

595.182057

ว. 16 D

3.3

การศึกษาเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และกลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนสในพลาสมาตัวจิกระยะติดต่อ

ห้องสมุดนักวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปริญญาณินท์

ของ

ผกายดาว บุญเริ่ม

11 พ.ค. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

เมษายน 2532

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178743

การศึกษาเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และกลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนสในพยาธิตัวจิกระยะติดต่อ

บทคัดย่อ

ของ

ผกายดาว บุญเริ่ม

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

เมษายน 2532

การศึกษาเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และกลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนสในพยาธิตัวจิตร
ระยะติดต่อพบว่าสามารถตรวจพบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ADH และ G6PDH ในส่วนใส
ของเซลล์พยาธิตัวจิตรระยะติดต่อกับไส้ปลาไหลน้ำจืดในกรุงเทพมหานคร โดยพบว่าเอนไซม์ ADH สามารถ
ใช้เอทานอลเป็นสับสเตรทและ NAD เป็นโคเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 40°C
และเอนไซม์ G6PDH สามารถใช้ G6P เป็นสับสเตรทและ NADP เป็นโคเอนไซม์โดยเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด
ที่ pH 9.5 อุณหภูมิ 40°C พบว่าเอนไซม์ G6PDH มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4°C มากกว่าเอนไซม์ ADH
ผลจากการศึกษาเอนไซม์ ADH และ G6PDH ด้วยวิธีโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิสพบแถบ
เอนไซม์ ADH และ G6PDH อย่างละ 1 แถบ ตรงกับโปรตีนแถบที่ 20 และ 14 ตามลำดับ

A STUDY OF ALCOHOL DEHYDROGENASE AND GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE
IN THE INFECTIVE STAGE OF Gnathostoma spp.

AN ABSTRACT
BY
PAKAIDAO BOONREAM

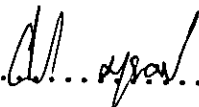
Present in partial fulfillment of the requirement
for the Master of Education degree
at Srinakarinwirot University

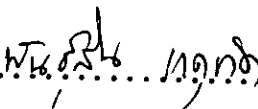
April 1989

The enzyme Alcohol Dehydrogenase (ADH) and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH) in the supernatant of the cell-free extract from the infective stage of Gnathostoma spp. were studied. The activity of ADH was detected by using ethanol as substrate and NAD as coenzyme. The optimum pH and temperature was 5.0 and 40°C respectively. The activity of G6PDH was found by using G6P as substrate and NADP as coenzyme. The optimum pH and temperature was 9.5 and 40°C respectively. G6PDH was found to be more stable than ADH at 4°C. Polyacrylamide gel electrophoretic studied showed each band of enzyme stain of ADH and G6PDH coincided with protein band number 20 and 14 respectively.

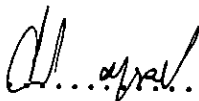
คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรี-
นครินทรวิโรฒได้

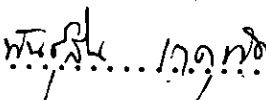
คณะกรรมการที่ปรึกษา

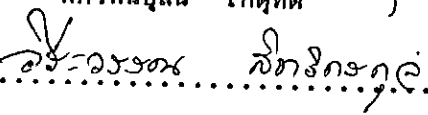
.....  ประธาน
(ดร.อารารัตน์ สุขศิริ)

.....  กรรมการ
(ผศ.พันธุ์สิน เกตุทัต)

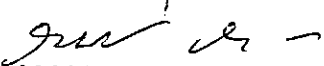
คณะกรรมการสอบ

.....  ประธาน
(ดร.อารารัตน์ สุขศิริ)

.....  กรรมการ
(ผศ.พันธุ์สิน เกตุทัต)

.....  กรรมการที่แต่งตั้ง เพิ่ม เติม
(ดร.วีรवरณ สิทธิกรกุล)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
การศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....  คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผ.ดร.สมพร บัวทอง)

วันที่ 1 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2532

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยคำแนะนำและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันธุ์สิน เกตุทัต ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณธรัตน์ มหายศนันท์ คุณนิยม ชลิตะนาวัน คุณเสาวนีย์ เสาวภาพโสภา คุณรุ่งลววรรณ ไพวรรณ ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ

ขอขอบคุณ คุณสมนึก การีเวท คุณภัทรบุรณ บุญญาวัฒน์ คุณพวง บุญญาวัฒน์ คุณสายสวาท สวัสดิ์สว่าง ที่กรุณาช่วยรวบรวมปลาไหลน้ำจืดเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่เป็นกำลังใจและให้การช่วยเหลือจนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี

ผกายดาว บุญเริ่ม

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
2 ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	6
3 ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	6
4 ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	6
นิยามศัพท์เฉพาะ	6
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย	9
3 วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	12
อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการ	12
วิธีดำเนินการและรวบรวมข้อมูล	13
การเก็บรวบรวมตัวอย่างพยาธิตัวจี๊ดระยะติดคอ	13
การสกัดโปรตีนและ เอนไซม์จากเซลล์ของตัวอย่างพยาธิตัวจี๊ดระยะติดคอ ..	13
การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง	14
การแยกโปรตีนและ เอนไซม์ในสารตัวอย่างโดยวิธีอีเล็กโตรโฟเรซิส	16
การศึกษาสมบัติของเอนไซม์	18
4 ผลการศึกษาค้นคว้า	20
การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง	21
การตรวจหาเอนไซม์ ADH และ G6PDH โดยโพลีอะคริลลาไมด์ เจล	
อีเล็กโตรโฟเรซิส.....	21
การศึกษาสมบัติของเอนไซม์	23
การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ ADH	29
การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ ADH	29
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ADH	29
การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ ADH	29

บทที่

หน้า

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ G6PDH	29
การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ G6PDH	30
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ G6PDH	30
การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ G6PDH	30
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	43
สรุปผล	43
อภิปรายผล	43
ข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม	50
ภาคผนวก	54
ประวัติย่อผู้วิจัย	64

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ชนิดของพหุาณิควัจิคที่มีรายงานไว้	3
2 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในการย้อมความสามารถในการทำงานของเอนไซม์	17
3 ข้อมูลค่านวณหาปริมาตรโปรตีนในสารตัวอย่าง	22
4 ค่าสเปซฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ ADH ณ pH ต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 25°C	31
5 ค่าสเปซฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ ADH ณ อุณหภูมิต่าง ๆ กันที่ pH 5.0	33
6 ค่าสเปซฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ ADH ณ เวลาต่าง ๆ กันเมื่อเก็บที่ 4°C	35
7 ค่าสเปซฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ G6PDH ณ pH ต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 25°C ...	37
8 ค่าสเปซฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ G6PDH ณ อุณหภูมิต่าง ๆ กันที่ pH 9.5	39
9 ค่าสเปซฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ G6PDH ณ เวลาต่าง ๆ กันเมื่อเก็บที่ 4°C ..	41

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 วงชีวิตของพยาธิตัวจิ๋ว	4
2 กราฟมาตรฐานแสดงการหาค่าปริมาณโปรตีน	21
3 กราฟแสดงการหาปริมาณ NADH และ NADPH จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ADH และ G6PDH	23
4 ภาพถ่ายและแผนภาพแสดงแถบโปรตีนของพยาธิตัวจิ๋วระยะติดต่อ	24
5 ภาพถ่ายและแผนภาพแสดงแถบเอนไซม์ ADH	25
6 ภาพถ่ายและแผนภาพแสดง เปรียบเทียบแถบเอนไซม์ ADH กับแถบโปรตีน	26
7 ภาพถ่ายและแผนภาพแสดงแถบเอนไซม์ G6PDH	27
8 ภาพถ่ายและแผนภาพแสดง เปรียบเทียบแถบเอนไซม์ G6PDH กับแถบโปรตีน ..	28
9 กราฟแสดงผลความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อสเปซิฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ ADH ที่อุณหภูมิ 25°C	32
10 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิต่อสเปซิฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ ADH ที่ pH 5.0 ..	34
11 กราฟแสดงความคงตัวของเอนไซม์ ADH เมื่อเก็บไว้ที่ 4°C ณ เวลาต่าง ๆ กัน	36
12 กราฟแสดงผลความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ G6PDH ที่อุณหภูมิ 25°C	38
13 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ G6PDH ที่ pH 9.5	40
14 กราฟแสดงความคงตัวของเอนไซม์ G6PDH เมื่อเก็บไว้ที่ 4°C ณ เวลาต่าง ๆ กัน	42
15 กระบวนการสร้างพลังงานของหนอนพยาธิ	44
16 กระบวนการสร้างพลังงานโดย pentose phosphate pathway.....	46
17 ภาพถ่ายแสดงตัวแก่พยาธิตัวจิ๋ว	55
18 ภาพถ่ายแสดงลักษณะไข่พยาธิตัวจิ๋ว	55

ภาพประกอบ

หน้า

19 ภาพถ่ายแสดงตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิตัวจิ๊ด	56
20 ภาพถ่ายแสดงตัวอ่อนระยะที่ 2 ของพยาธิตัวจิ๊ด	56
21 ภาพถ่ายแสดงตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด	57

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

พยาธิตัวจิ๊ด (Gnathostoma spp.) เป็นพยาธิตัวกลมที่มีรายงานการตรวจพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2379 โดย ริชาร์ด โอเวน (Richard Owen) นักสัตววิทยาชาวอังกฤษ พบในก้อนทุม (tumour) บริเวณกระเพาะอาหารของเสือโคร่ง (Felis tigris) ซึ่งตายด้วยสาเหตุเส้นเลือดแดงใหญ่แตก ณ สวนสัตว์กรุงลอนดอน (Swasti Daengsvang. 1983 : 1 - 10) และให้ชื่อพยาธิชนิดนี้ว่า Gnathostoma spinigerum ต่อมา มีรายงานเกี่ยวกับพยาธิตัวนี้ในสัตว์ป่าอีกหลายชนิดตลอดจนในคน รายงานพบในคนครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2432 โดยนายแพทย์ดอนท์เซอร์ (Deuntzer) ตรวจพบจากบริเวณ ด้านมของหญิงไทยและเรียกชื่อพยาธิตัวนี้ว่า Cheiracthus siamensis ภายหลังมีรายงานว่า เป็นชนิด เดียวกันกับ Gnathostoma spinigerum (Swasti Daengsvang. 1981 : 53 - 63)

การศึกษาทางชีววิทยา และอนุกรมวิธาน ได้มีการจัดหมวดหมู่ของพยาธิตัวจิ๊ดไว้ดังนี้ (York and Maplestone. 1969 : 334)

Phylum Nematelminthes

Class Nematoda

Order Euneematoda

Superorder Spiruroidea

Family Gnathostominae

Genus Gnathostoma

Genus Gnathostoma มีรายงานไว้ทั้งหมด 19 ชนิด (ตาราง 1) แต่ในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบเพียง 4 ชนิด คือ G. spinigerum, G. hispidum, G. doloresi, G. vietnamicum (Miyazaki. 1960 : 338 - 370)

ลักษณะพยาธิตัวจิ๊ดโดยทั่วไป

ตัวเต็มวัย (adult) ลำตัวจะกลมยาวเรียวจากหัวไปหาง ลำตัวใส ส่วนหัวแยกจากส่วนลำตัว โดยมีคอคอด หัวค่อนข้างกลม มีริมฝีปาก 1 คู่ มีขอเล็ก ๆ (hook or hooklets) ล้อมรอบส่วนหัว 8 แฉก ภายในมีถุง 4 ถุง (ballonets) แต่ละถุงมีช่องค้ำกับลำตัวข้างหลอดอาหาร ปลายถุงตัน ลำตัวเป็นผนังหนา (cuticle) มีรอยย่นตลอดลำตัว มีหนามปกคลุมโดยเฉพาะตอนส่วนค้นของลำตัวจะหนาแน่นกว่าส่วนอื่น ตัวผู้มีขนาดประมาณ 11 - 25 mm (มิลลิเมตร) กว้าง 1 - 1.5 mm ปลายหางจะแผ่กว้างออกเป็น ชูโดเบอร์ซ่า (pseudobursa) บริเวณด้านล่างมีพาลิลลี (papillae) 4 คู่ มีขอ (spicule) 2 อัน อาจโผล่ให้เห็นชัดที่ช่องขับถ่าย (cloaca) ตัวเมียมีขนาดยาวประมาณ 25 - 54 mm กว้าง 1 - 2 mm จะมีหางเรียวเล็กกว่าตัวผู้ มีช่องเปิดระบบสืบพันธุ์ (vulva) มีรูเปิดช่องคลอด (vagina) 1 ช่อง ต่อจากช่องคลอดเป็นมดลูก (uterus) แยกเป็น 2 ท่อ และมีไข่เค็มมดลูก (Miyazaki. 1966 : 531 - 585) (ภาคผนวก)

ลักษณะไข่ หัวท้ายจะมนเกือบเท่ากัน มีจุกเมือก (mucoid plug) อยู่ที่ปลายข้างหนึ่งเปลือกไข่บางสีน้ำตาล มีขนาดยาวประมาณ 62 - 79 ไมครอน กว้าง 36 - 42 ไมครอน (ภาคผนวก)

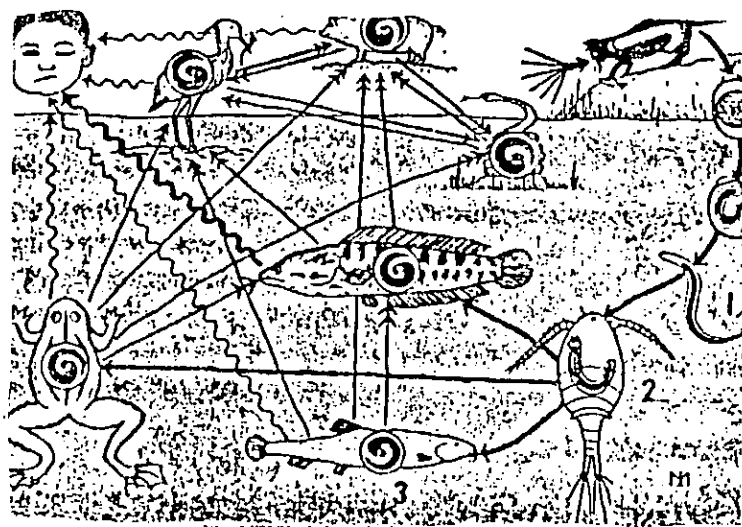
ลักษณะตัวอ่อน ระยะที่หนึ่ง (first stage larva) รูปร่างจะเรียวยาวจากหัวไปท้าย ที่หัวมีหนามสั้น ๆ 1 แฉก มีปลอกหุ้มรอบตัว ขนาดประมาณ 265.3 x 15.8 ไมครอน (ภาคผนวก)

ระยะที่สอง (second stage larva) ไม่มีปลอกหุ้ม มีริมฝีปาก 1 คู่ ขนาดเท่ากัน บริเวณหัวมีหนาม 4 แฉก มีหลอดอาหารและลำไส้ มีรอยย่นของหนามที่ลำตัวชัดปลายหางมนมีขนาดประมาณ 372.5 x 61.6 ไมครอน (ภาคผนวก)

ระยะที่สาม (third stage larva) เป็นระยะติดต้อมีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัย แต่ขนาดเล็กกว่า ลักษณะหนามไม่ชัดเจน ความยาวประมาณ 4.5 - 6.31 mm ส่วนใหญ่จะขดตัวอยู่ในซิสต์ (cyst) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 mm (ภาคผนวก)

ตาราง 1 แสดงชนิดของพยาธิตัวจิ๋วที่มีรายงานไว้ (Miyazaki, 1960 : 339)

<u>Species of Gnathostoma</u>	<u>Type host</u>	<u>Habitat</u>	<u>Locality</u>
1. <u>G.spinigerum</u> (Owen,1836)	<u>Felis tigris</u>	Stomach wall	England
2. <u>G.robustum</u> (Diesing,1838)	<u>Felis concolor</u>	Stomach wall	Brazil
3. <u>G.gracile</u> (Diesing,1838)	<u>Arapaima gigas</u> (Fish)	Intestinal canal	Brazil
4. <u>G.horridum</u> (Leidy,1856)	<u>Alligator mississippiensis</u>	Stomach lumen	U.S.A.
5. <u>G.sociale</u> (Leidy,1858)	<u>Mustela vison</u> (mink)	Stomach wall	U.S.A.
6. <u>G.radulum</u> (Schneider,1866)	<u>Paradoxurus philippinensis</u>	Stomach wall	Philippines
7. <u>G.hispidum</u> (Fedchenko,1872)	<u>Susscrofa ferus</u> & <u>Sussnofa domesticus</u>	Stomach wall	Turkestan & Hungary
8. <u>G.pelecani</u> (Chatin,1874)	<u>Pelecanus onocrotalus</u>	Subcutis & airsac	(?)
9. <u>G.siamense</u> (Levinsen,1889)	<u>Homo sapiens</u>	Subcutis	Thailand
10. <u>G.Turgidum</u> (Stossich,1902)	<u>Didelphis azarae</u>	Stomach wall	Argentina
11. <u>G.paronai</u> (Porta,1908)	<u>Rattus rajah</u>	Intestinal canal	Menlawei Islands
12. <u>G.accipitri</u> (Skrjabin,1915)	Lagle	Subcutis(?)	Turkestan
13. <u>G.americanum</u> (Travassos,1925)	<u>Felis tigrina</u>	Stomach wall	Brazil
14. <u>G.doloresi</u> (Tubangui,1925)	<u>Sussnofa domesticus</u>	Stomach wall	Philippines
15. <u>G.didelphis</u> (Chandler,1932)	<u>Didelphis virginiana</u>	Liver	U.S.A.
16. <u>G.nipponicum</u> (Yamaguti,1941)	<u>Mustela sibirica</u> <u>aitatsi</u>	Eosophageal	Japan
17. <u>G.procyonis</u> (Chandler,1942)	<u>Procyon lotor lotor</u>	Stomach wall	U.S.A.
18. <u>G.minutum</u> (Steknoven,1943)	Serpent	Connective tissue	Belgian Congo
19. <u>G.braziliense</u> (Ruiz,1952)	<u>Lutreolina crassicaudata</u>	Liver	Brazil



