574.1925
ธ 379ก
ว 3

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บางชนิดในระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด

ปริญญานิพนธ์

ของ

ธรัตน์ มหายศนันท์

ธ.ค. พ.ศ. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2530

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178517

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บางชนิดในระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด

บทคัดย่อ

ของ

ธรัตน์ มหายศนันท์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2530

การศึกษาเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์เอสเทอเรสจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดโดยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลี-อะคริลอาไมด์ พบว่า เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสมี 3 ไอโซไซม์ ซึ่งแต่ละไอโซไซม์มีปริมาณไม่เท่ากัน ไอโอไซม์ที่มีมากที่สุดมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีค่าประจุบวกสุทธิของโมเลกุลสูงกว่าไอโซไซม์อื่น ๆ และจากการศึกษาไคเนติกของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส พบว่า สามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่สุด ที่สภาพความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 10 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสมีคุณสมบัติคงสภาพนานถึง 5 วัน ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนสและเอนไซม์เอสเทอเรส

A STUDY ON PROPERTIES OF SOME ENZYMES IN INFECTIVE STAGE OF *Gnathostoma spinigerum*

AN ABRTRACT

BY

THARUTN MAHAYOSSANUNT

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Marter of Education degree

at Srinakharinwirot University

Febuary 1987

Polyacrylamide gel electrophoresis on enzyme lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and esterase of the infective stage of Gnathostoma spinigerum was carried out. Three bands of malate dehydrogenase were detected and the most cathodal band was most intense in color, while the rest were less intense. The optimum pH for the activity of malate dehydrogenase was 10, and the optimum temperature was 55 °C. The stability of malate dehydrogenase lasting for 5 day at 8 °C was found. The activity of lactate dehydrogenase and esterase could not be found in this study.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา		คณะกรรมการสอบ	
.....	ประธาน	.....	ประธาน
.....	กรรมการ	.....	กรรมการ
		.....	กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ และผู้ช่วยศาสตราจารย์พันธุ์สิน เกตุทัต ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณรุ่งลาวรรณ ไพรวรรณ ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ขอขอบคุณญาติ มิตร ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ธรัตน์ มหายศนันท์

สารบาญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	คำนำ	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	4
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	5
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	5
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	5
2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	9
3	วิธีดำเนินการ	13
	อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการ	13
	วิธีดำเนินการและรวบรวมข้อมูล	14
	การเก็บรวบรวมตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด	14
	การสกัดโปรตีนและเอนไซม์จากเนื้อเยื่อเซลของตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด	14
	การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง	15
	การแยกโปรตีนและเอนไซม์ในสารตัวอย่าง	17
	การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์	20
4	ผลการศึกษาค้นคว้า	24
	การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง	24
	การแยกโปรตีนและเอนไซม์ในสารตัวอย่างด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์	26

บทที่ หน้า

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส 29
การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการทำงานของ
เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส 29
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์
มาเลตดีไฮโดรจีเนส 32
การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส 35

5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 38
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า 38
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า 38
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล 38
สรุปผลการศึกษาค้นคว้า 39
อภิปรายผล 39
ข้อเสนอแนะ 44

บรรณานุกรม 45

ภาคผนวก 51
1. รูปร่างลักษณะของพยาธิตัวจี๊ด 52
2. การเตรียมสารเกมี 57
3. การคำนวณค่าสเปซิฟิคแอคติวิตี 59

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ ... 19

2 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง .. 26

3 แสดงค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่อุณหภูมิ 25 °C ณ pH ต่าง ๆ เมื่อมีความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง 0.168 mg 30

4 แสดงค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่ pH 10 ณ อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อมีความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง 0.021 mg 33

5 แสดงค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเก็บอุณหภูมิ 8 °C ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยให้เอนไซม์ทำงานที่ pH 10 อุณหภูมิ 55 °C และมีความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง 0.021 mg 36

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แผนภาพแสดงวงชีวิตของ *G. spinigerum*	2
2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโมเมตร	25
3	ภาพถ่ายและแผนงานแสดงเปรียบเทียบแถบของโปรตีนและเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากการแยกโปรตีนและเอนไซม์โดยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์	27
4	แสดงผลการแยกโปรตีนและเอนไซม์โดยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์ แล้วนำมาย้อมสีหรือย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์	28
5	กราฟแสดงผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส	31
6	กราฟแสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส	34
7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสกับระยะเวลาที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 8 °C	37
8	ภาพถ่ายและแผนภาพแสดงรูปร่างลักษณะของไข่ *G. spinigerum* ...	52
9	ภาพถ่ายและแผนภาพแสดงตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *G. spinigerum* ..	53
10	แผนภาพแสดงตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อของ *G. spinigerum*	54
11	ภาพถ่ายแสดงตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด	55
12	ภาพถ่ายแสดงตัวแก่ของพยาธิตัวจี๊ด	56

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

พยาธิตัวจี๊ด (*Gnathostoma* spp) เป็นพยาธิตัวกลมที่มีรายงานการตรวจพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1836 โดย ริชาร์ด โอเวน (Richard Owen) ซึ่งตรวจพบที่ก้อนเนื้องอกบริเวณกระเพาะอาหารของเสือ (*Felis tigris*) ที่ตายในสวนสัตว์กรุงลอนดอน (Daengsvang. 1986 : 124 - 147) ต่อมาพบในสัตว์ป่าหลายชนิด เช่น สุนัข แมว เสือดาว สัตว์ที่กินปลาเป็นอาหาร (ธงชัย ปภัสราทร และคนอื่น ๆ 2526 : 111 - 117, Jaroonvesama and Harinasuta. 1973 : 312 - 313) ในคนนั้นมีรายงานครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1889 โดยพบพยาธิชนิดนี้ในหญิงสาวชาวไทย (Daengsvang. 1983 : 1 - 10, Daengsvang. 1986 : 124 - 147)

จากการศึกษาทางชีววิทยาและอนุกรมวิธาน ได้มีการจัดหมวดหมู่ของพยาธิตัวจี๊ดไว้ดังนี้

Phylum Nematoda

Class Phasmidia

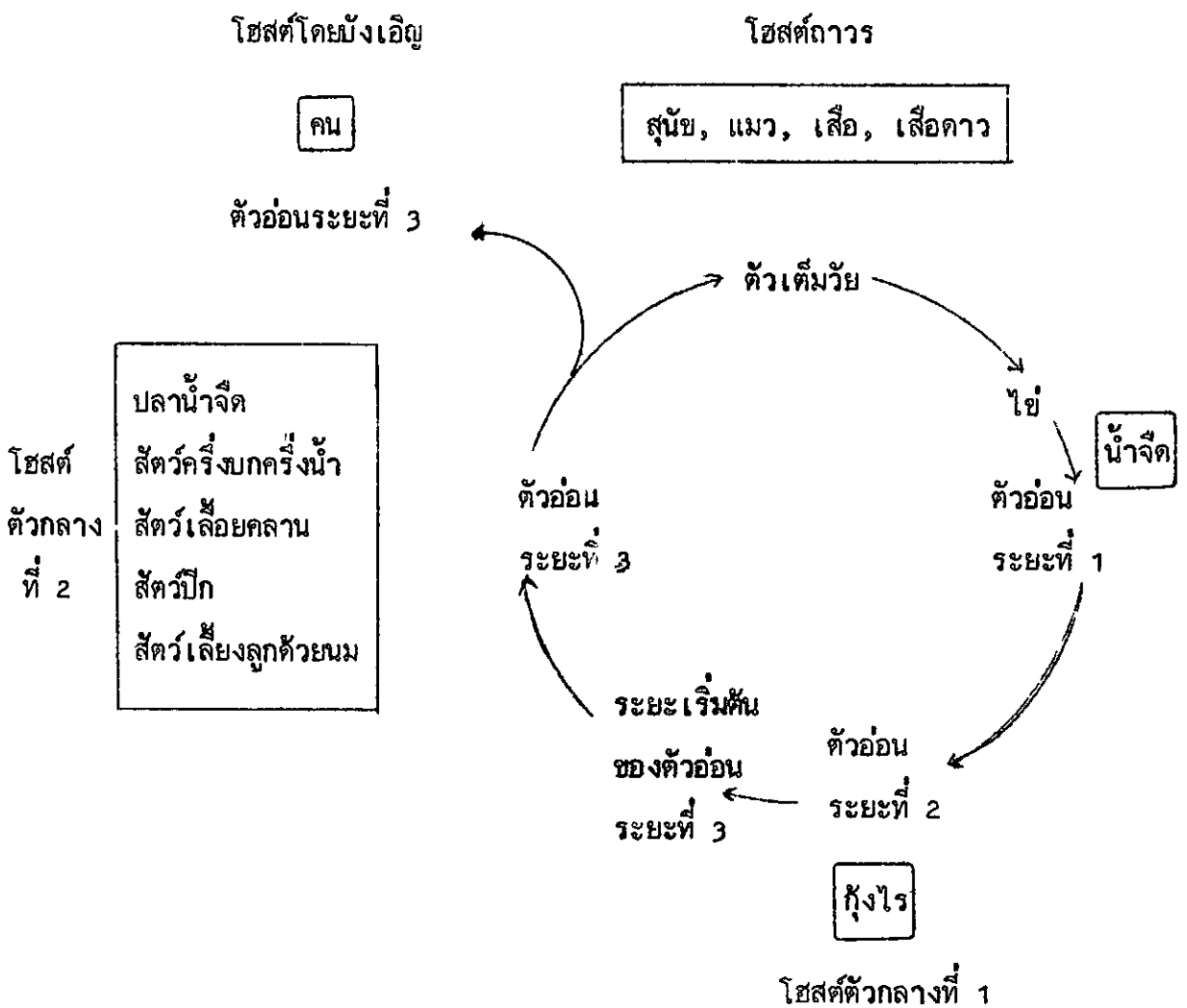
Order Spirurida

Family Gnathostomatidea

Genus Gnathostoma

ใน Genus Gnathostoma มี 19 species (Miyazaki. 1960 : 338 - 370) แต่มี *G. spinigerum* เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคพยาธิตัวจี๊ดในคน (Gnathostomiasis) (สมพนธ์ บุญยคุปย์ 2510 : 686 - 694)

วงชีวิตของพยาธิตัวจี๊ด



ภาพประกอบ 1 แสดงวงชีวิตของ G. spinigerum

จากภาพจะเห็นว่าคนเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ เมื่อคนบริโภคอาหารที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด (ภาคผนวก) ซึ่งเป็นระยะติดต่อ (infective stage larva) เข้าไป ตัวอ่อนจะไชทะลุกระเพาะอาหาร เคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ทำให้เกิดอาการของโรคพยาธิตัวจี๊ดขึ้น โดยที่ตัวอ่อนเหล่านี้จะไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้เลย (หลวงเฉลิม คัมภีร์เวชช์ และสวัสดิ์ แดงสว่าง 2477 : 49 - 53, ธงชัย ปภัสราทร และคนอื่น ๆ 2526 : 111 - 117)

โรคพยาธิตัวจี๊ดในคนเป็นโรคที่พบได้ในภูมิภาคแถบตะวันออกไกล ตลอดจนตะวันออก-กลาง และพบเสมอในประเทศไทย อาการที่รู้จักกันดี คือ การบวมเคลื่อนที่ตามผิวหนังโดยไม่เจ็บปวด (ทนงศักดิ์ บุนนาค พิพัฒน์ ชุติชูเดช และสมพนธ์ บุณยคุปต์ 2511 : 813 - 821) จากการศึกษาพบว่า พยาธิชนิดนี้ทำให้เกิดพยาธิสภาพแก่อวัยวะภายในต่าง ๆ ได้โดยที่พยาธิตัวเดียวสามารถเคลื่อนที่ไปตามอวัยวะต่าง ๆ ได้หลายแห่ง มีรายงานหลายฉบับในประเทศไทยซึ่งกล่าวถึงอันตรายและความร้ายแรงของพยาธิตัวจี๊ด ซึ่งอาจเกิดขึ้นกับคนในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ใต้ผิวหนัง (ประดิษฐ์ ตัณฑสุรัต 2498 : 25 - 32, Daengsvang, Sangsinkeo and Senivong Na Ayudhaya. 1973 : 260 - 262) ในปอดและเยื่อหุ้มปอด (Prijyanonda, Pradatsundarasar and Viranuvatti. 1955 : 121, Bovornkitti and Tandhanand. 1959 : 328, Vivulseth and Leelarasamee. 1980 : 23 - 24) ในช่องท้องและลำไส้ (ส. เสยยงคะ 2507 : 218, Daengsvang. 1939 : 339) ในเปลือกตาและลูกตา (จำรัส ฤทธิแพทย์ และสวัสดิ์ แดงสว่าง 2479 : 840 - 845, บรรจงศักดิ์ นะมาตร์ และคนอื่น ๆ 2505 : 549 - 556) ในหู (Prasansak. 1974 : 260) ในปาก (ประดิษฐ์ ตัณฑสุรัต 2498 : 25 - 32) ในมดลูกและช่องคลอด (Srisongkram and Saraya. 1969 : 531 - 533) ในกระเพาะปัสสาวะและทางเดินปัสสาวะ (ประณต มิคะเสน สมทรง ธนภูมิ และปรีชา เจริญลาภ 2507 : 85 - 90) ในสมองและไขสันหลัง (สมพนธ์ บุณยคุปต์ และพิพัฒน์ ชุติชูเดช 2510 : 367 - 373, Chitanondb and Rosen 1967 : 638) โดยอุปนิสัยของการกินทำให้พยาธิตัวจี๊ดเป็นปัญหาที่สำคัญในเรื่องสุขภาพอนามัยอย่างหนึ่งของชาวไทย แต่การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจี๊ดที่ได้ผลแน่นอนยังไม่เป็นที่ยอมรับกัน แนวการตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันยังต้องอาศัยประวัติอาการทางคลินิค และผลเลือดของผู้ป่วยเป็นสำคัญ (พวงน้อย ณ สงขลา 2526 : 316 - 321) การทดสอบทางผิวหนัง (skin test) เป็นวิธีการหนึ่งที่สะดวกและนิยมใช้ แต่ก็ให้ผลในการตรวจวินิจฉัยไม่แน่นอน (Miyazaki. 1960 : 338 - 370) ด้านการรักษาก็ยังไม่มีวิธีใดได้ผลดีเท่ากับการให้ตัวพยาธิออกมาจากร่างกาย ซึ่งตามรายงานทางการแพทย์มักจะเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญ มีการทดลองใช้ยาหลายชนิดในการรักษาโรคพยาธิตัวจี๊ดทั้งใน

