

Prieto JH, Koncarevic S, Park SK, Yates J, Becker K. 2008. Large-scale differential proteome analysis in *Plasmodium falciparum* under drug treatment. *PLoS ONE.* 3:e4098

Trager W and Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 193(4254): 673-5.

Cash, P. 2003. Proteomics of bacterial pathogens. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 83: 93-115.

Cooper RA and Carucci DJ. 2004. Proteomic approaches to studying drug targets and resistance in *Plasmodium*. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 4: 41-51.

Makanga M, Bray PG, Horrocks P, Ward SA. 2005. Towards a proteomic definition of CoArtem action in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proteomics*. 5: 1849–1858.

Sims PFG and Hyde JE. 2006. Proteomics of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Exp. Rev. Proteomics*. 3: 87–95.

Pantumthong P, and Vattanaviboon P. 2006. Improvement of proteomic profile of *Plasmodium falciparum* by two step protein extraction in two dimensional gel electrophoresis. *Thammasat Int J Sci Technol*. 11: 61-68.

Johnson JR, Florens L, Carucci DJ, and Yates JR. 2004. Proteomics in malaria. *Journal of proteome research*. 3: 296-306.

Nirmalan N, Sims PFG, Hyde J. Quantitative proteomics of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and its application to studies of development and inhibition. *Molecular Microbiology*. 2004. 52(4): 1187-1199

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. **Rungsihirunrat K.** (2010). Comparison of protein patterns between *Plasmodium falciparum* mutant clone T9/94-M1-1(b3) induced by pyrimethamine and the original parent clone T9/94. Proceeding of The XIIth International Congress of Parasitology (ICOPA). August 15-20, 2010. Melbourne, Australia.

2. **Rungsihirunrat K,** Chaijaroenkul W, Siripoon N, Seugorn A, Thaithong S, Na-Bangchang K. (2012). Comparison of protein patterns between *Plasmodium falciparum* mutant clone T9/94-M1-1 (b3) induced by pyrimethamine and the original parent clone T9/94. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(1): 66-69.

ภาคผนวก

Reagents

Stock 1% Saponin in PBS (1 g saponin in 100 ml PBS, sterized by filter)

Dilute to 0.15% saponin in PBS (15 ml of stock 1% saponin + 85 ml PBS), keep in 4 C.

10 mM Tris-HCl pH 7.4 (100 ml)

Dissolved 121 mg Tris base in 50 ml water, then adjust pH to 7.4 with 1 N HCl, adjust to final volume 100 ml with water. Sterile by filtering through 0.2 um acrylic membrane. Store at RT.

Lysis buffer (10 ml)

Dissolved the following ingredients in 5 ml water

8M Urea	8.84 g
2M Thiourea	1.52 g
1% CHAP (4 C)	0.1 g
65 mM DTT (-20 C)	0.1 g
0.5% ampholyte 3-10 (4 C)	50 ul

Then adjust to final volume 10 ml with water. Store at 4 C until use or -20 C for longer.

Rehydration buffer (10 ml)

Dissolved the following ingredients in 5 ml water

8M urea	4.8 g
1% CHAP (4 C)	100 mg
15mM DTT (-20 C)	23 mg
0.001% bromophenol blue	0.1mg

Then adjust to final volume of 10 ml. Aliquot 1 ml in microtube and store at -20 C until use

10% Ammonium persulphate

Dissolve 50 mg ammonium persuphate in 0.5 ml water

10% SDS

Dissolved 10 g of SDS in 100 ml of water

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Dissolved 18.15 g Tris base in 50 ml of water and adjusted to pH 8.8 using 1 N HCl and then adjusted to a final volume of 100 ml with water. The solution was filtered through a 0.2 um acrylic membrane and stored at 4 C until used

0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Dissolved 6.05 g Tris base in 50 ml of water and adjusted to pH 6.8 using 1 N HCl and then adjusted to a final volume of 100 ml with water. The solution was filtered through a 0.2 um acrylic membrane and stored at 4 C until used

EQI and EQII (100 ml)

The stock equilibrium buffer contained 6 M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl and 20% glycerol. The stock solution was stored at – 20 C until used. For preparing the EQI and EQII, DTT (- 20 C) (130 mM) and iodoacetamide (4 C) (IAA, 135 mM) was added into stock solution for preparing EQI and EQII, respectively.

6 M Urea	36g
2%SDS	2g
0.375M Tris HCl (1.5 M Tris-HCl pH8.8)	25 ml
20% Glycerol (autoclave)	20 ml

Aliquot 10 ml/ tube and store at -20C. For EQI, add DTT 200mg/10ml before use. For EQII, add IAA 250 mg/10ml EQ before use.

Stock acrylamide solution (30%)

Dissolved 30 g acrylamide and 0.8 g Bis acrylamide in 100 ml water. The solution was filtered through a 0.2 um acrylic membrane for sterilizing and stored at 4 C in dark brown bottle.

Separating gel (12%) (5 ml /small gel)

The polyacrylamide separating gel (12%) consisted of the following ingredients:
3.25 ml of water. 2.5 ml of 1.5 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 ul of 10% SDS solution, 4 ml of 30% stock acrylamide solution. The polymerization was initiated by adding 50 ml of 10% ammonium persulphate (freshly prepared) and 5 ml TEMED. The gel was poured into the casting apparatus, overlaid with water and allowed to polymerize for at least 30 min at room temp.

10X Electrode buffer pH 8.3

The electrode buffer contained the following ingredients:
30.3 g of Tris-base, 144 g of glycine, and 10 g SDS. The buffer was prepared by dissolving all above reagents in a small volume of water, adjusted pH to 8.3 with conc HCl and then adjusted to make a final volume of 1 liter.

1X Electrode buffer pH 8.3 (Running buffer)

50 ml of 10X electrode buffer was diluted in 450 ml of water.

Overlay agarose gel

Dissolved 0.5 g low melt agarose and 0.001 g (1 mg) bromophenol blue in 100 ml 1X electrode buffer. Melt the solution until completely dissolve. The solution was stored at 4 C until used.

Coomassie Brilliant Blue stain

The Coomassie Brilliant Blue stain was prepared by dissolving 1 g of Coomassie Brilliant Blue R-250 dye in 333 ml of absolute methanol, 333 ml glacial acetic acid and 333 ml of water and then filtered through a Whatman No. 1 paper and stored at room temp until used.

Destaining solution

The solution was prepared by mixing 100 ml glacial acetic acid, 100 ml methanol, and 800 ml of water and then stored at room temp.