595.122048
ป299ก
ร3

การศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย

ปริญญานิพนธ์

ของ

ประพนธ์ ศิลปรัศมี

13 ก.ย. 2533

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

ธันวาคม 2532

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

170435

การศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย

บทคัดย่อ

ของ

ประพนธ์ ศิลปรัศมี

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

ธันวาคม 2532

จากการศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย โดยวิธี โซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรไฟร์ซีส พบว่า Paragonimus siamensis ประกอบด้วยแถบโปรตีน ประมาณ 25 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 12 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่ 12, 13, 14, 15.5, 17.5, 19, 23, 24, 25 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ส่วน P. heterotremus ประกอบด้วยแถบโปรตีน ประมาณ 28 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 12 กิโลดาลตัน จนถึง 83 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่ 12, 13, 14, 15.5, 17.5, 19, 23, 24, 25 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ องค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus มีความคล้ายกันมากในบริเวณ แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ คือ ตั้งแต่ 12 กิโลดาลตัน ถึง 38.5 กิโลดาลตัน เมื่อน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 38.5 กิโลดาลตันขึ้นไป จะพบความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเฉพาะแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 110 กิโลดาลตัน และมากกว่า 116 กิโลดาลตัน จะพบเฉพาะใน P. siamensis เท่านั้น

A STUDY ON PROTEIN COMPONENTS OF ADULT LUNG FLUKES *PARAGONIMUS SIAMENSIS* AND *P. HETEROTREMUS*

AN ABSTRACT

BY

PRAPON SILAPARUSSAMEE

A dissertation submitted in partial fulfilment of the requirements

for the Master of Education degree in Biology

at Srinakharinwirot University

December 1989

This study of protein components of two species of adult lung fluke, using crude extract and SDS - PAGE method, showed that about 25 and 28 bands of protein molecular weight ranging from 12 to over 116 kilodalton were found in Paragonimus siamensis, from 12 to 83 kilodalton in P. heterotremus. Both species revealed almost the same major bands, and they were 12, 13, 14, 15.5, 17.5, 19, 23, 24, 25 and 27 kilodalton, only the 25 kilodalton band was absent in P. heterotremus. Banding similarity between the two species was found in those with low molecular weight ranging from 12 to 38.5 kilodalton. While different banding was apparent after 110 kilodalton, beyond which high molecular weight bands were detectable only in P. siamensis.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน
(ผศ. พันธุ์สิน เกตุทัต)

..... กรรมการ
(ผศ. จินดา นัยเนตร)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน
(ผศ. พันธุ์สิน เกตุทัต)

..... กรรมการ
(ผศ. จินดา นัยเนตร)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศ. ดร.สมพร บัวทอง)

วันที่ ๑๐ เดือน กันยายน พ.ศ. 2532

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยคำแนะนำ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันธุ์สิน เกตุทัต และผู้ช่วยศาสตราจารย์ จินดา นัยเนตร ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ไพบูลย์ นัยเนตร จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือในการแนะนำเรื่องปู

ขอขอบพระคุณ คุณรุ่งราวรรณ เชวงเกียรติกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือและเทคนิคต่าง ๆ

ขอขอบคุณ คุณสกุลรัฐ สุพิมพ์ คุณผกายคาว บุญเริ่ม คุณนันทวัน จันทร์วันณา ที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างทำการวิจัย รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่เป็นกำลังใจในการทำปริญญานิพนธ์ด้วย

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงคุณบิดามารดา ที่ได้ให้การสนับสนุนการศึกษาตลอดมา

ประพนธ์ ศิลปรัศมี

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	3
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	4
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	4
	นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	6
	วิธีการไบยูเร็ท	6
	วิธีของลอว์รี	6
	วิธีบราดฟอร์ด	7
	ดิส อิเล็คโตรโฟรีซีส	7
	เอส ดี เอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส	9
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	11
	อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการทดลอง	11
	วิธีดำเนินการทดลอง	14
	สถานที่เก็บปูทำการศึกษา	14
	การเก็บรวบรวมเมตาเซอคาเรีย	14

บทที่ หน้า

การทำให้สัตว์ทดลองติดเชื้อกับพยาธิใบไม้ปอด 14
การหาปริมาณโปรตีนจากสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย 15
การหาน้ำหนักโมเลกุลและองค์ประกอบโปรตีนจากสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย 20

4 ผลการศึกษาค้นคว้า 25
อัตราการติดเชื้อของพยาธิในสัตว์ทดลอง 25
ปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย 25
องค์ประกอบโปรตีนจากสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย 29

5 บทย่อ สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ 38
บทย่อ 38
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า 38
วิธีการศึกษาค้นคว้า 38
สรุปผล 39
อภิปรายผล 40
ข้อเสนอแนะ 41

บรรณานุกรม 43

บทที่ หน้า

ภาคผนวก 48

ภาคผนวก ก. 49

ภาคผนวก ข. 52

ประวัติย่อของผู้วิจัย 58

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	การวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน	16
2	การวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis	19
3	การวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus	20
4	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน	26
5	แสดงข้อมูลคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis	28
6	แสดงข้อมูลคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus	29
7	องค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus	32
8	เปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus ที่ย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ กับ สีซิลเวอร์ ...	35

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 แสดงกราฟของปริมาณโปรตีนมาตรฐาน 27

2 แสดงกราฟของน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน 31

3 เปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus ที่ย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 36

4 เปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus ที่ย้อมด้วยสีซิลเวอร์ 37

5 เมตาเซอคาเรีย P. siamensis 50

6 เมตาเซอคาเรีย P. heterotremus 50

7 พยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis 51

8 พยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus 51

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

พยาธิใบไม้ปอด เป็นปรสิตที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ปอด (Paragonimiasis) การแพร่ระบาดของโรคนี้ขึ้นอยู่กับนิสัยการกินอาหารที่เป็นปูดิบหรือสุก ๆ ดิบ ๆ ของคนในเขตพื้นที่นั้น ๆ ทวีปที่มีการระบาดของโรคนี้มี 3 ทวีป คือ ทวีปเอเชีย พบในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี ลาว ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และไทย ในทวีปอาฟริกา พบในประเทศคัมเมอร์รูน คองโก และแกมเบีย ในทวีปอเมริกา พบในประเทศคอสตาริกา แม็กซิโก และเปรู (Yuvadee Vanvanitchi. 1985 : 4) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานพบพยาธิใบไม้ปอดรวมทั้งหมด 6 ชนิด โดยที่มีรายงานพบตัวเต็มวัยของพยาธิเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2507 ซึ่งพบตัวเต็มวัยของ Paragonimus westermani จากปอดเสือดาว 2 ตัว ที่ตายที่สวนสัตว์ดุสิต เสือทั้งสองตัวนี้ส่งมาจากจังหวัดชุมพร (Svasti Daengsvang, Tongchi Papasarathorn and Banchong Tongkoom. 1963 : 304) ต่อมา พ.ศ. 2508 ได้พบพยาธิใบไม้ปอดชนิดใหม่เป็นชนิดที่ 2 โดยพบจากปอดแมวในจังหวัดอุดรธานี และให้ชื่อพยาธิชนิดนี้ว่า P. siamensis (Miyazaki and Wykoff. 1965 : 252) พยาธิชนิดนี้มีแหล่งระบาดเกือบทุกภาคของประเทศ โดยภาคกลางที่จังหวัดนครนายก อยุธยา และราชบุรี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัดอุดรธานี ขอนแก่น และสกลนคร (Suvajra Vajrasthira. 1986 : 100) ภาคตะวันออกที่จังหวัดปราจีนบุรี สำหรับเมตาเซอคาเรีย (ภาพประกอบ 5 ภาคผนวก ก.) พบติดเชื้อในปูนา Somanniathelphusa bangkokensis, S. germaini, S. sexpunctatum และ S. dugusti (ฮาวารียะห์ อะหมัด. 2519 : 21 - 30; ไพบูลย์ นัยเนตร. 2521 : 23 - 37; สกุลรัฐ สุพิมพ์. 2532 : 20 - 21) ในปี พ.ศ. 2509 ได้พบ P. heterotremus เป็นพยาธิใบไม้ปอดชนิดที่ 3 โดยพบพยาธิตัวเต็มวัย

ในปอดแมวทดลองและในคน สำหรับในคนมีรายงานพบตัวเต็มวัยของพยาธิ 2 ตัว จากกล้ามเนื้อใต้ผิวหนังหน้าอก (subcutis) ของผู้ป่วยที่เป็นเด็กชายอายุ 13 ปี ที่มาจากจังหวัดนครนายก (Miyazaki and Tranackchit Harinasuta. 1966 : 509 - 514) ต่อมา พ.ศ. 2522 ได้พบพยาธิตัวเต็มวัย 7 ตัว จากเสมหะของผู้ป่วยซึ่งเป็นชาวนาอายุ 40 ปี จากอำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก ภายหลังจากการรักษาด้วยยาพราซิควอนเทล (Praziquantel) (Sirivan Vanijanonta and others. 1981 : 104 - 106) นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2513 ยังได้พบพยาธิตัวอ่อน และพยาธิตัวเต็มวัยอย่างละตัวจากปอดผู้ป่วยเพศชาย ซึ่งเป็นชาวลาวอพยพ อายุ 39 ปี ซึ่งตายด้วยโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Miyazaki and Fontan. 1970 : 109 - 113) แหล่งระบาดของพยาธิชนิดนี้อยู่บริเวณภาคกลาง ตำบลหินตั้ง อำเภอเมือง อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก โดยพบเมตาเซอคาเรีย (ภาพประกอบ 6 ภาคผนวก ก.) ติดเชื้อในปูน้ำตก Potamon smithianus Rathbun, 1923 (= Larnaudia beusekomae Bott. 1970) และตำบลชะอม น้ำตกเจ็ดคต อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี โดยพบเมตาเซอคาเรียติดเชื้อในปูน้ำตก Larnaudia larnandii A. Milne Edwards. 1869 (Ruchareka Wittayawudthikul. 1985 : 14 - 16; Yuvadee Vanvanitchai. 1985 : 60 - 69; อัจฉรา องค์ศิริวิทยา. 2530 : 24 - 31; ไพบูลย์ นัยเนตร. 2531 : 178 - 200) ต่อมาใน พ.ศ. 2510 ได้ศึกษาพบพยาธิใบไม้ปอดชนิดใหม่เป็นชนิดที่ 4 ให้ชื่อว่า P. bangkokensis ตัวเต็มวัยพบจากปอดแมวทดลอง โดยมีแหล่งระบาดในจังหวัดนครนายก และเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ปอดชนิดนี้พบติดเชื้อในปูน้ำตกชนิด L. beusekomae (Miyazaki and Suvajra Vajrasthira. 1967 a : 243 - 249) ในปีเดียวกันนี้ได้พบพยาธิใบไม้ปอดชนิดที่ 5 คือ P. macrorchis โดยตัวเต็มวัยพบจากหนูท้องขาว Rattus rattus ซึ่งจับได้จากจังหวัดนครนายก (Miyazaki and Suvajra Vajrasthira. 1967 b : 894 - 895) เมตาเซอคาเรียพบติดเชื้อในปูน้ำตก L. beusekomae (Suvajra Vajrasthira. 1986 : 101) และใน พ.ศ. 2511 ได้พบพยาธิชนิดใหม่เป็นชนิดที่ 6 ให้ชื่อว่า P. harinasutai โดย

ตัวเต็มวัยได้จากปอดแมวทดลอง มีแหล่งระบาดในจังหวัดนครนายก และเมตาเซอคาเรียของพยาธิชนิดนี้พบในปูน้ำตกชนิด L. beusekomae (Miyazaki and Suvajra Vajrasthira. 1968 : 81 - 87) พยาธิทั้ง 6 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดในส่วนประกอบของโครงสร้างทั้งในตัวเต็มวัยและระยะเมตาเซอคาเรีย (สกุลรัฐ สุพิมพ์. 2532 : 9 - 13) สำหรับการติดเชื้อพยาธิในผู้ป่วยของประเทศไทยเท่าที่มีรายงาน พบตัวเต็มวัยเป็นพยาธิใบไม้ปอดชนิด P. heterotremus (Suvajra Vajrasthira. 1986 : 99)

เนื่องจากมีรายงานถึงการระบาดของพยาธิใบไม้ปอด P. siamensis ได้เกือบทุกภาคของประเทศ รวมทั้งระบาดได้กว้างกว่า P. heterotremus แต่ยังไม่มีรายงานพบว่า P. siamensis ติดเชื้อในคน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis (ภาพประกอบ 7 ภาคผนวก ก.) กับ P. heterotremus (ภาพประกอบ 8 ภาคผนวก ก.) เพื่อหาข้อมูลในการวิเคราะห์ถึงความเป็นไปได้ของ P. siamensis ที่จะติดเชื้อได้ในคนเหมือนกับ P. heterotremus และผลการทดลองครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานในการศึกษาด้านวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อใช้หาลักษณะแอนติเจนเฉพาะ (specific antigen) ของพยาธิทั้งสองชนิดที่ทำการศึกษาต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus และ P. siamensis

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

ทำให้ทราบถึงองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus และ P. siamensis เพื่อเป็นพื้นฐานของการศึกษาด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน และการแพร่กระจายของพยาธิใบไม้ปอด ที่ทำการศึกษาทั้งสองชนิด

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus และ P. siamensis โดยวิธีบราดฟอร์ด (Bradford method)

2. การศึกษาน้ำหนักโมเลกุล และองค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย โดยใช้วิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis : SDS - PAGE)