สัตว์ทดลองและคน แต่ยังไม่สามารถค้นพบยาที่ให้ผลโดยตรงต่อการรักษา (Jaroonvesama and Harinasuta. 1973 : 312 - 313, Setasuban, Chiamratana and Muennoo. 1981 : 454)

แนวทางการวินิจฉัยโรคหนอนพยาธิหลายชนิดให้ความสำคัญกับการศึกษาเอนไซม์ที่เป็นส่วนประกอบของพยาธิ เช่น พยาธิใบไม้ในตับ (Agatsuma. 1981 : 157 - 159, Agatsuma and Suzuki. 1980 : 249 - 254, Probert and Lewin. 1977 : 89 - 94) พยาธิใบไม้ในปอด (Agatsuma and Suzuki. 1981 : 37 - 43) พยาธิใบไม้ในเลือด (Agatsuma and Suzuki. 1983 : 27 - 30) พยาธิตืด (Logan, Ubelaker and Vrijenhoek. 1977 : 51 - 53, Moon, Hulbert and Mustafa. 1977 : 249 - 254) พยาธิไส้เดือนตัวกลม (Agatsuma and Suzuki. 1981 : 81 - 83, Zee and Zinkham. 1968 : 574 - 584) โดยเฉพาะเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส มีการศึกษากันมาก เพราะเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ และเอนไซม์เอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน พบว่ามีการศึกษาในพยาธิใบไม้ในปอด (Agatsuma and Suzuki. 1981 : 37 - 43) พยาธิไส้เดือนตัวกลม (Zam. 1973 : 797 - 803) ความรู้ที่ได้จากการศึกษาเอนไซม์ในพยาธิเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพยาธิทั้งในคนและสัตว์

การศึกษาถึงชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่เป็นส่วนประกอบของพยาธิตัวจี๊ดในระยะติดต่อ จะเป็นความรู้พื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการตรวจวินิจฉัย และการรักษาโรคพยาธิตัวจี๊ดต่อไป

<u>ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า</u>

เพื่อตรวจหาเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์เอสเทอเรส ที่เป็นส่วนประกอบของตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ตรวจพบ

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ผลจากการศึกษาทำให้ทราบเทคนิควิธีการตรวจหาโปรตีน เอนไซม์มาเลตดี-ไฮโดรจีเนส เอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนสและเอนไซม์เอสเทอเรส รวมทั้งวิธีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ในตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด

2. ผลจากการศึกษาค้นคว้าและวิเคราะห์ จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ ชีวเคมีและสรีรวิทยาของหนอนพยาธิ รวมทั้งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยเพื่อการตรวจวินิจฉัย และรักษาโรคพยาธิตัวจี๊ดที่ได้ผลแน่นอนต่อไป

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดที่ตรวจหาจากปลาไหลน้ำจืดจากตลาดในกรุงเทพมหานคร

2. ศึกษาโปรตีนและเอนไซม์ในส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปของสารละลาย (soluble protein)

3. ตรวจหาโปรตีนและเอนไซม์ด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์

4. เอนไซม์ในการศึกษาครั้งนี้คือ เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์แลคเทตดี-ไฮโดรจีเนส และเอนไซม์เอสเทอเรส

5. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนสด้วยการตรวจหาปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm.

6. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เอสเทอเรส ด้วยวิธีคัลเลอริเมตริค (colorimetric method) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 555nm.

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

1. พาราไซต์ (parasite) หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่ต้องอาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตอื่นและทำให้สิ่งมีชีวิตที่ถูกอาศัยอยู่นั้นเกิดโรค

2. โฮสต์ (host) หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่ยอมให้พาราไซต์เข้าอาศัยอยู่

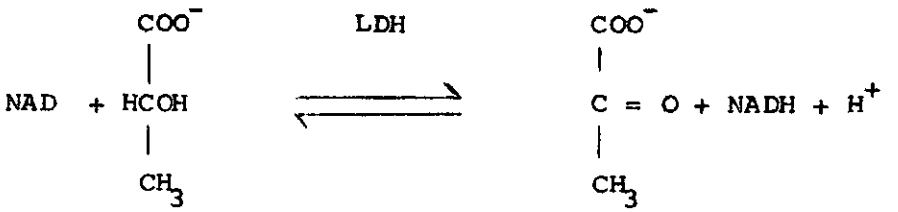
3. โฮสต์ถาวร (definitive host) หมายถึง โฮสต์ที่มีตัวแก่ของพยาธิเจริญเติบโตอยู่ได้ตามปกติ และพยาธิผสมพันธุ์ได้ในโฮสต์นั้น

4. โฮสต์ตัวกลาง (intermediate host) หมายถึง โฮสต์ที่มีระยะตัวอ่อนของพยาธิ อาศัยอยู่และเจริญได้ชั่วระยะหนึ่ง เพื่อที่จะอยู่ในโฮสต์อื่นอีกต่อไป

5. โฮสต์โดยบังเอิญ (accidental host) หมายถึง โฮสต์ที่มีพาราไซต์อาศัยอยู่โดยบังเอิญ ซึ่งพาราไซต์นั้นจะไม่สามารถเจริญ และเพิ่มจำนวนต่อไปได้

6. โฮโมจีเนต (homogenates) หมายถึงของเหลวที่ได้จากการนำเอาพยาธิตัวจี๊ดไปบดด้วยเครื่องบดทำให้เนื้อเยื่อหลุดเป็นเซล

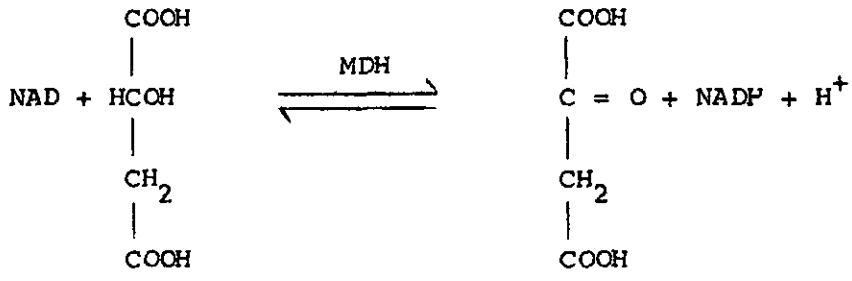
7. เอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase : LDH) หมายถึง เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงระหว่างแลคเทต (lactate) กับไพรูเวท (pyruvate) ดังสมการ



แลคเทต ไพรูเวท

ปฏิกิริยานี้พบในเมตาโบลิซึมของคาร์โบไฮเดรต

8. เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase : MDH) หมายถึง เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงระหว่างมาเลต (malate) กับออกซาโลอะซีเตต (oxaloacetate) ดังสมการ



มาเลต ออกซาโลอะซีเตต

ปฏิกิริยานี้พบในเมตาโบลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) และในขบวนการสร้างกลูโคส (glucogenesis)

9. เอสเทอร์เรส (esterase : EST) หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายสารที่เป็นเอสเทอร์ ให้เป็นอัลกอฮอล์และกรด

10. อีเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) หมายถึงวิธีการแยกโปรตีนโดยอาศัยหลักการที่ อิออนเมื่ออยู่ในสารตัวกลางและในสนามไฟฟ้าจะมีการเคลื่อนย้ายไปยังขั้วที่มีประจุไฟฟ้าตรงข้าม โปรตีนเป็นสารที่มีอิออนเนื่องจากมีการไอออนไนซ์ของหมู่อมิโน หมู่คาร์บอกซิลและหมู่ฟังชั่นนัลในสายรอง(side chain)ของกรดอมิโนที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นโปรตีน ในค่า pH หนึ่ง ๆ สารละลายโปรตีนแต่ละชนิดจะมีประจุสุทธิแตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจจะเป็นบวก เป็นลบหรือเป็นกลางก็ได้ ในสารละลายที่มี pH เท่ากับ pH ที่ทำให้อนุภาคของโปรตีนมีประจุเป็นกลาง (pH = pI) อนุภาคของโปรตีนจะไม่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ในทางตรงข้าม โปรตีนสามารถเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าที่มี pH สูงกว่าหรือต่ำกว่า pI เพื่อไปยังจุดที่ทำให้อนุภาคมีประจุเป็นกลาง (isoelsotric point) ถ้าในสารตัวกลางมีโปรตีนอยู่หลายชนิด อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนแต่ละชนิดในสนามไฟฟ้าจะแตกต่างกันไปคือ โปรตีนที่มีขนาดเท่ากันพวกที่มีประจุมากจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ส่วนโปรตีนที่มีประจุเท่ากับพวกที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ทำให้สามารถแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันได้

11. อีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์ (polyacrylamide gel electrophoresis) หมายถึงวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสที่ใช้เจลโพลีอะคริลอาไมด์เป็นสารตัวกลาง การแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้โปรตีนจะแยกออกจากกันตามประจุและขนาดของโมเลกุล

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

การศึกษาโปรตีนและเอนไซม์ที่เป็นส่วนประกอบของหนอนพยาธิ มีการทำกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในต่างประเทศ วิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษาเพื่อแยกชนิดของโปรตีนและเอนไซม์ ได้แก่ วิธีอีเลคโตรโฟรีซีส (Agatsuma and Suzuki. 1981 : 37 - 43, Carter. 1973 : 297 - 307, Moon, Hulbert and Mustafa. 1977 : 249 - 254, Peppas and Schroeder. 1979 : 134 - 139) เพราะวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สามารถแยกสารได้ดี และใช้ปริมาณสารที่ต้องการแยกเพียงเล็กน้อย (บุญยืน สาริกะภูติ 2522 : 109 - 113, Agatsuma and Suzuki. 1981 : 37 - 43) สารตัวกลางที่นิยมใช้อาจแตกต่างกันไปตามสถานการณ์ ความเหมาะสมและจุดมุ่งหมายของการศึกษา ทำให้มีการใช้ทั้งเปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซีส (paper electrophoresis) สตาชเจลอีเลคโตรโฟรีซีส (starch gel electrophoresis) โพลีอะกริลอาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส (polyacrylamide gel electrophoresis) และเอสดีเอสโพลีอะคริลอาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส (SDS - polyacrylamide gel electrophoresis) ในการศึกษาโปรตีนและเอนไซม์ของหนอนพยาธิ เช่น

เปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซีส : มีผู้ใช้วิธีนี้ร่วมกับอาการ์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส (agar gel electrophoresis) ในการศึกษาส่วนประกอบของสารสกัดจากพยาธิไส้เดือนตัวกลม (Ascaris lumbricoides) ทำให้แยกโปรตีนในสารสกัดออกจากกันได้เป็นกลุ่ม ๆ และเมื่อใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่มีไดเอธธิลอะมิโน เอธธิล เซลลูโลส (diethyl aminoethyl cellulose หรือ DEAE - cellulose) เป็นส่วนประกอบทำให้สามารถแยกเก็บแต่ละกลุ่มย่อยของโปรตีนได้ (Kent 1960 : 313 - 323)

สตาชเจลอีเลคโตรโฟรีซีส : มีผู้นำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของพยาธิใบไม้ในตับ Fasciola sp. เพื่อประโยชน์ในการแบ่งแยกประเภท (Agatsuma and Suzuki. 1980 : 249 - 254, Agatsuma. 1981 : 157 - 159) ศึกษาเอนไซม์ในพยาธิใบไม้ในปอด Paragonimus spp. เพื่อเปรียบเทียบไอโซไซม์

(Isozyme) ระหว่าง P. ohirai และ P. miyazakii (Agatsuma and Suzuki. 1981 : 37 - 43) ศึกษาความแตกต่างของกลูโคสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (glucosephosphate isomerase) ใน P. iloktsuenensis ที่พบตามธรรมชาติ เพื่อประโยชน์ทางพันธุศาสตร์ของเซล (cytogenetic) (Agatsuma. 1981 : 73 - 77) ศึกษาเอนไซม์ในตัวอ่อนของพยาธิแอนนิซาคิส (Anisakis larva) เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกประเภท (Agatsuma. 1981 : 35 - 39) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาไอโซไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนสชนิดแอล (L (+) lactate dehydrogenase) ในพยาธิตืด Hymenolepis diminuta เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยา (activity) ของเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน (Logan, Ubelaker and Vrijenhoek. 1977 : 51 - 53)

โพลีอะคริลอาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส หรืออีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลี-อะคริลอาไมด์ : มีการนำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของอมีบา 3 สายพันธุ์ คือ Amoeba proteus strain T, Amoeba proteus strain Bk และ Amoeba discoides ทำให้ทราบว่าอมีบาทั้ง 3 สายพันธุ์มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบประมาณ 16 แถบ (bands) เหมือนกัน (Kates and Gold stein. 1964 : 30 - 35) ใช้ศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของพยาธิตัวกลมพวก Meloidogene spp., Ditylenchus spp., Heterodera glycines และ Aphelenchus avenae พบว่า ชนิดของโปรตีนและระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่แยกได้จากพยาธิแต่ละชนิดมีบางส่วนแตกต่างกัน (Dickson Sasser and Huisingh. 1970 : 286 - 293) นอกจากนี้ยังมีผู้ใช้วิธีนี้ศึกษาเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนสและมาเลตดีไฮโดรจีเนสในตัวแก่ของพยาธิตืด Hymenolepis diminuta (Moon, Hulbert and Mustafa. 1977 : 249 - 254) และศึกษาเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนสที่เป็นส่วนประกอบของพยาธิไส้เดือนตัวกลม Ascaris suum (Agatsuma and Suzuki. 1981 : 81 - 83)

เอสดีเอสโพลีอะคริลอาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส : เป็นวิธีที่สามารถแยกชนิดของโปรตีนออกจากกันได้ตามน้ำหนักโมเลกุล เมื่อใช้วิธีนี้ร่วมกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล จะสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ศึกษาได้ และถ้าใช้วิธีนี้ร่วมกับเจลฟิลเตรชั่น (gel filtration) จะทำให้ทราบจำนวนหน่วยย่อยของโปรตีนที่ศึกษาได้ (Savasti and Panijpan. 1977 : 560 - 562, Weber and Osborn. 1969 : 4406 - 4412) มีผู้ใช้วิธีเอสดีเอสโพลีอะคริลอาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส ศึกษาโครงสร้าง คุณสมบัติทางเคมี และคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนของสารสกัดจากเมมเบรนบริเวณผิว (surface membrane) ของ Leishmania donovani และพบว่าเมมเบรนบริเวณผิวของ L. donovani ประกอบด้วยเปปไทด์ประมาณ 40 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 1.2×10^4 ถึง 2.2×10^5 ดาลตัน และแถบของเปปไทด์เด่นที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5.3×10^4 ดาลตัน (Dwyer. 1981 : 9 - 28) จากการศึกษาโปรตีนที่สกัดจากมาโครซิซอนท์ (macrochizonts) ของ Theileria parva ด้วยวิธีเดียวกัน ทำให้ทราบชนิดของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญ ทราบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด และทราบชนิดของโปรตีนที่เป็นแอนติเจน (Creemers. 1983 : 54 - 59) ในประเทศไทยมีผู้ใช้วิธีเอสดีเอสโพลีอะคริลอาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส ร่วมกับอิมมูโนพรีซิพิเตชั่น (immuno precipitation) และออโตเรดิโอกราฟฟี (autoradiography) ศึกษาวิเคราะห์แอนติเจนต่าง ๆ ของพยาธิใบไม้ในตับ Opisthorchis viverini ในระยะตัวแก่ (adult) สารละลายจากเนื้อเยื่อพยาธิ (somatic extract) สารละลายจากเนื้อเยื่อของเมตตาเซอคาเรีย (metacercariae somatic extract) และสารคัดหลั่งจากพยาธิ (excretory secretory products) ทำให้ทราบชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบ รวมทั้งความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของสารสกัดจากพยาธิใบไม้ในตับแต่ละส่วน (สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน และสถิตย์ สิริสิงห 2527 : 262 - 263)

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) เกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) สภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (optimum pH) ความคงตัว (stability) สามารถทำได้โดยให้เอนไซม์ทำงานในสภาพที่มีสับสเตรต

(substrate) และโคแฟคเตอร์ (co-factor) อื่น ๆ ตามความเหมาะสมกับเอนไซม์ที่ต้องการศึกษา จากนั้นวัดปริมาณสารที่หายไป หรือเกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์นั้น ดังเช่น มีรายงานการศึกษาการทำงานของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสในพยาธิใบไม้ในตับ Fasciola hepatica ในแมลงหวี่ Drosophila melanogaster โดยใช้แอล-มาเลต (L-malate) เป็นสับสเตรต นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (NAD) เป็นโคเอนไซม์ (Probert and Lwin. 1977 : 89 - 94, Pappas and Rodrick. 1971 : 709 - 713) และศึกษาการทำงานของเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนสในพยาธิตืด Hymenolepis diminuta พยาธิใบไม้ในตับ Fasciola hepatica โดยใช้ ดีแอล-แลคเทต (DL-lactate) เป็นสับสเตรต นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (NAD) เป็นโคเอนไซม์ (Moon, Hulbert and Mustafa. 1977 : 249 - 254, Probert and Lwin. 1977 : 89 - 94) ส่วนเอนไซม์เอสเทอเรส มีการศึกษาโดยใช้วิธีคัลเลอริเมตริค (Gomori. 1953 : 445 - 453, Markert and Hunter. 1959 : 42 - 49)

สำหรับโปรตีนในพยาธิตัวจี๊ดนั้น เคยมีผู้ทำการศึกษาโดยการติดฉลากไอโอดีน 125 เข้ากับโปรตีนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด แล้วนำมาศึกษาโดยวิธีเอสดีเอสโพลีอะคริลอาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีสกับออโตเรดิโอกราฟฟี พบว่าโปรตีนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ กัน จำนวนอย่างน้อย 20 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 90,000 - 10,000 ดาลตัน และองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 39,000 ดาลตัน มีปริมาณมากที่สุด (รุ่งลาวรรณ ไพรวรรณ 2528) ส่วนเอนไซม์ในพยาธิตัวจี๊ดนั้นไม่พบรายงานว่ามีการศึกษามาก่อนในประเทศไทย ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาทางชีวเคมีของหนอนพยาธิให้ลึกซึ้งต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการ

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. ถาดผ่าตัด
3. กล้องจุลทรรศน์สเตริโอ (stereo microscope)
4. จานแก้ว (petridish disc)
5. หลอดหยด (dropper)
6. พลาสเตอร์ไปเปต (plastuer pipette)
7. พู่กันขนาดเล็ก (เบอร์ 0 หรือ เบอร์ 1)
8. ขวดแก้วใสขนาดเล็กพร้อมฝาปิด
9. ขวดรูปชมพู่ (flask)
10. ปิเปต (pipette)
11. แผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil)
12. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)
13. เครื่องบดทำให้เนื้อเยื่อหลุดเป็นเซล (homogenelzer)
14. เครื่องทำให้เซลแตกด้วยคลื่นเสียง (soniprep 150 ultrasonic disintegrator)
15. เครื่องเซนตริฟิวจ์ (super speed refrigerated centrifuge)
16. เครื่องอีเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis apparatus)
17. เครื่องให้กำลังไฟฟ้า (power supply)
18. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV - 240)

วิธีดำเนินการและรวบรวมข้อมูล

1. การเก็บรวบรวมตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด

นำปลาไหลทั้งตัวหรือเฉพาะเครื่องในปลาไหล มาเก็บรวบรวมตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด โดยใช้น้ำย่อยเทียม (องุ่น เกียรติวุฒิ และบุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ 2523 : 37 - 39) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.1 เตรียมน้ำย่อยเทียมโดยละลายเปปซินผง 10 g ในน้ำกลั่น 900 ml เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 7 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

1.2 ผ่าตัดแยกเอาตับปลาไหลออกจากอวัยวะอื่น ๆ แล้วสับตับนั้นให้ละเอียด หรืออาจใช้เครื่องปั่นไฟฟ้า ปั่นให้ละเอียด

1.3 ชั่งตับที่ละเอียดแล้ว 10 g ต่อน้ำย่อย 30 ml ผสมให้เข้ากันในขวดรูปชมพู่ ปิดฝาด้วยแผ่นอลูมิเนียม

1.4 แช่ขวดรูปชมพู่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง

1.5 ดูดตะกอนที่ก้นขวดรูปชมพู่ด้วยปิเปต ใส่ลงในจานแก้ว ตรวจหาตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตริโอ

1.6 ใช้เข็มและพู่กันขนาดเล็ก เขี่ยเอาตัวอ่อนของพยาธิตัวจี๊ดออกจากตะกอนใส่ลงในจานแก้วที่มีน้ำเกลือ 0.9 %

1.7 ล้างตัวอ่อนของพยาธิด้วยน้ำเกลือ 0.9 % สัก 2 - 3 ครั้ง แล้วจึงเก็บตัวอ่อนของพยาธิไว้ในขวดแก้วใสขนาดเล็กที่มีน้ำเกลือ 0.9 % ที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การสกัดโปรตีนและเอนไซม์จากเนื้อเยื่อเซลของตัวอ่อนระยะติดต่อของตัวจี๊ด

2.1 นำตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดมาเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M phosphate buffer pH 7.5) ลงไปประมาณ 2 เท่าของปริมาตรพยาธิตัวจี๊ด

2.2 ทำให้เนื้อเยื่อของตัวอ่อนพยาธิหลุดเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ด้วยเครื่องบดทำให้เนื้อเยื่อหลุดเป็นเซล แล้วนำไปทำให้เซลแตกหมดด้วยเครื่องทำให้เซลแตกด้วยคลื่นเสียง ซึ่งจะต้องเดินเครื่อง 15 ครั้ง (ครั้งละ 1 นาที พัก 1 นาที)

2.3 นำโฮโมจีเนตที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 g ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 20 นาที

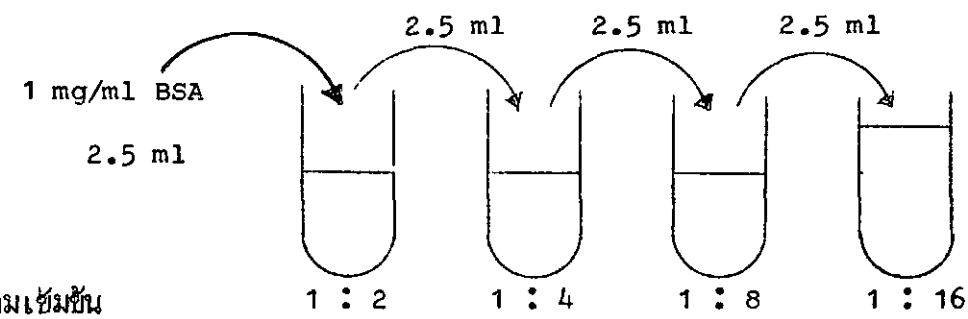
2.4 เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้เป็นสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ต่อไป

3. การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

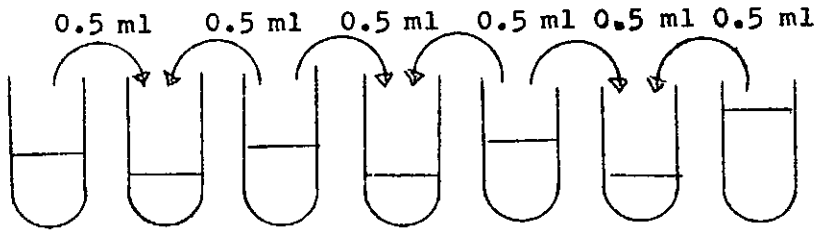
ใช้วิธีของ ลอว์รี และคนอื่น ๆ (Lowry and others. 1951 : 265 - 275) โดยใช้โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin : BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.1 การเขียนกราฟมาตรฐาน

3.1.1 เจือจาง BSA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml แบบทูโฟลด์ไดลูชั่น (two fold dilution) ให้มีความเจือจางตั้งแต่ 1 : 2 จนถึง 1 : 16 โดยเริ่มจากใส่น้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 5 หลอด ๆ ละ 2.5 ml จากนั้นใส่ BSA 1 mg/ml จำนวน 2.5 ml ลงในหลอดที่ 1(1 : 2) ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายไปหลอดที่ 2 2.5 ml (1 : 4) ทำเช่นเดียวกันจากหลอดที่ 2 ไปหลอดที่ 3 และต่อไปจนถึงหลอดที่ 4 (1 : 16)



เพิ่มชนิดของอัตราส่วนความเข้มข้นให้มากขึ้น โดยผสมระหว่างสารละลาย BSA ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นสูงและต่ำอย่างละ 0.5 ml



อัตราความเข้มข้น	1:2	1:3	1:4	1:6	1:8	1:12	1:16
ความเข้มข้น (µg/ml)	500	375	250	187.5	125	93.75	62.5

3.1.2 เตรียมสารละลายที่ต้องใช้

3.1.2.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) เตรียมจาก

สารละลาย ก. โซเดียมคาร์บอเนต 2 % ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M (2 % Na_2CO_3 in 0.1 M. NaOH)

สารละลาย ข. คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 % ในโซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต 1 % (0.5 % $CuSO_4$ $5H_2O$ in 1 % sodiumpotassiumtartrate)

ผสมสารละลาย ก. 25 ml กับสารละลาย ข. 0.5 ml เมื่อต้องการใช้

3.1.2.2 โฟลินรีเอเจนต์ 1 N(1 N. Folin reagent) เตรียมเมื่อต้องการใช้โดยเจือจาง Folin reagent : Sigma ด้วยน้ำกลั่นในสัดส่วน 1 : 1

3.1.3 การวัดการดูดกลืนแสง (optical density : OD) มีขั้นตอนดังนี้

BSA 0.2 ml + สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 1 ml

↓ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

เติม โฟลินรีเอเจนต์ 1 N 0.1 ml

↓ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer UV - 240) ที่ความยาวคลื่น 700 nm โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีนเป็นแบลงค์ (blank)

3.1.4 เขียนกราฟมาตรฐานจากค่า O.D. ที่อ่านได้กับค่าความเข้มข้นของ BSA เป็น mg/ml

3.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 เจือจางสารตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นพอเหมาะแล้วนำมา 0.2 ml ไปผ่านขั้นตอนในข้อ 3.1.3 เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานเพื่ออ่านค่า O.D

3.2.2 อ่านความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างโดยเทียบค่า O D กับกราฟมาตรฐาน

4. การแยกโปรตีนและเอนไซม์ในสารตัวอย่าง

4.1 เตรียมแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์ (slab gel)

4.1.1 เตรียมบลอคก์ (block) กระจกขนาด 11 × 10 × 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.1.2 เตรียมโพลีอะคริลอาไมด์ 10 % (ภาคผนวก) ใส่ลงไปในบลอคก์และเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อปรับผิวหน้าให้เรียบ เจลขั้นนี้เรียกว่า เจลแยกสาร (separating gel of running gel) ซึ่งควรเก็บไว้ค้างคืนในตู้เย็นแล้วนำมาใช้วันต่อไป

4.1.3 เทน้ำกลั่นที่อยู่เหนือเจลแยกสารออก แล้วใส่โพลีอะคริลอาไมด์ 4 % (ภาคผนวก) ลงไปแทน พร้อมกับใส่โคมบ์ (comb) ให้เจลเป็นร่องลึกลงไปสำหรับหยอดสารตัวอย่าง เจลส่วนนี้เรียกว่า แซมเปิดเจล หรือสเปเซอร์เจล (sample gel or spacer gel) ซึ่งเมื่อแข็งตัวควรนำไปใช้ภายใน 1 - 2 ชั่วโมง

4.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

เตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง (ประมาณ 200 mg/ml) ในแซมเปิลบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวปรับความเข้มข้น

4.3 หยอดสารตัวอย่างลงในหลุมของสเปเซอร์เจลที่มีอีเลคโตรโฟรีซีสบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก) ท่วมหลุม แล้วเดินไฟฟ้ากระแสตรง 2 มิลลิแอมแปร์ต่อความกว้างของแผ่นเจล 1 เซนติเมตร โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบ (ด้านบน) ลงสู่ขั้วบวก (ด้านล่าง) เมื่อสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบถึงขอบเจลด้านล่างจึงหยุดการเดินกระแสไฟฟ้า

4.4 แยกเอาแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์ออกมาจากแผ่นกระจก นำส่วนของเจลแยกสารไปย้อมด้วยสารละลายดังต่อไปนี้

4.4.1 ย้อมโปรตีน ใช้สารละลายสีโคมาสสีบริลเลียนท์บลูอาร์ (ภาคผนวก) ย้อมนานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 5 % เมธานอล 7 % กรดอะซิติก

4.4.2 การย้อมเอนไซม์ (enzyme activities stain) ใช้สารละลายที่มีส่วนประกอบดังตาราง 1

