



แลคเตททีไฮโดรจีเนส ของพลาสโมเดียมเบอร์กี ไอ

บุญยืน สาริกะภูติ Ph.D.*

อุกมพันธ์ ขาลสุวรรณ วท.บ.*

บทคัดย่อ

เม็กลีอกแดงของหนูถีบจักรที่ติดเชื้อไข้มาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมเบอร์กี ไอ เมื่อนำมาแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอรีซิส โดยใช้เซลลูโลสอะซิเททเมมเบรน แล้วย้อมด้วยดี ปรากฏว่าแบนด์ของแลคเตททีไฮโดรจีเนสของพาราไซท์ แยกต่างไปจากของโฮสต์ โดยเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่าของโฮสต์ ทั้งนี้ได้ทดลองเปรียบเทียบกับแลคเตททีไฮโดรจีเนสของเม็กลีอกแดงของหนูถีบจักรปกติ

บทนำ

ใน ค.ศ. 1945 Speck และ Evans ได้แสดงให้เห็นว่าใน cell free extracts ของ *Plasmodium gallinaceum* มีเอ็นไซม์แลคเตททีไฮโดรจีเนส (LDH) Sherman (1961, 1963) ศึกษาโดยวิธีอิเล็กโตรฟอรีซิสบน starch gel block พบว่า LDH ของ *P. lophurae* และ *P. berghei* เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าแตกต่างไปจาก LDH ในเม็กลีอกแดงของ host Sherman (1961) หาค่า Michaelis constant (Km) ของ LDH ใน *P. lophurae* ได้เท่ากับ $1.9 \times 10^{-5} M$

และ Km ของ LDH ในเม็กลีอกแดงของเบ็ด ซึ่งเป็น host ได้เท่ากับ $1.7 \times 10^{-5} M$ สำหรับ pyruvate ส่วนค่า pH optimum มีค่าเท่ากันทั้งใน *P. lophurae* และใน host คือเท่ากับ 7.5 Pisphumvidhi และ Langer (1969) ได้ศึกษา LDH ของ cell-free extract ของเม็กลีอกแดงของหนูถีบจักรปกติและของ host - cell-free *P. berghei* เข้าพบว่า LDH ของ free parasite เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าแตกต่างไปจากของ host อย่างไรก็ตามที่ Pisphumvidhi และ Langer (1969) ได้รายงานว่า LDH ของเม็กลีอก

* ภาควิชาชีวเคมี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เลือดแดงของหนูถีบจักรที่มีเชื้อ P.berghei อยู่ปรากฏให้เห็นเพียง band เดียวเมื่อแยกโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสด้วย Polyacrylamide gel ผู้เขียนจึงได้ทำการทดลองแยก LDH ของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักรที่มีเชื้อ P.berghei โดยใช้วิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสด้วย cellulose acetate membrane เพื่อที่จะศึกษาว่าการแยกแบบนี้สามารถแยก LDH ของ P.berghei ให้ปรากฏ band แยกต่างไปจาก LDH ของเม็ดเลือดแดงของ host หรือไม่

วัสดุและวิธีทำ

เจาะเลือดจากหัวใจของหนูถีบจักรที่มีเชื้อ P.berghei ประมาณ 40% โดยใช้ heparin เป็น anticoagulant นำมา centrifuge ที่ 1000 g เป็นเวลา 10 นาทีที่ 4°ซ. แยกเอา plasma ออกทิ้ง ล้างเม็ดเลือดแดงที่ยูกันหลอดด้วย 0.9% saline สองครั้ง นำเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้วนี้มาใส่ลงใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.6 ซึ่งเย็นประมาณ 4°ซ. โดยใช้ phosphate buffer 2 ส่วนต่อเม็ดเลือดแดงที่ packed แล้ว 1 ส่วน หลังจากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกออกโดยใช้ ultrasonic disintegrator ให้คลื่นสูงกว่าเสียงผ่านเม็ดเลือดแดงซึ่งผสมอยู่ใน phosphate buffer ที่เย็น 4°ซ. เป็นเวลา 20 นาที รวมสามครั้ง แต่ละครั้งพัก 20 วินาที เพื่อกันมิให้เม็ดเลือดแดงมีอุณหภูมิสูงเกินไป ซึ่งเอ็นไซม์จะถูกทำลาย หลังจากนั้น centrifuge ที่ 5000 g เป็นเวลา

10 นาที ที่ 2°ซ. เก็บเอา hemolysate ไปทำอิเล็กโทรฟอรีซิสทันที

ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส ใช้ cellulose acetate membrane และ barbiturate buffer pH 8.6 เครื่องมือที่ใช้ทำคือ Beckman model R-100 microzone electrophoresis system ตอนแรกแช่ cellulose acetate membrane ลงใน barbiturate buffer ประมาณ 5 นาที แล้วซับด้วยกระดาษกรองที่สะอาดวาง membrane ที่ขึ้นลงในเครื่องมือดังกล่าว หยด hemolysate ปริมาณ 25 ไมโครลิตรลงบน membrane โดยอาศัย applicator ช่วย หลังจากนั้นผ่านกระแสไฟให้โวลตเทจคงที่เท่ากับ 110 โวลต์ นานหนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25°ซ.)

วิธีย้อมสี

ใช้มีเดียสำหรับอินคิวเบชัน 1 ปริมาตร ผสมกับบาร์บิทูเรตบัฟเฟอร์ 1 ปริมาตร ให้ pH ของผสมนี้เป็น 7.1 อินคิวเบชันมีเดียเตรียมโดยละลาย NAD, NBT (nitroblue tetrazolium) และ phenazine methosulphate ลงในบาร์บิทูเรตบัฟเฟอร์ pH 8.6 เมื่อผสมเสร็จแล้ว pH จะเป็น 7.4 เนื่องจาก NBT และ phenazine methosulphate มี pH 7.2 และ 7.8 ตามลำดับ นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเทมมาอีกแผ่นหนึ่งซึ่งไม่ได้ใช้ทำอิเล็กโทรฟอรีซิส สมมติว่าเป็นแผ่น ข. จุ่มในอินคิวเบชันมีเดียที่เตรียมไว้แล้วนี้ให้ชุ่ม แล้วนำไปประกบกับแผ่นเซลลูโลสอะซิเทมที่ได้ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสของ LDH ไว้ จากนั้นนำ

ไปอินคิวเบตที่ 37° ซ. เป็นเวลา 30 นาที ผลจะปรากฏให้เห็นแถบ LDH เป็นสีน้ำเงินออกมาทั้งสองแผ่น เนื่องจากสารละลายซิมจากแผ่นหนึ่งไปสู่อีกแผ่นหนึ่งได้ เพื่อที่จะให้สารละลายซิมไปสู่อีกแผ่นหนึ่งได้ดี ใน petridish ที่ใช้อินคิวเบตนั้นจำเป็นต้องใช้ผ้าชุบน้ำใส่ไว้ด้วย เพื่อกันไม่ให้แห้ง หลังจากอินคิวเบตแล้วนำไป fix ด้วย formol saline เป็นเวลาประมาณ 5-15 นาที

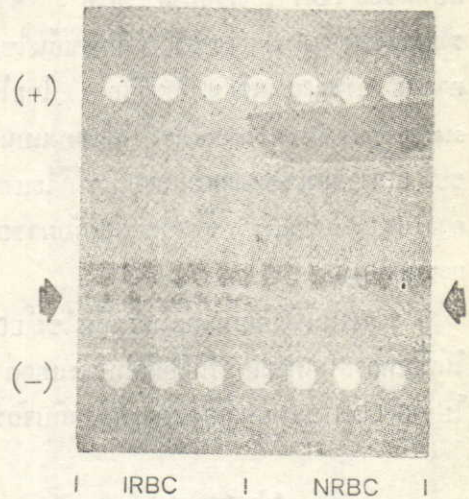
วิธีทำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตให้ใส

แช่แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตในกรดน้ำส้ม 0.36 M สีย้อมที่ติดบนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตยังคงทนอยู่ได้ในกรดน้ำส้มนี้ ยกแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตออกจากน้ำส้มแล้วแช่ลงในเอทธานอล (ethanol) 95% นาน 1 นาที ท่อจากนั้นแช่ลงใน clearing solution อีก 1 นาทีค่อย ๆ วางแผ่นเซลล์โลสอะซีเตต ลงบนแผ่นกระจกเรียบ วิกเอาฟองอากาศออกให้หมด อบที่ 80° ซ. นาน 10 นาที แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตจะแห้งและใส

ผล

จากการแยกเอ็นไซม์ lactate dehydrogenase โดยใช้วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยแผ่นเซลล์โลสอะซีเตต ปรากฏว่า extract ของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อไข้มาลาเรียพลาสโมเดียมเบอร์เกอี มีแถบที่ปรากฏให้เห็นแตกต่างไปจากแถบของเอ็นไซม์จากเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักรปกติ คือเคลื่อนที่ไกลช้าลงมากกว่า host enzyme ทั้งในรูป

ผลการทดลอง



รูปแสดง electrophoretic pattern ของ lactate dehydrogenase ใน extract ของ P-berghei-infected mouse erythrocytes และของ normal mouse erythrocytes.

วิจารณ์

หลังจากที่มีการผลิตแผ่นเซลล์โลสอะซีเตต เมมเบรนออกมาใช้ ยังไม่ได้มีผู้นำแผ่นนี้มาใช้แยก LDH ของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อไข้มาลาเรีย ผู้รายงานจึงได้ทดลองทำเพื่อดูความสามารถในการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้แผ่นนี้ บนเครื่อง Beckman model R-100 microzone electrophoresis system ที่คณะแพทยศาสตร์มีอยู่เป็นเครื่องกระตุ้นครั้งแรกในการใช้ และสามารถแยกแถบเอ็นไซม์ของเชื้อมาลาเรียปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจน จากรูปจะเห็นว่าบนแผ่นนี้สามารถแยก sample ได้ถึงครั้งละ 8 sample ซึ่งช่วยทุ่นเวลาในการทำเทคนิคการแยกโดยใช้แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตจึงดีกว่าวิธีของ Phisphumvidhi และ Langer ที่ใช้ polyacrylamide gel แต่ไม่สามารถแยก

แบนด์ของ LDH ของเชื้อมาลาเรียได้ จาก รายงานของ Carter (1973) ผู้ศึกษาเอ็นไซม์ ต่าง ๆ ของพลาสโมเดียมเบอร์เกอ โดย ใช้ starch gel electrophoresis ได้แสดงแบนด์ ของ LDH ของเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอแตกต่าง ไปจากของ host ซึ่งสอดคล้องกับผลของการทดลองนี้

รายงานนี้ยืนยันให้เห็นว่าเอ็นไซม์ LDH ในเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอมีลักษณะแตกต่าง ไปจาก LDH ของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักร

Abstract

A study of electrophoretic pattern of lactate dehydrogenase in Plasmodium berghei infected mouse red-cell has been made by using cellulose acetate membrane. The result showed characteristic bands of the enzyme originated from the parasite which was different from that of the host.

REFERENCES.

BARNETT, H. The staining of lactic dehydrogenase isoenzymes after electrophoretic separation on cellulose acetate, J. Clin Path. 17: 567-570, 1964.

CARTER, R. Enzyme variation in Plasmodium berghei and Plasmodium vinckei, Parasitology 66: 297-307, 1973.

PHISPHUMVIDHI, P. and LANGER, B.W., JR. Malaria Parasite Metabolism: The lactic acid dehydrogenase of Plasmodium berghei. Exp. Parasit. 24: 37-41, 1959.

SHERMAN, I.W. Molecular heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (Plasmodium lophurae). J. Exp. Med. 114: 1049-1062, 1961.

SHERMAN, I.W. Heterogeneity of lactic dehydrogenase in intraerythrocytic parasites Trans. N.Y. Acad. Sci Ser II, 24: 944-953, 1962.

SPECK, J.F. and EVANS, E.A., Jr. The biochemistry of the malaria parasite II Glycolysis in cell-free preparations of the malaria parasites J. biol. chem. 159: 71-81, 1945.