3. การศึกษาค้นคว้าทำในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ปูน้ำตก (water fall crabs) หมายถึง ปูที่อาศัยในบริเวณแอ่งน้ำตก หรือลำธารที่ไหลมาจากน้ำตก โดยอาศัยตามใต้ก้อนหินบริเวณริมฝั่งของลำธาร รูลึกประมาณ 0.5 - 1 เมตร

2. ปูนา (rice field crabs) หมายถึง ปูน้ำจืดที่อาศัยอยู่ในรูบริเวณนาข้าว หรือแหล่งน้ำใกล้เคียง

3. เมตาเซอคาเรีย (metacercaria) หมายถึง ตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ปอด ซึ่งช่วงนี้เป็นปรสิตในปูที่เป็นผู้ให้อาศัยชั่วคราว โดยสร้างเกาะหุ้มตัวเป็นซิสต์ (cyst) ฝังอยู่ตามเหงือก ตับ และกล้ามเนื้อ

4. พยาธิตัวเต็มวัย (adult worm) หมายถึง พยาธิที่เจริญเติบโตในผู้ให้อาศัยที่แท้จริง (definitive host) จนมีอวัยวะสืบพันธุ์สมบูรณ์และสามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ (sexual reproduction)

5. สารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย (adult crude extract) หมายถึง ของเหลวที่ได้จากการนำเอาพยาธิตัวเต็มวัยไปบดด้วยเครื่องบดแล้วทำให้เซลแตกด้วยเครื่องโซนิเพรพ (soniprep)

6. อิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis) เป็นการเคลื่อนที่ของอิออนในสนามไฟฟ้า เนื่องจากความแตกต่างในปริมาณประจุสุทธิ และความแตกต่างในอัตราส่วนของประจุต่อมวล ซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญที่ทำให้อิออนต่าง ๆ เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยความเร็วไม่เท่ากัน

7. เอส ดี เอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส (SDS - polyacrylamide gel electrophoresis) เป็นโซนอิเล็คโตรโฟรีซีส (zone electrophoresis) ชนิดหนึ่ง ซึ่งใช้สำหรับแยกโปรตีนและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เป็นตัวค้ำจุนและใส่โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate : SDS) เพื่อให้จับกับโปรตีน ทำให้โปรตีนนั้นเสียสภาพและมีประจุสุทธิเป็นลบ เนื่องจากหมู่ของเอส ดี เอส และอัตราส่วนของจำนวนประจุลบของโปรตีนต่อน้ำหนักโมเลกุลมีค่าคงที่ เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์ โปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนไปยังขั้วไฟฟ้าบวกได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากสมบัติการมีรูที่เป็นเหมือนตะแกรงของโพลีอะคริลาไมด์เจล ซึ่งขนาดของรูเจลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ และเมทิลลีน-บิส อะคริลาไมด์ (methylene - bis acrylamide) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ในการใช้เตรียมโพลีเมอร์ของอะคริลาไมด์ เจล

บทที่ ๒

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ในการวิเคราะห์ด้านภูมิคุ้มกัน (immunodiagnosis) และด้านเอ็นไซม์ (enzyme) ตลอดจนการหาองค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิใบไม้ปอด ขั้นตอนแรกของการศึกษาจำเป็นต้องหาปริมาณโปรตีนซึ่งมีอยู่ในสารสกัดพยาธิก่อน เพื่อจะนำข้อมูลที่ได้ใช้ประกอบการศึกษาขั้นต่อไป ในการหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดพยาธิใบไม้ปอด ได้มีผู้ศึกษาโดยใช้วิธีการต่าง ๆ ดังนี้

วิธีการไบยูเร็ท (Biuret procedure) เป็นวิธีที่มีข้อดี คือ ทำได้รวดเร็ว และง่ายในการปฏิบัติ แต่ข้อเสียคือ ไม่ไวในการทำปฏิกิริยาต้องใช้สารตัวอย่างมากกว่า 100 ไมโครกรัม ในการทำปฏิกิริยาซึ่งทำให้สิ้นเปลืองสารตัวอย่างมาก ตลอดจนมีสารแปลกปลอมหลายชนิด (Cooper. 1977 : GPC - 3.4) ซึ่งวิธีการนี้มีผู้ใช้ศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัยของ P. westermani, P. ohirai, P. miyazakii (Yoshimura. 1969 a : 118 - 130; Yoshimura. 1969 b : 107 - 117) และ P. iloktsuenensis (Yoshimura, Hishinuma and Sato. 1969 : 249 - 257)

วิธีของลอว์รี (Lowry method) วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับการนิยมในการหาปริมาณโปรตีนในแอนติเจน (antigen) หรือสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดซึ่งมีข้อดีคือ มีความไวในการทำปฏิกิริยามากกว่าวิธีไบยูเร็ทถึง 10 เท่า นั้นคือใช้สารตัวอย่างเพียง 1 ไมโครกรัม ก็ทดสอบได้ แต่วิธีการนี้มีข้อเสียหลายอย่างคือ ต้องใช้เวลาทดลองนาน มีหลายขั้นตอนทำให้ยุ่งยาก ในการทดลองแต่ละขั้นตอนต้องคำนึงถึงเวลาในการทดลอง และมีสารแปลกปลอมเหมือนกับวิธีไบยูเร็ทแต่มีระดับการแปลกปลอมสูงกว่า (Cooper. 1977 : GPC - 3.4) วิธีการนี้มีผู้ใช้หาปริมาณโปรตีนของแอนติเจน และสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดระยะตัวอ่อน P. westermani (Sugiyama, Horiuchi and Tomimura. 1988 : 169 - 174) ระยะตัวเต็มวัย P. westermani (Cho. and others. 1981 : 151 - 156; Sugiyama, Horiuchi and Tomimura. 1987 :

363 - 367) P. siamensis และ P. heterotremus (Quicho. 1981 : 364 - 370; Indrawate. 1988 : 21 - 36)

วิธีบราดฟอร์ด (Bradford method) เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณโปรตีนในแอนติเจน หรือสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดได้อย่างดีมาก เนื่องจากมีความไวในการทำปฏิกิริยาสูงมาก ใช้สารตัวอย่างเพียง 1 ไมโครกรัมก็สามารถทดสอบได้ วิธีนี้ไม่มีข้อจำกัดมากมายจากสารแปลกปลอมเหมือนอย่างวิธีของลอว์รี นอกจากนี้สารประกอบที่ซับซ้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาคงที่ได้นานถึง 1 ชั่วโมง แต่วิธีการนี้มีข้อควรระวังเนื่องจากปฏิกิริยามีความไวสูง จึงจำเป็นต้องใช้น้ำกลั่น 2 ครั้ง ทำให้ปราศจากอิออนแปลกปลอม และใช้คิวเว็ตแก้วแทนคิวเว็ตควอทซ์ (quartz) เพื่อป้องกันสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนที่เกิดจากปฏิกิริยายึดจับควอทซ์ทำให้ค่าดูดกลืนแสงผิดพลาดได้ (Bradford. 1976 : 248 - 254) ซึ่งวิธีการนี้มีผู้ใช้หาปริมาณโปรตีนในสารสกัดเมตาเซอคาเรีย Paragonimus sp. จากอำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี กับ P. siamensis จากอำเภอเมือง จังหวัดนครนายก (ประพนธ์ ศิลปรัศมี และอมรรัตน์ ชาญปรีชากุล. 2531 : 1 - 33) และในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus จากประเทศไทย และ P. westermani จากประเทศญี่ปุ่น (Sugiyama and Punsin Katudat. 1989 : 110)

สำหรับการศึกษาด้านส่วนประกอบโครงสร้างโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดนั้น มีผู้ศึกษาโดยวิธีการอิเล็คโตรโฟรีซีสแบบต่าง ๆ ดังนี้

ดิส อิเล็คโตรโฟรีซีส (disc electrophoresis) จัดเป็นเทคนิคโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส ซึ่งจำเป็นต้องใช้ควบคู่กับเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (densitometer) เพื่อวัดความเข้มสีของแถบโปรตีนแต่ละแถวในเจล (ธนิต ผิวนิ่ม. 2528 : 78 - 79) วิธีการนี้มีผู้ใช้ศึกษา คือ

โยชิมูรา (Yoshimura. 1969 a : 118 - 130) ได้ศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัยทั้งตัวของ P. westermani, P. ohirai และ P. miyazakii โดยมีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของโปรตีนที่แตกต่างกันของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัยทั้ง

3 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า P. westermani มีองค์ประกอบของโปรตีนแยกก็ได้อย่างน้อย 23 แถบ และโดยการใช้เดนซิโตมิเตอร์วัดความเข้มของแถบสีของโปรตีนพบว่ามีอย่างน้อย 6 ยอด (peak) ของกราฟที่เป็นลักษณะเฉพาะของพยาธิชนิดนี้ สำหรับ P. ohirai มีองค์ประกอบของโปรตีนแยกได้อย่างน้อย 24 แถบ มีอย่างน้อย 7 แถบ ที่เป็นลักษณะเฉพาะของพยาธิชนิดนี้ P. miyazakii มีองค์ประกอบของโปรตีนแยกได้อย่างน้อย 23 แถบ มีอย่างน้อย 6 แถบ โดยเฉพาะแถบที่ 7 และ 11 ที่เป็นลักษณะเฉพาะของพยาธิชนิดนี้รูปแบบอิเล็คโตรโฟรีซีสของพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 3 ชนิด มีความคล้ายคลึงกันที่บริเวณใกล้จุดเริ่ม และส่วนต้น ๆ ของแถบเจล มีสองแถบบนเจลที่พบเหมือนกันของพยาธิทุกชนิดที่นำมาศึกษา ส่วนความแตกต่างส่วนมากจะอยู่บริเวณส่วนกลางของเจล

โยชิมูรา (Yoshimura. 1969 b : 107 - 117) ได้ศึกษาส่วนของโปรตีนจากพยาธิตัวเต็มวัยทั้งตัว โดยมีจุดประสงค์ที่จะได้ข้อมูลมาใช้จำแนกชนิดพยาธิใบไม้ปอดจากเกาะซาโด ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบของโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัยแต่ละชนิดที่พบบนเกาะซาโด เป็นหลักฐานตรวจสอบจำแนกชนิดของพยาธิ ผลการศึกษาพบว่าองค์ประกอบโปรตีนแยกได้อย่างน้อย 23 แถบ ซึ่งมี 7 แถบ มีลักษณะเฉพาะของพยาธิชนิดนี้ พยาธิชนิดนี้มีความแตกต่างจากพยาธิ P. westermani และ P. miyazakii อย่างแน่นอน และจากการศึกษาด้วยอิเล็คโตรโฟรีซีส ชี้ให้เห็นว่าเป็นพยาธิ P. ohirai

โยชิมูรา, ชิชินูมา และซาโต (Yoshimura, Hishinuma and Sato. 1969 : 249 - 257) ได้ศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย P. iloktsuenensis กับ P. ohirai ผลการศึกษาพบว่าพยาธิ P. iloktsuenensis มีองค์ประกอบโปรตีนแยกได้อย่างน้อย 23 แถบ และความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิ P. iloktsuenensis. กับ P. ohirai อยู่ที่บริเวณส่วนกลางของเจลตั้งแต่แถบที่ 10 ถึง 22 โดยที่พยาธิ P. ohirai จะมีความเข้มของแถบที่ 16 ถึง 21 มากกว่า P. iloktsuenensis ยกเว้นแถบที่ 18 แต่จะมีแถบโปรตีนที่คล้ายกันของพยาธิทั้งสองชนิดที่บริเวณส่วนต้นและปลายเจล และจากการเปรียบเทียบ

องค์ประกอบโปรตีนของพยาธิ P. iloktsuenensis กับ P. miyazakii และ P. sadoensis ซึ่งได้ศึกษาไว้ก่อนแล้ว พบว่ารูปแบบองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิทั้งหมดนี้มีความแตกต่างอย่างชัดเจน

ลุย (Liu. 1985 : 44 - 46) ได้ศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย P. skrjabini กับ P. westermani ในประเทศจีน

เอส ดี เอส โพลีอะคริลอาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส วิธีการนี้ใช้สำหรับแยกองค์ประกอบโปรตีน และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้อย่างถูกต้อง ตลอดจนใช้กับโปรตีนได้หลายชนิด รวมทั้งไกลโคโปรตีนด้วย (Segrest and Jackson. 1972 : 54 - 63; Svasti Jisnuson and Panijpan Bhinyo. 1977 : 560 - 562; Werber and Osborn. 1969 : 4406 - 4412) วิธีการนี้มีผู้ศึกษาไว้ดังนี้

ซูกิยามา และคนอื่น ๆ (Sugiyama and others. 1987 : 363 - 367) ได้ศึกษาลักษณะและตำแหน่งของแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย P. westermani ที่กระตุ้นให้สร้างแอนติบอดี (antibody) ในหนู และแมวที่ถูกทำให้ติดเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าลักษณะองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย แยกได้อย่างน้อย 36 แถบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 10,100 ถึง 103,000 ดาลตัน และจากการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนบลอททิง (immunoblotting technique) พบว่าแถบของโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน จะทำปฏิกิริยากับซีรัม (serum) ของแมวและหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้ออย่างชัดเจน