ตาราง 1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ต้องการย้อม	ความเข้มข้นของสารที่ใช้			
	สับสเตรท (substrate)	โคเอนไซม์ (coenzyme)	สารร่วมปฏิริยา (other addition)	บัฟเฟอร์
มาเลตดีไฮโดรจีเนส	แอล-มาเลต (L-Malate) 20 mM.	NAD 0.03 mg/ml.	NBT 0.08 mg/ml. PMS 0.08 mg/ml.	0.1 M Tris HCl pH 8.2
แลคเทตดีไฮโดรจีเนส	ดีแอล-แลคเทต (D,L-Lactate) 20 mM.	NAD 0.03 mg/ml.	NBT 0.08 mg/ml. PMS 0.08 mg/ml.	0.1 M Tris HCl pH 8.2
เอสเทอร์เรส	แอลฟา แนพธิล อะซิเตท (α-napthyla-cetate) 0.6 mg/ml.	-	Fast blue RR 1 mg/ml.	0.2 M Tris HCl pH 7.1

NAD nicotinamide adenine dinucleotide

NBT nitroblue tetrazolium

PMS phenazine methosulfate

Fast blue RR Diazotized product of 4 benzoylamino-2, 5-dimethoxyaniline $ZnCl_2$

การย้อมเอนไซม์ทำในที่มืด อุณหภูมิ 37 °c ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 5 % กรดอะซิติค

5. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

5.1 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

5.1.1 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส โดยมีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

แอล-มาเลต	0.1 M
NAD	0.75 mM
เอนไซม์จากพยาธิตัวจี๊ด	0.2 mg protein
บัฟเฟอร์	0.1 M
ให้สารละลายมีปริมาตรรวมเป็น	1.0 ml

วัดอัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นต่อ 1 นาที ที่ความยาวคลื่น 340 nm เปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้ตั้งแต่ pH 5.5 - 11.5 ดังนี้

pH 5.5 - 8.0 ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) ที่เตรียมจาก Na_2HPO_4 กับ NaH_2PO_4

pH 8.5 - 10.5 ใช้ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (glycine NaOH buffer)

pH 11.0 - 11.5 ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมจาก Na_2HPO_4 กับ NaOH

5.1.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์มาเลตโดรจีเนส โดยมีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

แอล-มาเลต	0.1 M
NAD	0.75 mM
เอนไซม์จากพยาธิตัวจี๊ด	0.2 mg protein
ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ pH 10	0.1 M
ให้สารละลายมีปริมาตรรวมเป็น	1.0 ml

ให้เอนไซม์ทำงานในสภาพอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในเวลา 1 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm

5.1.3 ศึกษาความคงตัว (stability) ของเอนไซม์มาเลต-ดีไฮโดรจีเนส โดยมีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

แอล-มาเลต	0.1 M
NAD	0.75 mM
เอนไซม์จากพยาธิตัวจี๊ด	0.2 mg protein
ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์ pH 10	0.1 M
ให้สารละลายมีปริมาตรรวมเป็น	1.0 ml

วัดอัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มต่อ 1 นาที ที่ความยาวคลื่น 340 nm เอนไซม์จากพยาธิตัวจี๊ดที่นำมาศึกษา เป็นเอนไซม์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 8 °C ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

5.2 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แลคเทตไฮโดรจีเนส ใช้วิธีการทำนองเดียวกันกับวิธีการในข้อ 5.1.1, 5.1.2 และ 5.1.3 ในการศึกษาผลของความเป็นกรด ด่าง ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเทตไฮโดรจีเนส และศึกษาความคงตัวของเอนไซม์แลคเทตไฮโดรจีเนสตามลำดับ แต่ใช้ดีแอล-แลคเทตแทนแอล-มาเลต

5.3 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เอสเทอเรส

5.3.1 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรส โดยมีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

แอลฟา-แนพธิลอะซิเตท (สับสเตรท)	0.2 mM
เอนไซม์จากพยาธิตัวจี๊ด	0.2 mg protein
บัฟเฟอร์	0.02 M
Red ITR Salt (diazotized 4 diethyl sulfonamido-2-aminosole)	0.7 mg/ml
ให้สารละลายมีปริมาตรรวมเป็น	1.0 ml

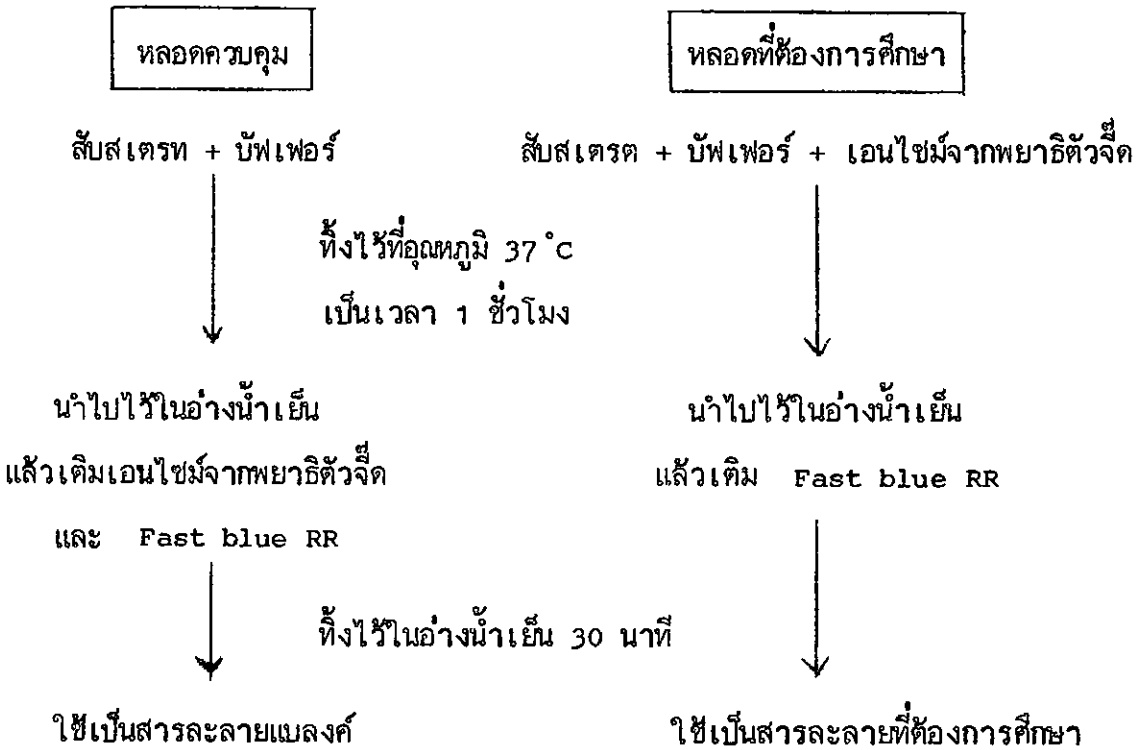
เปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้ตั้งแต่ pH 5.5 - 10.5 ดังนี้

178517

pH 5.5 - 8.0 ใช้ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

pH 8.5 - 10.5 ใช้ ไกลซีนโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 555 nm มีขั้นตอนดังนี้



5.3.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เอลเทอเรส โดยมีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

แอลฟา-แนพธิลอะซิเตท	0.2 mM
เอนไซม์จากพยาธิตัวจี๊ด	0.2 mg protein
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	0.02 M
Red ITR Salt	0.7 mg/ml
ให้สารละลายมีปริมาตรรวมเป็น	1.0 ml

ให้เอนไซม์ในหลอดที่ต้องการศึกษา ทำงานในสภาพอุณหภูมิต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 555 nm เช่นเดียวกันกับวิธีการในหัวข้อ 5.3.1

5.3.3 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์เอสเทอเรส โดยมีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

แอลฟา-แนพธิลอะซิเตท	0.2 mM
เอนไซม์จากพยาธิตัวจี๊ด	0.2 mg protein
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	0.02 M
Red ITR Salt	0.7 mg/ml
ให้สารละลายมีปริมาตรรวมเป็น	1.0 ml

วัดการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกันกับวิธีการในหัวข้อ 5.3.1 เอนไซม์จากพยาธิตัวจี๊ดที่นำมาศึกษาเป็นเอนไซม์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 8 °C ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

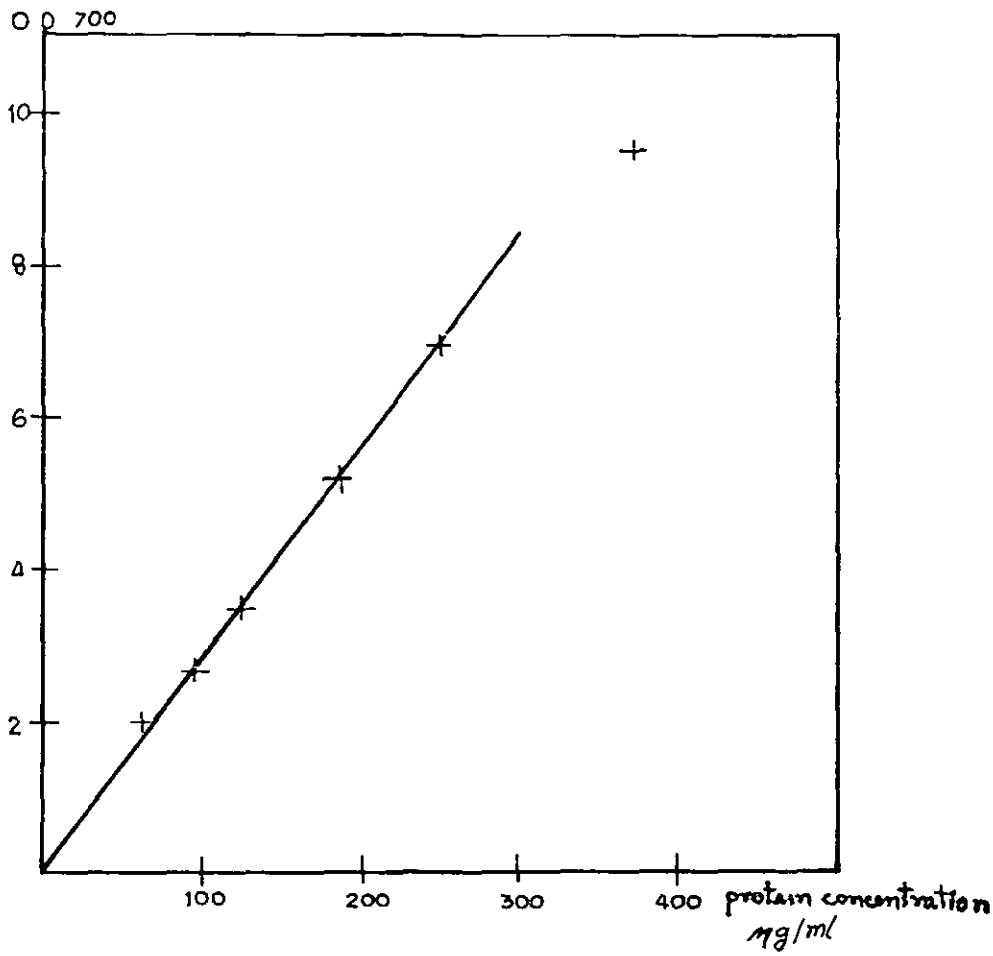
บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

1. การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

เมื่อนำสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ กัน มาหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของลอว์รี พบว่า ได้ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เป็นเส้นตรงที่ผ่านจุดกำเนิด (origin) ดังภาพประกอบ 2

สารตัวอย่าง 5 ml ที่เตรียมได้จากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด ประมาณ 1,700 ตัว เมื่อนำมาเจือจางที่อัตราส่วนความเข้มข้น 1 : 16 พบว่ามีความเข้มข้นของโปรตีน 260 mg/ml และเมื่อนำมาเจือจางที่อัตราส่วนของความเข้มข้น 1 : 32 พบว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนของ 133 mg/ml ดังนั้นสารตัวอย่างจึงมีความเข้มข้นประมาณ 4.2 mg/ml (ตาราง 2) คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 21 mg



ภาพประกอบ 2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนกับ
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร

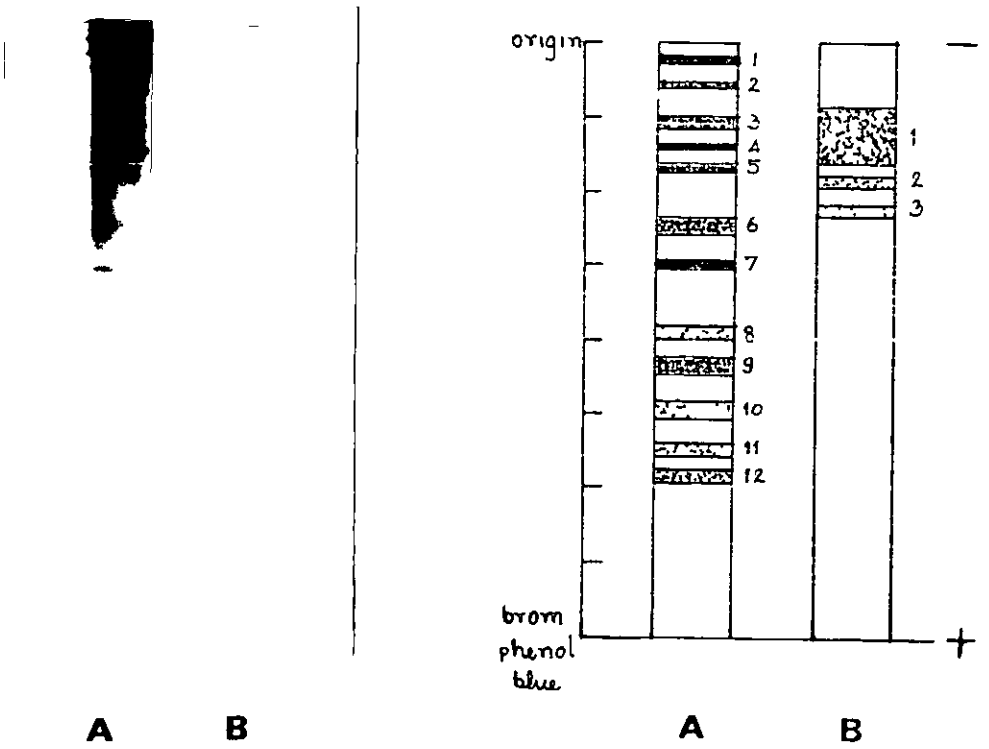
ตาราง 2 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง

อัตราส่วนความเข้มข้น	O.D. 700	ความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง (mg/ml)		
		หลังเจือจาง	ก่อนเจือจาง	
1 : 16	0.718	260	4.160	เฉลี่ย 4.208
1 : 32	0.369	133	4.265	

2. <u>การแยกโปรตีนและเอนไซม์ในสารตัวอย่างด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์</u>

จากการนำส่วนใสของพยาธิตัวจี๊ดที่เก็บไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการแยกโปรตีนและเอนไซม์ ด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์ แล้วย้อมสีโปรตีนและย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเจล พบว่ามีแถบของโปรตีนที่เด่นชัด ประมาณ 12 แถบ และมีแถบของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส 3 แถบ (ภาพประกอบ 3) ซึ่งแถบบนสุดทางขั้วลบเป็นแถบขนาดใหญ่มีปริมาณเอนไซม์มากที่สุด ส่วนแถบสารถัดมาทางขั้วบวก มีปริมาณเอนไซม์น้อยลงตามลำดับ แต่ไม่พบแถบที่แสดงถึงแอคติวิตีของเอนไซม์-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์เอสเทอเรสจากการย้อมเจล (ภาพประกอบ 4)

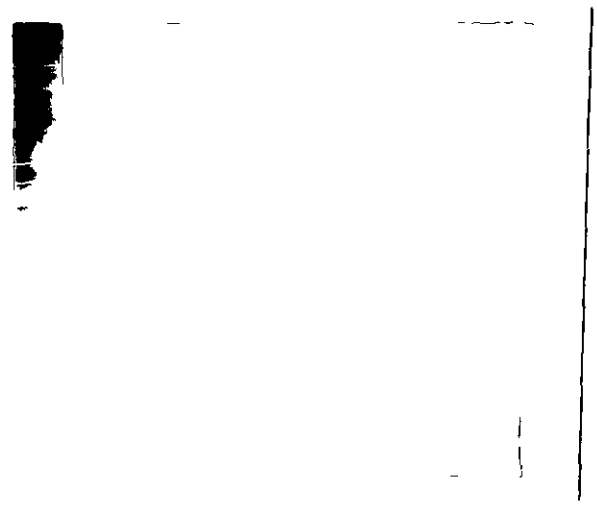
เมื่อเปรียบเทียบแถบของโปรตีน และแถบของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส พบว่า ตำแหน่งที่ปรากฏแถบของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสแถบบนสุดทางขั้วลบซึ่งเป็นแถบที่มีขนาดใหญ่ตรงกับตำแหน่งที่ติดสีย้อมโปรตีนค่อนข้างเข้ม ส่วน 2 แถบล่างของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่อยู่ถัดมาทางขั้วบวก มีตำแหน่งตรงกับบริเวณที่ติดสีย้อมโปรตีนค่อนข้างจาง (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 ภาพถ่าย (ซ้าย) และแผนภาพ (ขวา) แสดงเปรียบเทียบแถบของโปรตีนและเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากการแยกโปรตีนและเอนไซม์ด้วยวิธีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์

A แถบของโปรตีน

B แถบของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส



ภาพประกอบ 4 แสดงผลการแยกโปรตีน และเอนไซม์ โดยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีส บนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์ แล้วนำมาย้อมสีหรือย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์

A ย้อมสีโปรตีนด้วยสารละลายสีโคมาสสี บลิลเลียนท์ บลูอาร์

B ย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์มาแลตดีไฮโดรจีเนส

C ย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส

D ย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เอสเทอเรส

3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

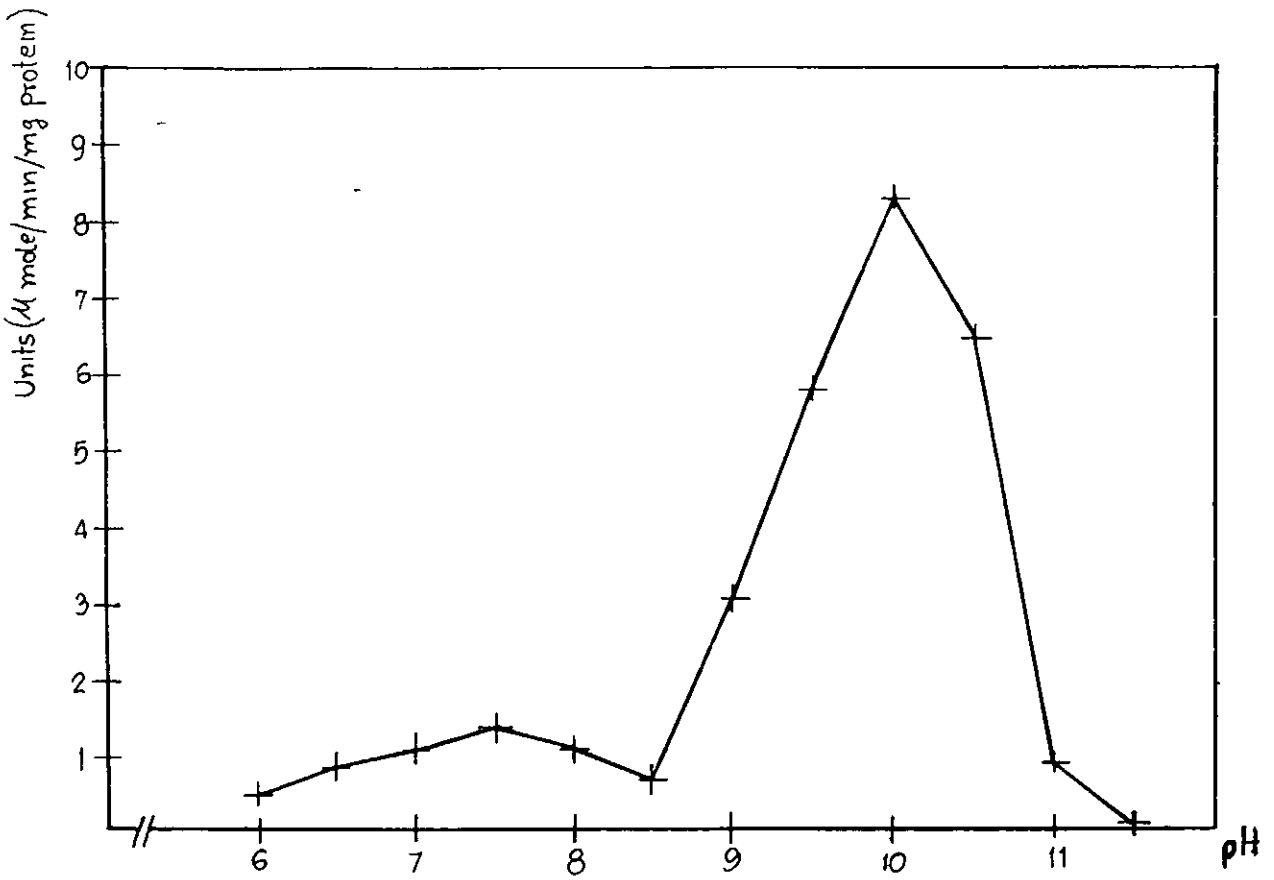
3.1 การศึกษาผลของความเป็นกรด - ด่าง ที่มีต่อการทำงานของเอมไซม์-มาเลตดีไฮโดรจีเนส

ผลจากการตรวจหาปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์-มาเลตดีไฮโดรจีเนส ที่อุณหภูมิ 25 °C ณ ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ กัน โดยวัดการดูดกลืนแสงของ NADH ที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 nm พบว่าเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่สุดที่ pH 10 โดยมีปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นเท่ากับ 0.139 mole ต่อ 1 นาที และสามารถคำนวณค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.827 หน่วย (หน่วยหมายถึง μ mole NADH produced/min/mg.protein)

เมื่อนำค่า สเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส ณ pH ต่าง ๆ ที่คำนวณได้มาเขียนกราฟพบว่า เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสในสารตัวอย่างมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่สุดที่ pH 10 ณ pH ที่น้อยกว่า 8.5 ยังพบว่าเอนไซม์มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7.5 แต่มีสเปซิฟิคแอคติวิตีเพียง 1 ใน 6 ของสเปซิฟิคแอคติวิตีที่ pH 10 (ภาพประกอบ 5)

ตาราง 3 แสดงค่าสเปซิฟิคแอคติวีตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่อุณหภูมิ 25 °C ณ pH ต่าง ๆ เมื่อมีความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง (final concentration) 0.168 mg

pH	$\Delta O.D_{340/min}$	NADH produced (μ mole/min)	specific activity (units)
6	0.047	0.008	0.048
6.5	0.082	0.013	0.077
7	0.110	0.018	0.107
7.5	0.144	0.023	0.137
8	0.113	0.018	0.107
8.5	0.069	0.011	0.065
9	0.316	0.051	0.304
9.5	0.604	0.097	0.577
10	0.862	0.139	0.827
10.5	0.671	0.108	0.643
11	0.091	0.015	0.089
11.5	0.005	0.001	0.006



ภาพประกอบ 5 กราฟแสดงผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนส

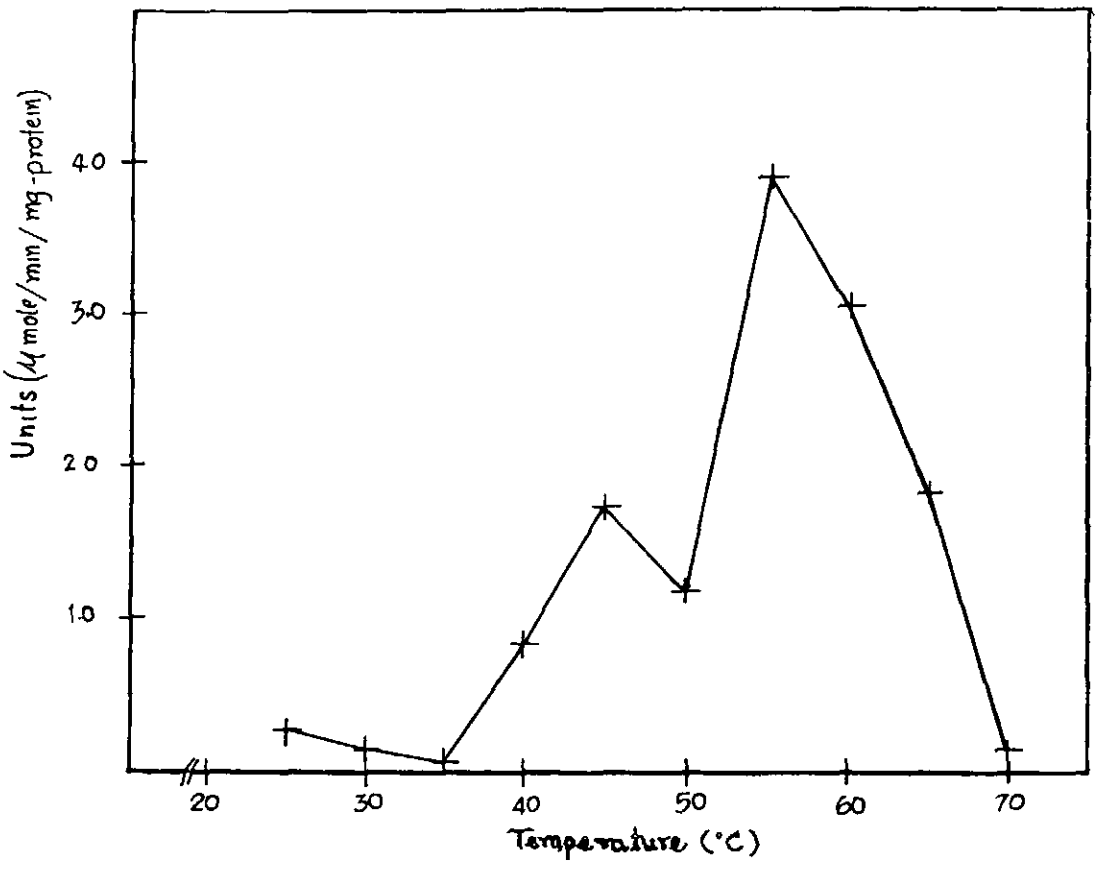
3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

ผลจากการตรวจหาปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่ pH 10 ณ อุณหภูมิต่าง ๆ โดยวัดการดูดกลืนแสงของ NADH ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 nm พบว่าเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 °c โดยมีปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นเท่ากับ 0.082 μ mole ต่อ 1 นาที และสามารถคำนวณค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอมไซม์ได้เท่ากับ 3.905 หน่วย (ตาราง 4)

เมื่อนำค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส ณ อุณหภูมิต่าง ๆ ที่คำนวณได้มาเขียนกราฟ พบว่านอกจากเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสในสารตัวอย่างจะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 °c แล้ว ณ อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 50 °c ยังพบว่าเอนไซม์มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 45 °c โดยมีสเปซิฟิคแอคติวิตีประมาณ 40 % ของสเปซิฟิคแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 °c (ภาพประกอบ 6)

ตาราง 4 แสดงค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่ pH 10 ณ อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อมีความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง (final concentration) 0.021 mg

Temperature (°C)	O.D.$_{340/min}$	NADH produced (μ mole/min)	Specific activity (units)
25	0.033	0.005	0.238
30	0.019	0.003	0.143
35	0.004	0.001	0.048
40	0.076	0.012	0.751
45	0.226	0.036	1.714
50	0.150	0.024	1.143
55	0.509	0.082	3.905
60	0.398	0.064	3.048
65	0.238	0.038	1.810
70	0.015	0.002	0.095