ภาพประกอบ 1 แสดงวงจรชีวิตของพยาธิตัวจิ๊ด

ตัวเต็มวัย อาศัยอยู่ที่ก้อนทุม (tumour) ในกระเพาะอาหารของสัตว์กินเนื้อ (carnivore) เช่น แมว, สุนัข ฯลฯ ซึ่งเป็นผู้ให้อาศัยโดยแท้จริง (definitive host) หลังจากผสมพันธุ์กันแล้วตัวเมียจะออกไข่และปล่อยออกมาทางรูติดต่อกับก้อนทุมไปตามลำไส้ออกมาพร้อมกับอุจจาระลงน้ำไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่หนึ่งภายใน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 27°C ตัวอ่อนจะถูกกินโดยกิ้งก่า (cyclop) ซึ่งเป็นผู้ให้อาศัยตัวที่หนึ่ง (first intermediate host) จากนั้นตัวอ่อนจะไชกระเพาะกิ้งก่าเข้าไปอยู่ช่องว่างกลางลำตัวและประมาณ 10 วัน ตัวอ่อนจะลอกคราบ 1 ครั้ง เจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่สอง และจะถูกกินต่อไปโดยผู้ให้อาศัยตัวที่สอง (second intermediate host) ซึ่งได้แก่ ปลาน้ำจืด กบ กุ้ง หอย ไข่ ตัวอ่อนระยะที่สองจะไชออกจากกระเพาะผู้ให้อาศัยตัวที่สองไปเจริญอยู่ตามกล้ามเนื้อและเกิดเป็นซิสต์ เข้าสู่ระยะการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่สาม เป็นระยะติดต่อ (infective stage) ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 เดือน และถ้าถูกกินโดยผู้ให้อาศัยโดยแท้จริง ตัวอ่อนระยะที่สามก็จะเจริญเป็นตัวเต็มวัย (mature adult worm) อาศัยอยู่ที่กระเพาะอาหารต่อไป (สวสดี. 2480 : 116 - 120)

คน ซึ่งเป็นผู้ให้อาศัยโดยบังเอิญ (accidental host) โดยได้รับเชื้อพยาธิจากการบริโภคปลา หรือเนื้อสัตว์ที่มีตัวอ่อนระยะที่สามในลักษณะสุกๆดิบๆ ตัวอ่อนที่ขดอยู่ในชีสจะออกจากชีสและไขห่อสุ กระเพาะอาหารผ่านตับแล้วเคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายทำให้เกิดพยาธิสภาพตามอวัยวะที่ ตัวอ่อนของพยาธิ เคลื่อนที่ไป

ปัจจุบันโรคพยาธิตัวจิ๊ดยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากอุปนิสัย การบริโภคของคนไทยนิยมบริโภคอาหารสุกๆดิบๆ อยู่เป็นประจำ และมักพบว่าที่ผิวหนังผู้ป่วยจะอักเสบ เป็นก้อนหูนุ่ม หรือเป็นรอยคดเคี้ยวไปมาและถ้าตัวอ่อนเคลื่อนที่ไปตาม ตา หู ปอด ช่องท้อง ทางเดินปัสสาวะ มดลูก ไช้หลัง หรือแม้กระทั่งสมองก็จะทำให้เกิดอาการตาบอด ปวดแก้วหู เจ็บหน้าอก มีก้อนในช่องท้อง กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ปลายประสาทหรือไช้หลังอักเสบ เลือดตกในสมองและอาจถึงแก่กรรมได้ (พิชิต สุวรรณประกร. 2529 : 273 - 276) นอกจากนี้พบว่าพยาธิตัวจิ๊ดมีชีวิตรอดอยู่ในคนได้นานถึง 14 ปี แต่ในการวินิจฉัยโรคอาศัยประวัติทางคลินิก และผลการตรวจเลือดผู้ป่วย พบว่าผู้ป่วยจะมี อีโอซิโนฟิล (eosinophil) สูงถึง 80 - 90 เปอร์เซ็นต์ มีการทดลองใช้ยาหลายชนิดในการรักษา เช่น Diethyl carbamazone, Prednisolone, Quinine sulfate, Mebendazole และ Levamisole แต่ก็ ไม่มีตัวยาใดรักษาได้ดีเท่ากับการนำตัวพยาธิออกจากร่างกาย (พวงน้อย ณ สงขลา. 2526 : 316 - 321)

การศึกษาเอนไซม์ของพยาธิมีความสำคัญต่อแนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคพยาธิโดยเฉพาะ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน (energy metabolism) ของคาร์โบไฮเดรต เช่น เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ตลอดจนอัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการที่ปราศจากออกซิเจน พยาธิที่ทำการศึกษานี้ได้แก่ พยาธิใบไม้ในตับ (Fasciola sp.) พยาธิใบไม้ในปอด (Paragonimus sp.) พยาธิตัวจิ๊ด (Hymenolepis sp.) พยาธิตัวกลม (Ascaris sp.) ตลอดจนโปรโตซัว (Protozoa) บางชนิด

การศึกษาชนิดและสมบัติของเอนไซม์ของพยาธิตัวจิ๊ดจะเป็นความรู้พื้นฐานด้านการวินิจฉัยและ ทางด้านเภสัชวิทยาเพื่อการรักษาโรคพยาธิตัวจิ๊ดต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อตรวจหาเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ในพยาธิตัวจิ๋วระยะติดต่อ
2. เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ผลจากการศึกษาทำให้ทราบเทคนิคและวิธีตรวจหาเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส รวมทั้งวิธีการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ในระยะติดต่อของพยาธิตัวจิ๋ว
2. ผลการศึกษาเป็นแนวทางให้ทราบถึงวิธีทางเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) เพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย และทางด้านเภสัชวิทยาในการรักษาโรคพยาธิตัวจิ๋วต่อไป

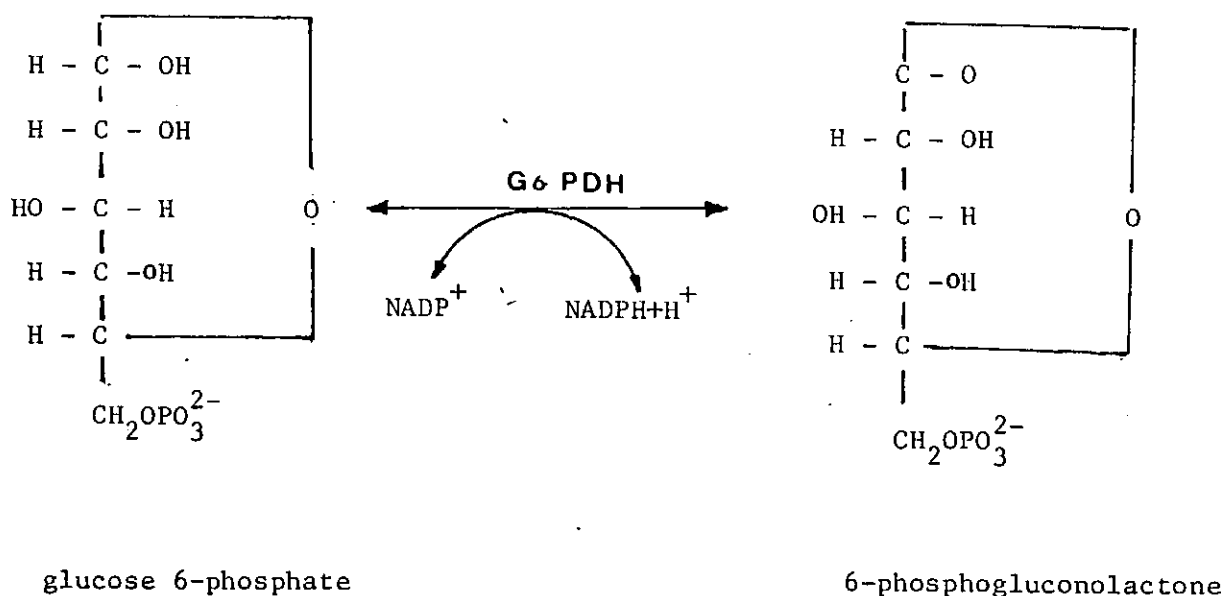
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาค้างนี้ใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อของพยาธิตัวจิ๋วโดยตรวจจากปลาไหลน้ำจืดจากตลาดสดกรุงเทพมหานคร
2. วิเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งอยู่ในส่วนใส (supernatant) ด้วยเทคนิคโพลีอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis)
3. ศึกษาค่าความเป็นกรด — ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ADH และ G6PDH และศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ทั้งสองเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

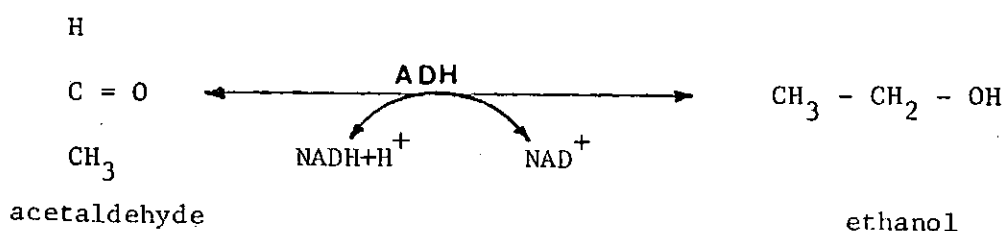
นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ผู้ให้อาศัย (host) หมายถึง คนหรือสัตว์ที่ยอมให้พยาธิเข้าอาศัยอยู่
2. ผู้ให้อาศัยโดยแท้จริง (definitive host) หมายถึง ผู้ให้อาศัยที่มีตัวแก่ของพยาธิเจริญเติบโตอยู่ได้ตามปกติ และพยาธิผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ในโฮสต์นั้น

3. ผู้ให้อาศัยตัวกลาง (intermediate host) หมายถึง โฮสต์ที่มีระยะตัวอ่อนของพยาธิอาศัยอยู่และเจริญได้ระยะหนึ่ง เพื่อที่จะอยู่ในโฮสต์อื่นอีกต่อไป
4. ผู้ให้อาศัยโดยบังเอิญ (accidental host) หมายถึง โฮสต์ที่มีพยาธิอาศัยอยู่โดยบังเอิญซึ่งพยาธิไม่สามารถเจริญหรือเพิ่มจำนวนต่อไปได้
5. โฮโมจีเนต (homogenate) หมายถึง ของเหลวที่ได้จากการนำเอาพยาธิไปบดด้วยเครื่องมือทำให้เซลล์ของเนื้อเยื่อพยาธิตัวจัดแตก
6. เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose 6-phosphate dehydrogenase ; G6PDH) หมายถึง เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงระหว่างกลูโคส 6-ฟอสเฟต (glucose 6-phosphate) กับ 6-ฟอสโฟกลูโคนแลกโตน (6-phosphogluconolactone) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาหนึ่งในวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway)



7. เอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase ; ADH) หมายถึง เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงจาก อีทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นเอทานอล (ethanol)



8. อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์สารโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้าตามความแตกต่างของขนาดหรือประจุของสารตัวอย่าง โดยบรรจุสารที่ต้องการแยกลงบนแผ่นค้ำจุน (supporting medium) ซึ่งอาจจะเป็นกระดาษกรอง เซลลูโลส อะซิเตท (cellulose acetate) หรือโพลีอะคริลลาไมด์ แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าไปชั่วระยะหนึ่ง สารที่มีประจุสุทธิต่างกันจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าตรงข้ามกับประจุของสารตัวอย่างด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยถ้าประจุสุทธิเท่ากันทำให้สามารถแยกสารออกจากกันได้

9. เอสดีเอส โพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS - polyacrylamide gel electrophoresis) คือวิธีการแยกสารโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้โพลีอะคริลลาไมด์เป็นตัวค้ำจุนและใส่โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate ; SDS) เพื่อให้จับกับโปรตีนและมีประจุสุทธิเป็นลบ เนื่องจากหมู่ของเอสดีเอส (โดยกรดอะมิโนบนสายโปรตีนประมาณ 3 เศษตัว (residue) จะจับกับเอสดีเอส 1 โมเลกุล) และอัตราส่วนของจำนวนประจุลบของโปรตีนต่อน้ำหนักโมเลกุลมีค่าคงที่จึงทำให้การแยกโดยวิธีนี้ไม่ขึ้นกับจำนวนประจุลบของโปรตีน เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงบนแผ่นโพลีอะคริลลาไมด์โปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าบวกได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ในทางปรสิตวิทยา อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคทางชีวเคมีที่ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกประเภท การศึกษาส่วนประกอบโครงสร้างโปรตีนตลอดจนเอนไซม์ในปรสิตชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะเทคนิคโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis ; PAGE) และ เอสดีเอส โพลีอะคริลลาไมด์ - เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS - polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) ที่นิยมใช้มากในการวิจัย เนื่องจากเป็นวิธีการแยกสารที่สะดวก รวดเร็ว และให้ผลตรงตามวัตถุประสงค์ (โสพิศ บงกคศิริเกียรติ. 2529 : 127 - 138)

เบอร์เซ, แมคเคนซี และเบิร์ต (Bursey, Mackenzie and Burt. 1980 : 167 - 174) รายงานถึงความแตกต่างของพยาธิตัวติด 3 ชนิด คือ Taenia taeniaeformis, T. macrocystis, T. pisiformis โดยศึกษาจากแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจล พบว่าพยาธิตัวติดต่างสปีชีส์ (species) กันจะมีแถบโปรตีนแตกต่างกัน แถบของโปรตีนที่ได้ก็จะแตกต่างกันไปด้วย ลอควูด, นอท และคัมบ์ (Lockwood, North and Coombs. 1984 : 245 - 253) ศึกษาโปรตีนจากโปรตัวชีว 3 ชนิด คือ Trichomonas vaginalis, T. foetus และ T. batrachorum พบว่าแถบโปรตีนของโปรตัวชีว 3 ชนิด แตกต่างกัน T. foetus ประกอบด้วยแถบโปรตีน 6 แถบ T. vaginalis 7 แถบ และ T. batrachorum แถบ นอกจากนี้เรนเกิลและคนอื่น ๆ (Rangle, and others. 1981 : 199 - 209) ใช้เทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) ร่วมกับ SDS-PAGE แยกโปรตีนของโปรตัวชีว (Trypanosoma cryzi) ให้บริสุทธิ์ พบว่าได้แถบโปรตีนบนแผ่นเจล 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60,000 ดาลตัน

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการใช้ SDS-PAGE ร่วมกับอิมมูโน ปริซิปปิเตชัน (immuno - precipitation) และออโตเรดิโอกราฟี (autoradiography) ศึกษาวิเคราะห์แอนติเจน (antigen) ต่าง ๆ ของพยาธิใบไม้ในตับ (Opisthorchis viverrini) ในระยะตัวแก่โดยสกัดสารละลายจาก

เนื้อเยื่อ somatic จากเมตาเซอคาเรีย (metacercaria) และสารคัดหลั่ง (secretory product) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้มีสมบัติเป็นแอนติเจนได้ (สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชิติน และสฤตย์ ลีรสิงห์. 2527 : 262 - 263)

ส่วนพยาธิตัวจิ๊ด มีรายงานการศึกษาด้านโปรตีนจากตัวอ่อนระยะที่สามโดยติดฉลากไอโอดีนกับโปรตีน แล้วนำมาศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE และทำอโตเรดิโอกราฟฟี พบว่าโปรตีนที่สกัดได้ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ ขนาดต่าง ๆ กันจำนวน 20 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10,000 - 99,000 ดาลตัน ซึ่งองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 39,000 ดาลตัน มีปริมาณมากที่สุด องค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 ดาลตัน ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับซีรัม (serum) หนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่สามของพยาธิตัวจิ๊ด (รุ่งลาวรรณ ไพรวรรณ. 2528 : 61 - 81)

อุเมซุริค และแอนยา (Umezurike and Anya. 1980 : 175 - 180) วิเคราะห์ LDH จากพยาธิใบไม้ในตับ (Fasciola gigantica) โดยใช้วิธี PAGE พบแถบไอโซไซม์ ปรากฏบนแผ่น เจล 5 แถบ โดย LDH - 1, LDH - 2, LDH - 3 ปรากฏชัดเจน ส่วน LDH - 4 , LDH - 5 ปรากฏแถบบ้างเพียงเล็กน้อย และในปีเดียวกันนั้น เคน และราช (Cain and Raj. 1980 : 56 - 67) ศึกษา MDH และ ADH จากตัวอ่อนของพยาธิตัวกลม 4 ชนิด คือ Anisakis sp., Phocanema sp. Comtracaecum sp. และ Sulcascaris sp. จากผู้ให้อาศัย 2 ชนิด คือ ปลา กับ หอย จากทะเล แปซิฟิกและแอตแลนติกพบเอนไซม์ ADH ในพยาธิทั้ง 4 ชนิด เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 2 ไอโซไซม์ ส่วน MDH พบว่า Anisakis sp. มี 1 แถบ Phocanema sp. 3 แถบ และ Sulcascaris sp. มี 2 แถบ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ SDS-PAGE หา น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วย เช่น พัพพาส และ ไชรเดอร์ (Pappas and Schroeder. 1979 : 134 - 139) โดยใช้ SDS-PAGE ร่วมกับเจล ฟิลเตรชัน ศึกษา LDH และ MDH จากตัวเต็มวัยของพยาธิตัวตืด (Hymenolepis microstoma) พบว่า LDH ประกอบด้วย 2 ไอโซไซม์ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160,000 ดาลตัน ส่วน MDH มี 3 ไอโซไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 49,000 ดาลตัน และในปี ค.ศ. 1982 โล และแชง (Lo and Chaeng. 1982 : 372 - 377) ศึกษา ADH จากโปรโตซัว (Entamoeba histolytica) พบว่า ADH บริสุทธิ์ มี 4 หน่วยย่อย (subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน

อโกชิน และอราเวนา (Agosin and Aravena. 1960 : 28 - 38) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ G6PDH จากสารสกัดจากเซลล์เนื้อเยื่อของพยาธิ Echinococcus granulosus โดยใช้กลูโคส

6-ฟอสเฟตเป็นสับสเตรด ออกซิโดซ์ ไตรฟอสโฟไพริดีน นิวคลีโอไทด์ (oxidized triphosphopyridine nucleotide : TPN) เป็นโคเอนไซม์ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมของ G6PDH คือ pH 9.0 เคนและراج (Cain and Raj. 1980 : 56 - 67) ศึกษาสมบัติเอนไซม์ ADH ของพยาธิตัวกลม Anisakis sp. โดยใช้ 2-บิวทานอล (2-butanol) เป็นสับสเตรด นิโคตินาไมด์ อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (nicotinamide adenine dinucleotide ; NAD) เป็นโคเอนไซม์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของ ADH คือ 45 °C

สำหรับพยาธิตัวจิ๊ดมีรายงานการศึกษาเอนไซม์ 3 ชนิด คือ LDH, MDH และ EST (esterase dehydrogenase) จากตัวอ่อนระยะที่สามโดยวิธี PAGE พบว่า MDH มี 3 ไอโซไซม์ แต่ละไอโซไซม์มีปริมาณไม่เท่ากัน ไอโซไซม์ที่มีมากที่สุดมีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีค่าประจุบวกสุทธิของโมเลกุลสูงกว่าไอโซไซม์อื่น ๆ และจากการศึกษาไคเนติก (kinetic) ของ MDH พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิโดซ์มาเลตได้มากที่สุด ที่สภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10 และที่อุณหภูมิ 55 °C จากรายงานไม่พบความสามารถในการทำงานของ LDH และ EST (ธรัตน์ มหายศนันท์. 2530 : 61 - 62)

บทที่ ๑

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการ

1. จานแก้ว (petridish disc)
2. ขวดรูปชมพู่ (flask)
3. หลอดทดลอง (test tube)
4. พาสเตอร์ ปิเปต (pasteur pipette)
5. ขวดแก้วใสขนาดเล็ก (vial)
6. ปิเปต (pipette)
7. ขู่กันขนาดเล็ก (เบอร์ ๐ หรือ เบอร์ 1 : blush)
8. แผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil)
9. ตู้อบ (oven)
10. เครื่องปั่น (bench top)
11. เครื่องบดทำให้เซลล์เนื้อเยื่อแตก (homogenizer)
12. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (high speed refrigerated centrifuge)
13. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis apparatus)
14. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)
15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, Shimadzu, UV - 240)

วิธีดำเนินการและรวบรวมข้อมูล

1. การเก็บรวบรวมตัวอ่อนระยะติดตัวของพยาธิตัวจืด

นำปลาไหลน้ำจืดมาเก็บรวบรวมตัวอ่อนระยะติดตัวของพยาธิตัวจืดโดยใช้น้ำย่อยเทียม (องุ่น เกียรติวุฒิ และบุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ. 2523 : 37 - 39)

1.1 แยกตับออกจากไส้ปลาไหล และบดด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 1,000 g : 2 นาที

1.2 เตรียมน้ำย่อยเทียมโดยละลาย เปปซินผง 10 g ในน้ำกลั่น 900 ml เติมกรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 7 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

1.3 ผสมตับที่จะเอี้ยดค่อน้ำย่อยเทียมในอัตราส่วน 1 : 3 (ปริมาตร : ปริมาตร) ผสมให้เข้ากันในขวดรูปชมพู่ ปิดฝาด้วยแผ่นอลูมิเนียม

1.4 ใส่ตู้อบอุณหภูมิ 37°C อย่างน้อย 6 ชั่วโมง หรือ 1 คืน กรองด้วยตะแกรงที่มี ขนาดของรู 1 mm ล้างเปปซินออกจากตะกอนด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) หลายครั้ง

1.5 ดูดตะกอนด้วยปิเปตใส่จานแก้ว ตรวจสอบตัวอ่อนระยะติดตัวของพยาธิตัวจืดด้วย กล้องจุลทรรศน์สเตรโอ

1.6 ใช้ฟุ้งขนาดเล็กแช่ตัวอ่อนพยาธิ ล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 - 3 ครั้ง ใส่ขวดแก้วขนาดเล็กที่มีน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพียงเล็กน้อย (พอท่วมตัวจืด) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อศึกษาขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดโปรตีนและเอนไซม์จากเซลล์ของตัวอ่อนระยะติดตัวของพยาธิตัวจืด

2.1 นำตัวอ่อนระยะติดตัวของพยาธิตัวจืดมาเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.5) ลงไปประมาณ 2 เท่าของปริมาตรพยาธิตัวจืด

2.2 ทำให้เนื้อเยื่อของตัวอ่อนพยาธิหลุดเป็นเซลล์เดี่ยว และแตกด้วยเครื่อง homogenizer

2.3 นำโซโมจีเนตที่ได้ไปเซนตริฟิวส์ที่ 15,000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที

2.4 เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็นสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ต่อไป

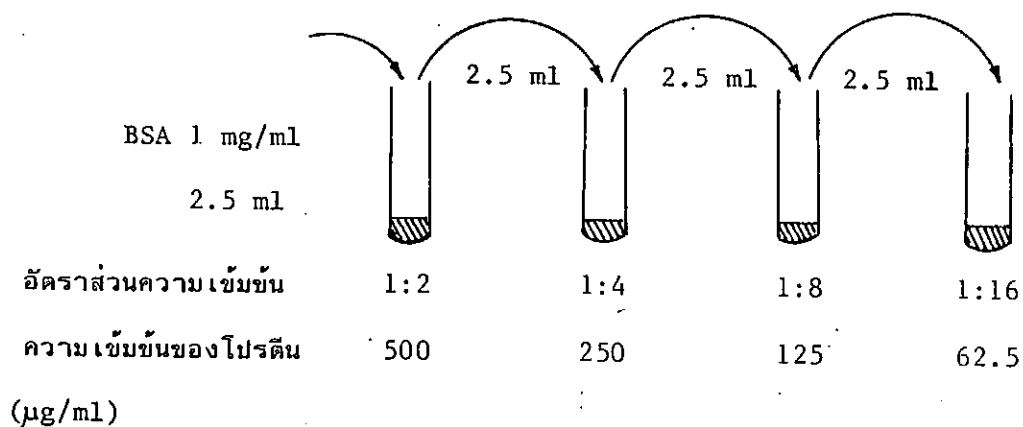
3. การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

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

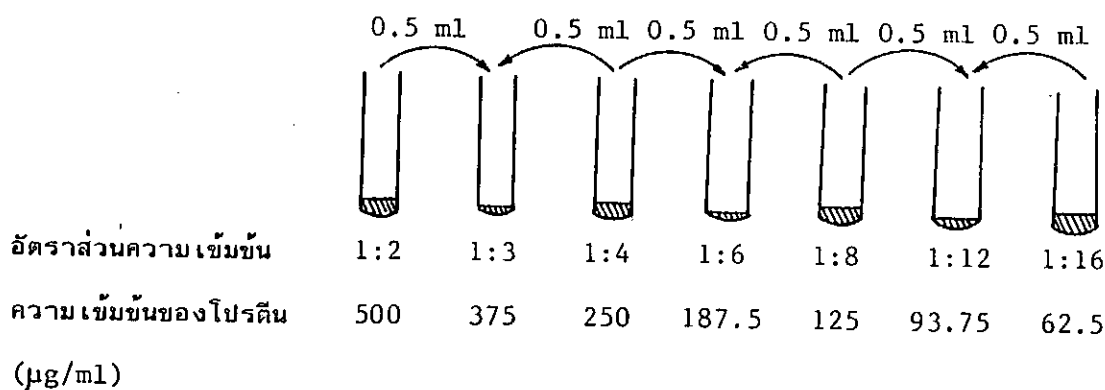
3.1 การเขียนกราฟมาตรฐาน

3.1.1 เจือจาง BSA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml แบบทูโฟลด์ ไดลูชัน

(two-fold dilution) ให้มีความเจือจางตั้งแต่ 1:2 จนถึง 1:16 โดยเริ่มจากใส่น้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 4 หลอด ๆ ละ 2.5 ml จากนั้นเติม BSA 1 mg/ml จำนวน 2.5 ml ลงในหลอดที่ 1 (1:2) ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายไปหลอดที่ 2 จำนวน 2.5 ml (1:4) ทำเช่นเดียวกันจากหลอดที่ 2 ไปหลอดที่ 3 และต่อไปจนถึงหลอดที่ 4 (1:16)



เพิ่มชนิดของอัตราส่วนความเข้มข้นให้มากขึ้นโดยผสมระหว่างสารละลาย BSA ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นสูงและต่ำ อย่างละ 0.5 ml



3.1.2 เตรียมสารละลายที่ต้องการใช้

3.1.2.1 สารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper solution)
เตรียมจาก

สารละลาย ก. โซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมไฮดรอกไซด์
0.1 M

สารละลาย ข. คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโปตัสเซียม-
ทาร์เทรต 1 เปอร์เซ็นต์

3.1.2.2 โฟลีนรีเอเจนต์ 1 N (1 N Folin reagent) เตรียมเมื่อต้องการ
ใช้โดยเจือจางโฟลีนรีเอเจนต์ ด้วยน้ำกลั่นในสัดส่วน 1 : 1 (ปริมาตร/ปริมาตร)

3.1.3 การวัดการดูดกลืนแสง (optical density ; OD) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

BSA 0.2 ml + สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 1 ml

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที



เติมโฟลีนรีเอเจนต์ 1 N 0.1 ml

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที



วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, UV-240)

ที่ความยาวคลื่น 700 nm

3.1.4 เขียนกราฟมาตรฐานจากค่า OD ที่อ่านได้กับค่าความเข้มข้นของ BSA

3.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 เจือจางสารตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นพอเหมาะแล้วนำมา 0.2 ml ไปผ่านขั้นตอน 3.1.3 เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานเพื่ออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 nm

3.2.2 หาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน

4. การแยกโปรตีนและเอนไซม์ในสารตัวอย่างโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.1 เตรียมแผ่นเจลโพลีอะคริลลาไมด์ (slab gel)

4.1.1 เตรียมบล็อก (block) กระจกขนาด 11 x 10 x 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.1.2 เตรียมโพลีอะคริลลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก) โดยใส่ลงไป
บล็อกให้มีความสูงประมาณ 8 cm (เซนติเมตร) แล้วค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงเหนือผิวหน้าเจล ให้มีความ
สูงของน้ำกลั่นประมาณ 2 mm (ระวังอย่าให้กระเทือนหน้าเจล) เพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบเมื่อแข็งตัว
ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 15 - 20 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะสังเกตเห็นรอยต่อคมชัดระหว่างผิวหน้าเจลและ
น้ำกลั่น เจลชั้นนี้เรียกว่า เจลแยกสาร (separating gel หรือ running gel) ซึ่งควรจะทิ้งไว้
อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหรือทิ้งไว้ค้างคืนในตู้เย็นก่อนใช้

4.1.3 เหน้กกลั่นที่อยู่เหนือเจลแยกสารออก แล้วใส่โพลีอะคริลลาไมด์ 4 เปอร์เซ็นต์
(ภาคผนวก) ลงไปแทนพร้อมกับใส่ทริเลียบ (comb) เพื่อให้เจลเป็นร่องลึกลงไปสำหรับหยอดสารตัวอย่าง
เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว เจลส่วนนี้เรียกว่า แซมเปิลเจล หรือสเปเซอร์เจล (sample gel or spacer gel)
ซึ่งเมื่อแข็งตัวควรนำไปใช้ภายใน 1 - 2 ชั่วโมง เพื่อกันไม่ให้เกิดการแพร่เข้าหากันระหว่างบัฟเฟอร์ของ
เจลทั้งสองชั้นนี้ (ก่อนจะใช้ต้องดึงคอมบ์ออกเพื่อจะได้มีที่ว่างสำหรับหยอดสารตัวอย่าง)

4.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

เตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง (ประมาณ 2 mg/ml)
ในแซมเปิลบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก) โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวปรับความเข้มข้น

4.3 หยอดสารตัวอย่างลงในหลุมของสเปเซอร์เจลที่มีอิเล็กโตรโฟรีซิสบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก)
ท่วมหลุม แล้วจ่ายกระแสไฟฟ้าตรง 2 มิลลิแอมป์ต่อความสูงของแผ่นเจล 1 cm โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่ง
จากขั้วลบ (ด้านบน) ลงสู่ขั้วบวก (ด้านล่าง) เมื่อสั้บรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบถึงขอบเจลด้านล่างจึง
หยุดการจ่ายกระแสไฟฟ้า

4.4 แยกเอาแผ่นเจลโพลีอะคริลลาไมด์ออกมาจากแผ่นกระจก ทำเครื่องหมายตำแหน่งของ
สีอ้างอิงบนแผ่นเจล แล้วนำส่วนของเจลแยกสารไปย้อมด้วยสารละลายดังต่อไปนี้

4.4.1 ย้อมโปรตีนด้วยสารละลายสีโคมาสสีบลูเลียนท์บลูอาร์ (ภาคผนวก) ประมาณ
1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย เมทานอล 5% ในกรดอะซิติก 7% หลาย ๆ ครั้งจนสีส่วน
เกินออกหมดและเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

4.4.2 การย้อมเอนไซม์ (enzyme activity stain) ใช้สารละลายที่มีส่วนประกอบดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดงส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในการย้อมความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ต้องการย้อม	ความเข้มข้นของสารที่ใช้			
	สับสเตรท (substrate)	โคเอนไซม์ (coenzyme)	สารร่วมปฏิกิริยา (other addition)	บัฟเฟอร์ (buffer)
ADH	ethanol 0.2 M, 2 ml	NAD 40 mg	NBT 25 mg PMS 3 mg	0.025 M sodium phosphate pH 9.0, 98 ml
G6PDH	G6P 5 mg	NADP 2.0 mg	MTT 2.0 mg PMS 2.0 mg	0.1 M sodium phosphate pH 9.5, 20 ml

NAD = nicotinamide adenine dinucleotide

NADP = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

MTT = 3 - (4,5 -dimethylthiazolyl 1,2) - 2,5 - diiphenyltetrazolium
bromide

NBT = nitroblue tetrazolium

PMS = phenazine methosulfate

การย้อมเอนไซม์สำหรับ ADH ; G6PDH กระทำในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที
หลังจากนั้นล้างสีส่วนเกินด้วยสารละลายกรดอะซิติก 6 เปอร์เซ็นต์

5. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์

5.1 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส

5.1.1 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ อัล-กอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นต่อ 1 นาที ที่ความยาวคลื่น 340 nm ใช้ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

ethanol	0.2 M
NAD	2 mM
homogenate	10-50 μ l
* buffer pH 3.5-9.0	0.1 M
ปรับด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	1 ml

* pH 3.5 - 5.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมจาก citric acid กับ Na_2HPO_4

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 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่อุณหภูมิต่าง ๆ แล้ววัดอัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm ใช้ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

ethanol	0.2 M
NAD	2 mM
homogenate	10-50 μ l
citric acid buffer pH 5.0	0.1 M
ปรับด้วยน้ำกลั่นให้สารละลายมีปริมาตรรวม	1 ml

5.1.3 ศึกษาความคงตัว (stability) ของเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาต่าง ๆ กันโดยวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นต่อ 1 นาที ที่ความยาวคลื่น 340 nm. ใช้ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

ethanol	0.2 M
NAD	2 mM
homogenate	10-50 μ l
citric acid buffer pH 5.0	0.1 M
ปรับด้วยน้ำกลั่นให้สารละลายมีปริมาตรรวม	1 ml

5.2 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส ใช้วิธีทำนองเดียวกันกับในข้อ 5.1.1 - 5.1.3 โดยมีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ดังนี้

G6P	0.2 mM
NADP	0.3 mM
homogenate	10-50 μ l
buffer pH 5.5-11.5	100 mM
ปรับด้วยน้ำกลั่นให้สารละลายมีปริมาตรรวม	1 ml

สำหรับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ G6PDH และความคงตัวของเอนไซม์จะใช้ buffer pH 9.5 เพียงชนิดเดียว

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

1. การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

เมื่อนำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA 1000 μ g/ml) มาทำให้เจือจางที่อัตราส่วนความเข้มข้น 1:4 และ 1:16 หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของโลว์รี (Lowry) พบว่าค่าความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm เป็นกราฟเส้นตรงผ่านจุดกำเนิด (origin) (ภาพประกอบ 2)