ซูกิยามา, โฮริยูชิ และโทมิมูรา (Sugiyama, Horiuchi and Tomimura. 1988 : 169 - 174) ได้ศึกษาลักษณะแอนติเจนของพยาธิตัวอ่อน P. westermani แยกได้อย่างน้อย 20 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10,000 ถึง 100,000 ดาลตัน หรือสูงกว่านี้ จากการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนบลอททิง พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 26,000 ถึง 100,000 หรือสูงกว่านี้ ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของพยาธิตัวอ่อน และผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพยาธิตัวอ่อน P. westermani มีแอนติเจนอย่างน้อย 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26,000 ดาลตัน ซึ่งเป็นแอนติเจนที่พบทั้งในพยาธิตัวอ่อนและตัวเต็มวัย อีกชนิดหนึ่งเป็นแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34,000 ดาลตัน ซึ่งเป็นแอนติเจนที่พบเฉพาะในพยาธิตัวอ่อนเท่านั้น

อินดราวติ (Indrawati. 1988 : 35 - 80) ใช้ เอส ดี เอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส ในการศึกษาขององค์ประกอบโปรตีนของ P. heterotremus เพื่อศึกษาภูมิต้านทานในระบบอิมมูนชนิดของเหลวในคน ผลการศึกษาพบว่า องค์ประกอบโปรตีนของแอนติเจนพยาธิตัวเต็มวัยทั้งตัว (crude somatic antigen) ประกอบด้วยแถบโปรตีนประมาณ 28 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 13 - 110 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15, 17, 27, 28, 44 และ 51 กิโลดาลตันตามลำดับ สำหรับแถบโปรตีนอื่น ได้แก่ 14, 18, 19, 20.5, 23, 25.5, 29, 30.5, 31.5, 34, 37, 38.5, 41, 44, 46, 56, 68, 74, 81.5 และ 89 กิโลดาลตันตามลำดับ และจากการศึกษาด้วยวิธีเวสเทรนบลอท (western blot analysis) พบว่าแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน เป็นแอนติเจนที่พบเฉพาะในพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus

ซูกิยามา และพันธุ์สิน เกตุทัต (Sugiyama and Punsin Ketudat. 1989 : 111 - 113) ได้ศึกษาลักษณะแอนติเจนของ P. heterotremus จากประเทศไทย และ P. westermani ในประเทศญี่ปุ่น พบว่าองค์ประกอบโปรตีนแอนติเจนของ P. heterotremus มีแถบโปรตีนหลัก 3 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000, 17,000 และ 15,500 ดาลตัน และมีแถบโปรตีนบาง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 26,000 ดาลตัน สำหรับ P. westermani มีแถบโปรตีนหลัก 3 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000, 17,000 และ 15,500 ดาลตัน เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนบล็อททิงพบว่า แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตันใน P. heterotremus และ P. westermani ทำปฏิกิริยากับซีรัมของแมวและหนูทดลองอย่างเด่นชัด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมเมตาเซอคาเรียจากปู

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือรวบรวมเมตาเซอคาเรีย ประกอบด้วย แผ่นกระจกขนาดกว้าง 3 นิ้ว ยาว 5.5 นิ้ว เข็มเขี่ย หลอดหยด จานแก้ว และบีกเกอร์
2. กล้องสเตอริโอ
3. ไมโครมิเตอร์ (micrometer)
4. กล้องจุลทรรศน์ พร้อมอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

สารเคมี

1. สารละลายไทโรด (tyrode solution) (ภาคผนวก ข.)

2. การเก็บรวบรวมพยาธิตัวเต็มวัยจากสัตว์ทดลอง

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลองหนูขาวอายุประมาณ 2 เดือน และแมวอายุประมาณ 1 ปี จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. หลอดสำหรับทำให้สัตว์ทดลองติดเชื้อ (animal intubation needles) เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร
3. ชุดเครื่องมือผ่าตัด

สารเคมี

1. อีเทอร์ (ether)
2. เอทานอล (ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์

3. การหาปริมาณโปรตีนจากสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย

อุปกรณ์

1. เครื่องบดทำให้เนื้อเยื่อแตก (homogenizer)

2. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงอุณหภูมิต่ำ (hispeed refrigerated centrifuge)

3. คิวเว็ต (cuvette) แก้วขนาด 3 มิลลิลิตร

4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

5. เครื่องโซนิเพรพ (soniprep 150 ultrasonic disintegator)

สารเคมี

1. ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ (phenylmethylsulfonylfluoride : PMSF) 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข.)

2. เอล-1-ทูซิลาไมด์-2-ฟีนิลเอทิล คลอโรเมทิล คีโทน (L-1-tosylamide-2-phenylethly chloromethyl ketone : TPCK) 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข.)

3. โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin)

4. น้ำกลั่น 2 ครั้ง ปราศจากอิออนแปลกปลอม (double distilled and deionized water)

5. น้ำเกลือ (normal saline) 0.85 เปอร์เซ็นต์

6. บราดฟอร์ด รีเอเจนต์ (bradford reagent) (ภาคผนวก ข.)

7. กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ (hydrochloric acid)

4. การหาน้ำหนักโมเลกุลและองค์ประกอบโปรตีนจากสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือสแลบ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส (slab gel electrophoresis apparatus)

2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)

3. เครื่องทำให้เจลแห้ง (dry gel apparatus)

4. อุปกรณ์ถ่ายรูปเจล

สารเคมี

1. โปรตีนมาตรฐาน (standard protein)

2. โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (ภาคผนวก ข.)

3. สารละลายโพลีอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (ภาคผนวก ข.)

4. เจล บัฟเฟอร์ (gel buffer) pH 6.8 (ภาคผนวก ข.)

5. เจล บัฟเฟอร์ pH 8.9 (ภาคผนวก ข.)

6. อิเล็คโตรโฟรีซิส บัฟเฟอร์ (electrophoresis buffer) pH 8.3 (ภาคผนวก ข.)

7. แซมเปิลบัฟเฟอร์ 5 เอ็กซ์ (sample buffer 5X) (ภาคผนวก ข.)

8. แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข.)

9. ทีเม็ด (N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine : TEMED) 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข.)

10. สีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ (coomassie brilliant blue R. stain) (ภาคผนวก ข.)

11. สารละลายสีส่วนเกิน (destaining solution) (ภาคผนวก ข.)

12. กรดอะซิติก (acetic acid) 12 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล (methanol) 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข.)

13. กรดอะซิติก 5 เปอร์เซ็นต์ ในเอทานอล (ethanol) 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข.)

14. โปแตสเซียม ไดโครเมต (potassium dichromate) 0.0034 โมลาร์ ในกรดไนตริก (nitric acid) 0.0032 นอร์มอล (ภาคผนวก ข.)

15. ซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) 0.012 โมลาร์ (ภาคผนวก ข.)

16. สารละลายอิมเมก ดีเวลลอปเปอร์ (image developer) (ภาคผนวก ข.)

17. กรดอะซิติก 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข.)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. สถานที่เก็บปูทำการศึกษา

1.1 สถานที่เก็บตัวอย่างปูนา Somanniathelphusa germaini, S. sexpunctatum จากบริเวณตำบลหินตั้ง อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก

1.2 สถานที่เก็บตัวอย่างปูน้ำตก Larnaudia larnaudii จากบริเวณน้ำตกเจ็ดคต อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี

2. การเก็บรวบรวมเมตาเซอคาเรียจากปูที่ทำการศึกษา

นำปูนาและปูน้ำตก จำแนกตามลักษณะอนุกรมวิธาน จากนั้นปูแต่ละชนิดถูกนำมาหาเมตาเซอคาเรีย โดยวิธีการดังนี้

2.1 รวบรวมเมตาเซอคาเรียจากเหงือก ตับ โดยใช้วิธีแผ่นกระจกกดทับเหงือกและตับ แล้วรวบรวมเมตาเซอคาเรียภายใต้กล้องสเตอริโอ

2.2 รวบรวมเมตาเซอคาเรียจากกล้ามเนื้อ โดยใช้วิธีบดเนื้อปูแล้วกรองด้วยตะแกรงขนาดตาห่างไปจนถี่ตามลำดับ จากนั้นนำส่วนที่กรองได้ตั้งให้ตกตะกอน ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง นำตะกอนหนักส่วนล่างมารวบรวมเมตาเซอคาเรียภายใต้กล้องสเตอริโอ

3. การทำให้สัตว์ทดลองติดเชื้อกับพยาธิใบไม้ปอด

3.1 นำเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ปอด P. siamensis ที่รวบรวมได้จากปูนา S. germaini และ S. sexpunctatum มาทำให้หนูขาวที่เตรียมไว้จำนวน 17 ตัว ติดเชื้อโดยการสอดสายยางทางปาก (สกุลรัฐ สุพิมพ์. 2532 : 60) ซึ่งให้เมตาเซอคาเรีย จำนวน 80 ซิสต์ต่อหนู 1 ตัว

3.2 นำเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ปอด P. heterotremus ที่รวบรวมได้จากปูน้ำตก Larnaudia larnaudii มาทำให้แมวที่เตรียมไว้จากข้อ 1 จำนวน 3 ตัว ติดเชื้อโดยการสอดสายยางทางปาก ซึ่งให้เมตาเซอคาเรีย จำนวน 120 ชิสต์ต่อแมว 1 ตัว

3.3 ตรวจสอบไข่พยาธิใบไม้ปอดจากอุจจาระแมวและหนูขาวด้วยวิธีฟอร์มาลิน-อีเทอร์ (สกุลรัฐ สุพิมพ์. 2532 : 59) ภายหลังให้เมตาเซอคาเรียแล้ว 2 เดือน และทุก 2 สัปดาห์ต่อมา

4. การหาปริมาณโปรตีนจากสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย

ทำโดยประยุกต์วิธีของบราดฟอร์ด โดยใช้โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน เป็นโปรตีนมาตรฐาน มีวิธีดังนี้

4.1 การหากราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน

4.1.1 เตรียมโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารตั้งต้น เจือจางโบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอดตามต้องการดังขั้นตอนปฏิบัติตามตาราง 1

4.1.2 จากตาราง 1 นำหลอดทั้ง 25 หลอด มาเติมบราดฟอร์ด รีเอเจนต์ หลอดละ 2.8 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรรวมทุกหลอดเท่ากัน คือ 3 มิลลิลิตร

4.1.3 นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเริ่มจากหลอดควบคุม หลอดที่ 1 และ 2 ปรับค่าการดูดกลืนแสงทั้ง 2 หลอด ให้เท่ากัน จากนั้นเริ่มวัดค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละหลอด ตั้งแต่หลอดที่ 3 ไปจนถึงหลอดที่ 25

4.1.4 วิธีการวัดโดยการเติมสารละลายในแต่ละหลอดลงในคิวเว็ตขนาด 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดกับเครื่องวัดการดูดกลืนแสง โดยเปรียบเทียบการดูดกลืนแสงกับหลอดควบคุม

4.1.5 การทดลองนี้จะต้องทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงให้เสร็จสิ้นภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเติมสารบราดฟอร์ด รีเอเจนต์ ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอด เพราะว่า

สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่คงที่ในเวลา 1 นาที ถึง 1 ชั่วโมง หลังจากเติมบราดฟอร์ด รีเอเจนต์

4.1.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ตาราง 1 การวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

หลอดที่	ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอดที่ต้องการ (ไมโครกรัม : µg)	ส่วนผสมในการเจือจางโปรตีนมาตรฐานตามต้องการ		เติมบราดฟอร์ดรีเอเจนต์ (ml)	ปริมาตรรวมในแต่ละหลอด (ml)
		โบไวน์ ซีรัมอัลบูมิน 1000 µg/ml (ml)	น้ำเกลือ 0.85 % (ml)		
1.	หลอดควบคุม (blank)	-	0.2	2.8	3
2.	หลอดควบคุม	-	0.2	2.8	3
3.	ปริมาณโปรตีน 2 µg	0.002	0.198	2.8	3
4.	ปริมาณโปรตีน 4 µg	0.004	0.196	2.8	3
5.	ปริมาณโปรตีน 6 µg	0.006	0.194	2.8	3
6.	ปริมาณโปรตีน 8 µg	0.006	0.192	2.8	3
7.	ปริมาณโปรตีน 10 µg	0.010	0.190	2.8	3
8.	ปริมาณโปรตีน 15 µg	0.015	0.185	2.8	3
9.	ปริมาณโปรตีน 20 µg	0.020	0.180	2.8	3
10.	ปริมาณโปรตีน 25 µg	0.025	0.175	2.8	3

ตาราง 1 (ต่อ)

หลอดที่	ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอดที่ต้องการ (ไมโครกรัม : µg)	ส่วนผสมในการเจือจางโปรตีนมาตรฐานตามต้องการ		เติมบราดฟอร์ดรีเอเจนต์ (ml)	ปริมาตรรวมในแต่ละหลอด (ml)
		โบไวน์ ซีรัมอัลบูมิน 1000 µg/ml (ml)	น้ำเกลือ 0.85 % (ml)		
11.	ปริมาณโปรตีน 30 µg	0.030	0.170	2.8	3
12.	ปริมาณโปรตีน 35 µg	0.035	0.165	2.8	3
13.	ปริมาณโปรตีน 40 µg	0.040	0.160	2.8	3
14.	ปริมาณโปรตีน 45 µg	0.045	0.155	2.8	3
15.	ปริมาณโปรตีน 50 µg	0.050	0.150	2.8	3
16.	ปริมาณโปรตีน 55 µg	0.055	0.145	2.8	3
17.	ปริมาณโปรตีน 60 µg	0.060	0.140	2.8	3
18.	ปริมาณโปรตีน 65 µg	0.065	0.135	2.8	3
19.	ปริมาณโปรตีน 70 µg	0.070	0.130	2.8	3
20.	ปริมาณโปรตีน 75 µg	0.075	0.125	2.8	3
21.	ปริมาณโปรตีน 80 µg	0.080	0.120	2.8	3
22.	ปริมาณโปรตีน 85 µg	0.085	0.115	2.8	3
23.	ปริมาณโปรตีน 90 µg	0.090	0.110	2.8	3
24.	ปริมาณโปรตีน 95 µg	0.095	0.105	2.8	3
25.	ปริมาณโปรตีน 100 µg	0.100	0.100	2.8	3