ภาพประกอบ 6 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

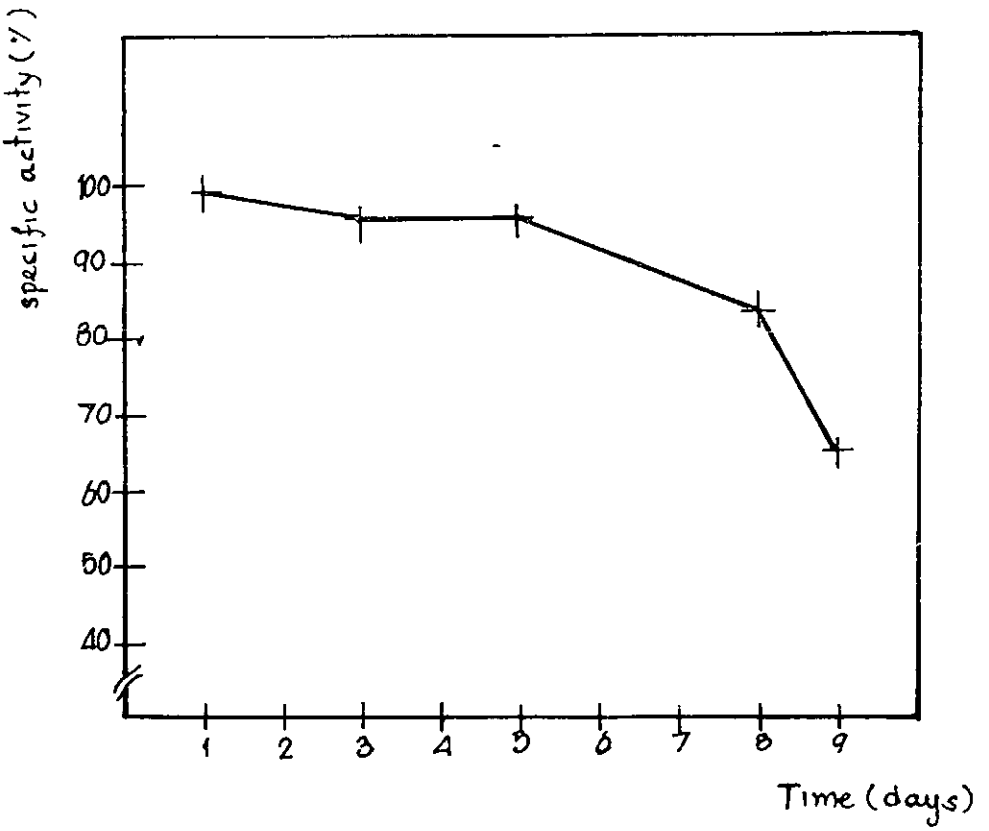
3.3 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

ผลจากการตรวจหาปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์-มาเลตของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส ในสารตัวอย่างซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 8 °C เป็นเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของ NADH ในช่วง 5 วันแรกใกล้เคียงกัน และอัตราการเพิ่มขึ้นของ NADH เริ่มลดลงหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 8 วันซึ่งทำให้สเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้มีค่าลดลงประมาณ 17 เปอร์เซนต์ และเมื่อเก็บเอนไซม์ไว้เป็นเวลา 9 วัน ทำให้ค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีลดลงมากถึง 35.18 เปอร์เซนต์ (ตาราง 5)

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีกับระยะเวลาที่เก็บได้กราฟดังภาพประกอบ 7

ตาราง 5 แสดงค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 8 °C ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยให้เอนไซม์ทำงานที่ pH 10 อุณหภูมิ 55 °C และมีความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง (final concentration) 0.021 mg

Time (days)	$O.D._{340/min}$	NADH produced (μ mole/min)	Specific activity (units)	Relative specific activity
1	0.509	0.082	3.905	100
3	0.489	0.079	3.762	96.34
5	0.492	0.079	3.762	96.34
8	0.425	0.068	3.238	82.92
9	0.330	0.053	2.524	64.64



ภาพประกอบ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส กับระยะเวลาที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 8 °C

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อตรวจหาเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์เอสเทอเรส ที่เป็นส่วนประกอบของตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ตรวจพบ

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด ที่ตรวจหาจากปลาไหลน้ำจืดจากตลาดในกรุงเทพมหานคร

2. ศึกษาโปรตีนและเอนไซม์ในส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปของสารละลาย

3. ตรวจหาโปรตีนและเอนไซม์ด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์

4. เอนไซม์ในการศึกษาครั้งนี้คือ มาเลตดีไฮโดรจีเนส แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และเอสเทอเรส

5. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ตรวจพบด้วยการตรวจหาปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล

1. เก็บรวบรวมตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ดจากปลาไหลน้ำจืด โดยใช้น้ำย่อยเทียม

2. สกัดโปรตีนและเอนไซม์จากเนื้อเยื่อเซลของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้เป็นสารตัวอย่างในการศึกษา

3. หาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยใช้วิธีของลอว์รีและคนอื่น ๆ

4. แยกโปรตีนและเอนไซม์ในสารตัวอย่างด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์

5. ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง และผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ และศึกษาความคงตัวของเอนไซม์

สรุปผลการศึกษาค้นคว้า

1. ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด 1,700 ตัว สามารถสกัดโปรตีนและเอนไซม์ได้ส่วนใสที่ใช้เป็นสารตัวอย่างปริมาตร 5 ml โดยมีความเข้มข้นของโปรตีน 4.2 mg/ml

2. เมื่อแยกโปรตีนและเอนไซม์ในสารตัวอย่างด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลอาไมด์ แล้วย้อมสีโปรตีนและย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่ามีแถบโปรตีนเด่นชัดประมาณ 12 แถบ และมีแถบของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส 3 แถบ ซึ่งแถบบนสุดทางขั้วลบมีขนาดใหญ่และมีปริมาณของเอนไซม์มากที่สุด แต่ไม่พบแอคติวิตีของเอมไซม์-แลกเทตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์เอสเทอเรส

3. เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่ตรวจพบสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์-มาเลตได้ดีที่สุดที่ pH 10 และอุณหภูมิ 55 °C โดยมีสเปซิฟิคแอคติวิตี = 3.905 หน่วย (μ mole/min/mg.protein)

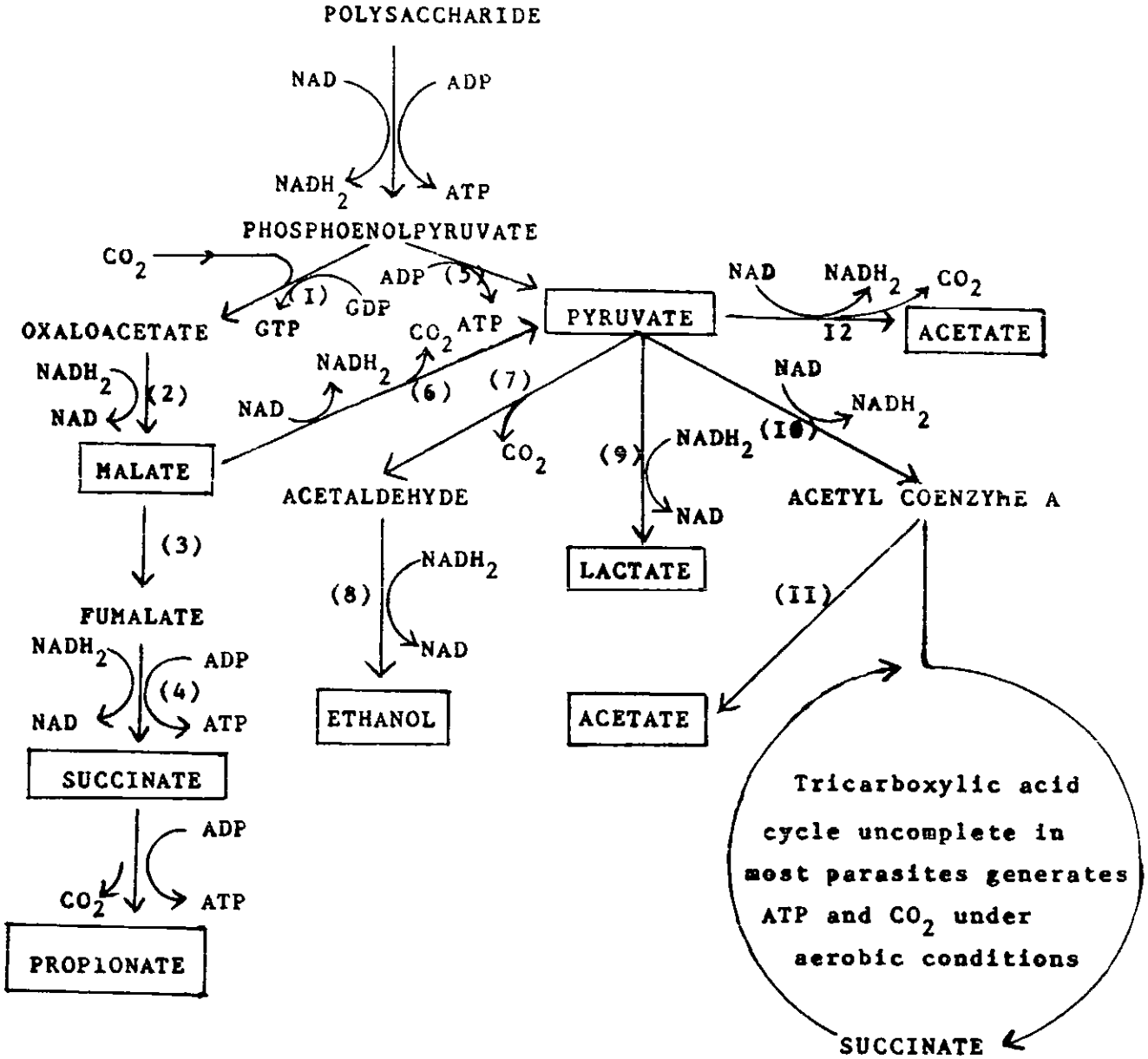
4. เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสสามารถคงสภาพในการเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้นาน 5 วัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8 °C

อภิปรายผล

เซลของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีสัดส่วนของ NAD/NADH ในระดับปกติแตกต่างกันไป เช่น ในเซลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่า มีสัดส่วนเป็น 1000 : 1 ในเซลกล้ามเนื้อและ 10:1 ในเซลตับ (Veech Raumand and Krebs. 1970 : 499 - 503) และสัดส่วนของ NAD/NADH นี้จะถูกควบคุมให้อยู่ในระดับปกติด้วยปฏิกิริยาออกซิโดรีดัคเตส (oxicoreductase reactions) ภายในเซล โดยปกติเมื่อมีการย่อยสลายไกลโคเจน

หรือกลูโคส NADH จะถูกผลิตขึ้นด้วยเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase) ทำให้ NAD ในเซลลดลง ซึ่งสัดส่วนของ NAD/NADH ที่เปลี่ยนแปลงไปนี้จะถูกปรับให้อยู่ในสภาพเดิมด้วยเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ตัวคือ เอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

จากการศึกษาเมตาโบลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในหนอนพยาธิหลายชนิดพบว่าเส้นทางเมตาโบลิซึมอาจเป็นไปได้หลายแบบดังนี้ (Bryant. 1982 : 84 - 115)



(1):phosphopyruvate carboxylase (2):malate dehydrogenase

(3):fumarase (4):succinate dehydrogenase

(5):pyruvate kinase (6):malate dehydrogenase(decarboxylating)

(7):pyruvate decarboxylase (8):alcohol dehydrogenase

(9):lactate dehydrogenase (10):pyruvate dehydrogenase complex

(11):acetyl CoA synthetase (12):pyruvate dehydrogenase

ในการศึกษาเอนไซม์ครั้งนี้ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนสทั้งในการย้อมเจลและการใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงตรวจหาปริมาณ NADH ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่สามารถตรวจพบแคติวิตีของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเอนไซม์ในหนอนพยาธิบางชนิดได้แก่ Ascaris Hymenolepis และ Fasciola โดยพบว่า เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์ฟูมาเลตไฮตราเตส และเอนไซม์ฟูมาเรตรีดัคเตน เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในขบวนการเมตาโบลิซึมของหนอนพยาธิและสามารถตรวจพบได้ในหนอนพยาธิทั่ว ๆ ไป (Bryant. 1982 : 84 - 115) เนื่องจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดเป็นพยาธิที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นสภาพที่ขาดออกซิเจน ดังนั้นเส้นทางเมตาโบลิซึมของโพลีแซคคาไรด์ในเซลตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดน่าจะมีการเปลี่ยนฟอสโฟอีนอลไพรูเวทที่ได้จากขบวนการไกลโคโลซีส ต่อไปเป็นออกซาโลอะซิเทต มาเลต และสารอื่น ๆ ตามลำดับ เพื่อสังเคราะห์พลังงาน ขบวนการนี้เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาและช่วยรักษาสัดส่วนระหว่าง NAD/NADH ภายในเซลให้อยู่ในระดับปกติ

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางอีเลคโตรโฟเรติคของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่สกัดจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด พบว่ามีแถบของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส 3 แถบ จากการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเจล นั่นแสดงว่ามีเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสในตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดถึง 3 ไอโซไซม์ และแต่ละไอโซไซม์มีปริมาณไม่เท่ากัน เพราะแถบของสีที่เกิดจากการย้อมเอนไซม์เข้มไม่เท่ากัน แถบบนสุดที่อยู่ใกล้ขั้วลบมีสีเข้มมาก แสดงว่าไอโซไซม์ที่มีปริมาณมากที่สุดมีโมเลกุลขนาดใหญ่ หรือมีค่าประจุบวกสุทธิของโมเลกุลสูงกว่าไอโซไซม์อื่น ๆ การเปรียบเทียบระหว่างแถบของโปรตีนและแถบของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส เป็นสิ่งที่ช่วยยืนยันว่าไอโซไซม์ที่อยู่ในแถบบนสุดใกล้ขั้วลบเป็นไอโซไซม์ที่มีปริมาณมากที่สุด เพราะไอโซไซม์ที่อยู่ในแถบบนสุดใกล้ขั้วลบอยู่ในตำแหน่งที่ตรงกับบริเวณที่ติดสีย้อมโปรตีนค่อนข้างเข้ม

การศึกษาไคเนติกของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่สกัดจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดทำให้ทราบว่า เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่เป็นส่วนประกอบของเซลตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด สามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่ pH 10 ซึ่ง

สอดคล้องกับผลการศึกษาของโปรเบิร์ทและแอลวิน ซึ่งรายงานไว้ว่า เอนไซม์มาเลตดีไฮโดร-จีเนสในส่วนใสที่สกัดจาก F. hapatica สามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่ pH 10 ในขณะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการรีดิวซ์ออกซาโลอะซิเทตในดีที่ pH 9 (Probert and Lwin. 1977 : 89 - 94) ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสในตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์-มาเลตได้ดีที่ pH 7.5 อีกด้วย แต่ที่ pH 7.5 นี้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาต่ำกว่า pH 10 มากที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะมีเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสหลายไอโซไซม์ในส่วนใสที่สกัดจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด และแต่ละไอโซไซม์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานต่างกัน โดยไอโซไซม์ที่มีมากที่สุดสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 10 และไอโซไซม์ที่มีน้อยกว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7.5 หรืออาจเป็นเพราะในสารตัวอย่างมีเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่มาจากองค์ประกอบภายในเซลต่างกัน คือ เอนไซม์ ส่วนที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่ pH 10 อาจเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในส่วนของไซโตปลาซึม และเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7 อาจเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งในการเตรียมสารตัวอย่างไม่สามารถสกัดเอนไซม์ในส่วนของไมโตคอนเดรียมาได้ทั้งหมด จึงทำให้มีปริมาณของเอนไซม์ที่ได้จากส่วนนี้มีจำนวนน้อยในสารตัวอย่าง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่สกัดจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด พบว่านอกจากเอนไซม์ที่สกัดได้จะสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์มาเลตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 °C แล้ว ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 °C เอนไซม์ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 45 °C อีกด้วย ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเหตุผลเดียวกันกับการที่เอนไซม์นี้มี pH ที่เหมาะสมในการทำงาน 2 ค่า นั่นคือ เอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 °C กับที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นคนละไอโซไซม์ หรือเป็นเอนไซม์ที่ได้มาจากองค์ประกอบภายในเซลต่างกัน

เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่สกัดได้จากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดไม่สามารถเก็บไว้ ที่อุณหภูมิสูงเช่นเดียวกับเอนไซม์ทั่ว ๆ ไป แต่ที่อุณหภูมิ 8 °C หรืออุณหภูมิในตู้เย็น เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่สกัดจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดสามารถคงรักษาสภาพการทำงานไว้ได้โดยมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากนานประมาณ 5 วัน ซึ่งนับว่า

เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสที่สกัดจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดมีความคงตัวค่อนข้างสูง

เอนไซม์เอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ตรวจไม่พบในการศึกษาครั้งนี้ อาจเป็นเพราะพลังงานเกือบทั้งหมดในขบวนการเมตาโบลิซึมของพยาธิตัวจี๊ดได้มาจากเมตาโบลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และมีรายงานถึงการศึกษาที่พบว่าหนอนพยาธิส่วนใหญ่ไม่มีการใช้ไขมันเป็นแหล่งพลังงาน (Bryant. 1982 : 84 - 115) ดังนั้นเอนไซม์เอสเทอเรสจึงอาจไม่มีความสำคัญในขบวนการเมตาโบลิซึมของตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดก็เป็นได้

เนื่องจากความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์และสารชีวเคมีในตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดยังมีผู้ทำการศึกษาค้นคว้าไว้น้อยมาก ความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำไปเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษา สายพันธุ์ของพยาธิตัวจี๊ด เมตาโบลิซึมของพยาธิตัวจี๊ด ซึ่งจะนำไปสู่ความรู้ขั้นสูงในเรื่องดังกล่าวและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ด้านการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคพยาธิตัวจี๊ดต่อไป

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. ควรทำการศึกษาหาตำแหน่งที่อยู่ของเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสภายในเซลของตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ด ว่าอยู่ในส่วนประกอบใดของเซล และถ้าพบเอนไซม์ในหลายส่วนประกอบของเซล ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบไคเนติคและคุณสมบัติทางอีเลคโตรโฟเรติคของเอนไซม์ที่อยู่ในแต่ละส่วนประกอบของเซล

2. ควรมีการศึกษาเอนไซม์อื่น ๆ ในตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจี๊ดต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จำรัส ฤทธิแพทย์ และสวัสดิ์ แดงสว่าง "ตัวจี๊ดที่ทำให้ตาบอด" วารสารจดหมายเหตุทางแพทย์ 19 : 840 - 845 2479

เฉลิม คัมภีร์เวชช์, หลวง และสวัสดิ์ แดงสว่าง "วงชีวิตของกนาโธสโตมา สปีนิเกรุม" วารสารจดหมายเหตุทางแพทย์ 17 : 49 - 53 2477

ทนงศักดิ์ บุนนาค พิพัฒน์ ชุติชูเดช และสมพนธ์ บุญยคุปย์ "พยาธิตัวจี๊ดจากผู้ป่วยไขสันหลังและสมองอักเสบ อีโลสิโนฟิลิคสองราย" จดหมายเหตุแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 51 : 813 - 821 พฤศจิกายน 2511

ธงชัย ปภัสราทร และคนอื่น ๆ "ตัวจี๊ด" ใน ปาราสิตสาธารณสุข หน้า 111 - 117 พิมพ์ครั้งที่ 2 คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2526

บรรจงศักดิ์ มะมาตร์ และคนอื่น ๆ "พยาธิตัวจี๊ดในช่องหน้าของลูกตา 1 ราย" จดหมายเหตุแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 45 : 549 - 556 พฤศจิกายน - ตุลาคม 2505

บุญยืน สาริกะภูติ โปรตีน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2522, 154 หน้า

ประณต มิคะเสน สมทรง ธนภูมิ และปรีชา เจริญลาภ "รายงานผู้ป่วยพยาธิตัวจี๊ดในทางเดินปัสสาวะ" จดหมายเหตุแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 47 : 85 - 90 กุมภาพันธ์ 2507

ประดิษฐ์ ตัณฑสุรัต "พยาธิสภาพของโรคพยาธิตัวจี๊ดในคน" จดหมายเหตุแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 38 : 25 - 32 มกราคม 2498

พวงน้อย ณ สงขลา "Gnathostomiasis" วชิรเวชสาร 27 : 316 - 321 พฤศจิกายน 2526

รุ่งลาวรรณ ไพรวรรณ ภูมิต้านทานในระบบอินมูนชนิดของเหลวในหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ด ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร 2528, 81 หน้า อัดสำเนา

ส. เสยยงคะ "ก้อนทูมในช่องท้อง" แพทย์สารทหารอากาศ 13 : 218 2507

สมพนธ์ บุณยคุปย์ "ความรู้ใหม่เรื่องโรคพยาธิตัวจี๊ด" จดหมายเหตุแพทยสมาคม แห่งประเทศไทย 50 : 686 - 694 ตุลาคม 2510

สมพนธ์ บุณยคุปย์ และพิพัฒน์ ชุติชูเดช "โรคพยาธิตัวจี๊ดในผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบ อีโอสิโนฟิลิค 1 ราย" วิทยาสารเสนารักษ์ 20 : 367 - 373 กรกฎาคม 2510

สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิต และสถิตย์ สิริสิงห "การวิเคราะห์แอนติเจนของพยาธิใบไม้ในตับ (Opisthorchis viverrini)" บทคัดย่อการประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 10 ณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 25 - 27 ต.ก. 27 หน้า 262 - 263

องุ่น เกียรติวุฒิ และบุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ การตรวจวินิจฉัยโรคปาราสิต ภาควิชา ปาราสิตวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2527, 127 หน้า

Agatsuma, T. "Electrophoretic Studies on Glucosephosphate Isomerase and Phosphoglucomutase in Two Types of Anisakis Larvae" International Journal of Parasitology. 12(1) 35 - 39, 1981.

_____ "Electrophoretic Studies on Enzymes in Paragonimus spp. IV comparison of Allelic Frequencies of Glucosephosphate Isomerase Isozymes in Natural Pouplations between P. ohirai and P. sadoensis" Jpn. J. Genet 56 73 - 77, February, 1981.

_____ "Electrophoretic Studies on Enzymes in Japanese Common Liver Fluke, Fasciola sp. II. On Further Three Enzymes, GPI, GDH and ME, in the Liver Fluke" Jap. J. Parasit. 30(2) 157 - 159, April, 1981.

Agatsuma, T and N. Suzuki. "Electrophortic Studies on Enzymes in Japanese Common Liver Fluke, Fasciola sp. I Enzyme Variations in The Natural Population" Japan. J. Med. Sci. Biol. 33 249 - 254, 1980.

_____ "Electrophoretic Studies on Enzymes in Paragonimus spp. I. Comparison of Isozyme Patterns between P. ohirai and P. miyazakii" Jap. J. Parasit. 30(1), 37 - 43, February, 1981.

Agatauma, T and N. Suzuki. "Electrophoretic Studies on Enzymes in Ascarids I. Lactate Dehydrogenase Isozymes in Ascaric summ," Jap. J. Parasit. 39(1) 81 - 83, February, 1981

Agatsuma, T and N. Suzuki. "Isozyme Patterns of Schistozoma japonicum and S. Mansoni," Journal of Helmin Thology. 57 27 - 30, 1983.

Bovornkitti, S and S. Tandhanand. "A Case of Spontaneous Pneumothorax Complicating Gnathostomiasis," Dis. Chest. 35 · 328, 1959.

Bryant, C "Biochemistry," in Modern Parasitology. p. 84 - 115, London, Black well Scientific pubplications, 1982.

Carter, R. "Enzyme Variation in Plasmodium Berghei and Plasmodium vinckei," Parasitology. 66 297 - 307, 1973.

Chitanondb, H. and L. Rosen. "Fatal Eosinophilic Encephalomyelitis Caused by the Nematode, Gnathostoma spinigerum," Amer. J. Trop. Med & H. 16 638, 1967.

Creemers, P. "Protein Antigens of Theileria parva Macroschizonts and Immune Precipitation Studies," The Jurnal of Parasitoloty. 69(1) 54 - 59, February, 1983.

Daengsvang, S. "An Abdominal Tumor Case by Gnathostoma spinigerum (Owen, 1836)," Indian Med. Gas. 74 339, 1939.

_____ "The World's First - story of Gnathostoma spinigerum Infection in the Young Thai Woman," Journal of Parasitology and Tropical Medicine Association of Thailand. 6 1 - 10, 1983.

_____ "Gnathostoma spinigerum and Human Gnathestomiasis A Brief Review," in The 25 th. Anniversary of The Faculty of Tropical Medicine. p. 124 - 147, Faculty of Tropical. Medicine, Mahidol University, 1986.

Daengsvang, S., P. Sangsingkeo and B. Senivong Na Ayudhaya. " A Case of Gnathostomiasis of a Finer," The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 4(2) · 260 - 262, 1973.

Dickson, D.W., J.N. Sasser and D. Huisingh. "Comparative Disc-electro-phoretic Protein Analysis of Selected Meloidogyne, Ditylenchus, Hetero-dera and Aphelenchus spp," Journal of Nematology. 2(4) 286 - 293, October, 1970.

Dwyer, D.M. "Structural, Chemical and Antigenic Properties of Surface Membranes Isolated from Leishmania Donovani," in The Biochemistry of Parasites. p. 9 - 28, Great Britain, Pergamon press, 1981.

Gomori, G. "Human Esterases," Journal of Laboratory and Clinical Medicine 42(3) 445 - 453, 1953.

Jaroonvesama, N and T. Harinasuta. "Comparison of Quinine with Prednisolone in Treatment of Gnathostomiasis" J. Med. Ass. Thailand. 56 312 - 313, 1973.

Kates, J.R. and L. Goldstein. "A Comparison of the Protein Composition of Three Species of Amoeba" Journal of Protozoology. 11(1) 30 - 35, 1964.

Kent, N.H. 1960. "Isolation of specific antigena from. A. lumbricoides var suum" Experimental Parasitology. 10 · 313 - 323, 1960.

Logan, J., J.E. Ubelaker and R.C. Vrijenhoek. "Isozymes of L (+) LDH in Hymenolepis diminute" Comparative Biochemistry and Physiology. 57 B 51 - 53, 1977.

Lowry, O. and Others. "Protein Measurement with the Folon Phenol Reagent." Journal of Bilolgical Chemistry. 193 265 - 275, 1951.

Markert, C.L. and R.L. Hunter. "The Distribution of Esterases in Mouse Tissue" Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 7 42 - 49, 1959

Miyazaki, I. "On the Genus Gnathostoma and Human Gnathostomiasis with Special Reference to Japan" Experimental Parasitology. 9 338 - 370, 1960.

Moon, T.W., W.C. Hulbert and T. Mustafa. "A Lactate Dehydrogenase and Malate Dehydrogenase in Adult Hymenolepis diminuta (Cestoda)" Comp. Biochem. Physiol. 56 B 249 - 254, 1977.

Pappas, P.W. and L.L. Schroeder. "Hymenolepis microstoma Lactate and Malate Dehydrogenases of Adult Worm" Experimental Parasitology. 47 134 - 139, 1979.

Pappas, R.W. and G.E. Rodrick. "An Electophoretic Study of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes, Protein and Lipoprotein of Drosophila melanogaster Larvae, Pupae and Adults" Comp. Biochem. Physiol. 40 B 709 - 713, 1971.

Prasansuk, S. "A Case of Neuro - otological Gnathostomiasis" Correspondence. 26 260, Mar, 1974.

Probert, A.J. and T. Lwin. "Fasociola hepatica The Subcellular Distribution and Kinetic and Eleotrophoretic Properties of Malate Dehydrogenase" Experimental Parasitology. 41 89 - 94, 1977.

Prijyanonda, B, A. Pradatsundarasar and V. Viranuvatti. "Pulmonary Gnathostomiasis (A Case Report)," Ann. Trop. Med. Parasite. 49 121, 1955.

Savasti, J. and B. Panijpan. "SDS - Polyacrylamide Gel Electrophoresis," Journal of Chemical Education. 54(9) 560 - 562, September, 1977.

Setasuban, P., B. Chiamratana and C. Muennoo. "The Effect of Praziquantal, Levamisole and Fansidar Against Gnathostomiasis in Hamsters," Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 12 454, 1981.

Srisongkrom, T. and P. Saraya. "Vaginal Bleeding Cased by Gnathostoma spinigerum Report of Case ' J. Med. Ass. Thailand. 52 531 - 533, 1969.

Vibulseth, S. and A. Leelarassamee. "A Case of Pulmonary of Gnathostomiasis," Siriraj Hospital Gazette. 32 23 - 24, 1980.

Veech R. L., Rauman L. and Krebs H.A. "Equilibibrium Relations Between the Cytoplasmic Adenine Nucleotide System and Nicotinamide - Adenine Nucleotide System in Rat Liver," Biochem. J. 117 499 - 503, 1970.

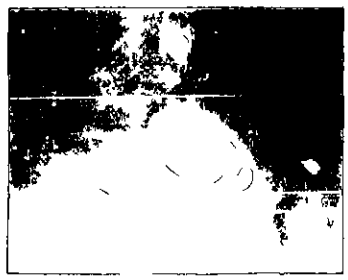
Weber, K. and M. Osborn. "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis," The Journal of Biological Chemistry. 244(16) 4406 - 4412, August, 1969.

Zan, S.G. "Disc Electrophoresis of Ascaris suum Fenale Reproductive System Esterase Enzymes," Comp. Biochem. Physiol. 46 B 797 - 803, 1973.