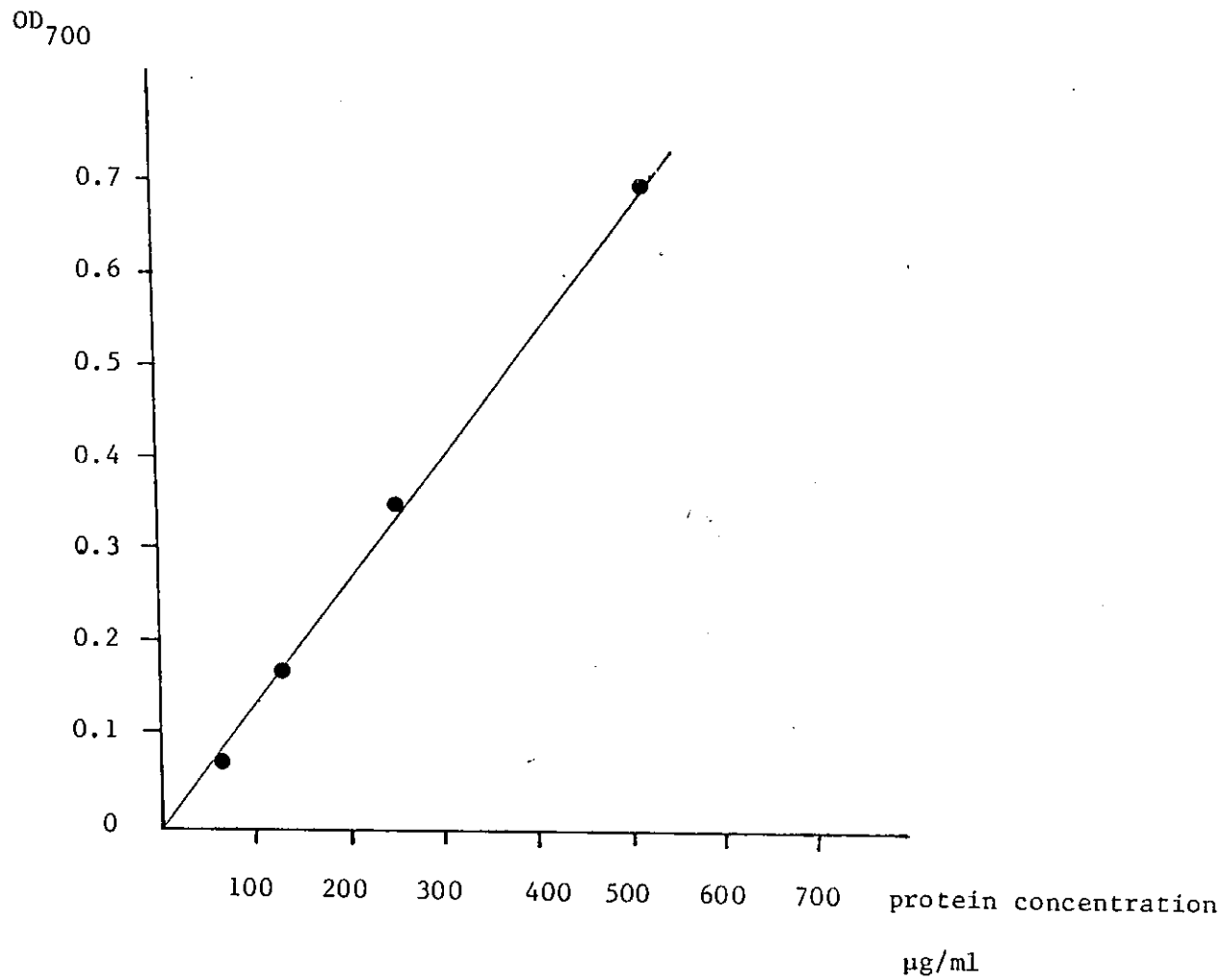
สารตัวอย่างจากหยาดพืชจัดระยะหาคัดต่อจำนวน 1,950 ตัว มีปริมาณโปรตีน 3.38 mg/ml หรือคิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งสิ้น 11.82 mg/ 3.5 ml ของสารตัวอย่าง (ตาราง 3)

2. การตรวจหาเอนไซม์ ADH และ G6PDH โดยปฏิกิริยาในหลอดทดลองและโฟลโอะคริสลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

จากการนำสารตัวอย่างที่เตรียมจากหยาดพืชจัดระยะหาคัดต่อมาตรวจหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ADH และ G6PDH ที่อุณหภูมิ 25°C pH 5.0 และ pH 9.5 ตามลำดับพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm มีค่าสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป (ภาพประกอบ 3) แสดงว่ามีปริมาณ NADH และ NADPH เพิ่มขึ้นจากการเปลี่ยน NAD และ NADP โดยเอนไซม์ ADH และ G6PDH ตามลำดับ

เมื่อนำสารตัวอย่างไปแยกโปรตีนและเอนไซม์ด้วยวิธีโฟลโอะคริสลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าปรากฏแถบโปรตีนเด่นชัด 20 แถบ ทางด้านซ้ายลบบมีแถบโปรตีนจำนวนมากค่อนข้างถี่และติดสีเข้ม ทางด้านขวาลบบมีแถบโปรตีนน้อยระยะห่างมากกว่าทางด้านซ้ายลบบ (ภาพประกอบ 4) และจากการย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายที่แสดงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์พบแถบเอนไซม์ ADH 1 แถบ ใกล้กับขวาลบบ (ภาพประกอบ 5) ซึ่งเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนพบว่าตรงกับแถบโปรตีนที่ 20 (ภาพประกอบ 6) และพบแถบเอนไซม์ G6PDH 1 แถบ เช่นกันค่อนข้างขวาลบบเล็กน้อย (ภาพประกอบ 7) เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนพบว่าตรงกับแถบโปรตีนที่ 14 (ภาพประกอบ 8)

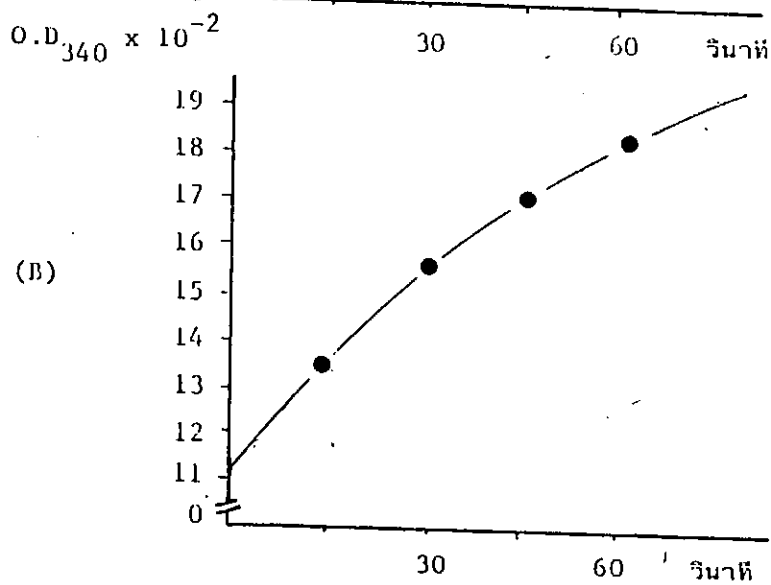
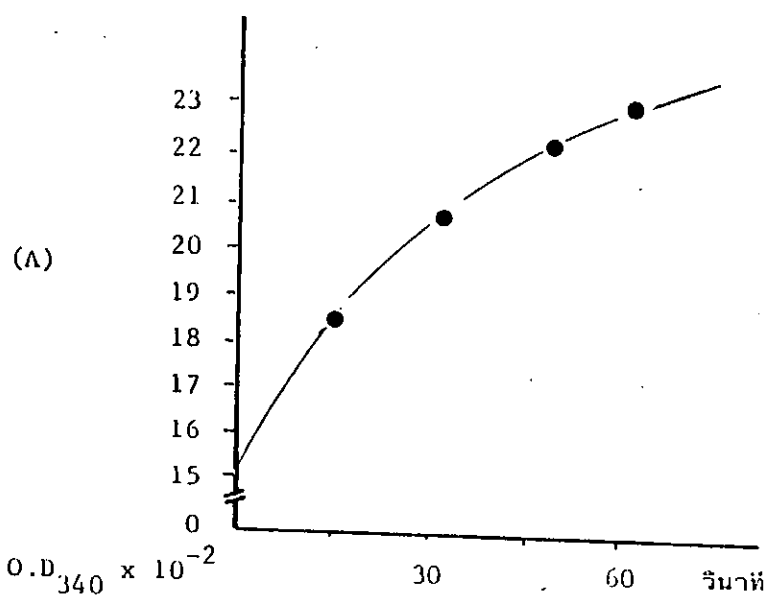
ห้องสมุดมหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



ภาพประกอบ 2 กราฟมาตรฐานแสดงการหาค่าปริมาณโปรตีน (Lowry method)

ตาราง 3 แสดงข้อมูลคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

อัตราส่วน ความเข้มข้น	OD (700 nm)	ความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง		ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg)
		หลังเจือจาง (mg/ml)	ก่อนเจือจาง (mg/ml)	
1:4	1.148	0.82	3.28	11.82 (3.5 x 3.38)
1:8	0.609	0.44	3.48	
1:16	0.295	0.21	3.38	
			เฉลี่ย 3.38	

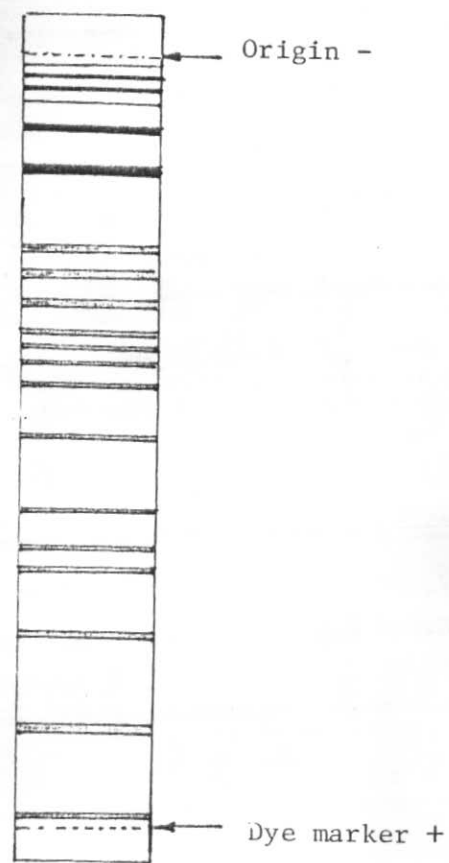
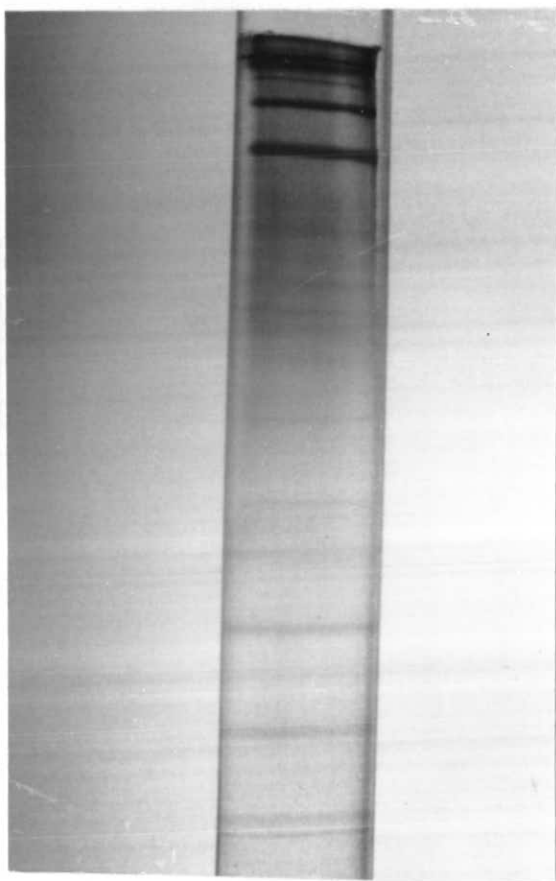
$O.D_{340} \times 10^{-2}$


ภาพประกอบ 3 กราฟแสดงการหาปริมาณ NADH และ NADPH จากปฏิกิริยาของเอนไซม์

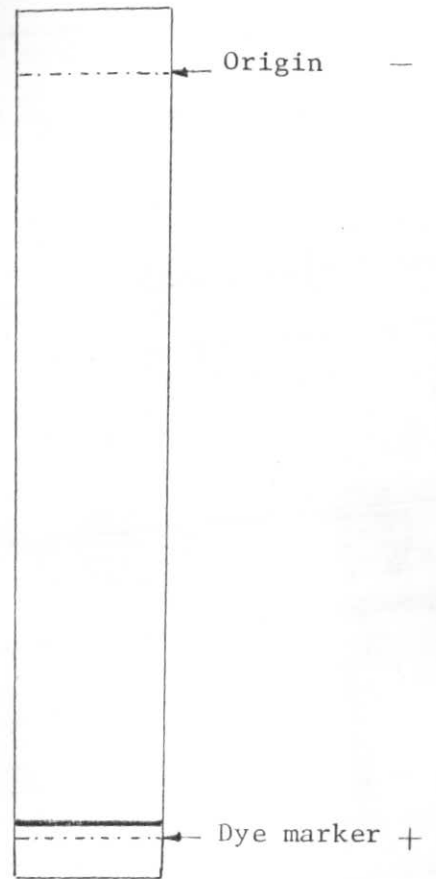
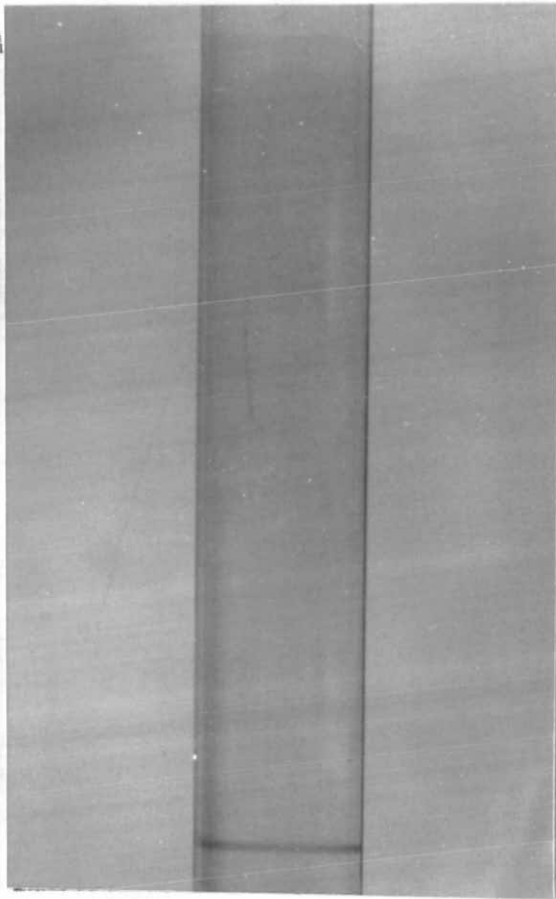
ADH และ G6PDH

(A) —•— homogenate + NAD + C_2H_5OH

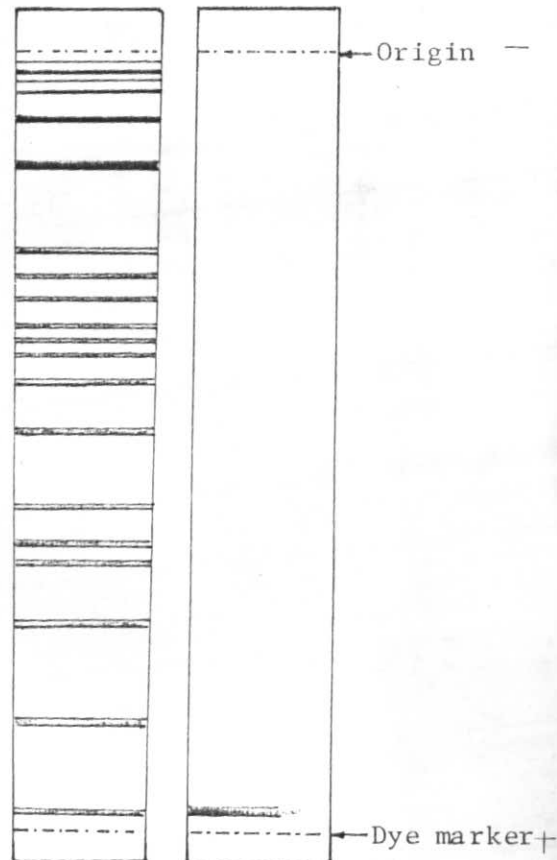
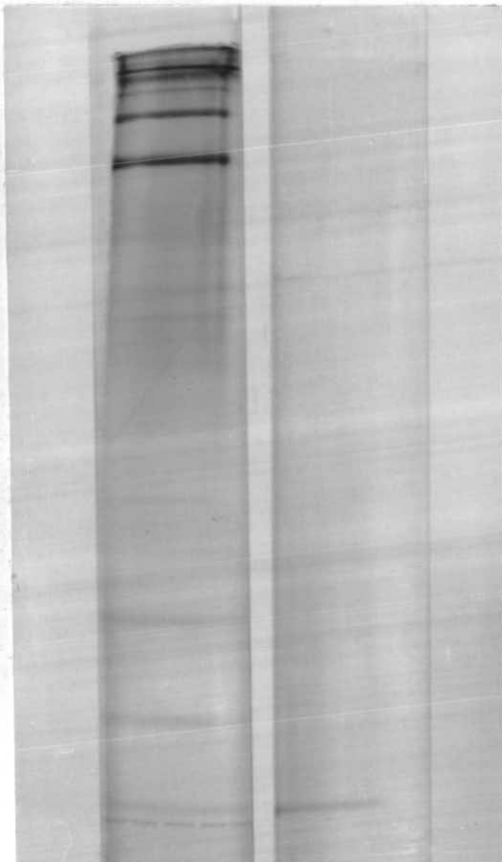
(B) —•— homogenate + NADP + G6P