4.2 การทำสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย

หนูขาวและแมวจะถูกฆ่า เมื่อตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระ หรือ 90 วัน หลังจากถูกทำให้ติดเชื้อ เพื่อนำพยาธิตัวเต็มวัยมาจากปอดของหนูขาวและแมว พยาธิตัวเต็มวัยที่ได้ถูกนำมาสกัดเป็นสารสกัด (adult crude extract) ตามวิธีของศิริพร ตันติโพธิ์พิพัฒน์ (Siriporn Tuntipopipat. 1989 : 13 - 14) มีวิธีการดังนี้

4.2.1 ล้างตัวพยาธิด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 นำพยาธิใส่ในเครื่องบดทำให้เนื้อเยื่อแตก โดยใส่น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ลงไปด้วยในปริมาณเล็กน้อยพอท่วมตัวพยาธิ

4.2.3 เติม ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารที่จะสกัดเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ และเติม เอล-1-ทูซิลาไมด์-2-ฟีนิลเอทิล คลอโรเมทิล คีโทน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารที่จะสกัดเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นตัวยับยั้งเอ็นไซม์ที่จะย่อยโปรตีนในขณะทำการบด

4.2.4 บดพยาธิด้วยเครื่องบดจนเนื่อเยื่อพยาธิหลุดเป็นเซลล์

4.2.5 นำสารสกัดพยาธิที่ได้จากการบดไปทำให้เซลล์แตกด้วยโซนิเพรพ โดยใช้ ดิวตีเซอร์เคิ้ล (dutycycle) 20 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 15 ครั้ง โดยเดินเครื่องครั้งละ 1 นาที พัก 1 นาที

4.2.6 สารละลายที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องโซนิเพรพ จะตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2.7 จากนั้นนำไปปั่น 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ด้วยเครื่องปั่นแบบความเร็วสูงอุณหภูมิต่ำ

4.2.8 ดูดของเหลวใส่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4.3 การวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย

4.3.1 นำสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis ปริมาณ 0.010 มิลลิลิตร ผสมน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.490 มิลลิลิตร (อัตราความเข้มข้น 1 : 50) เป็นหลอดตั้งต้นในการทำให้เจือจางแบบ ทู โฟลด์ ไดลูชั่น (two fold dilution) จนได้อัตราความเข้มข้นสุดท้าย 1 : 400 สำหรับสารสกัดตัวเต็มวัย P. heterotremas กระทำเช่นเดียวกับสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis จากนั้นทำการทดลองดังแสดงไว้ในตาราง 2 และ 3

ตาราง 2 การวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis

หลอดที่	อัตราความเข้มข้นสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis	ปริมาณสารสกัดในแต่ละหลอด (ml)	บราดฟอร์ด รีเอเจนต์ (ml)	ปริมาณรวมในแต่ละหลอด
1.	1 : 50	0.20	2.80	3.0
2.	1 : 100	0.20	2.80	3.0
3.	1 : 200	0.20	2.80	3.0
4.	1 : 400	0.20	2.80	3.0

ตาราง 3 การวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus

หลอดที่	อัตราความเข้มข้นสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis	ปริมาณสารสกัดในแต่ละหลอด (ml)	บราดฟอร์ด รีเอเจนต์ (ml)	ปริมาณรวมในแต่ละหลอด
1.	1 : 50	0.20	2.80	3.0
2.	1 : 100	0.20	2.80	3.0
3.	1 : 200	0.20	2.80	3.0
4.	1 : 400	0.20	2.80	3.0

4.3.2 ในการวัดค่าดูดกลืนแสงนั้นใช้หลอดควบคุมเช่นเดียวกับข้อ 4.1 การหากราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงไว้ในตาราง 1

4.3.3 ได้ค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละหลอดนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัยทั้งหมด

5. การหาน้ำหนักโมเลกุลและองค์ประกอบโปรตีนจากสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย

5.1 การเตรียมสแลบ เจล

5.1.1 เตรียมบล็อคกระจก (glass block) ขนาด 9.6 12.7 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.1.2 เตรียมเอส ดี เอส โพลีอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข.) จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในบล็อคให้มีความสูงประมาณ 7.4 เซนติเมตร แล้วค่อย ๆ เติม

น้ำกลั่นลงเหนือผิวหน้าเจลให้มีความสูงของน้ำกลั่นประมาณ 2 มิลลิเมตร (ระวังอย่าให้กระเทือนหน้าเจล) เพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบ เจลชั้นนี้เรียกว่า เจลแยกสาร หรือรันนิ่งเจล (separating gel or running gel) เจลแยกสารนี้จะแข็งตัวเป็นโพลิเมอร์ (polymer) ที่อุณหภูมิห้องเมื่อได้รับแสงฟลูออเรสเซนท์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง (สามารถเก็บค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ 4 องศาเซลเซียส)

5.1.3 เทน้ำกลั่นที่อยู่เหนือรันนิ่งเจลออก แล้วใส่เอส ดี เอส โพลีอะคริลาไมด์ 4 เปอร์เซ็นต์ pH 6.8 (ภาคผนวก ข.) ลงไปแทนพร้อมกับใส่หวีเสียบ (comb : แผ่น พลาสติกตัดเป็นซี่พัน 8 ซี่ แต่ละซี่กว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร) เพื่อให้เจลเป็นร่องลึกลงไปสำหรับหยอดสารตัวอย่าง เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว เจลส่วนนี้เรียกว่า แซมเปิลเจลหรือสเปเซอร์เจล (sample gel or spacer gel) ซึ่งเจลส่วนนี้จะแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเมื่อได้รับแสงฟลูออเรสเซนท์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากแข็งตัวต้องนำมาใช้ทันที เพื่อกันไม่ให้เกิดการแพร่เข้าหากันระหว่างบัฟเฟอร์ของเจลทั้ง 2 ชั้นนี้

5.2 การเตรียมสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย

5.2.1 เตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 2 ชนิด (ประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ได้จากข้อ 4.2

5.2.2 นำสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัยที่เตรียมได้มา 4 ส่วน ผสมแซมเปิลบัฟเฟอร์ 5 เอ็กซ์ 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 2.5 นาที เพื่อให้โปรตีนในสารสกัดลดรูปและเสียสภาพ

5.3 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ เบต้า-กาเลคโตซิเดส (β-galactosidase) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 116 กิโลดาลตัน ฟอสโฟรีเลส บี (phosphorylase b) มีน้ำหนักโมเลกุล 97.4 กิโลดาลตัน โบไวน์ อัลบูมิน (bovine albumin) มีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน อัลบูมินของไข่ (egg albumin) มีน้ำหนักโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน ทริปซิโนเจน

170435

(trypsinogen) มีน้ำหนักโมเลกุล 24 กิโลดาลตัน เบต้า-แลคโตโกลบูลิน (β-lactoglobulin) มีน้ำหนักโมเลกุล 18.4 กิโลดาลตัน และไลโซไซม์ (lysozyme) มีน้ำหนักโมเลกุล 14.3 กิโลดาลตัน (Sigma)

5.3.1 เตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

5.3.2 นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมได้มา 4 ส่วน ผสมแซมเปิล บัฟเฟอร์ 5 เอ็กซ์ 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 2.5 นาที เพื่อให้โปรตีนลดรูป และเสียสภาพ

5.4 การทำอิเล็คโตรโฟรีซีส

5.4.1 จัดบล็อคกระจกเข้ากับอ่างอิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoretic chamber) 2 อ่าง โดยอ่างอันหนึ่งอยู่ด้านบนบล็อคกระจก อีกอ่างหนึ่งอยู่ด้านล่างบล็อคกระจก จากนั้นเทอิเล็คโตรโฟรีซีส บัฟเฟอร์ ให้ท่วมแผ่นกระจกทั้งด้านบน และล่าง

5.4.2 หยอดสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมไว้จากข้อ 5.3 (ปริมาณโปรตีนประมาณ 30 - 45 ไมโครกรัม) ลงในหลุมที่ 1 ของสเปเซอร์ เจล ที่มีอิเล็คโตรโฟรีซีส บัฟเฟอร์ท่วมหลุม ส่วนหลุมที่เหลือใส่สารสกัดพยาธิตัวเต็มวัยทั้ง 2 ชนิด ที่เตรียมได้จากข้อ 5.2 ในแต่ละหลุม (ปริมาณโปรตีนที่ใส่ในแต่ละหลุมประมาณ 30 - 45 ไมโครกรัม)

5.4.3 จ่ายกระแสไฟฟ้าตรง 5 มิลลิแอมแปร์ต่อเจลหนึ่งบล็อค โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบ (ด้านบน) ลงสู่ขั้วบวก (ด้านล่าง) เมื่อสีบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบถึงขอบเจลด้านล่างจึงหยุดการจ่ายกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมง

5.4.4 แยกเอาแผ่นเจล โพลีอะคริลาไมด์ ออกมาจากแผ่นกระจก ทำเครื่องหมายตำแหน่งของสีอ้างอิงบนแผ่นเจล

5.4.5 วัดความยาวของส่วนรันนิ่งเจลทั้งหมด และความยาวของสีบรอมฟินอลบลู ที่เคลื่อนที่ได้ เพื่อเก็บข้อมูลไว้สำหรับคำนวณหาค่า รีเลทีฟ โมบิลิตี (relative mobility) ในข้อ 5.6.1 ต่อไป

5.5 การย้อมสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์

5.5.1 แผ่นเจลที่แยกจากบล็อคกระจกถูกนำไปแช่ในสารละลายสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ เป็นเวลา 1 - 2 ชั่วโมง

5.5.2 นำเจลที่ย้อมสีแล้วไปแช่ในสารละลาย ล้างสีส่วนที่เกินออก โดยแช่ทิ้งไว้ 1 วัน

5.5.3 หลังจากล้างสีส่วนที่เกินออกแล้ว นำเจลมาวัดความยาวของรันนิ่งเจลทั้งหมดอีกครั้ง เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า รีเลทีฟโมบิลิตี ในข้อ 5.6.1 ต่อไป

5.6 การกำหนดน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย

การกำหนดน้ำหนักโปรตีนใช้วิธีการของสุรศักดิ์ วงค์รัตนชีวิน (Surasakdi Wongratanacheewin. 1987 : 26 - 27) โดยน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัยจะหาได้จากการเปรียบเทียบค่าอิเล็คโตรโฟรีติกโมบิลิตี (electrophoretic mobility) ระหว่างสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัยกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวหาได้ดังนี้

5.6.1 หาค่ารีเลทีปโมบิลิตี จากสมการดังนี้

$$\frac{\text{ระยะทางของโปรตีนที่เคลื่อนที่}}{\text{ความยาวของเจลหลังย้อมสี}} \times \frac{\text{ความยาวของเจลก่อนย้อมสี}}{\text{ระยะทางของสีที่เคลื่อนที่}}$$

5.6.2 นำค่ารีเลทีปโมบิลิตี และค่าล็อกกาลิทึม (logarithmic values) ของน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐานมาเขียนกราฟมาตรฐาน

5.6.3 นำค่ารีเลทีปโมบิลิตีของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัยแต่ละแถบบนเจลมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานหาน้ำหนักโมเลกุลในแต่ละแถบโปรตีน

5.7 การย้อมสีซิลเวอร์ (silver)

การย้อมสีซิลเวอร์ ใช้ในการย้อมสีแถบโปรตีนเล็ก ๆ เพราะว่าการย้อมแบบนี้มีความไวมากกว่าการย้อมแบบคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ ถึง 100 เท่า เจลที่ถูกย้อมด้วยสี คูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ แล้วสามารถถูกย้อมสีซิลเวอร์ใหม่ตามวิธีของเมอร์ริล และคนอื่น ๆ (Mirril and others. 1981 : 1437 - 1438) ดังนี้

5.7.1 นำเจลแช่ในสารละลายกรดอะซิติก 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.7.2 เปลี่ยนเจลมาแช่ในสารละลายกรดอะซิติก 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที

5.7.3 แช่เจลในโปแตสเซียม ไดโครเมต 0.0034 โมลาร์ ซึ่งละลายในกรดไนตริก 0.0032 นอร์มอล เป็นเวลา 5 นาที

5.7.4 ล้างเจล 4 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนเจือปน

5.7.5 นำเจลแช่ในสารละลายซิลเวอร์ ไนเตรต 0.012 โมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที

5.7.6 ล้างเจลอย่างรวดเร็ว ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนแปลกปลอม

5.7.7 นำเจลแช่ในสารละลาย อิมเมก ดีเวลลอปเปอร์ เขย่าจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนบนเจลปรากฏชัดเจน

5.7.8 เมื่อเห็นแถบโปรตีนบนเจลชัดเจน รีบหยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดอะซิติก 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที

5.7.9 จากนั้นล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วเก็บไว้ในน้ำกลั่น