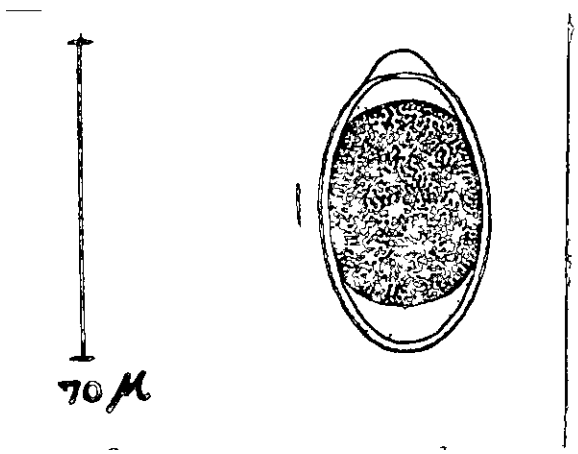
Zee, D.S., Wm. H. Zinkham. "Malate Dehydrogenase in Ascaris Summ Characterization, Ontogeny, and Genetic Control," Archives of Biochemistry and Biophysics. 126 574 - 584, 1968.

ภาคผนวก

1. รูปร่างลักษณะของเ ยาธิตัวจี๊ด



ก

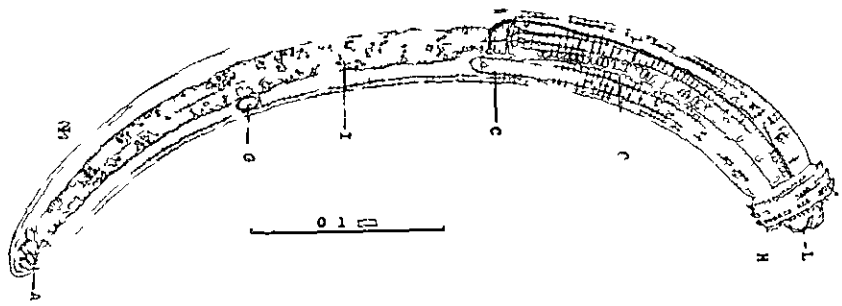


ข

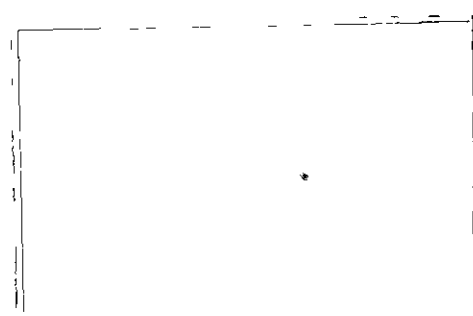
ภาพประกอบ 8 แสดงรูปร่างลักษณะของไข่ G. spinigerum

ก. ภาพถ่าย

ข. แผนภาพ



ก



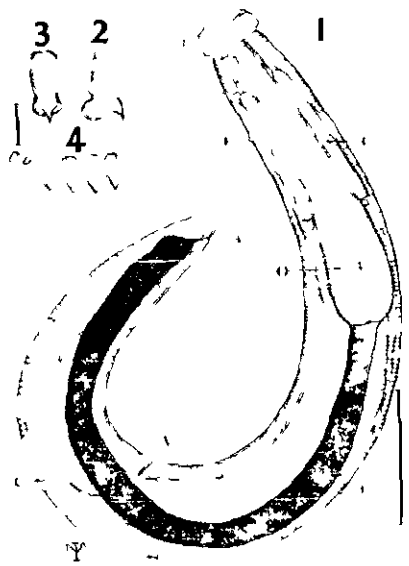
ข

ภาพประกอบ 9 แสดงตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ G. spinigerum

ก. แผนภาพ เมื่อดูจากด้านข้าง

L	Lip	I	Intestine
H	Head	G	Genital primodium
O	Esophagus	A	Anus
C	Cervical sac		

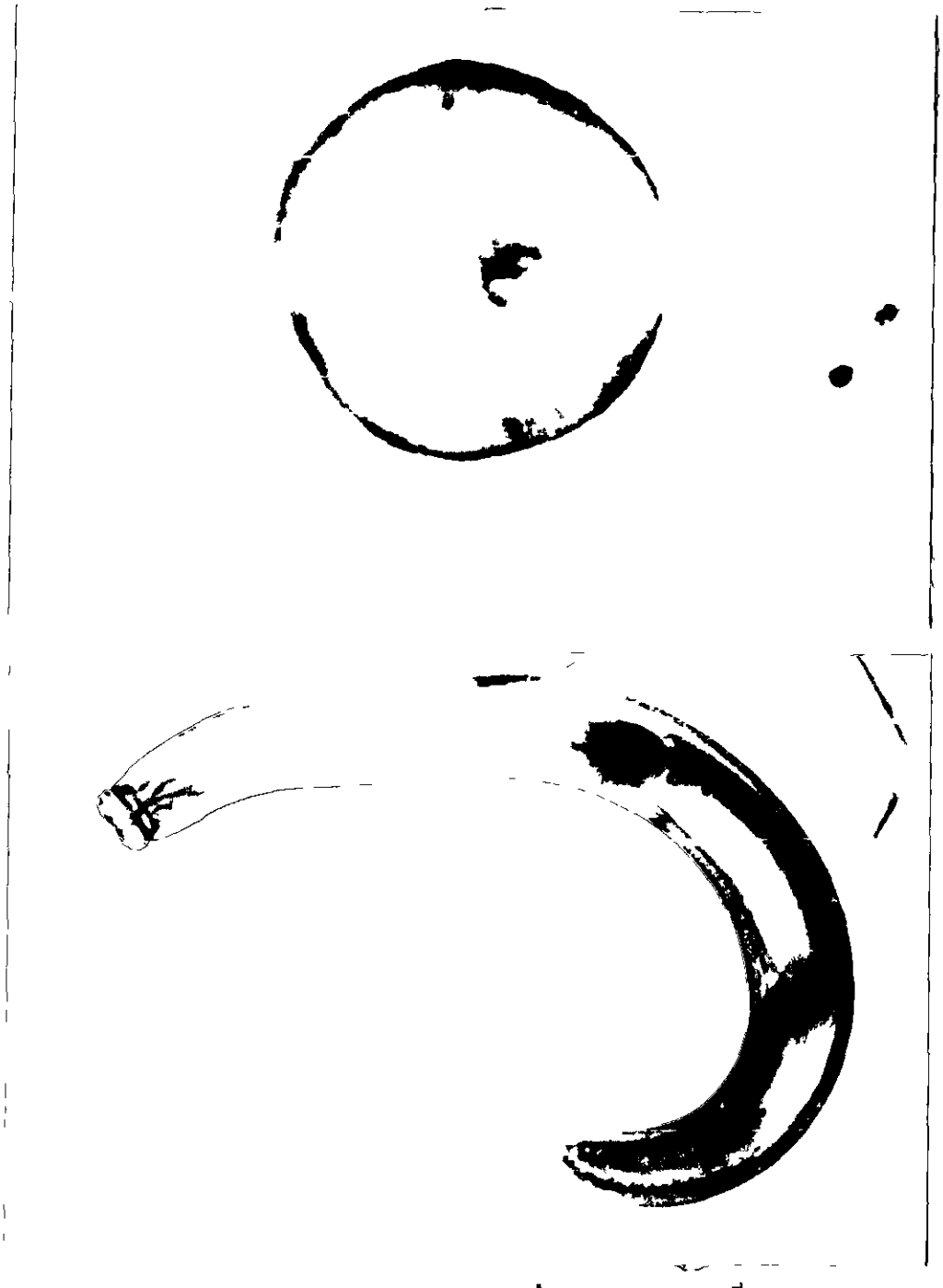
ข. ภาพถ่ายกุ้งไรที่มีตัวอ่อนระยะที่ 2 อาศัยอยู่



ภาพประกอบ 10 แผนภาพแสดงตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อ G. spinigerum

1. ตัวอ่อนระยะที่ 3 เมื่อดูจากด้านข้าง
2. และ 3. แสดงลักษณะของ hook ที่อยู่บริเวณส่วนหัว เมื่อดูจากด้านข้าง และด้านบนตามลำดับ
4. แสดงลักษณะของ spines บริเวณผิวลำตัวซึ่งเห็นได้ชัดบริเวณลำตัวส่วนต่อจากหัว

L	Lip	C	Cervical sac	V	Vulva
H	Head bulb	O	Esophagas	G	Lateral line
P	Cervical papilla	I	Intestine	A	Anus
E	Excretory pore				



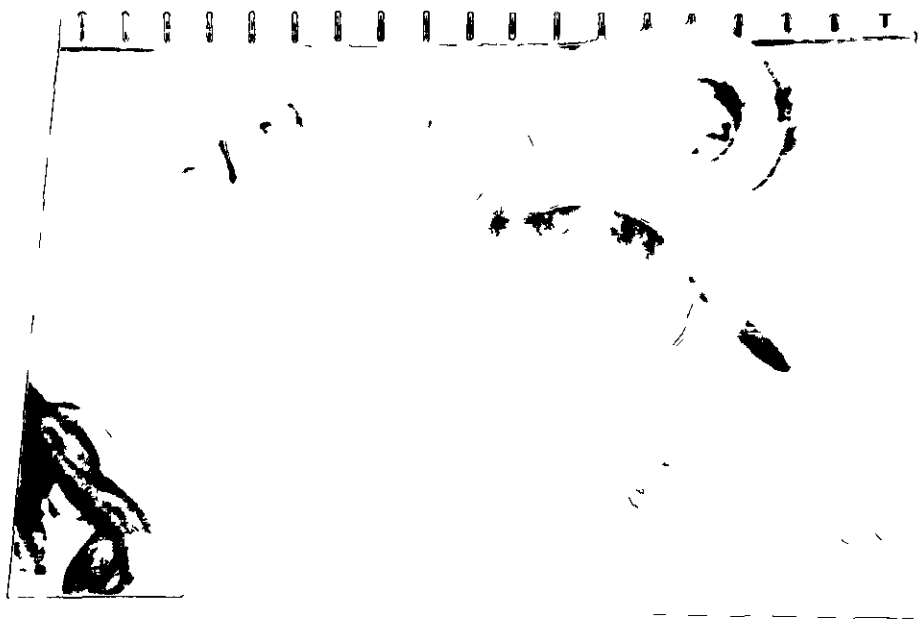
ก

ข

ภาพประกอบ 11 ภาพถ่ายแสดงตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด

ก. ตัวอ่อนที่อยู่ในซีสต์

ข. ตัวอ่อนที่ออกจากซีสต์



ภาพประกอบ 12 ภาพถ่ายแสดงตัวแก่ของพยาธิตัวจี๊ด

2. การเตรียมสารเคมี

Acrylamide · Bis - acrylamide (30 0.8 %)

Acrylamide	30.0	g
Bis - acrylamide	0.8	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาณรวม	100.0	ml

เขย่าให้ละลาย ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 8 °C สารละลายนี้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน

1.5 M Tris HCl buffer pH 8.9

Tris	36.330	g
น้ำกลั่น	180	ml
ปรับ pH ด้วย 6 M HCl ให้ได้ pH 8.9		
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200	ml

เก็บสารละลายในขวดพลาสติก ที่อุณหภูมิ 8 °C

0.5 M Tris HCl Buffer pH 6.8

Tris	6.055	g
น้ำกลั่น	85	ml
ปรับ pH ด้วย 6 M HCl ให้ได้ pH 6.8		
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	100	ml

เก็บสารละลายในขวดพลาสติก ที่อุณหภูมิ 8 °C

10 % Temed

Temed	2	ml
เติมน้ำกลั่น	18	ml

5 % $(NH_4)_2S_2O_8$ (เตรียมเมื่อต้องการใช้)

$(NH_4)_2S_2O_8$	0.05	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	1.0	ml

Polyacrylamide gel 10 % (Running gel)

Acrylamide Bis - acrylamide	3.33	ml
1.5 M Tris HCl buffer pH 8.9	2.50	ml
น้ำกลั่น	4.05	ml
Temed 10 %	0.02	ml

นำสารละลายที่ได้ไปดูดเอาอากาศออก (deair) หลังจากนั้นนำมาเติม

5 % $(NH_4)_2S_2O_8$	0.1	ml

แล้วนำสารละลายไปบรรจุลงในบลอคก์ทันที ปิดผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย เพื่อให้หน้าเจลเรียบ

Polyacrylamide gel 4 % (Spacer gel)

Acrylamide Bis - acrylamide	0.665	ml
0.5 M Tris HCl buffer pH 6.8	1.25	ml
น้ำกลั่น	2.965	ml
Temed 10 %	0.02	ml
5 % $(NH_4)_2S_2O_8$	0.10	ml

Sample buffer (5X)

Glycerol	1.0	ml
0.5 M Tris HCl pH 6.8	1.0	ml
Bromophenal blue	0.001	g

Electrophoresis buffer pH 8.3

Tris	0.6	g
Glycine	2.88	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200.0	ml

เก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น

Coomassie Brilliant Blue R. Stain

Coomassie brilliant blue R	0.4	g
Gracial acetic acid	14.0	ml
Methanol	9.3	ml
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200.0	ml

3. การคำนวณค่าสเปซิฟิคแอคติวิตี

จากกฎของเบียร์ (Beer's Law)

$$\text{Absorbance (OD)} = -\log \frac{I}{I_o}$$

หรือ $OD = \Sigma cl$

เมื่อ I = ความเข้มของแสงหลังผ่านสาร

I_o = ความเข้มของแสงก่อนผ่านสาร

Σ = ค่าคงที่ของการดูดแสง (extinction coefficient) ซึ่งมีค่าเฉพาะสำหรับสารหนึ่ง ๆ และที่ความยาวคลื่นหนึ่ง ๆ ค่า Σ ของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm คือ 6,220

l = ความยาวของระยะทางที่แสงผ่านสารตัวอย่าง = 1 cm.

c = ความเข้มข้นของสารละลาย มีหน่วยเป็นโมลาร์ (M)

∴ ความเข้มข้นของ NADH = $\frac{OD}{6,220 \times 1}$ M

ความเข้มข้นของ NADH ในสารละลาย 1 ml

= $\frac{OD}{6.22}$ mole/ml

ความเข้มข้นของ NADH ที่เปลี่ยนไปต่อ 1 นาที ในสารละลาย 1 ml

= $\frac{OD}{6.22}$ mole/min

สเปซิฟิคแอคติวิตี = $\frac{\text{ความเข้มข้นของ NADH ที่เปลี่ยนไปต่อ 1 นาที}}{\text{ปริมาณโปรตีนจากสารตัวอย่างที่ใช้}}$ Unit

(Unit mole/min/mg.protein)