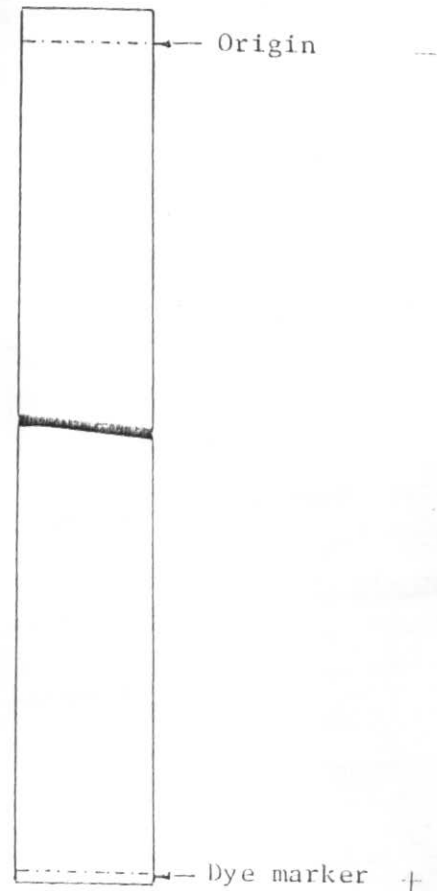
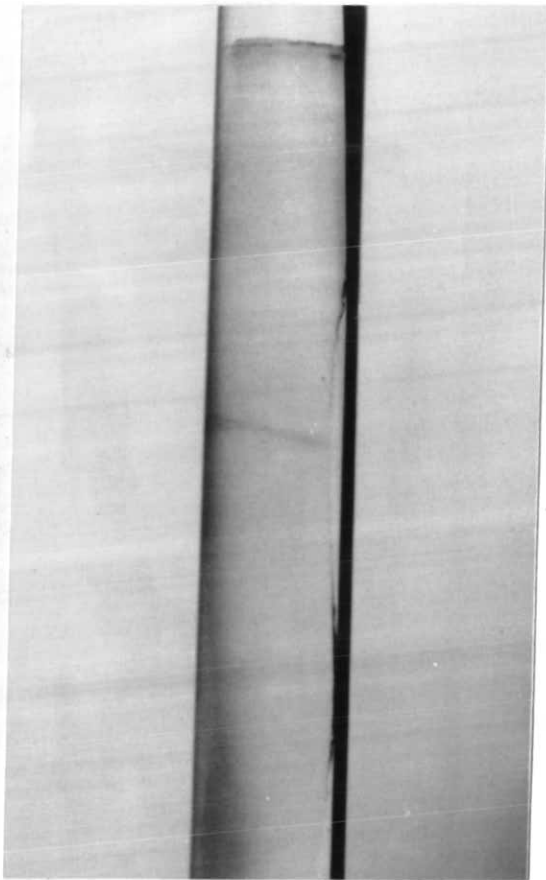
ภาพประกอบ 4 ภาพถ่าย (ซ้าย) และแผนภาพ (ขวา) แสดงแถบโปรตีนของสารตัวอย่าง (30 μ g) ที่เตรียมจากพยาธิตัวจิ๋วระยะติดต่อ แยกด้วยวิธี โพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส ย้อมสี โปรตีนด้วย Coomassie Blue



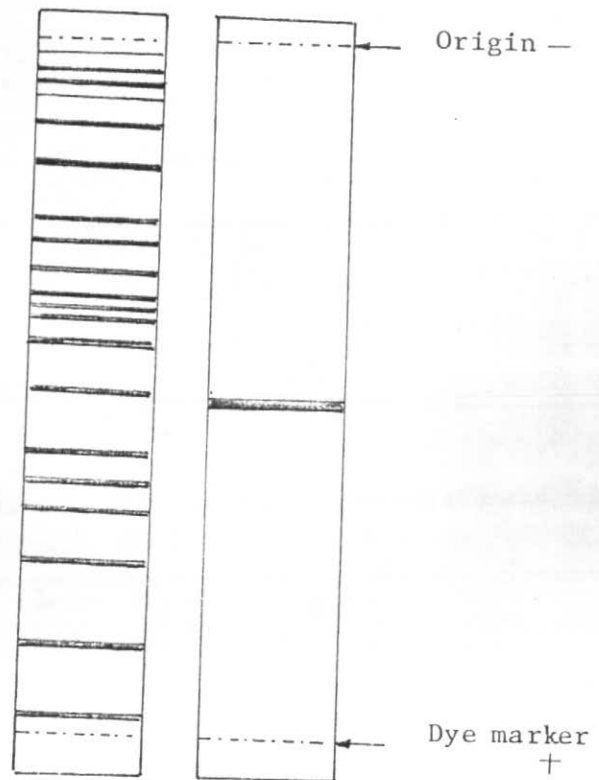
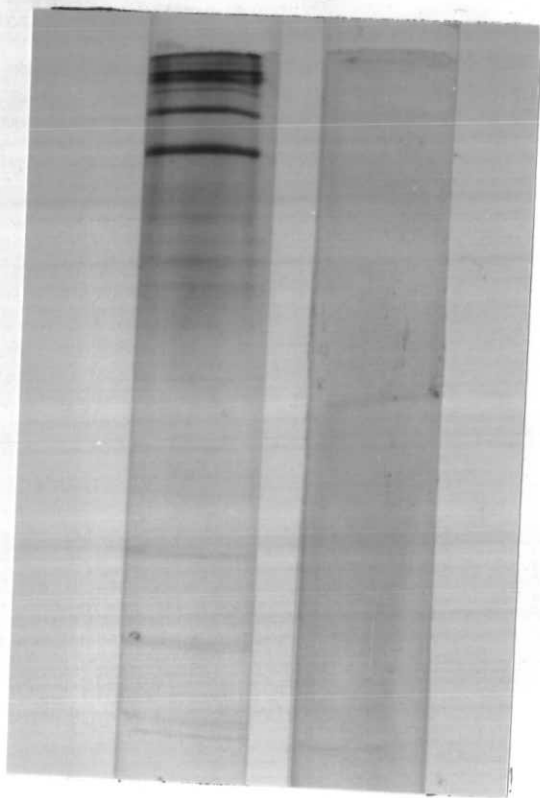
ภาพประกอบ 5 ภาพถ่าย (ซ้าย) และแผนภาพ (ขวา) แสดงแถบแอนไอโซม ADH ที่ได้จากการแยกด้วยวิธีโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟเรซิส



ภาพประกอบ 6 ภาพถ่าย (ซ้าย) และแผนภาพ (ขวา) แสดงการเปรียบเทียบแถบเอนไซม์ ADH กับแถบโปรตีนที่ได้จากการแยกด้วยวิธีโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส



ภาพประกอบ 7 ภาพถ่าย (ซ้าย) และแผนภาพ แสดงแถบเอนไซม์ G6PDH ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี
โพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส



ภาพประกอบ 8 ภาพถ่าย (ซ้าย) และแผนภาพ (ขวา) แสดงเปรียบเทียบแถบเอนไซม์ G6PDH
กับแถบโปรตีนที่ได้จากการแยกด้วยวิธีโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์

3.1 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ ADH

3.1.1 การศึกษาผลความเป็นกรด-ด่าง ต่อการทำงานของเอนไซม์ ADH ณ อุณหภูมิ 25°C ที่ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ กัน โดยวัดการดูดกลืนแสงของ NADH ที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 nm พบว่าเอนไซม์ ADH สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 โดยมีปริมาณ NADH เกิดขึ้น 0.0308 $\mu\text{mole/นาที่/โปรตีน}$ 8.2 μg คิดเป็นค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีเท่ากับ 3.756 หน่วย (unit : $\mu\text{mole NADH produced/min/mg protein}$) (ตาราง 4) ซึ่งได้ความสัมพันธ์ระหว่างสเปซิฟิคแอคติวิตีของเอนไซม์ ADH กับค่า pH เป็นกราฟรูประฆังคว่ำ (ภาพประกอบ 9)

3.1.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ADH ณ pH 5.0

ผลการตรวจหาปริมาณ NADH ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ADH ณ pH 5.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่าเอนไซม์ ADH สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40°C โดยปริมาณ NADH เกิดขึ้น 0.0643 $\mu\text{mole/นาที่/โปรตีน}$ 16 μg คิดเป็นค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีเท่ากับ 4.018 หน่วย (ตาราง 5) ได้ความสัมพันธ์ระหว่างสเปซิฟิคแอคติวิตีกับอุณหภูมิ เป็นกราฟรูประฆังคว่ำ (ภาพประกอบ 10)

3.1.3 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ ADH

ผลการตรวจปริมาณ NADH ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ADH ณ pH 5.0 อุณหภูมิ 40°C เมื่อเก็บสารตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาต่าง ๆ กันพบว่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ADH จะมีค่าลดลง (ตาราง 6 และภาพประกอบ 11) ซึ่งถ้าเก็บไว้นานกว่า 4 วัน จะมีความสามารถในการทำงานเหลือไม่ถึง 50%

3.2 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ G6PDH

3.2.1 ศึกษาผลความเป็นกรด-ด่าง ต่อการทำงานของเอนไซม์ G6PDH

ผลการตรวจหาปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ G6PDH ที่อุณหภูมิ 25°C ณ ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ กันโดยวัดการดูดกลืนแสงของ NADPH ที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 nm. พบว่าเอนไซม์ G6PDH สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด ณ pH 9.5 โดยมีปริมาณ NADPH เกิดขึ้น 0.0154 $\mu\text{mole/นาที่/โปรตีน}$ 16 μg คิดเป็นค่าสเปซิฟิคแอคติวิตีเท่ากับ 0.9625 หน่วย (ตาราง 7 และภาพประกอบ 12)

3.2.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ G6PDH ณ pH 9.5

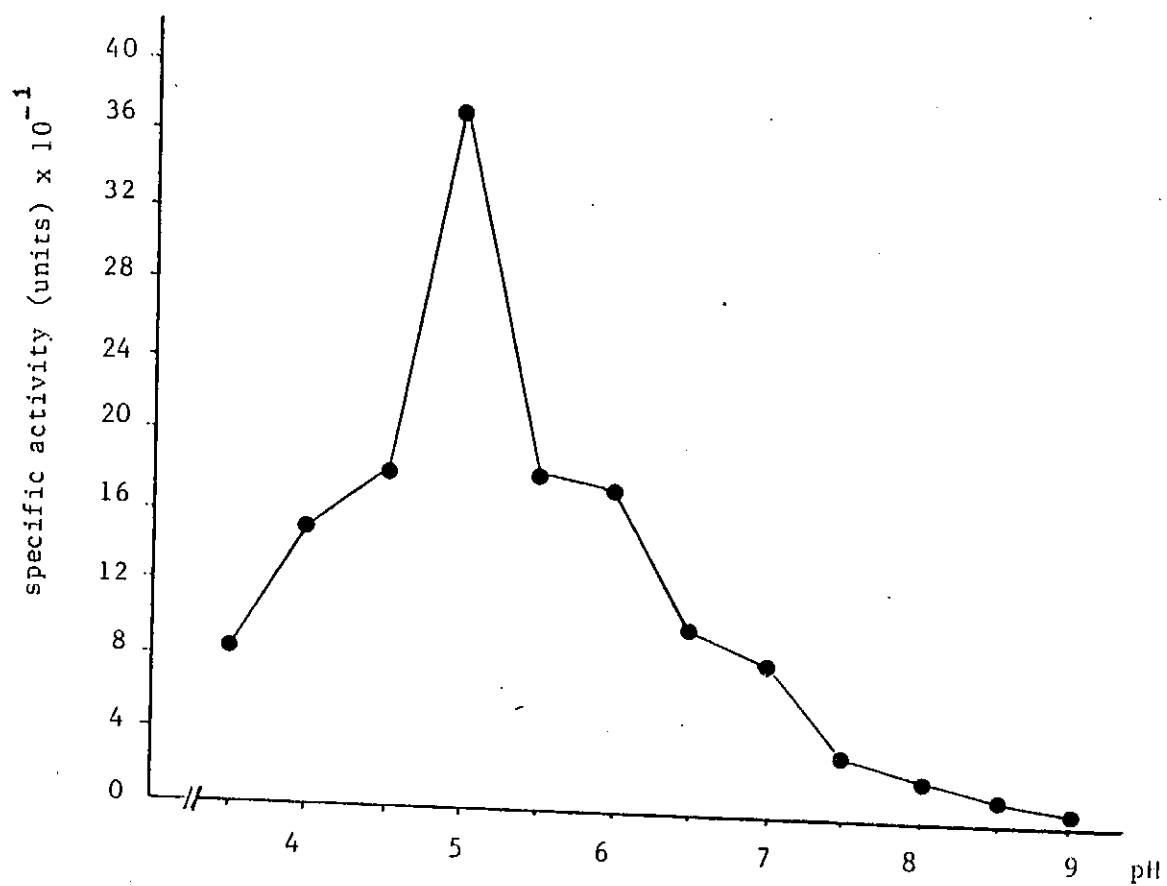
ผลการตรวจหาปริมาณ NADPH ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ G6PDH ณ pH 9.5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันพบว่าเอนไซม์ G6PDH สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40°C โดยมีปริมาณ NADPH เกิดขึ้น 0.0514 $\mu\text{mole/นาที่/โปรตีน}$ 16 μg คิดเป็นค่าสเปซิฟิคแอกติวิตีเท่ากับ 3.215 หน่วย (ตาราง 8) โดยมีความสัมพันธ์ของค่าสเปซิฟิคแอกติวิตีกับอุณหภูมิเป็นรูปประขังคว่ำ (ภาพประกอบ 13)

3.2.3 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ G6PDH

ผลการตรวจปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ G6PDH ณ pH 9.5 อุณหภูมิ 40°C เมื่อเก็บสารตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ G6PDH ได้ถึง 5 วัน โดยความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลงเพียง 10% เท่านั้น หลังจากนั้นเอนไซม์จะสูญเสียความสามารถในการทำงานอย่างรวดเร็วโดยเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 9 วัน เหลือค่าแอกติวิตีประมาณ 50%

ตาราง 4 แสดงค่าสเปกโตรโฟตริกแอคติวิตีของเอนไซม์ ADH ณ pH ต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 25°C ความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง (final concentration) 0.0082 mg/ml

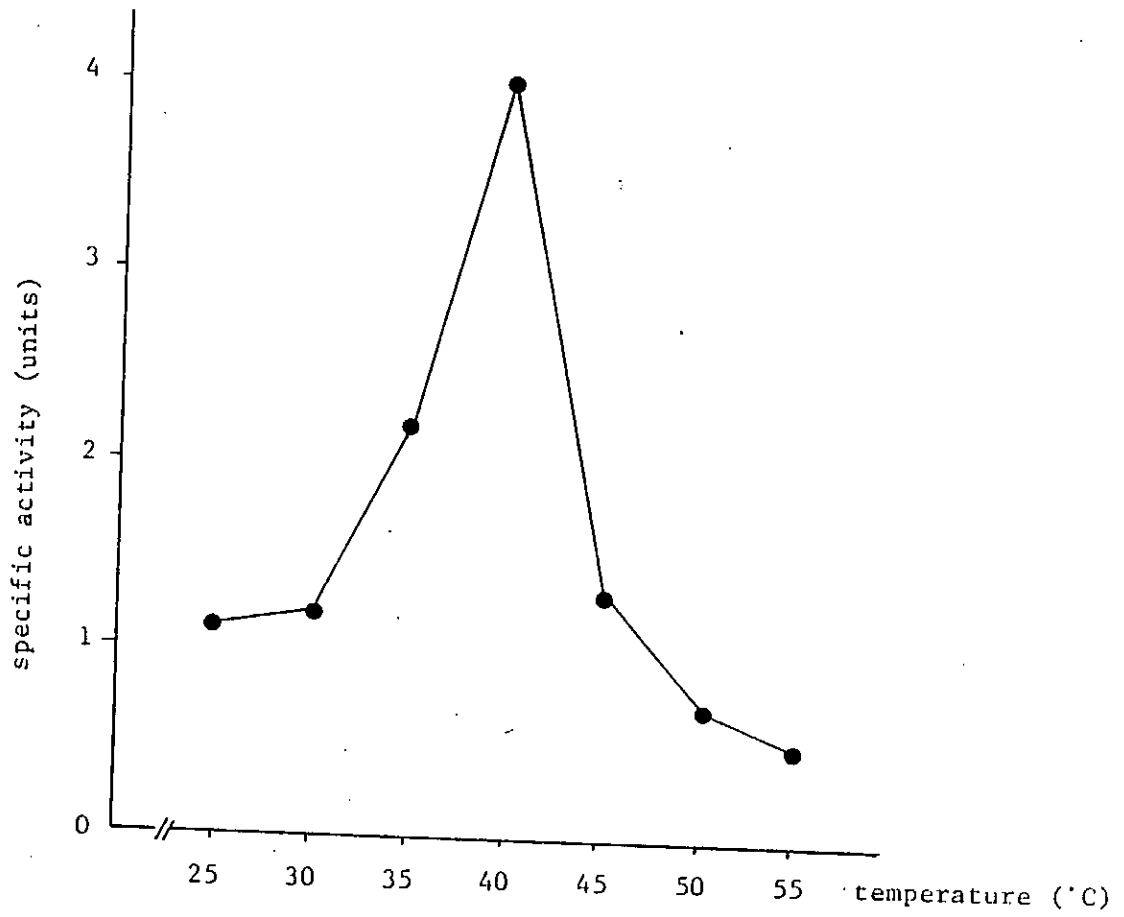
pH	$O D_{340}$ nm/min	NADH produced (μ mole/min)	specific activity (units)
3.5	0.051	0.0081	0.987
4.0	0.082	0.0131	1.597
4.5	0.095	0.0152	1.853
5.0	0.192	0.0308	3.756
5.5	0.092	0.0154	1.878
6.0	0.088	0.0140	1.707
6.5	0.054	0.0086	1.048
7.0	0.042	0.0067	0.817
7.5	0.018	0.0028	0.341
8.0	0.011	0.0017	0.207
8.5	0.006	0.0009	0.109
9.0	0.005	0.0008	0.097



ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงผลความเป็นกรด-ด่าง ที่มีคอสเปซิฟิกแอคทีวิตีของเอนไซม์
ADH ที่อุณหภูมิ 25 °C

ตาราง 5 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ADH ณ pH 5.0 ความเข้มข้นของโปรตีน
ในหลอดตัวอย่าง (final concentration) 0.016 mg/ml

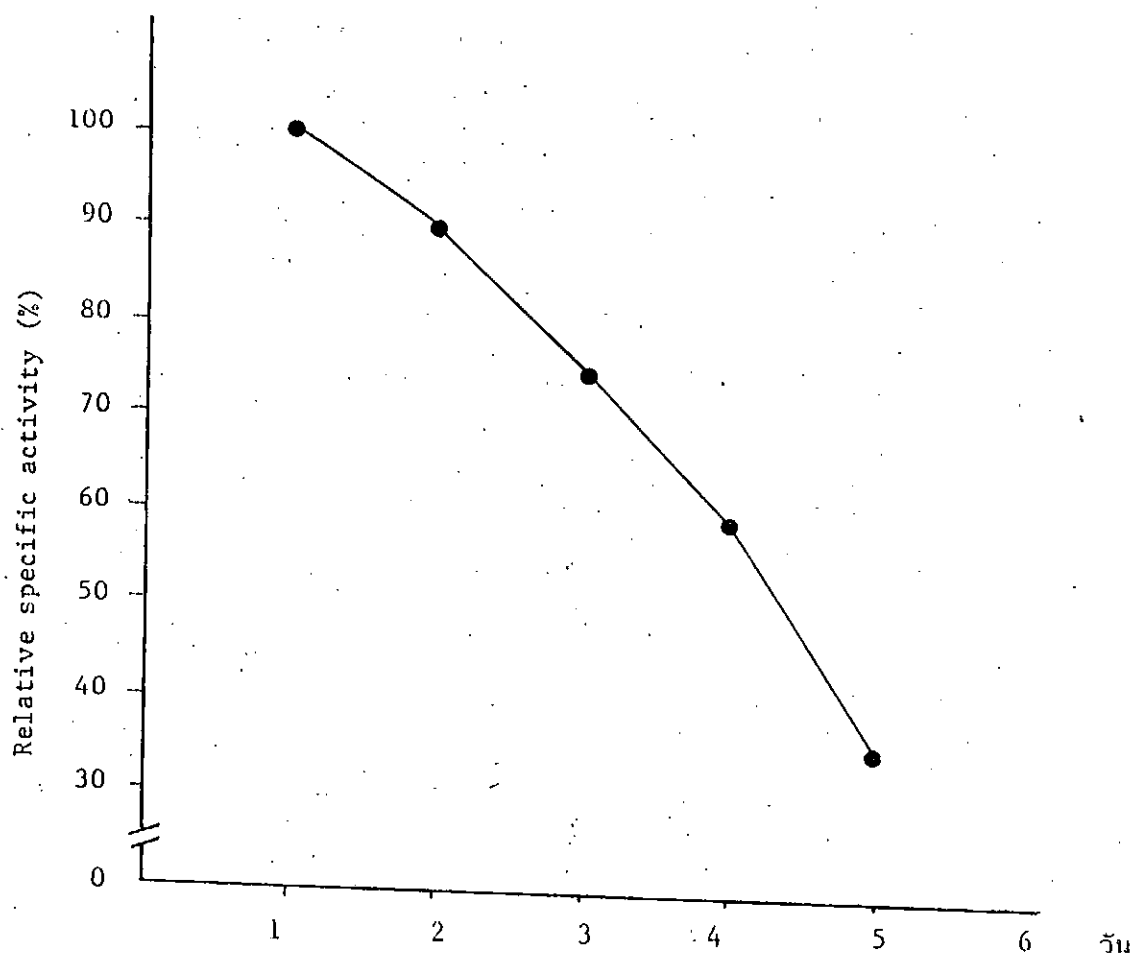
Temperature (°C)	O D _{340 nm/min}	NADH produced (μ mole/min)	specific activity (units)
25	0.110	0.0176	1.100
30	0.120	0.0192	1.200
35	0.240	0.0385	2.406
40	0.400	0.0643	4.018
45	0.080	0.0128	1.280
50	0.072	0.0115	0.720
55	0.050	0.0008	0.500



ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่าสเปซิฟิคแอกติวิตีของเอนไซม์ ADH ที่ pH 5.0

ตาราง 6 แสดงค่าสเปซฟิคแอกติวิตีของเอนไซม์ ADH ที่เก็บไว้ ๗ อุณหภูมิ 4°C ในระยะเวลาต่าง ๆ
 กันโดยให้เอนไซม์ทำงานที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40°C ความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง
 0.016 mg/ml

Time (days)	OD _{340 nm/min}	NADH produced (μ mole/min)	specific activity (units)	Relative specific activity (%)
1	0.400	0.0643	4.018	100
2	0.362	0.0581	3.631	90.36
3	0.300	0.0482	3.012	74.96
4	0.233	0.0374	2.337	58.16
5	0.133	0.0213	1.331	33.12

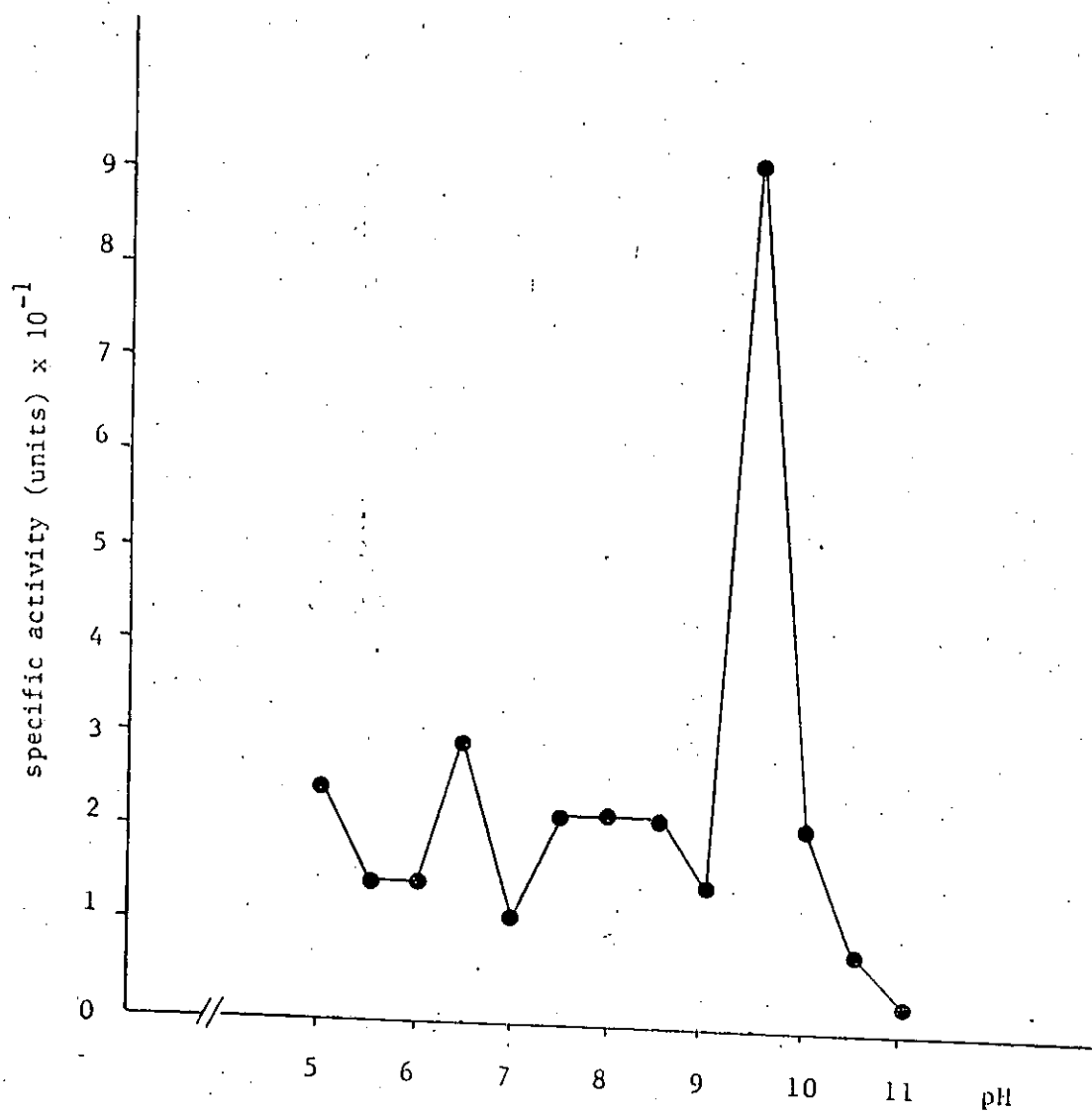


ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงความคงตัวของเอนไซม์ ADH ๗ อุณหภูมิ 4°C

โดยเอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40°C

ตาราง 7 แสดงค่าสเปซิฟิคแอกติวิตีของเอนไซม์ G6PDH ณ pH ต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 25°C ความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง 0.016 mg/ml

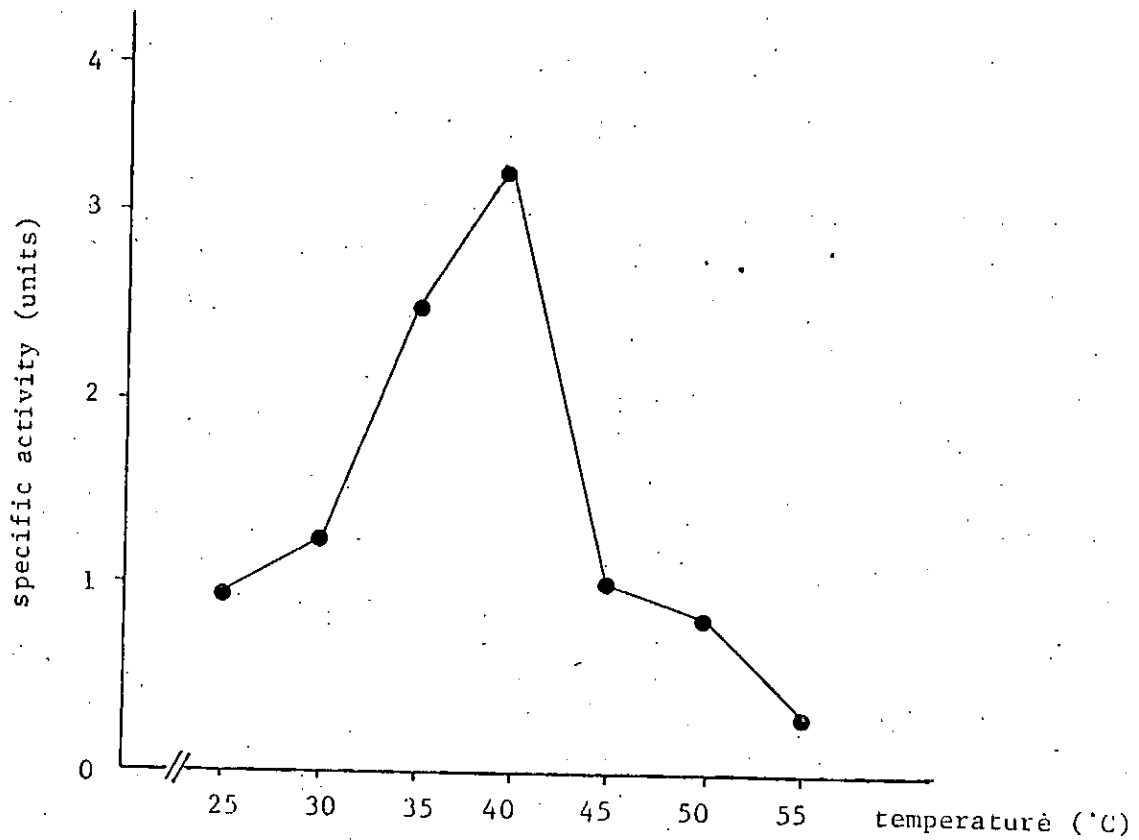
pH	$O D_{340} \text{ nm/min}$	NADPH produced ($\mu \text{ mole/min}$)	specific activity (units)
5.0	0.026	0.0041	0.256
5.5	0.016	0.0025	0.156
6.0	0.016	0.0025	0.156
6.5	0.032	0.0051	0.318
7.0	0.013	0.0020	0.125
7.5	0.024	0.0038	0.237
8.0	0.024	0.0038	0.237
9.0	0.016	0.0025	0.156
9.5	0.096	0.0154	0.963
10.0	0.021	0.0033	0.206
10.5	0.008	0.0012	0.075
11.0	0.003	0.0004	0.025



ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงผลของความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ C6PDH ที่อุณหภูมิ 25 °C

ตาราง 8 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ G6PDH ณ pH 9.5 ความเข้มข้นของ
โปรตีนในหลอดตัวอย่าง 0.016 mg/ml

Temperature (°C)	O.D. ₃₄₀ nm/min	NADPH produced (μ mole/min)	specific activity (units)
25	0.096	0.0154	0.963
30	0.120	0.0192	1.206
35	0.240	0.0395	2.412
40	0.320	0.0514	3.215
45	0.106	0.0170	1.066
50	0.083	0.0133	0.834
55	0.033	0.0050	0.332

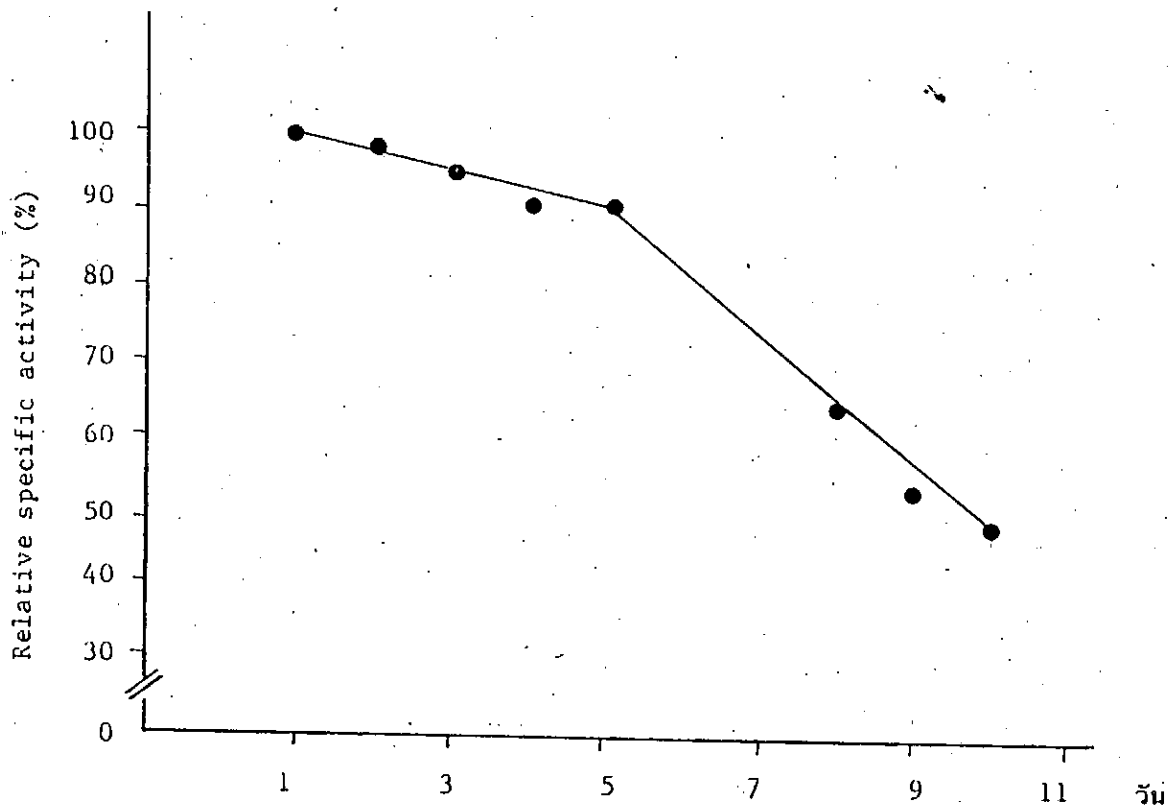


ภาพประกอบ 13 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อสเปกตรัมของเอนไซม์ C6PDH

ที่ pH 9.5

ตาราง 9 แสดงค่าสเปกโทรโฟโตเมตริกของเอนไซม์ G6PDH ที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 4°C ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยเอนไซม์ทำงานที่ pH 9.5 อุณหภูมิ 40°C ความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง 0.016 mg/ml

Time (days)	OD _{340 nm/min}	NADPH produced (μ mole/min)	specific activity (units)	relative activity (%)
1	0.320	0.0514	3.213	100
2	0.314	0.0504	3.155	98.19
3	0.304	0.0498	3.054	95.05
4	0.292	0.0469	2.934	91.31
5	0.292	0.0469	2.934	91.31
8	0.209	0.0336	2.100	65.35
9	0.172	0.0276	1.728	53.78
10	0.159	0.0255	1.597	49.70



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความคงตัวของเอนไซม์ G6PDH ณ อุณหภูมิ 4°C โดยให้
เอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่ pH 9.5 อุณหภูมิ 40°C

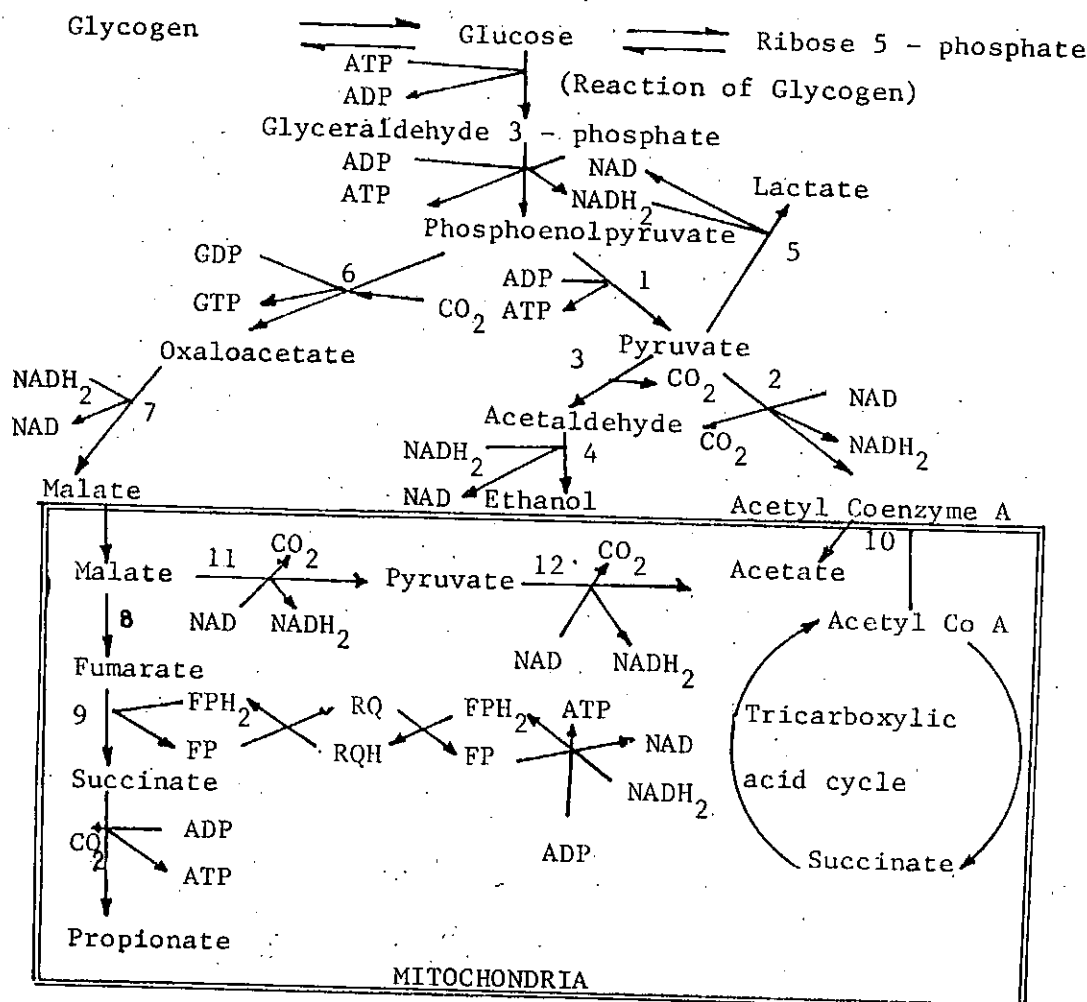
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษาค้นคว้า