5.7.10 วัดความยาวของรันนิ่งเจลทั้งหมด เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่ารีเลทีฟ โมบิลิตี ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 5.6.1 อีกครั้งต่อไป

5.8 การถ่ายรูปเจล และทำให้เจลแห้ง

นำเจลที่ได้มาถ่ายรูป จากนั้นนำเจลเข้าเครื่องทำให้เจลแห้งเป็นเวลาประมาณ 45 นาที เพื่อเก็บเจลไว้ศึกษาต่อไป

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

1. อัตราการติดเชื้อของพยาธิในสัตว์ทดลอง

1.1 พยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis พบพยาธิตัวเต็มวัยจากปอดและช่องปอด จำนวน 151 ตัว จากหนูที่ทำให้ติดเชื้อ 17 ตัว คิดเฉลี่ยอัตราการติดเชื้อของหนู 11.10 เปอร์เซ็นต์

1.2 พยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus พบพยาธิตัวเต็มวัยจากปอดและช่องปอด จำนวน 155 ตัว จากแมวที่ทำให้ติดเชื้อ 3 ตัว คิดเฉลี่ยอัตราการติดเชื้อของแมว 43.05 เปอร์เซ็นต์

2. ปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย

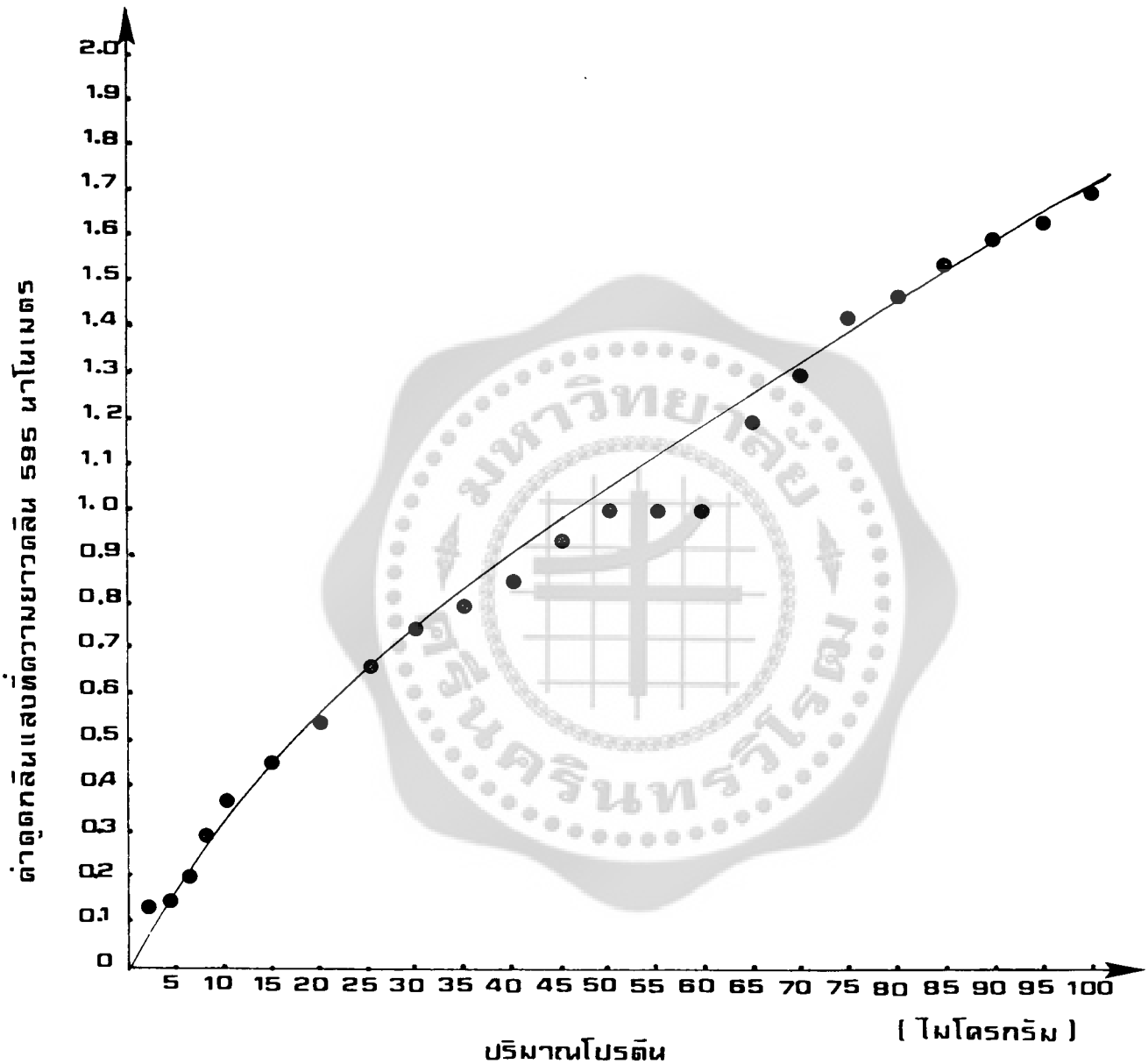
2.1 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ดังแสดงให้เห็นในตาราง 4 และสามารถเขียนกราฟของโปรตีนมาตรฐานดังภาพประกอบ 1

2.2 ปริมาณโปรตีนของ P. siamensis มีความเข้มข้น 3.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัด (ปริมาณสารสกัดรวม 2 มิลลิลิตร) ดังแสดงในตาราง 5 คิดเฉลี่ยปริมาณโปรตีนต่อพยาธิตัวเต็มวัยหนึ่งตัวเท่ากับ 48.48 ไมโครกรัม

2.3 ปริมาณโปรตีนของ P. heterotremus มีความเข้มข้น 4.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัด (ปริมาณสารสกัดรวม 5.1 มิลลิลิตร) ดังแสดงในตาราง 6 คิดเฉลี่ยปริมาณโปรตีนต่อพยาธิตัวเต็มวัยหนึ่งตัวเท่ากับ 158.92 ไมโครกรัม

ตาราง 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน

หลอดที่	ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด ที่ต้องการ (ไมโครกรัม : µg)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	หลอดที่	ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด ที่ต้องการ (ไมโครกรัม : µg)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
1.	ปริมาณโปรตีน 2µg	0.136	13.	ปริมาณโปรตีน 50µg	1.068
2.	ปริมาณโปรตีน 4µg	0.156	14.	ปริมาณโปรตีน 55µg	1.096
3.	ปริมาณโปรตีน 6µg	0.203	15.	ปริมาณโปรตีน 60µg	1.030
4.	ปริมาณโปรตีน 8µg	0.294	16.	ปริมาณโปรตีน 65µg	1.196
5.	ปริมาณโปรตีน 10µg	0.369	17.	ปริมาณโปรตีน 70µg	1.304
6.	ปริมาณโปรตีน 15µg	0.441	18.	ปริมาณโปรตีน 75µg	1.433
7.	ปริมาณโปรตีน 20µg	0.537	19.	ปริมาณโปรตีน 80µg	1.477
8.	ปริมาณโปรตีน 25µg	0.658	20.	ปริมาณโปรตีน 85µg	1.555
9.	ปริมาณโปรตีน 30µg	0.744	21.	ปริมาณโปรตีน 90µg	1.602
10.	ปริมาณโปรตีน 35µg	0.797	22.	ปริมาณโปรตีน 95µg	1.637
11.	ปริมาณโปรตีน 40µg	0.856	23.	ปริมาณโปรตีน 100µg	1.708
12.	ปริมาณโปรตีน 45µg	0.935			



ภาพประกอบ 1 แสดงกราฟของปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

ตาราง 5 แสดงข้อมูลคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis

อัตราส่วนความเข้มข้น	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัด P. siamensis		เฉลี่ยความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัด (mg/ml)
		หลังเจือจาง (mg/ml)	ก่อนเจือจาง (mg/ml)	
1 : 50	0.814	0.067	3.350	
1 : 100	0.479	0.035	3.500	3,663
1 : 200	0.282	0.019	3.800	
1 : 400	0.157	0.010	4.000	

ตาราง 6 แสดงข้อมูลคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus

อัตราส่วนความเข้มข้น	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัด P. siamensis		เฉลี่ยความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัด (mg/ml)
		หลังเจือจาง (mg/ml)	ก่อนเจือจาง (mg/ml)	
1 : 50	1.046	0.096	4.800	
1 : 100	0.614	0.048	4.800	4,833
1 : 200	0.359	0.025	5.000	
1 : 400	0.190	0.012	4.800	

3. องค์ประกอบโปรตีนจากสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย

จากการนำค่ารีเลทีฟ โบบิลิตี และค่าล็อกกาลิทึม ของน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐานมาเขียนกราฟมาตรฐาน ดังภาพประกอบ 2

3.1 ผลการทดลองจากการย้อมสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์

3.1.1 องค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis ประกอบด้วย แถบโปรตีนประมาณ 18 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 14 ถึง 100 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่น้ำหนักโมเลกุล 14, 15.5, 24 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สำหรับแถบโปรตีนอื่นที่บาง ๆ คือ 16.5, 17.5, 19, 20.5, 22, 30.5, 34.5, 38.5, 41, 45, 51.5, 61, 71.5 และ 110 กิโลกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 3

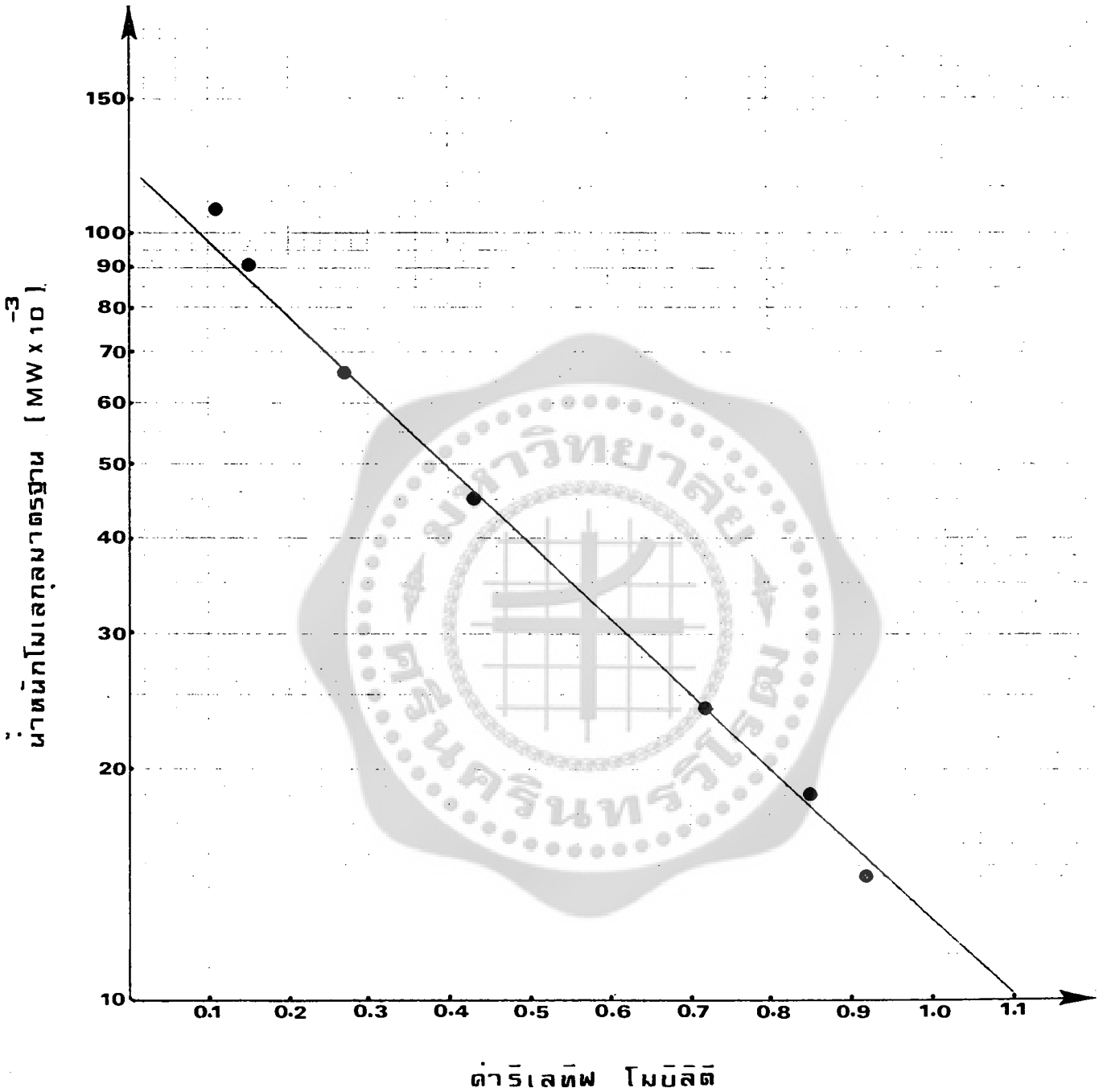
3.1.2 องค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus ประกอบด้วย แถบโปรตีนประมาณ 22 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 14 ถึง 65 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่น้ำหนักโมเลกุล 14, 15.5, 17.5, 23, 24 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สำหรับแถบโปรตีนอื่นที่บาง ๆ คือ 16.5, 19, 20.5, 22, 28.5, 30.5, 34.5, 38.5, 40, 41, 42, 47, 51.5, 53, 61 และ 65 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 3

3.2 ผลการทดลองจากการย้อมสีซิลเวอร์

3.2.1 องค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis ประกอบด้วย แถบโปรตีนประมาณ 25 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 12 ถึงแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 116 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่น้ำหนักโมเลกุล 12, 13, 14, 15.5, 17.5, 19, 23, 24, 25 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สำหรับแถบโปรตีนอื่นที่บาง ๆ คือ 16.5, 20.5, 22, 30.5, 34.5, 38.5, 41, 45, 51.5, 61, 71.5, 74, 85, 110 และมากกว่า 116 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 4

3.2.2 องค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus ประกอบด้วยแถบโปรตีนประมาณ 28 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 12 ถึง 83 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่น้ำหนักโมเลกุล 12, 13, 14, 15.5, 17.5, 19, 23, 24 และ 29 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สำหรับแถบโปรตีนอื่นที่บาง ๆ คือ 16.5, 20.5, 22, 28.5, 30.5, 34.5, 38.5, 40, 41, 42, 46, 47, 51.5, 53, 61, 65, 73, 75 และ 83 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 4

3.3 ผลการทดลองจากการย้อมสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ และสีซิลเวอร์ พบว่าการย้อมด้วยสีซิลเวอร์จะสามารถย้อมติดแถบโปรตีนได้มากและกว้างกว่าการย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ ดังแสดงในตาราง 8



ภาพประกอบ 2 แสดงกราฟของน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน

ตาราง 7 องค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus

ลำดับที่ของแถบโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	ความเข้มของแถบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis		ความเข้มของแถบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus	
		สีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์	สีซิลเวอร์	สีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์	สีซิลเวอร์
1	12	-	4+	-	4+
2	13	-	4+	-	4+
3	14	4+	4+	4+	4+
4	15.5	3+	4+	3+	4+
5	16.5	2+	2+	2+	2+
6	17.5	2+	3+	3+	3+
7	19	1+	3+	2+	3+
8	20.5	1+	2+	2+	2+
9	22	1+	2+	+	2+
10	23	-	4+	4+	4+
11	24	4+	4+	3+	3+
12	25	-	4+	-	-
13	27	4+	4+	3+	4+
14	28.5	-	-	2+	2+

ตาราง 7 (ต่อ)

ลำดับที่ของแถบโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	ความเข้มของแถบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis		ความเข้มของแถบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus	
		สีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์	สีซิลเวอร์	สีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์	สีซิลเวอร์
15	30.5	+	1+	2+	2+
16	34.5	1+	2+	2+	2+
17	38.5	+	2+	+	+
18	40	–	–	+	+
19	41	+	1+	+	1+
20	42	–	–	1+	1+
21	45	+	1+	–	–
22	46	–	–	–	+
23	47	–	–	+	1+
24	51.5	+	+	+	+
25	53	–	–	+	1+
26	61	+	+	1+	1+
27	65	–	–	1+	1+
28	71.5	+	+	–	–
29	73	–	–	–	+

ตาราง 7 (ต่อ)

ลำดับที่ของแถบโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	ความเข้มของแถบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis		ความเข้มของแถบโปรตีนของสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus	
		สีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์	สีซิลเวอร์	สีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์	สีซิลเวอร์
30	74	-	+	-	-
31	75	-	-	-	+
32	83	-	-	-	+
33	85	-	+	-	-
34	110	1+	+	-	-
35	>116	-	2+	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง แถบโปรตีนที่มีความเข้มบางที่สุด

1+ หมายถึง แถบโปรตีนที่มีความเข้มบาง

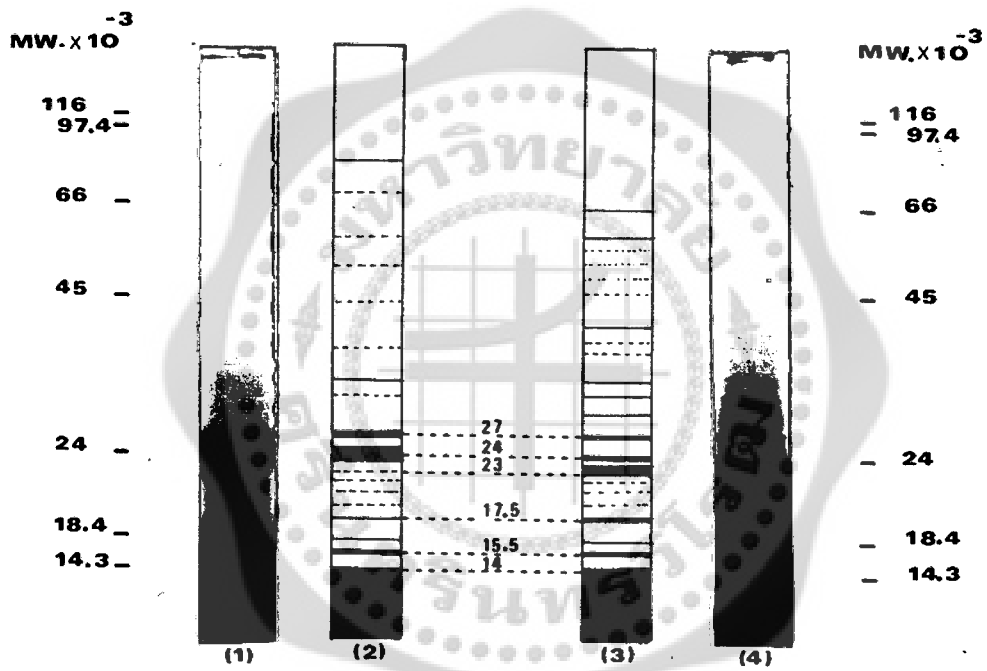
2+ หมายถึง แถบโปรตีนที่มีความเข้มปานกลาง

3+ หมายถึง แถบโปรตีนที่มีความเข้มมาก (ถือว่าเป็นแถบโปรตีนหลัก)

4+ หมายถึง แถบโปรตีนที่มีความเข้มมากที่สุด (ถือว่าเป็นแถบโปรตีนหลัก)

ตาราง 8 เปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย 2 ชนิด ที่ย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ กับสีซิลเวอร์

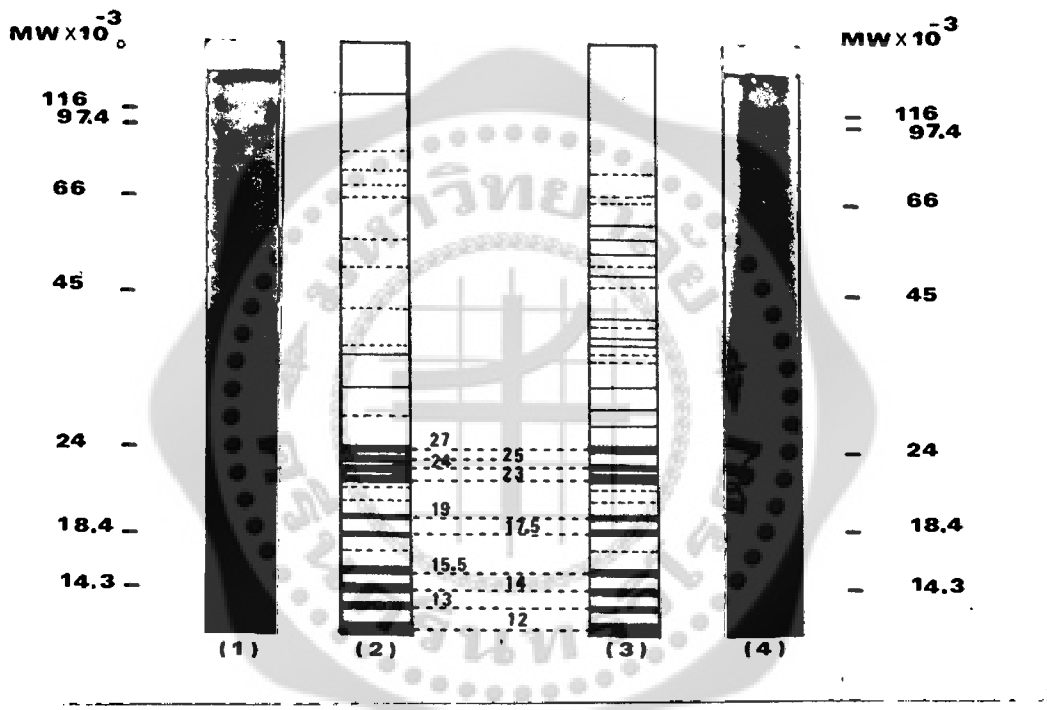
สารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย	ย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์		ย้อมด้วยสีซิลเวอร์	
	จำนวนแถบโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	จำนวนแถบโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)
P. siamensis	18	14 - 110	25	12 - >116
P. heterotremus	22	14 - 65	28	12 - 83



ภาพประกอบ 3 เปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์

(1) (2) รูปและแผนภาพ P. siamensis ตามลำดับ

(3) (4) แผนภาพและรูป P. heterotremus ตามลำดับ



ภาพประกอบ 4 เปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยสีซิลเวอร์

(1) (2) รูปและแผนภาพ P. siamensis ตามลำดับ

(3) (4) แผนภาพและรูป P. heterotremus ตามลำดับ

บทที่ 5

บทย่อ สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus และ P. siamensis

วิธีการศึกษาค้นคว้า

1. เก็บรวบรวมเมตาเซอคาเรียจากปูที่ทำการศึกษา
2. ทำให้สัตว์ทดลองติดเชื้อกับพยาธิใบไม้ปอดระยะเมตาเซอคาเรีย
3. เมื่อครบกำหนดที่พยาธิเจริญเป็นตัวเต็มวัยในปอด ประมาณ 90 วัน หรือเมื่อตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระสัตว์ทดลอง ทำการเก็บรวบรวมพยาธิตัวเต็มวัยจากปอดสัตว์ทดลอง
4. นำพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัยมาทำเป็นสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย
5. หาปริมาณโปรตีนจากสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัยโดยวิธีบราดฟอร์ด
6. ทำการศึกษาองค์ประกอบโปรตีนจากสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย

6.1 นำสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัยมาศึกษาองค์ประกอบโปรตีนโดยวิธีโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส

6.2 นำเจลที่ได้จากการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสมาย้อมสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ จากนั้นศึกษาองค์ประกอบโปรตีนจากแถบโปรตีนบนเจล

6.3 นำเจลมาล้างสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ ออกแล้วย้อมสีซิลเวอร์ จากนั้นศึกษาองค์ประกอบโปรตีน จากแถบโปรตีนบนเจล

6.4 ทำเจลให้แห้งเพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

สรุปผล

จากการศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus โดยวิธีโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส และย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ และสีซิลเวอร์ พบว่า

1. องค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. siamensis ประกอบด้วยแถบโปรตีน ประมาณ 25 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 12 กิโลดาลตัน จนถึงแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 116 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่ 12, 13, 14, 15.5, 17.5, 19, 23, 24, 25 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

2. องค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. heterotremus ประกอบด้วยแถบโปรตีน ประมาณ 28 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 12 กิโลดาลตัน จนถึง 83 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่ 12, 13, 14, 15.5, 17.5, 19, 23, 24 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

3. องค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus มีความคล้ายคลึงกันมากในบริเวณแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ คือตั้งแต่ 12 กิโลดาลตัน ถึง 38.5 กิโลดาลตัน โดยช่วงนี้พบความแตกต่างอยู่ที่แถบโปรตีนหลักที่ 25 กิโลดาลตัน ซึ่งพบมีแต่ในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis เท่านั้น และยังพบความแตกต่างที่แถบโปรตีนอื่นที่ 28.5 กิโลดาลตัน ที่พบเฉพาะในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus เท่านั้น ความแตกต่างขององค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดทั้งสองชนิดนี้ มีความแตกต่างกัน

อย่างชัดเจนในบริเวณแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 38.5 กิโลดาลตันขึ้นไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่าในสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis จะมีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 110 กิโลดาลตัน และมากกว่า 116 กิโลดาลตัน ซึ่งใน P. heterotremus ไม่พบ

อภิปรายผล

จากการศึกษาองค์ประกอบโปรตีน โดยการย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ และสีซิลเวอร์ พบว่าการย้อมด้วยสีซิลเวอร์จะสามารถย้อมติดแถบโปรตีนได้มากและกว้างกว่าการย้อมด้วยสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการศึกษาของเมอร์ริล และคนอื่น ๆ (Merril and others. 1981 : 1437 - 1438) ที่พบว่าการย้อมด้วยสีซิลเวอร์มีความไวในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนมากกว่าสีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์ ถึง 100 เท่า โดยสีซิลเวอร์สามารถย้อมติดปริมาณโปรตีนบนเจล จำนวนเพียง 0.01 นาโนกรัมต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรเท่านั้น

ในด้านการศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. heterotremus สอดคล้องกับการศึกษาของอินดราวติ (Indrawati. 1988 : 35 - 80) ที่พบว่าองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus ประกอบด้วยแถบโปรตีนประมาณ 28 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ 13 ถึง 110 กิโลดาลตัน โดยมีแถบโปรตีนหลักที่น้ำหนักโมเลกุล 15, 17, 27, 28, 44 และ 51 กิโลดาลตัน สำหรับแถบโปรตีนอื่นได้แก่ 14, 18, 19, 20.5, 23, 25.5, 29, 30.5, 31, 34, 37, 38.5, 41, 46, 56, 68, 78, 81.5 และ 89 กิโลดาลตัน ตามลำดับ นอกจากนั้นผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของซูกิยามา และพันธุ์สิน เกตุทัต (Sugiyama and Pansin Ketadat. 1989 : 111 - 113) ซึ่งพบว่าองค์ประกอบโปรตีนแอนติเจนของ P. heterotremus มีแถบโปรตีนหลัก 3 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15.5, 17 และ 27 กิโลดาลตัน และมีแถบโปรตีนบาง ๆ ที่น้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน

สำหรับองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. siamensis มีความคล้ายกับพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. heterotremus มากในบริเวณแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 38.5 กิโลดาลตัน ตลอดจนมีองค์ประกอบโปรตีน คล้ายกับพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. westermani ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งประกอบด้วยแถบโปรตีนประมาณ 36 แถบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลจาก 10.1 กิโลดาลตัน ถึง 103 กิโลดาลตัน และมีแถบโปรตีนหลักที่ 15.5, 17 และ 27 กิโลดาลตันเหมือนกัน (Sugiyama and others. 1987 : 365; Sugiyama and Punsin Ketudat. 1989 : 111 - 113) ฉะนั้นผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. siamensis และ P. heterotremus มีแถบโปรตีนหลักเหมือนกับพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย P. westermani ที่น้ำหนักโมเลกุล 15.5, 17 และ 27 กิโลดาลตัน ซึ่งก็เป็นไปได้ว่าพยาธิใบไม้ปอด P. siamensis สามารถติดเชื้อในคนได้เช่นเดียวกับพยาธิใบไม้ปอด P. heterotremus และ P. westermani แต่เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของพยาธิใบไม้ปอด P. siamensis ต่ำกว่า P. heterotremus ซึ่งอาจเนื่องมาจาก ความทนทานของชิสต์ระยะเมตาเซอคาเรีย P. heterotremus มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า P. siamensis

ข้อเสนอแนะ

1. การหาปริมาณโปรตีน จากสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย โดยวิธีบราดฟอร์ด มีข้อควรระวังดังนี้

1.1 บราดฟอร์ด รีเอเจนต์ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ ถ้าต้องการเก็บไว้ใช้ควรเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อนำมาใช้ใหม่ควรกรองอย่างน้อย 1 ครั้ง

1.2 คิวเว็ตที่ใช้ใส่สารละลายวัดการดูดกลืนแสงนั้นควรใช้คิวเว็ตแก้ว ไม่ควรใช้คิวเว็นควอทซ์ เพราะสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนที่เกิดจากปฏิกิริยาจะยึดจับควอทซ์ทำให้ค่าดูดกลืนแสงผิดพลาด

2. การหาองค์ประกอบโปรตีนจากสารสกัดพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย โดยวิธีเอส ดี เอส โพลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส เนื่องจากพบว่าสารสกัดพยาธิ P. siamensis มีแถบโปรตีนหลักที่น้ำหนักโมเลกุลสูงมาก คือ ประมาณ 110 และมากกว่า 116 กิโลดาลตัน จึงควรกำหนดน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนให้ชัดเจนโดยลดเปอร์เซ็นต์ของรันนิ่ง เจล ลงเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ และใช้โปรตีนมาตรฐานดังนี้ มายโอซิน (myosin) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 205 กิโลดาลตัน เบต้า-กาเลคโตสิเดส ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 116 กิโลดาลตัน ฟอสโฟรีเลส บี มีน้ำหนักโมเลกุล 97.4 กิโลดาลตัน โบไวน์ อัลบูมิน มีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน อัลบูมินของไข่ น้ำหนักโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน และคาร์บอนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) มีน้ำหนักโมเลกุล 29 กิโลดาลตัน

3. ควรใช้วิธีการอิมมูโนบล็อททิง ศึกษา แอนติเจน จากพยาธิใบไม้ปอดทั้งสองชนิด เพื่อหาแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงของพยาธิแต่ละชนิด ซึ่งจะได้นำผลมาใช้ประโยชน์ด้านวิยาภูมิคุ้มกันต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ธนิต ผิวนิ่ม. "อิเล็คโตรโฟรีซีส และไอโซอิเล็คตริคโฟกัสชิง," ใน เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องการแยกสารทางชีวเคมี. หน้า 65 - 89. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2528.

ประพนธ์ ศิลปรัศมี และอมรรัตน์ ชาญปรีชากุล. การหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดเมตาเซอคาเรีย Paragonimus sp. กับ P. siamensis โดยวิธีบราดฟอร์ด. เอกสารประกอบการเรียนวิชา ชว.591 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2531. อัดสำเนา.

ไพบูลย์ นัยเนตร. "ปูน้ำจืดที่เป็นพาหะของพยาธิใบไม้ปอด และการกระจายในประเทศไทย," วารสารสมาคมปราสิตแห่งประเทศไทย. 2(1) : 23 - 37; 24 กันยายน 2521.

_____. "ปูน้ำจืดในประเทศไทย," ใน อนุสรณ์งานพระราชทานเพลิงศพรองศาสตราจารย์นายแพทย์ประพันธ์ จิตต์จำนงค์. หน้า 178 - 200. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ศิลป์การพิมพ์, 2531.

สกุลรัฐ สุพิมพ์. การศึกษาชนิดของพยาธิใบไม้ปอด ในเขตตำบลหินตั้ง อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2532. อัดสำเนา.

อัจฉรา องค์ศิริวิทยา. การศึกษาเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ปอดในปูน้ำตกในเขตจังหวัดสระบุรี และจันทบุรี. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.

ฮาวาริยะห์ อะหมัด. การศึกษาการเคลื่อนย้ายของตัวอ่อน และสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด (Paragonimus siamensis) ในหนูพุกใหญ่ (Bandicota indica). ปริญญานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2519. อัดสำเนา.

Bradford, Marion M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," Analytical Biochemistry. 72 : 248 - 254; January, 1976.

Cho, Seung Yull and others. "Application of Micro-ELISA in Serodiagnosis of Human Paragonimiasis," The Korean Journal of Parasitology. 19(2) : 151 - 156; 1981.

Cooper, T. "Determination of Protein Concentration," in The Tools of Biochemistry. p. GPC-3-4. New York : John Wiley and Sons, 1977.

Indrawati, Isna. Humoral Immune Response to Paragonimus heterotremus (Chen Hsia, 1964) in Human. Master's Thesis Bangkok : Mahidol University, 1988. mimeograped.

Liu, J.B. "Comparative Disc Electrophoretic Study of Paragonimus skrjabini and Paragonimus westermani," Chung Hua Hseuch Isa Chih. 65(1) : 44 - 46; January, 1985.

Merril, C.R. and others. "Trace Polypeptides in Cellular Extracts and Human Body Fluids Detected by Two-dimensional Electrophoresis and a Highly Sensitive Silver Stain," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76(9) : 4335 - 4339; September, 1979.

_____. "Ultrasensitive Stain for Protiens in Polyacrylamide Gel Shows Regional Variation in Crebrospinal Fluid Proteins," Science. 211 : 1437 - 1438; 1981.

Miyazaki, Ichiro and Fontan Raimond. "Mature Paragonimus heterotremus found from a Man in Laos," Japanese Journals of Parasitology. 19(1) : 109 - 113; March, 1970.

Miyazaki, Ichiro and Suvajra Vajrasthira. "On a New Lung Fluke, Paragonimus bangkokensis spp. nov. in Thailand (Trematoda : Troglotrematidae)," Japanese Journal of Medical Sciences and Biology. 20(3) : 243 - 249; June, 1967 a.

_____. "Occurrence of the Lung Fluke. Paragonimus macrorchis Chen, 1962 in Thailand," Journal of Parasitology. 53(4) : 894 - 895; August, 1967 b.

_____. "On a New Lung Fluke Found in Thailand, Paragonimus harinasutai sp. nov. (Trematoda, Troglotrematidae," Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 60(1) : 81 - 87; March, 1968.

Miyazaki, Ichior and Tranakchit Harinasuta. "The First Case of Human Paragonimiasis Caused by Paragonimus heterotremus Chen et Hsia, 1964," Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 60(4) : 509 - 514; December, 1966.

Miyazaki, Ichiro and Wykoff E. Dale. "On a New Lung Fluke, Paragonimus siamensis n. sp. Found in Thailand, (Trematoda : Troglotrematidae)," Japanese Journal of Parasitology. 14(3) : 251 - 257; April, 1965.

Quicho, Lucivic P. and others. "Humoral Immune Respone of Cats to Paragonimus Infection," Southeast Asian Journal of Tropical and Public Health. 12(3) : 364 - 370; September, 1981.

Ruchareka Wittayawudthikul. Studies on Paragonimus heterotremus Chen and Hsia 1964. Master's thesis. Bangkok : Mahidol University, 1985. mimeographed.

Segrest, Jere P. and Richard L. Jackson. "Molecular Weight Determination of Glycoproteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate," in Methods in Enzymology. v.28 p.54 - 63; New York : National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, 1972.

Siriporn Tuntipopipat. Identification and Characterization of Gnathostoma Antigens with Potential for Immunodiagnosis of Gnathostomiasis. Master of Science. Bangkok : Mahidol University, 1989. mimeographed.

Sirivan Vanijanonta and others. "Pulmonary Paragonimiasis with Expectoration of Worm : A Case Report," Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 12(1) : 104 - 106; March, 1981.

Sugiyama, Hiromu and others. "Characterization and Localization of Paragonimus westermani Antigen Stimulating Antibody Formation in Both the Infected Cat and Rat," The Journal of Parasitology. 73(2) : 363 - 367; April, 1987.

Sigiyama, Hiromu and Punsin Ketudat. "Characterization of Antigen in Paragonimus heterotremus Common to Those in P. westermani," in Paragonimus in Asia Biology, Genetic Variation and Speciation. p. 110 - 113. Fukuoka : Shunpposha Photographic Printing, Co., Ltd., 1989.

Sugiyama, Hiromu, Teiji Horiuchi and Tomotsu Tomimura. "Antigen Characteristics of Larval Paragonimus westermani," Japannese Journal of Veterinary Science. 50(1) : 167 - 174; October, 1988.

Surasakdi Wongratanacheewin. Characterization of Humoral Immune Response in the Serum and Bile of Patients with Opisthorchiasis and Its Application in Immunodiagnosis. Doctor's Thesis. Bangkok : Mahidol University, 1987. mimeographed.

Suvajra Vajrasthira. "Paragonimiasis," in the 25th Anniversary of the Faculty of Tropical Medicine. p.98 - 104. Bangkok : Krung Siam Press, 1986.

Svasti Daengsvang, Tongchai Papasarathorn and Banchong Tongkoom. "Paragonimus westermani (Kerbert, 1978) in Thai Leopards," Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 58(3) : 304 - 306; September, 1963.

Svasti Jisnuson and Panijpan Bhinyo. "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. A Simple Explanation of Why It works," Journal of Chemical Education. 54(9) : 560 - 562; September, 1977.

Weber, Klaus and Mary Osborn. "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis," The Journal of Biological Chemistry. 244(16) : 4406 - 4412; August, 1969.

Yoshimura, Kentaro. "Paragonimus westermani, P. ohirai, and P. miyazakii : Electrophoretic Comparison of Whole Body Proteins," Experimental Parasitology. 25 : 118 - 130; 1969 a.

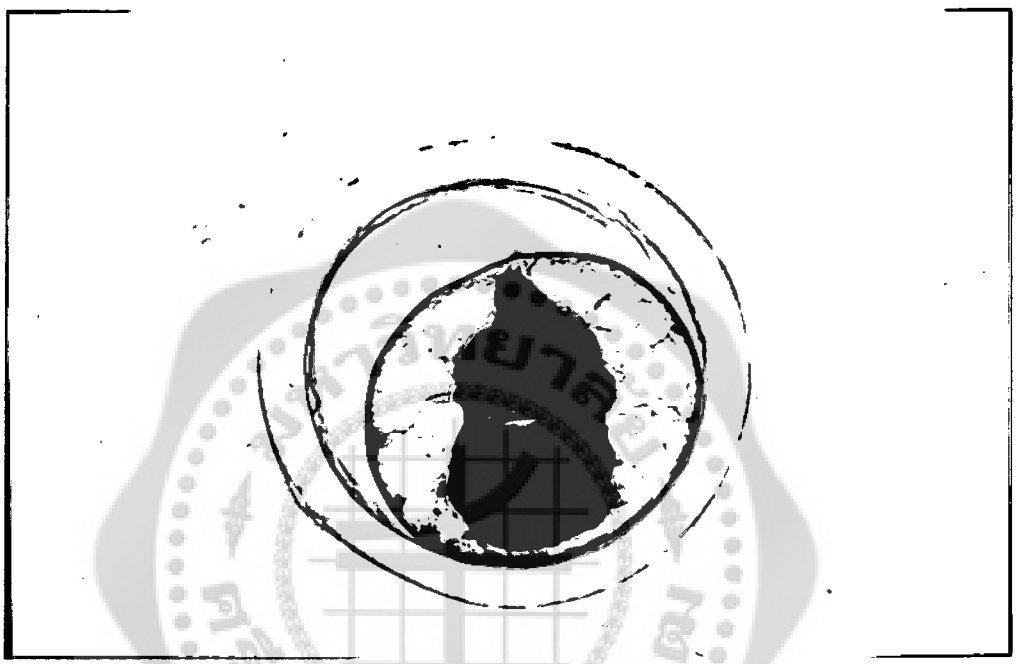
_____. "Paragonimus : Electrophoretic Fractionation of Whole Body Proteins as an Aid in Specific Identification of a Species from Sado Island, Japan," Experimental Parasitology. 25 : 107 - 117; 1969 b.