1. จากตัวอย่างพยาธิตัวจิ๋วระยะติดต่อกันจำนวน 1,950 ตัว สกัดเป็นสารตัวอย่าง 3.5 ml หยดปริมาณโปรตีนทั้งสิ้น 11.82 mg คิดเป็นความเข้มข้นของโปรตีน 3.38 mg/ml
2. พบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ADH และ G6PDH ในส่วนของสารตัวอย่าง
3. สมบัติของเอนไซม์ ADH ที่ตรวจพบในสารตัวอย่างสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 40°C และเมื่อเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 4 วัน ความสามารถในการทำงานลดลง 40% และสมบัติของเอนไซม์ G6PDH สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 9.5 ณ อุณหภูมิ 40°C เมื่อเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 4 วัน ความสามารถในการทำงานลดลง 10%
4. จากการแยกโปรตีน และเอนไซม์ของพยาธิตัวจิ๋วระยะติดต่อกันด้วยวิธีโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่าได้โปรตีน 20 แถบ และจากการทำ enzyme stain ได้แถบเอนไซม์ ADH และ G6PDH อย่างละ 1 แถบ ซึ่งตรงกับโปรตีนแถบที่ 20 และ 14 ตามลำดับ

อภิปรายผลการทดลอง

การสร้างพลังงาน (ATP) และรีดิวซ์ซึ่งอิกวิวาเลนซ์ (NADH ; NADPH) เพื่อการดำรงชีวิตของหนอนพยาธิจะต้องอาศัยกระบวนการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ทั้งใช้ออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน (aerobic and anaerobic carbohydrate metabolism) โดยทั่วไปมักสะสมอาหารในรูปของไกลโคเจน (glycogen) ประมาณ 1 - 60% ของน้ำหนักตัวแห้ง เส้นทางของกระบวนการสร้างพลังงานที่เกิดขึ้นได้เสมอมี 4 รูปแบบ คือ glycolysis ; carbondioxide fixation, tricarboxylic acid cycle pentose phosphate pathway (Bryant 1975 : 84 - 115) (ภาพประกอบ 15) โดยเฉพาะ : pentose phosphate pathway มีรายงานการศึกษาในพยาธิหลายชนิดว่า

CYTOSOL

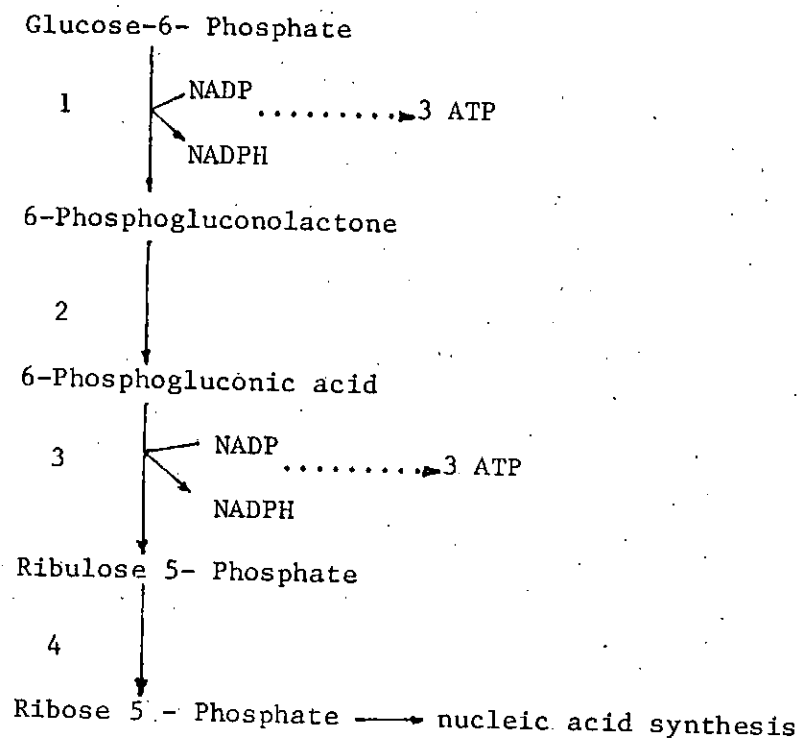
ภาพประกอบ 15 แสดงกระบวนการสร้างพลังงานของหนองพยาธิ

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1: Pyruvate kinase | 7: Malate dehydrogenase |
| 2: Pyruvate dehydrogenase complex | 8: Fumarate hydratase |
| 3: Pyruvate decarboxylase | 9: Fumarate reductase |
| 4: Alcohol dehydrogenase | 10: Acetyl Co A synthetase |
| 5: Lactate dehydrogenase | 11: Malate dehydrogenase (decarboxylating) |
| 6: Phosphoenolpyruvate carboxykinase | 12: Pyruvate dehydrogenase |

อาศัยกระบวนการนี้ในการสร้าง ATP เช่น ใน Ascaris lumbricoides (Delay and Vercryse. 1955 : 615 - 616) ; Anisakis sp. Phocanema sp. Contracaecum sp. และ Sulcuscaris sp. (Cain and Raj. 1980 : 56 - 67) Echinoccus granulosus (Agosin and Aravena. 1960 : 28 - 38) และ Leishmania donovani (Ghosh and Datta. 1970 : 103 - 109) โดยรีดิวซ์นิโคตินาดีน (NADPH) ที่สร้างขึ้นจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน กรดอะมิโน และเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate) จะนำไปสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก Pentose phosphate pathway จะเกิดขึ้นในส่วนของไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ของเซลล์โดยเปลี่ยนน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (pentose) ซึ่งจะได้พลังงานในรูปของ NADPH 2 โมเลกุล หรือ 6 ATP ต่อกลูโคส 1 โมเลกุล มี G6PDH เป็นเอนไซม์เริ่มแรกของกระบวนการโดยจะออกซิไดส์ G6P เป็น 6-phosphogluconolactone (White Handler and Smith. 1973 : 260) (ภาพประกอบ 16)

การศึกษาเอนไซม์ในพยาธิตัวจิ๋วระยะติดต่อครั้งนี้พบเอนไซม์ ADH และ G6PDH ในส่วนใสของเซลล์โดยตรวจสอบได้จากค่าของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm เพิ่มขึ้นเมื่อใช้สับสเตรทและโคเอนไซม์ที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งแสดงว่ามีผลิตภัณฑ์ NADH หรือ NADPH เกิดขึ้น และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปใน 1 นาทีแรกมาคำนวณค่า specific activity ของเอนไซม์ทั้งสองพบว่า เอนไซม์ ADH มี specific activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 40°C และ pH 5.0 ส่วนเอนไซม์ G6PDH มี specific activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 40°C และ pH 9.5

เคน และราช (Cain and Raj. 1980 : 56 - 67) ได้รายงานว่าพบเอนไซม์ ADH ในโปรตีนส่วนใสที่สกัดได้จากพยาธิตัวกลม 4 ชนิดคือ Anisakis sp. Phocanema sp. Contracaecum sp. และ Sulcuscaris sp. โดยใช้ 2-บิวทานอล (2-butanol) เป็นสับสเตรทและ NAD เป็นโคเอนไซม์ในขณะที่โล และแซง (Lo and Chaeng. 1982 : 372 - 377) พบเอนไซม์ ADH ในโปรโตซัว (Entamoeba histolytica) โดยใช้เอทานอลเป็นสับสเตรทและ NADP เป็นโคเอนไซม์ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ADH ในพยาธิตัวจิ๋วระยะติดต่อโดยใช้ 2-บิวทานอล เป็นสับสเตรทและ NAD เป็นโคเอนไซม์ พบว่า NADH ที่เกิดขึ้นมีค่าแปรปรวนไม่สามารถทำการทดลองซ้ำเพื่อให้ได้ผลเช่นเดิมได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากความยุ่งยากในการเตรียมสารละลาย 2-บิวทานอล ให้ได้ความเข้มข้นคงที่เพราะความสามารถในการละลายของ 2-บิวทานอล



ภาพประกอบ 16 แสดงกระบวนการสร้างพลังงานโดยวิถี Pentose Phosphate Pathway

- 1: Glucose-6-phosphate dehydrogenase
- 2: Lactonase
- 3: 6-phosphogluconate dehydrogenase
- 4: Phosphopentose isomerase

ที่น้อยมาก และเมื่อเปลี่ยนมาใช้เอทานอลเป็นสับสเตรท และ NADP เป็นโคเอนไซม์ผลปรากฏว่าไม่มี NADPH เกิดขึ้น แสดงว่าเอนไซม์ ADH ในพยาธิตัวจิตรระยะติดต่อดังกล่าวไม่สามารถใช้ NADP เป็นโคเอนไซม์ได้ จึงได้เปลี่ยนมาใช้ NAD เป็นโคเอนไซม์แทน และใช้เอทานอลเป็นสับสเตรทแทนที่จะใช้ 2-บิวทานอล เพื่อตัดปัญหาที่ยากในการเตรียมสารละลายซึ่งทำให้ตรวจพบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ADH ได้ จึงพอจะสรุปได้ว่าเอนไซม์ ADH ในพยาธิตัวจิตรระยะติดต่อดังกล่าวสามารถใช้ 2-บิวทานอล หรือเอทานอล เป็นสับสเตรทได้แต่ต้องใช้ NAD เป็นโคเอนไซม์เท่านั้น

ส่วนเอนไซม์ G6PDH ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้ G6P เป็นสับสเตรท และ NAD เป็นโคเอนไซม์ แต่ไม่สามารถตรวจพบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ G6PDH ในพยาธิตัวจิตรระยะติดต่อดังกล่าวได้จึงเปลี่ยนโคเอนไซม์เป็น NADP ผลปรากฏว่าตรวจพบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ G6PDH สอดคล้องกับการศึกษาของดีเลย์ และเยอร์คริสส์ (Delay and Yercrysse. 1955 : 615 - 616) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าพบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ G6PDH ในพยาธิตัวกลม (Ascaris lumbricoides) เมื่อใช้ G6P เป็นสับสเตรท และ NADP เป็นโคเอนไซม์โดยมีการออกซิไดซ์ G6P ไปเป็น 6-phosphogluconolactone

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ตัวอ่อนระยะติดต่อดังกล่าวของพยาธิตัวจิตรดำรงชีวิตส่วนหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ ADH และ G6PDH ในกระบวนการสร้างพลังงานตามวิถีทางของ glycolysis และ pentose phosphate ทำให้ได้พลังงาน 2 ATP จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ ADH และ 6 ATP จากปฏิกิริยาการออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ G6PDH คอกลูโคส 1 โมเลกุล อันเป็นประโยชน์ต่อการเคลื่อนที่ของพยาธิตัวจิตรเพื่อแทรกไปตามเนื้อเยื่อของผู้ให้อาศัย (host) ในสภาพที่ขาดออกซิเจนได้เป็นอย่างดี และจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ADH ยังให้ NAD กลับคืนสู่วิถีทางของ glycolysis อันจะเป็นประโยชน์ต่อการสร้างพลังงานต่อไป (มนครี จุฬารัตน และคนอื่น ๆ. 2530 : 229 - 238)

ผลการศึกษาสมบัติทางอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีนและเอนไซม์พบว่าแถบโปรตีนของพยาธิตัวจิตรระยะติดต่อดังกล่าวเด่นชัดในแผ่นเจล 20 แถบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของรุ่งลารรณ (รุ่งลารรณ ไพรวรรณ. 2528) กล่าวว่าโปรตีนจากตัวอ่อนระยะติดต่อดังกล่าวมีอย่างน้อย 20 ชนิด เมื่อแยกโดยวิธีโพลีอะคริลอไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า โปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในพยาธิตัวจิตรระยะติดต่อดังกล่าวจะปรากฏแถบค่อนข้างไปทางซ้ายของแผ่นเจลมากกว่าทางขวามาก ซึ่งแสดงว่าใน pH 8.9 โปรตีนส่วนใหญ่มีประจุสุทธิเป็นลบไม่มาก และ/หรือมีขนาดค่อนข้างใหญ่ จึงเคลื่อนที่ไปยัง

ชีวบวกได้เข้าและพบว่าโปรตีนแถบที่ 14 (จากชีวลบ) อาจเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ G6PDH เนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ G6PDH ได้ตรงกับโปรตีนแถบที่ 20 ซึ่งเป็นโปรตีนแถบสุดท้ายทางชีวบวกก็อาจเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ ADH เนื่องจากตรงกับตำแหน่งของเอนไซม์ ADH ที่ยับยั้งได้ ซึ่งพอจะเปรียบเทียบได้ว่า เอนไซม์ ADH มีขนาดเล็กกว่าเอนไซม์ G6PDH ถ้าเอนไซม์ทั้งสองมีประจุลบสุทธิเท่ากัน ณ. pH 8.9 หรือเอนไซม์ G6PDH มีประจุลบสุทธิน้อยกว่าเอนไซม์ ADH ถ้าเอนไซม์ทั้งสองมีขนาดใกล้เคียงกันซึ่งต้องทำการทดลองต่อไปด้วยเทคนิค เจลฟิลเตรชัน เพื่อหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ทั้งสองว่าต่างกันอย่างไร

จากการศึกษาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ADH และ G6PDH พบว่าเอนไซม์ ADH สามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิโดซ์เอทธานอลได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ณ อุณหภูมิ 40°C และสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ที่ 4°C ได้ประมาณ 3-4 วันโดยยังคงมีแอกติวิตีเหลือมากกว่า 50% ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของโลและแซง (Lo and Chaeng. 1982 : 372 - 377) กล่าวว่าเอนไซม์ ADH ที่สกัดจากเซลล์ของ *Entamoeba histolytica* สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 6.5 เมื่อเก็บสารตัวอย่างไว้ที่ 4°C ปฏิกิริยาคงสภาพได้ 4-5 วัน แต่ถ้าเก็บ ณ อุณหภูมิ -40°C จะคงสภาพได้นานกว่า ส่วนเอนไซม์ G6PDH สามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิโดซ์ G6P ได้ดีที่สุด pH 9.5 ณ อุณหภูมิ 40°C และเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 5 วัน ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงเพียง 10% และพบว่าสามารถเก็บได้นานถึง 9. วัน โดยที่ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ยังเหลือถึง 50% สอดคล้องกับการทดลองของโกชิน และอราเวนา (Agosin aravana. 1960 : 28 - 38) กล่าวว่าเอนไซม์ G6PDH จากเซลล์ที่สกัดได้ของพยาธิ *Echinococcus granulosus* สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 9.0 จึงนับว่าเป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างในขณะที่เอนไซม์ ADH ทำปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ ADH และ G6PDH เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 40°C ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมปกติคือ 37°C อาจเป็นไปได้ว่าพยาธิตัวจี๊ดระยะติดต่อ เมื่อเข้าสู่คนโดยบังเอิญจะใช้เอนไซม์ ADH และ G6PDH ในขบวนการสร้าง ATP เพื่อการดำรงชีพและการเคลื่อนตัวแทรกไปตามกล้ามเนื้อของผู้ให้อาศัย ส่วนในผู้ให้อาศัยที่แท้จริงเช่น แมว, สุนัข, เลือ ฯลฯ พยาธิตัวจี๊ดระยะติดต่อจะมีการสร้างก้อนทุมบริเวณผนังด้านในของกระเพาะอาหาร ดังนั้นอาจใช้เอนไซม์ ADH ซึ่งทำงานได้ดีในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรดของกระเพาะอาหารเพื่อการสร้างพลังงาน สำหรับการแพร่พันธุ์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การเก็บตัวอย่างพยาธิตัวจิ๋วจากปลาไหลน้ำจืด ควรกระทำในช่วงฤดูฝนจะทำให้การติด เชื้อพยาธิมีจำนวนมาก
2. ในการศึกษาเรื่องเอนไซม์ในพยาธิควรเก็บพยาธิที่สด และมีน้ำหนักไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง เพื่อไม่ให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เสียไปมาก
3. ควรแยกประเภทตัวอย่างพยาธิตัวจิ๋วในปลาไหลน้ำจืดตามลักษณะทางกายภาพ
4. ควรเปรียบเทียบแลบเอนไซม์ต่าง ๆ ของตัวอ่อนกับตัวเต็มวัยพยาธิตัวจิ๋วเพื่อศึกษาข้อแตกต่างเพื่อเป็นประโยชน์ในด้านเภสัชวิทยาต่อไป
5. ควรศึกษาเอนไซม์อื่น ๆ ในพยาธิตัวจิ๋วระยะติดต่อกต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ธรัตน์ มหายศนันท์. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บางชนิดในระยะติดตัวของพยาธิตัวจิ๊ด.
ปริญญาณพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530.
อัดสำเนา.
- พวงน้อย ณ สงขลา. "Gnathostomiasis," วัชรเวชสาร. 27(1) : 316 - 321 ;
พฤศจิกายน 2526.
- พิชิต สุวรรณประกร. "การรักษาโรคพยาธิตัวจิ๊ดด้วย Levamisole," วารสารแพทยสภาสาร.
6(1) : 273 - 276 ; มิถุนายน 2529.
- รุ่งลาวรรณ ไพรวรรณ. ภูมิคุ้มกันต้านในระบบภูมิคุ้มกันชนิดของเหลวในหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๊ด.
ปริญญาณพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2528.
อัดสำเนา.
- มนตรี จุฬวัฒน์ทล และคนอื่น ๆ. ชีวเคมี. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล, 2530.
- สวัสดิ์ แดงสว่าง. "โรคพยาธิตัวจิ๊ด, วงชีวิตพยาธิตัวจิ๊ดและการติดต่อ," จดหมายเหตุแพทย์
สมาคมแห่งประเทศไทย. 20(1) : 116 ; พฤศจิกายน 2480.
- สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน และสถิตย์ ลีรสิงห์. "การวิเคราะห์แอนติเจนของพยาธิใบไม้ในตับ
(*opisthorchis viverrini*)," ใน บทความการประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 10. หน้า 262 - 263. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่, 2527. อัดสำเนา.
- โสพิศ มงคลศิริเกียรติ. "หลักการและเทคนิค Electrophoresis," ใน บทความการประชุม
เชิงปฏิบัติการ. หน้า 127 - 138. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2529.
อัดสำเนา.
- อ๋องน เกียรติวุฒิ และบุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ. การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต. กรุงเทพฯ :
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2527.

- Agatsuma, Tokeshi and Noriji Suzuki. "Electrophoretic Studies on Enzymes in Paragonimus spp. I. Comparison of Isozyme Patterns between P. ohirai and P. miyazaki," Japanese Journal Parasitology. 30(1) : 37 - 43 ; February, 1981.
- Agosin, Moises and Luisa Aravena. "Studies on the Metabolism of Echinococcus granulosus. IV. Enzymes of the Pentose Phosphate Pathway," Experimental Parasitology. 10(2) : 28 - 36 ; June, 1960.
- Bryant, C. "Biochemistry," in Modern Parasitology. P. 84 - 115. London : Black well Scientific publications, 1982.
- Bursey, C.C., J.A. Mackenzie and M.D.B. Burt. "Polyacrylamide gel Electrophoresis in the differentiation of Taenia (Cestoda) by total protein," International Journal for Parasitology. 10(2) : 167 - 174 ; June, 1980.
- Cain, George D. and R. Kaleysa Raj. "Anisakis, Phocanema, Contracaecum, and Sulcascaris spp. Electrophoresis and Thermostability of Alcohol and Malate Dehydrogenase from Larva," Experimental Parasitology. 49(1) : 56 - 67 ; February, 1980.
- Delay, J. and R. Vercryse. "Glucose -6 phosphate and gluconate-6-phosphate dehydrogenase in worms," Biochimicaet Biophysica Acta. 16(1) : 615 - 616 ; February, 1955.
- Lo, H.S. and C.J. Chaeng. "Purification and properties of NADP - linked, Alcohol dehydrogenase from Entamoeba histolytica," Journal parasitology. 68(3) : 372 - 377 ; June, 1982.
- Lockwood, B.C, M.J. North and G.H. Coombs. "Trichomonas vaginalis, Trichomonas foetus and Trichomitus batrachorum : Comparative Proteolytic Activity," Experimental Parasitology. 58(3) : 245 - 253 ; December, 1984.
- Lowry, O. and others. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," Journal of Biological Chemistry. 193(1) : 265 - 275 ; June, 1951.
- Matsuda, Koremitsu. "Enzymatic Studies on the Toxin of Gnathostoma spinigerum. (Japan with English abstract)," Fukuoka Acta Medicine. 50(1) : 2301 - 2321 ; 1959.
- Miyazaki, Ichiro. "On the Genus Gnathostoma and Human Gnathostomia with Special Reference to Japan," Experimental Parasitology. 9(1) : 338 - 370 ; June, 1960.
- _____. "Gnathostoma and Gnathostomiasis in Japan," in Medical Parasitology in Japan. P. 531 - 585. Japan : Sankyo Biijutsu Company, 1966.

- Pappas, Peter W. and Lisa L. Schroeder. "Hymenolepis microstoma : Lactate and Malate Dehydrogenase of the Adult Worm," Experimental Parasitology. 74(2) : 134 - 130 ; April, 1979.
- Rangel, H.A. and others. "Trypanosoma cruzi : Isolation and Characterization of a Proteinase," Experimental Parasitology. 52(1) : 199 - 209 ; October, 1981.
- Swasti Daengsvang. "The World's First - story of Cnathostoma spinigerum. Infection in the Yong Thai Woman," Journal Parasitology Tropical Medicine Associate Thailand. 6(1) : 1 - 10 ; November, 1983.
- _____. "Gnathostoma spinigerum," Journal Parasitology Tropical Medicine Associate Thailand. 4(2) : 53 - 63 ; November, 1981.
- Umezurike, Gabriel M. and Anya O. Anya. "Carbohydrate energy metabolism in Fasciola gigantica (Trematoda)," International Journal for Parasitology. 10(1) : 175 - 180 ; June, 1980.
- York, W. and Maplestone, P.R. The nematode parasites of Vertebrates. London : Hafner Publishing Company, 1969.

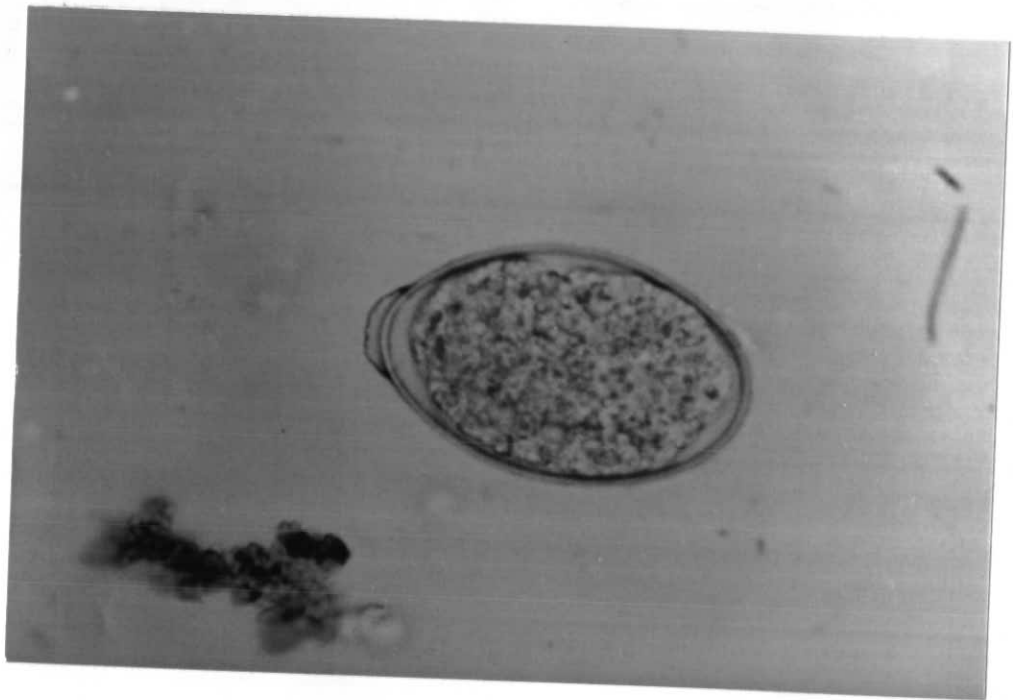
การคำนวณ



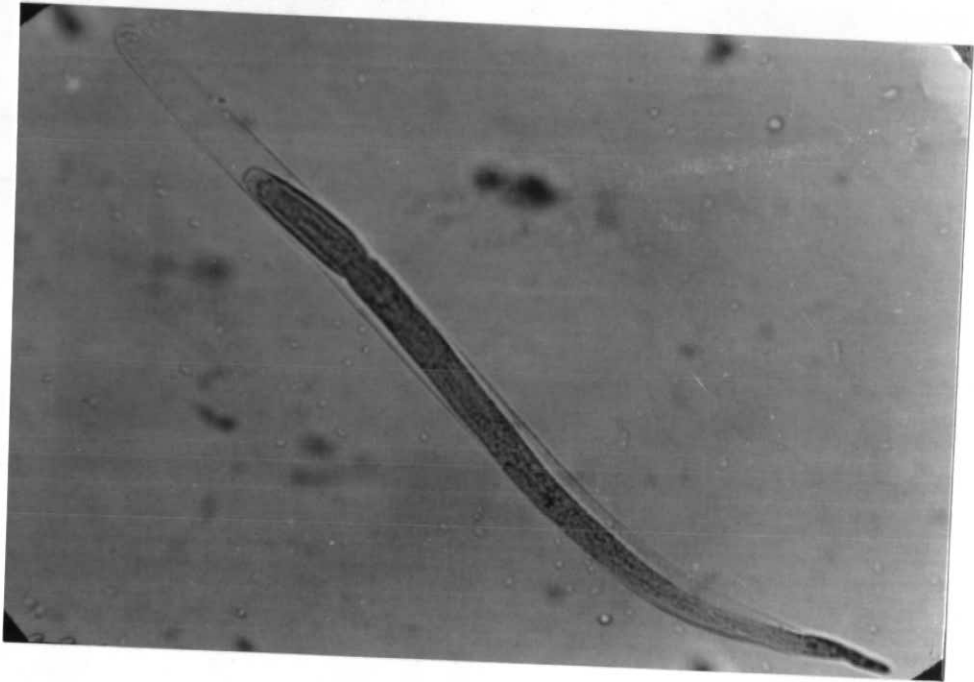
1. ลักษณะพยาธิตัวจิ๋ว



ภาพประกอบ 17 ภาพถ่ายแสดงตัวแก่พยาธิตัวจิ๋ว



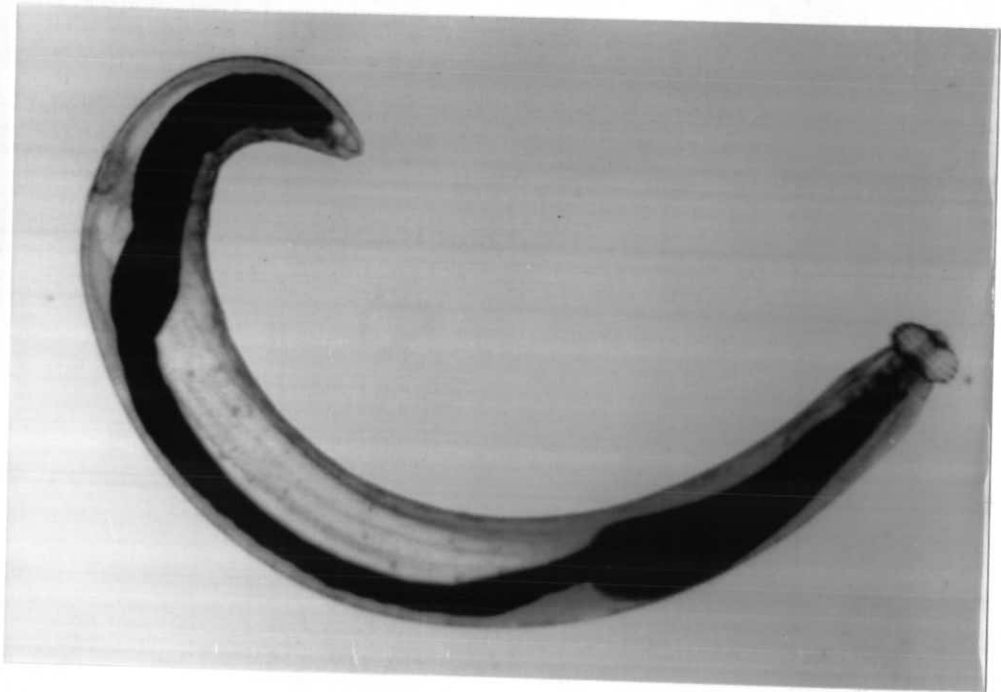
ภาพประกอบ 18 ภาพถ่ายแสดงลักษณะไข่พยาธิตัวจิ๋ว (x 100)



ภาพประกอบ 19 ภาพถ่ายแสดงตัวอ่อนระยะที่หนึ่งของพยาธิตัวจิ๊ด (x 100)



ภาพประกอบ 20 ภาพถ่ายแสดงตัวอ่อนระยะที่สองของพยาธิตัวจิ๋ว (x 100)



ภาพประกอบ 21 ภาพถ่ายแสดงตัวอ่อนระยะที่สามของพยาธิตัวจิ๋ว (X 200)

2. การเตรียมสารเคมี

Acrylamide : Bis-acrylamide (30 : 0.8 เปอร์เซ็นต์)

Acrylamide	30.0	g
Bis-acrylamide	0.8	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	100	ml

เขย่าให้ละลายถ้ามีส่วนที่ไม่ละลายให้กรองเอาตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออกและเก็บสารละลาย
ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C สารละลายนี้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน

1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.9

Tris	36.33	g
น้ำกลั่น	180	ml
ปรับ pH ด้วย 6M HCl ให้ได้ pH	8.9	
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200	ml
เก็บสารละลายในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ	4°C	

0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8

Tris	6.005	g
น้ำกลั่น	85	ml
ปรับ pH ด้วย 6M HCl ให้ได้ pH	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	100	ml
เก็บสารละลายในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ	4°C	

N,N,N',N' - tetramethylene diamine (TEMED) 10 เปอร์เซ็นต์

TEMED	2.0	ml
น้ำกลั่น	18.0	ml

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (5 เปอร์เซ็นต์) เตรียมเมื่อต้องการใช้

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0.05	g
น้ำกลั่น	1.0	ml

Polyacrylamide gel (running gel) pH 8.9 10 เปอร์เซ็นต์

Acrylamide : Bis-acrylamide	3.33	ml
1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.9	2.50	ml
น้ำกลั่น	4.05	ml
TEMED 10 เปอร์เซ็นต์	0.02	ml

นำสารละลายที่ได้ไปดูดอากาศออก (deair) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้น

นำมาเติม

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 5 เปอร์เซ็นต์	0.1	ml
---	-----	----

เขย่าเบา ๆ ให้สารละลายเข้ากันดีนำไปบรรจุในบล็อกรันที่ ปิดหน้าเจลด้วย

น้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยเพื่อให้หน้าเจลเรียบเมื่อแข็งตัว

Polyacrylamide gel (spacer gel) pH 6.8 4 เปอร์เซ็นต์

Acrylamide : Bis-acrylamide	0.665	ml
0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8	1.25	ml
น้ำกลั่น	2.965	ml
TEMED 10 เปอร์เซ็นต์	0.02	ml
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 5 เปอร์เซ็นต์	0.10	ml

Sample buffer (5x)

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

Eelectrophoresis chamber buffer pH 8.3

Tris	0.6	g
Glycine	2.88	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200.0	ml
เก็บสารละลายในตู้เย็น		

Coomassie Brilliant Blue R Stain

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

การคำนวณค่าสเปซิฟิคแอคทิวิตี (Specific activity) ของเอนไซม์

จากกฎของเบียร์ (Beer's Law)

$$\text{Absorbance (OD)} = -\log \frac{I}{I_0}$$

$$\text{หรือ OD} = \sum c l$$

เมื่อ I = ความเข้มของแสงหลังผ่านสาร

I_0 = ความเข้มของแสงก่อนผ่านสาร

$\sum$ = ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (molar extinction coefficient) ซึ่งมีค่าเฉพาะสำหรับสารหนึ่ง ๆ และที่ความยาวคลื่นหนึ่ง ๆ (ค่า $\sum$ ของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm คือ 6,220)

l = ความยาวของระยะทางที่แสงผ่านสารตัวอย่าง (1 cm)

c = ความเข้มข้นของสารละลายที่มีหน่วยเป็นโมลาร์ (M)

$$\text{ความเข้มข้นของ NADH} = \frac{\text{O.D}}{6,220 \times 1} \text{ M}$$

ความเข้มข้นของ NADH ในสารละลาย 1 ml

$$= \frac{\text{O.D}}{6.22} \mu \text{ mole/min}$$

ความเข้มข้นของ NADH ที่เปลี่ยนไปต่อ 1 นาที ในสารละลาย

$$= \frac{\text{O.D}}{6.22} \mu \text{ mole/min}$$

$$\text{สเปซฟิคแอกติวิตี} = \frac{\text{ปริมาณของ NADH ที่เปลี่ยนไปต่อ 1 นาที}}{\text{ปริมาณโปรตีนจากสารตัวอย่างที่ใช้}} \text{ Unit}$$

$$(\text{Unit} = \mu \text{mole/min/mg protein})$$

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวผกายดาว ชื่อสกุล บุญเริ่ม

เกิดวันที่ 2 เดือนกรกฎาคม

พุทธศักราช 2502

สถานที่เกิด

กรุงเทพมหานคร

สถานที่อยู่ปัจจุบัน

บ้านเลขที่ 25/6/45 ถนนประชาราษฎร์ ตำบลสวนใหญ่

อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน

อาจารย์

สถานที่ทำงานปัจจุบัน

โรงเรียนเซนต์คาเบรียล ตำบลสามเสน

เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2520 มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทยาศาสตร์) จากสตรีนนทบุรี

พ.ศ.2522 ป.กศ สูง (วิทยาศาสตร์) จากวิทยาลัยครูสวนดุสิต

พ.ศ.2524 กศ.บ (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

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