Yoshimura, Kentaro., Yoshimara Hishinuma and Mitsuko Sato. "Disc Electrophoresis Patterns of Adult Paragonimus iloktsuenesis Chen, 1940, with Special Reference to P. ohirai Miyazaki, 1939," Japanese Journal of Parasitology. 18(3) : 249 - 257; February/December, 1969.

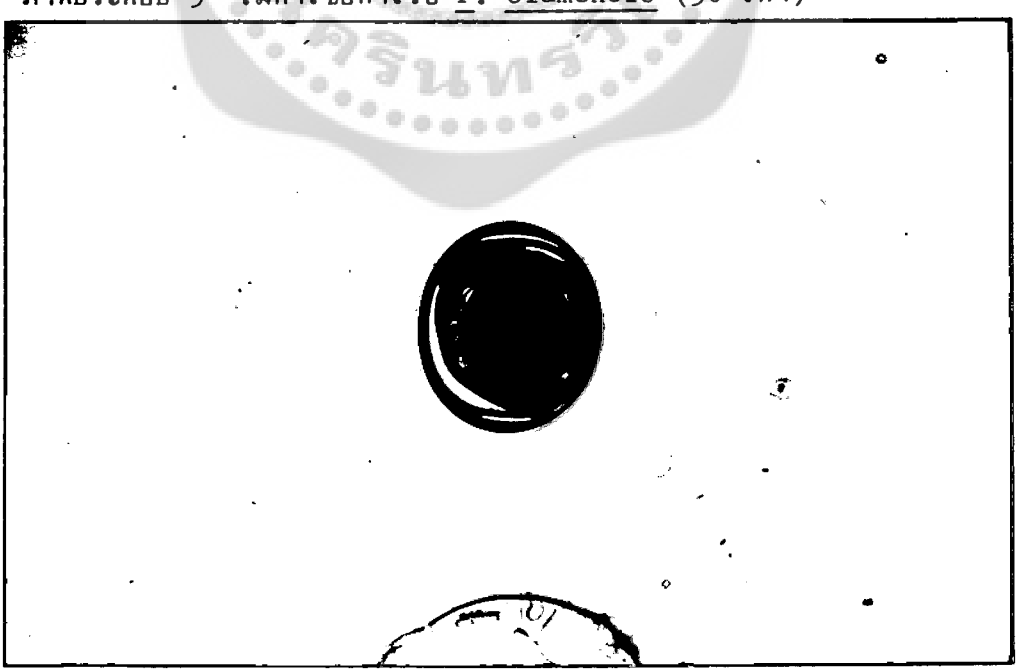
Yuvadee Vanvanitchi. Studies on Paragonimus Species in Man and Animals in Tambon Cha-Om. Amphoe Kaeng Khoi, Saraburi Province. Master's Thesis. Bangkok : Mahidol University, 1985. mimeographed.

ภาคผนวก

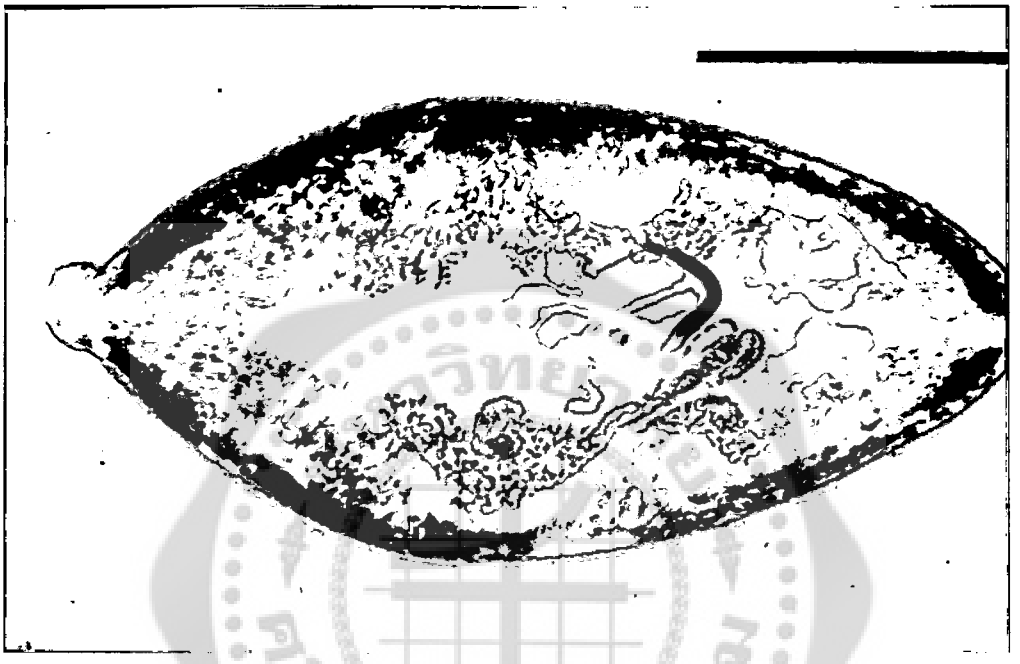
ภาคผนวก ก.



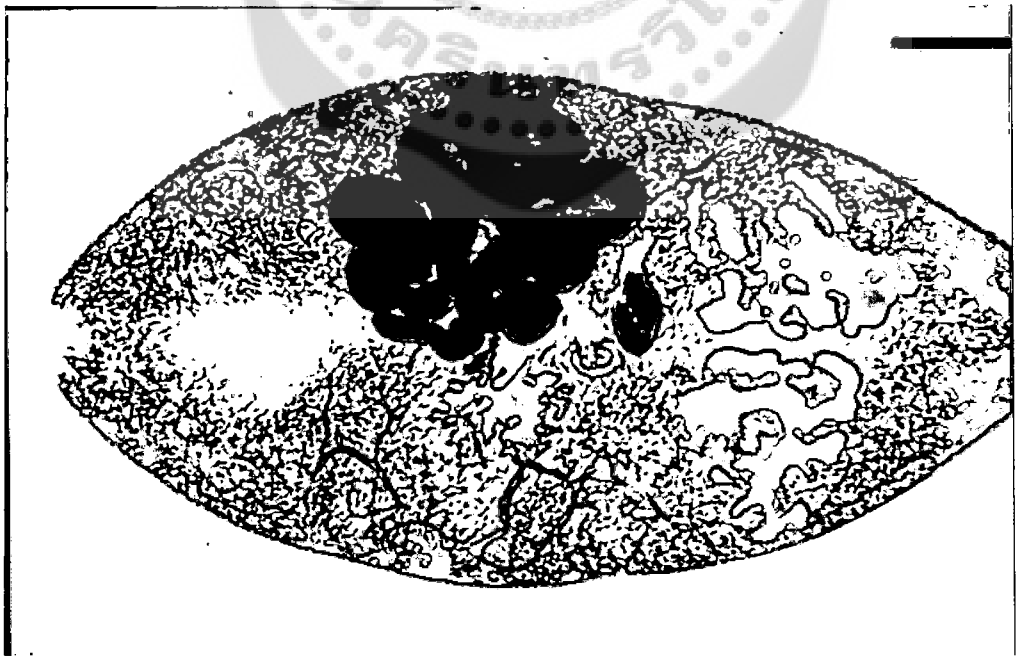
ภาพประกอบ 5 เมตาเซอคาเรีย P. siamensis (50 เท่า)



ภาพประกอบ 6 เมตาเซอคาเรีย P. heterotremus (50 เท่า)



ภาพประกอบ 7 พยาธิตัวเต็มวัย P. siamensis (สเกล 2 มิลลิเมตร)



ภาพประกอบ 8 พยาธิตัวเต็มวัย P. heterotremus (สเกล 2 มิลลิเมตร)

ภาคผนวก ข.

1. สารละลายไทโรด

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.00	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.2	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	0.1	กรัม
เด็ส์โตส (Dextrose)	1	กรัม
น้ำกลั่นเติมจนครบปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

2. ฟีนิลเมทิลซัฟโฟนิลฟลูโอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์

ฟีนิลเมทิลซัฟโฟนิลฟลูโอไรด์	0.0035	กรัม
ไดเมทิลซัฟโฟโซด์ (dimethylsulfoxid : DMSO)	1	มิลลิลิตร

3. เอล-1-ทูซิลาไมด์-2-ฟีนิลเอทิล โครโรเมทิล คีโตน 10 มิลลิโมลาร์

เอล-1-ทูซิลาไมด์-2-ฟีนิลเอทิล โครโรเมทิล คีโตน	0.0017	กรัม
ไดเมทิลซัลโฟไซด์	1	มิลลิลิตร

4. บราดฟอร์ด รีเอเจนต์

คูมาสสี บริลเลียนท์ บลู จี-250	100	มิลลิกรัม
ละลายในเอทานอล หรือเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	50	มิลลิลิตร
เติมกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ (w/v)	100	มิลลิลิตร

ทำให้เจือจางลงโดยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสารละลายสุดท้าย เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

6. แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมแล้วใช้ภายใน 1 สัปดาห์)

แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

7. ทีเม็ด 10 เปอร์เซ็นต์

ทีเม็ด	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	18	มิลลิลิตร

8. สารละลายโพลีอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

อะคริลาไมด์ (acrylamide)	30	กรัม
บริส อะคริลาไมด์ (N,N-bis-methylene acrylamide)	0.8	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	100	มิลลิลิตร

9. เจล บัฟเฟอร์ pH 6.8 (0.5 โมลาร์)

ทริสมา เบส (trizma base)	3.0275	กรัม
ใช้กรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล ปรับค่า pH จนได้ 6.8		
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	50	มิลลิลิตร

10. เจล บัฟเฟอร์ pH 8.9 (3 โมลาร์)

กรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล	12	มิลลิลิตร
ทริสมา เบส	9.075	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	25	มิลลิลิตร

11. เอส ดี เอส โพลีอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์

สารละลายโพลีอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซ็นต์	3.33	มิลลิลิตร
เจล บัฟเฟอร์ pH 8.9	1.25	มิลลิลิตร
โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	0.100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5.265	มิลลิลิตร

ทีเม็ด	0.005	มิลลิลิตร
แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	0.05	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	10	มิลลิลิตร

12. เอส ดี เอส โพลีอะคริลาไมด์ 4 เปอร์เซ็นต์

สารละลายโพลีอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซ็นต์	0.665	มิลลิลิตร
เจล บัฟเฟอร์ pH 6.8	1.25	มิลลิลิตร
โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	0.050	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.010	มิลลิลิตร
ทีเม็ด	0.005	มิลลิลิตร
แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	0.025	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	5	มิลลิลิตร

13. อิเล็คโตรโฟรีซีส บัฟเฟอร์ pH 8.3

ทริสมา เบส	1.5	กรัม
ไกลซีน (glycine)	7.2	กรัม
โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต	0.5	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย	500	มิลลิลิตร

14. แซมเปิล บัฟเฟอร์ 5 เอ็กซ์

ทริสมา เบส	0.3784	กรัม
โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต	0.50	กรัม
กลีเซอรอล (glycerol)	5	มิลลิลิตร
2-เมอร์แคพโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)	2.5	มิลลิลิตร
บรอมฟินอล บลู (bromphenol blue)	0.005	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้าย	10	มิลลิลิตร

15. สีคูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์

คูมาสสี บริลเลียนท์ บลู อาร์	1	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก (glacial acetic acid)	35	มิลลิลิตร
เมทานอล (methanol)	232.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	232.5	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	500	มิลลิลิตร

16. สารละลายสีส่วนที่เกิน

เมทานอล	50	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	70	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

17. กรดอะซิติก 12 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์

เมทานอล บริสุทธิ์	500.00	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	120.00	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

18. กรดอะซิติก 5 เปอร์เซ็นต์ ในเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์

เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	105.26	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	50.00	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

19. โปแตสเซียม ไดโครเมต 0.0034 โมลาร์ ในกรดไนตริก 0.0032 นอร์มอล

โปแตสเซียม ไดโครเมต	10.00	กรัม
กรดไนตริก	63.02	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

20. สารละลาย ซิลเวอร์ไนเตรต 0.012 โมลาร์ (เตรียมแล้วใช้ทันที)

ซิลเวอร์ ไนเตรต	0.41	กรัม
เติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนแปลกปลอมจนได้ปริมาตร	200.00	กรัม

21. สารละลาย อิมเมก ดีเวลลอปเปอร์

โซเดียม คาร์บอเนต	29.70	กรัม
ฟอร์มาลิน	0.50	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

22. กรดอะซิติก 3 เปอร์เซ็นต์

กรดอะซิติก	30.00	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000.00	มิลลิลิตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นายประพนธ์ ศิลปรัศมี

เกิดวันที่ 20 เดือน กันยายน พุทธศักราช 2504

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 124/23 ถนนมนตรีสุริยวงศ์ ซอยมนตรี 3 ตำบลหน้าเมือง อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี 70000

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน อาจารย์ 1 ระดับ 4

สถานที่ทำงานปัจจุบัน โรงเรียนสามร้อยยอดวิทยาคม อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 77180

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2524 มัธยมศึกษา (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ ราชบุรี

พ.ศ. 2527 กศ.บ. เกียรตินิยมอันดับ 1 (วิชาเอกชีววิทยา วิชาโทวิทยาศาสตร์ทางทะเล) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา

พ.ศ. 2532 กศ.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร