นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษารูปแบบโปรตีนสกัดจากตัวเต็มวัยของ พยาธิเฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และ คูเปอเรีย ในโค โดยวิธี SDS-PAGE

สนธยา เตียวศิริทรัพย์* อมรเทพ คูประทุมศิริ*** สุวรรณี นิธิอุทัย*
นิคม ชัยศิริ** ถิรายุทธ์ โฆสิตะมงคล* สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์*

Abstract

Sonthaya Tiawsirisup* Amonthep Khuprathumsiri* Suwannee Nithiuthai***
Nikom Chaisiri Thirayuth Kositamongkol* Sudchit Chungpivat***

SDS-PAGE ANALYSIS FOR PROTEIN PATTERNS OF ADULTS *HAEMONCHUS PLACEI, MECISTOCIRRUS DIGITALIS* AND *COOPERIA SPP.* IN CATTLE

Protein profiles of crude extracts from adult male and female *Haemonchus placei, Mecistocirrus digitatus* and *Cooperia spp.* were studied. The parasites were collected from the abomasum and duodenum of cattle at Pathumthani and Nonthaburi's abattoirs. SDS-PAGE analysis of the crude extracts revealed, protein bands of various intensities ranging from 13- 24 bands with a molecular mass of between 19-130 kDa. The protein band patterns of each parasite at a molecular weight of between 48.2-111 kDa were similar whereas other protein bands at a molecular mass below 48.2 kDa were different. The number of distinct bands shown by the crude extract from males and females of three species were 13 and 21, 20 and 18 and 24 and 23 respectively. High density, specific protein bands from *Mecistocirrus digitatus* and *Cooperia spp.* were clearly shown at 22 and 20/ 20.5 kDa. In contrast, a low density but specific band at 33.8 kDa was only seen in extract from the male adult *Haemonchus placei*.

Keywords : *Haemonchus placei, Mecistocirrus digitatus, Cooperia spp.*, cattle, protein, SDS-PAGE

* **Veterinary Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology,**
** **Biochemistry Unit, Department of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok**
*** **Large animal hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Nakhonprathom province.**

* หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา **หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*** โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จ.นครปฐม

บทคัดย่อ

สนธยา เตียวศิริทรัพย์* อมรเทพ คูประทุมศิริ*** สุวรรณี นิธิอุทัย*
นิคม ชัยศิริ** ถิรายุทธ์ โฆสิตะมงคล* สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์*

การศึกษารูปแบบโปรตีนสกัดจากตัวเต็มวัยของพยาธิเฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และ คูเปอเรีย ในโค โดยวิธี SDS-PAGE

ศึกษารูปแบบโปรตีนจากสารสกัดของพยาธิเพศผู้และเพศเมีย 3 ชนิด คือ พยาธิเฮมอนคัส เพลซิอัย พยาธิเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และพยาธิคูเปอเรีย โดยเก็บตัวอย่างพยาธิจากกระเพาะแท้และลำไส้เล็กส่วนต้นของโคจากโรงฆ่าสัตว์จังหวัดนนทบุรีและปทุมธานี จากการแยกวิเคราะห์โปรตีนจากสารสกัดของพยาธิด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue พบว่าสารสกัดของพยาธิทั้งสามชนิดมีรูปแบบโปรตีนซับซ้อน ปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน ที่มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 19-130 kDa จำนวน 13-24 แถบ ความเข้มและการปรากฏของแถบโปรตีนของพยาธิแต่ละชนิดและแต่ละเพศคล้ายคลึงกันในช่วงระหว่างมวลโมเลกุล 48.2-111 kDa และส่วนที่แตกต่างกันอยู่ที่ช่วงมวลโมเลกุลต่ำกว่า 48.2 kDa พยาธิเฮมอนคัส เพลซิอัย เพศผู้และเพศเมียมีแถบโปรตีนจำนวน 13 และ 21 แถบ พยาธิเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส เพศผู้และเพศเมียมีจำนวน 20 และ 18 แถบ และพยาธิคูเปอเรีย เพศผู้และเพศเมียมีจำนวน 24 และ 23 แถบ ตามลำดับ โดยพยาธิคูเปอเรีย มีแถบโปรตีนที่เข้มชัดเจนและมีความจำเพาะที่มวลโมเลกุล 20 และ 20.5 kDa พยาธิเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส มีแถบโปรตีนที่เข้มชัดเจนและมีความจำเพาะที่ 22 kDa ส่วนพยาธิเฮมอนคัส เพลซิอัย เพศผู้ ปรากฏโปรตีนแถบบางๆ ที่มีความจำเพาะที่ 33.8 kDa

คำสำคัญ : พยาธิเฮมอนคัส เพลซิอัย พยาธิเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส พยาธิคูเปอเรีย โค โปรตีน SDS-PAGE

บทนำ

โรคปรสิตหนอนพยาธิในระบบทางเดินอาหารเกิดจากหนอนพยาธิตัวกลม ที่สำคัญได้แก่พยาธิสตรองกายกลุ่มที่อยู่ใน superfamily Trichostrongyloidea และ Strongyloidea ซึ่งเป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในส่วนของกระเพาะแท้ ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ สามารถก่อให้เกิดอันตรายในสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเฉพาะโค กระบือ และแกะ เนื่องจากถูกพยาธิดูดเลือด แย่งอาหาร และ/หรือรบกวนโฮสต์ทำให้ร่างกายอ่อนแอ การเจริญเติบโตช้า โลหิตจาง ซูบผอม เกิดโรคอื่นแทรกซ้อนได้ง่ายและสัตว์อาจถึงตายได้ (Kaufmann, 1996) หนอนพยาธิที่ทำอันตรายต่อโคและมีความสำคัญทางปศุสัตว์ในประเทศไทยมี 4 สกุล ได้แก่ เฮมอนคัส เพลซิอัย *(Haemonchus placei)* เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส *(Mecistocirrus digitatus)* คูเปอเรีย *(Cooperia spp.)* และพยาธิเม็ดตุ่ม *(Oesophagostomum radiatum)* (วิจิตร, 2524)

เฮมอนคัส เพลซิอัย และเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส เป็นพยาธิที่อยู่ในกระเพาะแท้ ส่วนคูเปอเรีย และพยาธิเม็ดตุ่ม ตัวเต็มวัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ตามลำดับ วงชีวิตของพยาธิแต่ละสกุลมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ โคติดพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 ในขณะที่กินหญ้า จากนั้นตัวอ่อนระยะติดต่อนี้ของเฮมอนคัส เพลซิอัย และ

เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส จะเข้าไปเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 ระยะที่ 5 และตัวเต็มวัยอยู่ในกระเพาะแท้ โดยใช้เวลา 19-21 วัน และ 61-79 วัน ตามลำดับ (Kaufmann, 1996; Van Aken et al., 1997) สำหรับคูเปอเรีย ใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ จึงจะเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย (มานพ, 2539)

การศึกษาเกี่ยวกับรูปแบบของแถบโปรตีน และโปรตีนที่มีความจำเพาะของเฮมอนคัส เพลซิอัย ในโคมีค่อนข้างจำกัด ส่วนใหญ่มักศึกษาในเฮมอนคัส คอนทอร์ทัส *(Haemonchus contortus)* ที่พบได้ในแกะเท่านั้น โปรตีนในสารสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยของเฮมอนคัส คอนทอร์ทัส ที่มีความจำเพาะมีมวลโมเลกุล 25 และ 26 kDa (Cuquerella et al., 1993; Gomez-Mu-noz et al., 1996) โปรตีนจากสารคัดหลั่งของเฮมอนคัส เพลซิอัย มี 10 แถบ และมีมวลโมเลกุลระหว่าง 10-100 kDa แต่ที่มีความจำเพาะและสามารถกระตุ้นให้โฮสต์สร้างภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุดคือแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 50 kDa (Schallig et al., 1996) รูปแบบโปรตีนของเฮมอนคัส คอนทอร์ทัส ในแกะ และเฮมอนคัส เพลซิอัย ในโค ส่วนใหญ่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (Schallig et al., 1994) สำหรับเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อพยาธิตัวเต็มวัยจะทำให้ทราบถึงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อพยาธิแต่ละสกุล และ/หรือชนิดซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางการศึกษาแอนติเจน และแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อพยาธิที่มีความสำคัญทางปศุสัตว์ในประเทศไทยต่อไป

ในการแยกวิเคราะห์แถบโปรตีนเพื่อหาความจำเพาะของพยาธินั้น วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งสามารถใช้ในการหามวลโมเลกุลหรือหน่วยย่อย (subunit) ของโปรตีน และใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์เมื่อใช้ควบคู่กับเทคนิค gel filtration และ ion-exchange chromatography (พิณทิพ, 2536 ; De Graaf et al.,1993) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย 3 สกุล คือ เฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และคูเปอเรีย โดยใช้วิธี SDS-PAGE เพื่อเป็นพื้นฐานในการตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดของพยาธิจากแถบโปรตีนและในการเตรียมแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อสกุลของพยาธิรวมทั้งการผลิตวัคซีนป้องกันการติดต่อของพยาธิกลุ่มนี้ในโคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างพยาธิที่ใช้ในการศึกษา

พยาธิตัวกลมที่ใช้ในการศึกษาคือตัวเต็มวัยของเฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และคูเปอเรีย เตรียมตามขั้นตอน ดังนี้

1.1 การเก็บตัวอย่างพยาธิและการจำแนกชนิด

ระหว่างเดือนตุลาคม 2540 ถึงพฤศจิกายน 2541 ทำการเก็บ abomasal content และ duodenal content ของโคจากโรงฆ่าสัตว์จังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี นำมาล้างด้วยน้ำจนกระทั่งสะอาด ตรวจหาแยกชนิด และเพศของเฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส ออกจาก abomasal content และคูเปอเรีย จาก duodenal content จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 พยาธิแต่ละชนิดและแต่ละเพศ จำนวน 50 ตัว นำมาศึกษารายละเอียดของรูปร่างลักษณะ วัดขนาด และบันทึกภาพ ส่วนที่ 2 พยาธิส่วนที่เหลือทั้งหมดนำมานับจำนวนและชั่งน้ำหนัก เก็บแช่แข็งที่ -20°ซ

1.2 การเตรียมสารสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

การเตรียมสารสกัดเพื่อทำอิเลคโตรโฟรีซิส ประยุกต์จากวิธีของ Maleewong (1995) โดยนำพยาธิแต่ละชนิดมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียด เติมสารละลายที่มีส่วนประกอบของ 100 mM PBS, pH 7.4, 10 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) และ 0.1mM L-1 tosylamide-2-phenyl chloromethyl ketone (TPCK)

จำนวนเล็กน้อย แล้วนำมาบดต่อด้วย ultrasonicator (Vibra cell™, Sonics and Material Inc.) ที่ 4°ซ นาน 10 นาที (20 kilocycles/วินาที ใช้เวลา 1 นาที และหยุดพัก 1 นาที ทำซ้ำ 10 ครั้ง) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 30 นาที เก็บส่วนใสนำไปตรวจวัดหาปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง spectrophotometer (Spectronic Genesys™5) ที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร

2. การศึกษารูปแบบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย

นำสารสกัดแต่ละชนิดมาศึกษารูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE โดยประยุกต์จากวิธีการของ Laemmli (1970) โดยใช้ความเข้มข้นของ 12% separating gel และของ 3 % stacking gel

นำตัวอย่างสารสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยที่มีปริมาณโปรตีน 2.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (bromphenol blue, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.125M Tris-HCl, pH 6.8) ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปต้มให้เดือดที่ 100°ซ 5 นาที แล้วนำไปใส่ในหลุมบนแผ่นเจลหลุมละ 10 ไมโครลิตร และใส่ตัวอย่างโปรตีนมาตรฐาน (pre-stained SDS-PAGE standards low range, BIO-RAD) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20.5 ถึง 111 kDa ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 1 หลุม เพื่อการเปรียบเทียบและคำนวณมวลโมเลกุลของโปรตีนที่แยกได้ แล้วจึงทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 150 โวลต์ นาน 50 นาที จากนั้นย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ล้างสีส่วนเกินออก และทำให้เจลแห้งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (Heto Dry GD-I, Heto Lab Equipment)

วิเคราะห์แถบโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัยแต่ละชนิดและแต่ละเพศ ที่ปรากฏบนแผ่นเจล นับจำนวนแถบทั้งหมดด้วยตาเปล่า และโดยใช้เครื่อง densitometer (Biorad GS670) บันทึกตำแหน่งและคำนวณค่าน้ำหนักของโมเลกุล โดยเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนนั้นๆ กับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล โปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด คือ phosphorylase B, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor และ lysozyme ซึ่งมีมวลโมเลกุล เท่ากับ 20.5, 28.6, 33.8, 48.2, 77.0, 111.0 ตามลำดับ

ผล

ขนาดความยาว น้ำหนัก และปริมาณโปรตีนที่ได้จากสารสกัดของพยาธิตัวกลมตัวเต็มวัย 3 ชนิด คือ เฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และคูเปอเรีย ดังแสดงในตารางที่ 1

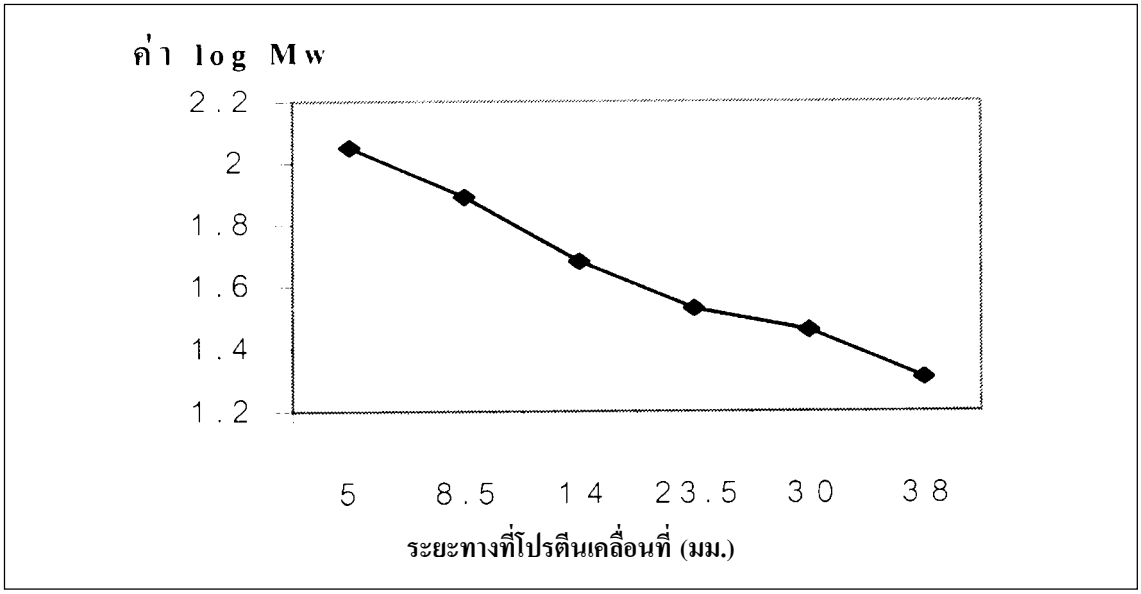
พยาธิเพศผู้ทั้ง 3 ชนิด มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย โดยเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส เพศเมียมีขนาดใหญ่ที่สุด 30.18±1.72 มม. มีน้ำหนักและปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 2.95 มิลลิกรัม และ 150.64 ไมโครกรัม ตามลำดับ เฮมอนคัส เพลซิอัย มีขนาดรองลงมา และพยาธิคูเปอเรีย มีขนาดเล็กที่สุด เพศผู้และเพศเมียมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน ปริมาณโปรตีนต่อตัวของพยาธิเพศผู้น้อยกว่าเพศเมีย

เฮมอนคัส เพลซิอัย และเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส ขณะมีชีวิตมีลักษณะเด่นคือ เห็นลักษณะท่อสีขาวพันสีแดงตลอดความยาวของลำตัว ส่วนหน้ามีลักษณะเรียวเล็กและมีหนามแหลมยื่นออกมาทางด้านข้างของลำตัวบริเวณหลอดอาหารข้างละ 1 อัน หนามที่พบในเฮมอนคัส เพลซิอัย มีขนาดใหญ่และยื่นไปตามแนวลำตัว ส่วนหนามของเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส มีขนาดเล็กมาก ฝังอยู่ในแอ่งและยื่นตามแนวขวางลำตัว คูเปอเรีย ผนังส่วนหน้าจะป่องออก และมีสันตามยาวและตามขวางผนังลำตัวด้านหน้าช่องคลอดของเฮมอนคัส เพลซิอัย และคูเปอเรีย มีลักษณะโป่งออก โดยช่องคลอดของเฮมอนคัส เพลซิอัย มีรูเปิดอยู่ที่บริเวณ 2/3 ของลำตัว คูเปอเรีย อยู่ที่กึ่งกลางของลำตัว ส่วนเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส มีรูเปิดลักษณะเรียบอยู่เกือบท้ายสุดของลำตัว เพศผู้ทั้ง 3 ชนิด มีเบอร์ซ่า (bursa copulatrix)

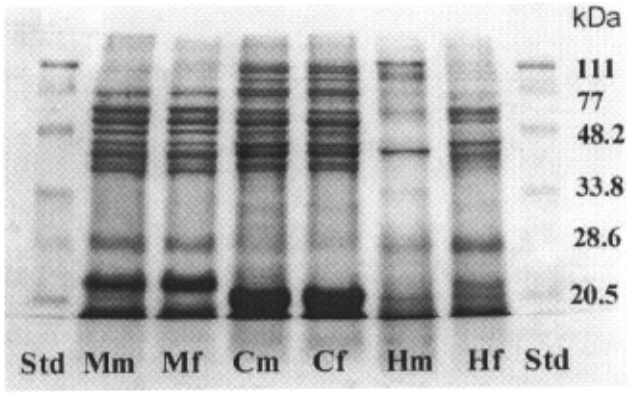
แตกต่างกันและ spicules 1 คู่ มีลักษณะเฉพาะ โดยใน เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส มีรูปร่างเรียวและยาวมาก เฮมอนคัส เพลซิอัย มีลักษณะอ้วนสั้นเป็นรูปตะขอ คูเปอเรีย มีลักษณะสั้นและบิดเป็นเกลียว

ตารางที่ 1 ขนาดความยาว น้ำหนัก และปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดพยาธิตัวเต็มวัย เฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และคูเปอเรีย

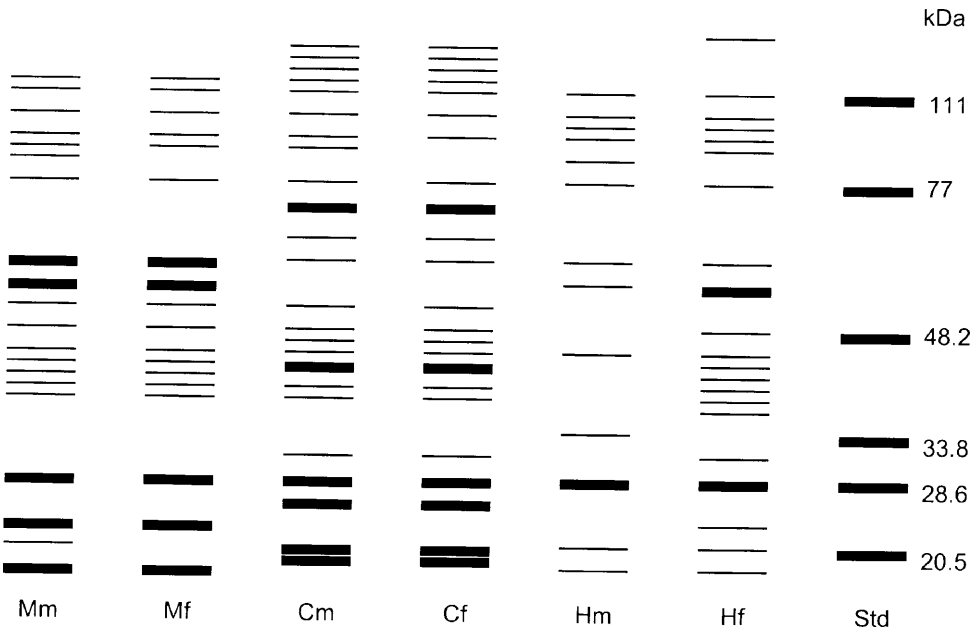
ชนิดของพยาธิ	ขนาดความยาว (มม.)	น้ำหนักพยาธิ (มก./ตัว)	ปริมาณโปรตีน (μg/ตัว)
เฮมอนคัส เพลซิอัย เพศผู้	9-12 (10.40±0.67)	0.23	18.34
เฮมอนคัส เพลซิอัย เพศเมีย	12-16 (14.44±0.79)	0.35	24.68
เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส เพศผู้	23-26 (24.88±0.77)	1.90	67.31
เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส เพศเมีย	26-35 (30.18±1.72)	2.95	150.64
คูเปอเรีย เพศเมีย	7-12 (9.10±1.30)	0.028	1.32
คูเปอเรีย เพศผู้	7-10 (7.94+0.93)	0.026	0.97



รูปที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลและระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่



รูปที่ 2 รูปแบบโปรตีนที่สกัดจากตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมียของเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส (Mm และ Mf) คูเปอเรีย (Cm และ Cf) เฮมอนคัส เพลซิอัย (Hm และ Hf) และโปรตีนมาตรฐาน (Std)



รูปที่ 3 ไดอะแกรมแสดงรูปแบบโปรตีนที่สกัดจากตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียของเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส (Mm และ Mf) คูเปอเรีย (Cm และ Cf) เฮมอนคัส เพลซิอัย (Hm และ Hf) และ โปรตีนมาตรฐาน (Std)

การเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับมวลโมเลกุล ได้ผลดังรูปที่ 1 รูปที่ 2 และ3 แสดงรูปแบบของโปรตีน ของสารสกัดจากตัวพยาธิ 3 ชนิด คือ เฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และคูเปอเรีย ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย ปรากฏว่าพยาธิแต่ละชนิดมีรูปแบบ จำนวนแถบ และความเข้มของแถบโปรตีนแตกต่างกันอย่างชัดเจน พยาธิชนิดเดียวกันแต่ต่างเพศมีรูปแบบโปรตีนคล้ายคลึงกัน ยกเว้นเฮมอนคัส เพลซิอัย ที่มีรูปแบบโปรตีนแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างเพศผู้และเพศเมีย

โปรตีนของเฮมอนคัส เพลซิอัย เพศผู้แยกได้เป็น 13 แถบ และของเพศเมียมี 21 แถบ เพศผู้มีแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 19, 20.5, 28.6, 33.8, 45, 57, 62, 77, 94, 101, 104, 106 และ 111 kDa ส่วนในเพศเมียมีมวลโมเลกุล 19, 20.5, 22, 28.6, 32.5, 37, 39, 40, 42, 43, 46, 48.2, 57, 62, 77, 99, 101, 104, 106, 111 และ 130 kDa มีแถบโปรตีนที่ปรากฏเฉพาะเพศเมีย คือ 22, 32.5, 48.2 และ 130 kDa ส่วนแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 33.8 kDa ปรากฏเฉพาะเพศผู้ จะสังเกตเห็นว่าแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลระหว่าง 33.8-48.2 kDa ของพยาธิเพศเมียมีจำนวนมากกว่าของเพศผู้

เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส เพศผู้ปรากฏแถบโปรตีน 20 แถบ และเพศเมีย 18 แถบ และมีมวลโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยเพศผู้มีแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 19, 20.5, 22, 28.6, 40, 41, 42, 43, 45, 48.2, 55, 57, 62, 77, 94, 99, 101, 106, 111 และ 112 kDa แถบโปรตีนที่พบในเพศเมียมีมวลโมเลกุล 19, 22, 28.6, 40, 41, 42, 43, 45, 48.2, 55, 57, 62, 77, 99, 101, 106, 111 และ 112 kDa แถบโปรตีนของเมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส เพศผู้และเพศเมีย มีแถบโปรตีนที่แตกต่างกันเพียงแถบเดียวคือที่ 20.5 kDa ซึ่งปรากฏเฉพาะของพยาธิเพศผู้ สำหรับแถบโปรตีนอื่นๆ คล้ายคลึงกัน มีแถบโปรตีนที่มีความเข้มสูงที่ 22 kDa

คูเปอเรีย เพศผู้มีจำนวนแถบโปรตีนใน 24 แถบ และเพศเมียมี 23 แถบ โดยเพศผู้มีแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 20, 20.5, 24, 28.6, 32, 40, 41, 43, 45.5, 47, 48.2, 55, 62, 68, 74, 77, 99, 101, 106, 111, 112, 121, 124, และ 127 kDa แถบโปรตีนที่พบในเพศเมียมีน้ำหนักโมเลกุล 20, 20.5, 24, 28.6, 32, 40, 41, 43, 45.5, 47, 48.2, 55, 62, 68, 74, 77, 101, 106, 111, 112, 121, 124, และ 127 kDa ซึ่งจะเห็นได้ว่ารูปแบบโปรตีนส่วนใหญ่เหมือนกัน แถบโปรตีนที่แตกต่างกันมีน้อยมากและไม่ชัดเจนนัก เพศผู้มีแถบโปรตีนที่ 99 kDa ซึ่งไม่พบในเพศเมีย แถบโปรตีนที่มีความเข้มสูงมากและเด่นชัดกว่าแถบอื่นๆ มี 2 แถบ คือ ที่ 20 และ 20.5 kDa

จึงอาจประมวลได้ว่ารูปแบบโปรตีนของพยาธิแต่ละชนิดทั้งเพศผู้และเพศเมียโดยรวม มีความคล้ายคลึงกันมากบริเวณที่มีมวลโมเลกุลระหว่าง 48.2-111 kDa ส่วนแถบที่มีความแตกต่างเด่นชัด คือ ที่มวลโมเลกุลระหว่าง 19-24 kDa โดยคูเปอเรีย มีแถบโปรตีนเข้มและชัดเจนมาก และรองลงเป็นลำดับที่น้ำหนักโมเลกุล 20 และ 20.5 kDa เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส มีแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพยาธิชนิดอื่นที่ 22 kDa ส่วนเฮมอนคัส เพลซิอัย นั้น ไม่มีแถบใดที่เข้ม และชัดเจนพบเฉพาะแถบบางๆ ที่ 19, 20.5 และ 22 kDa

วิจารณ์

พยาธิแต่ละตัวอาจนำมาศึกษาถึงรูปแบบโปรตีนได้ ยกเว้น คูเปอเรีย ซึ่งมีขนาดเล็กมาก มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 1.15 ไมโครกรัม/ตัว ต้องนำมาวิเคราะห์รวมกันครั้งละหลายตัว เคยมีรายงานการศึกษาพยาธิปากขอโดยใช้สารสกัดของพยาธิหลายๆ ตัวรวมกันหรือวิเคราะห์เป็นรายตัวให้ผลไม่แตกต่างกัน (Bangkulthum et al., 1994) และพบว่าเพศผู้และเพศเมียมีรูปแบบโปรตีนที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แถบโปรตีนที่ปรากฏเฉพาะในพยาธิเพศเมียนั้นมีการสันนิษฐานว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับอวัยวะใน

ระบบสืบพันธุ์ อย่างไรก็ตามรูปแบบโปรตีนของพยาธิชนิดต่างๆ แต่ละชนิดที่รายงานส่วนใหญ่ศึกษาจากสารที่สกัดจากพยาธิหลายๆ ตัวรวมกันทั้งสิ้น (Dineen,1963; De Graaf et al., 1993; Nieuwland et al., 1995; Van Diemen et al., 1997)

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการแยกวิเคราะห์หารูปแบบการเคลื่อนที่ จำนวนแถบ และความเข้มของโปรตีนจากสารสกัดของพยาธิตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมียของเฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และคูเปอเรีย ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าพยาธิทั้ง 3 ชนิดมีแถบโปรตีนส่วนหนึ่งคล้ายคลึงกันมาก คือ ระหว่าง 48.2-111 kDa แต่ความเข้มของแถบอาจแตกต่างกันบ้าง และส่วนที่มีความแตกต่างและมีความจำเพาะเฉพาะพยาธิแต่ละชนิด เป็นแถบโปรตีนที่อยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 48.2 kDa พยาธิชนิดเดียวกันแต่ต่างเพศมีรูปแบบโปรตีนคล้ายคลึงกัน ยกเว้น เฮมอนคัส เพลซิอัย ที่มีจำนวนแถบโปรตีนของพยาธิทั้งสองเพศมีความแตกต่างกันมาก มีแถบที่มีความจำเพาะเฉพาะชนิดในพยาธิเพศผู้เท่านั้น คือ 33.8 kDa นอกจากนี้แถบที่ปรากฏเฉพาะในเฮมอนคัส เพศเมียเท่านั้น การที่พยาธิเพศผู้และเพศเมียมีแถบโปรตีนที่แตกต่างอาจจะเกี่ยวข้องกับอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ (Bangkulthum et al., 1994) Schallig และคณะ (1996) ศึกษาจากสารคัดหลั่งจากตัวเต็มวัยของ เฮมอนคัส เพลซิอัย พบมีแถบโปรตีนจำนวนมากกว่า 10 แถบ และที่มีความจำเพาะต่อพยาธิชนิดนี้เป็นแถบซึ่งมีมวลโมเลกุล 24 และระหว่าง 50-55 kDa นอกจากนี้มีบางรายงานพบว่าแถบโปรตีนของเฮมอนคัส เพลซิอัย และเฮมอนคัส คอนทอร์ทัส ส่วนมากมีลักษณะคล้ายคลึงกัน (Schallig et al., 1994) การวิเคราะห์จากแถบโปรตีนจึงไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าพยาธิทั้งสองชนิดแตกต่างกัน การจำแนกชนิดของพยาธิดังกล่าวให้ชัดเจนจำเป็นต้องชันสูตรยืนยันโดยอาศัยการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในระดับ DNA และ RNA (Blouin et al., 1997)

เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส เพศผู้ และเพศเมียมีรูปแบบของแถบโปรตีนคล้ายคลึงกันมาก น้ำหนักโมเลกุล 19-112 kDa แถบที่ชัดเจนที่สุด และแตกต่างจากพยาธิชนิดอื่นอยู่ที่น้ำหนักโมเลกุล 22 kDa การศึกษาและทดลองเกี่ยวกับตัวพยาธิ และสารที่สกัดจากพยาธิชนิดนี้มีข้อมูลน้อยมาก Van Aken และคณะ (1998) ได้ใช้สารสกัดจากตัวเต็มวัยของพยาธิตรวจหาระดับของภูมิคุ้มกัน ด้วย ELISA และรายงานอื่นๆ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาทางด้าน วงชีวิต ความก่อโรค และระดับแอนติบอดีเท่านั้น (Fernando and Soulsby, 1970; Van Aken et al., 1998)

สำหรับรูปแบบและจำนวนแถบโปรตีนของคูเปอเรีย ทั้งสองเพศคล้ายคลึงกันมาก มีน้ำหนักโมเลกุล 20-117 kDa แถบโปรตีนที่จำเพาะ และชัดเจนที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุล 20 และ 20.5 kDa และแถบที่มีความเข้มสูงมาก และรองลงมาเป็นลำดับคือ ที่น้ำหนักโมเลกุล 20, 20.5, 43 และ 62 kDa การศึกษาครั้งนี้ได้ผลใกล้เคียง และบางส่วนสอดคล้องกับหลายรายงาน (Baker et al.,1993; De Graaf et al., 1993; Nieuwland et al., 1995; Parmentier et al., 1995) Baker และคณะ (1993) รายงานว่าแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 13.3 และ 18 kDa มีความจำเพาะต่อ คูเปอเรีย ออองโคฟอรา และที่น้ำหนักโมเลกุล 15.7 และ 66 kDa แถบโปรตีนมีความเข้มชัดเจนมาก Nieuwland และคณะ (1995) พบว่าพยาธิชนิดเดียวกันนี้มีแถบโปรตีนที่จำเพาะที่น้ำหนักโมเลกุล 12-15 kDa เช่นเดียวกับ Parmentier และคณะ (1995) ที่พบว่าแถบโปรตีนดังกล่าว มีความจำเพาะสามารถนำมาใช้เพื่อการวินิจฉัยตัวเต็มวัย ตัวอ่อนระยะที่ 4 และภาวะการติดโรคของสัตว์ได้ Van Diemen และคณะ (1997) และ Poot และคณะ (1997) รายงานว่าสารสกัดจากตัวเต็มวัยของพยาธิดังกล่าวที่น้ำหนักโมเลกุล 12-16 และ 27 kDa มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีที่พบในลูกโคทดลอง เมื่อนำแถบโปรตีนนี้มาศึกษาด้วยอิเลคโตรโฟริซิส แบบ 2 มิติ คือ

การทำ isoelectric focusing (IEF) ร่วมกับ SDS-PAGE และการทำ immunoblotting จะปรากฏแถบโปรตีน 20 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 12-16 kDa และ1 แถบที่ 27 kDa

สรุป

โปรตีนของสารสกัดจาก เฮมอนคัส เพลซิอัย เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส และคูเปอเรีย ด้วยวิธี SDS-PAGE มีแถบโปรตีนที่แตกต่างกัน บางแถบมีความจำเพาะต่อชนิดของพยาธิ โดยคูเปอเรีย มีแถบโปรตีนที่เข้มชัดเจน และมีความจำเพาะที่มวลโมเลกุล 20 และ 20.5 kDa เมซิสโตเซอรัส ดิจิตาตัส มีแถบโปรตีนที่เข้มชัดเจน และมีความจำเพาะที่น้ำหนักโมเลกุล 22 kDa ส่วน เฮมอนคัส เพลซิอัย ไม่ปรากฏแถบโปรตีนใดที่มีความเข้มสูงในช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 48.2 kDa พบเฉพาะแถบบางๆ ที่น้ำหนักโมเลกุล 19, 20.5 และ 22 kDa

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2541 ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา คณาจารย์ และบุคลากร หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา และหน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวกทางห้องปฏิบัติการ พนักงานประจำโรงฆ่าสัตว์จังหวัดนนทบุรี และจังหวัดปทุมธานี ที่เอื้อเฟื้อให้เก็บตัวอย่างพยาธิ และเจ้าหน้าที่ศูนย์คอมพิวเตอร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคการทำคอมพิวเตอร์กราฟฟิค

เอกสารอ้างอิง

พิณทิพ รื่นวงษา 1993 (2536) การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่ม 1 สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา หน้า 4.3-4.9

มานพ ม่วงใหญ่ 1996 (2539) โรคหนอนพยาธิประมวลความรู้เกี่ยวกับโคนม คณะสัตวแพทย-ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพิมพ์ตีรณสาร กรุงเทพฯ หน้า 178 - 182

วิจิตร สุขเพสน์ 1981 (2524) การศึกษาพยาธิภายในของโค เวชสารสัตวแพทย์ 11 (4) : 248 - 257

Baker, D.G., Stott, J.L. and Gershwin, L.J. 1993. Abomasal lymphatic lymphocyte subpopulation in cattle infected with *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia sp.* Vet. Immunol. Immunopathol. 39 : 467-473.

Bangkulthum, R., Vongvichian, V. and Sueblinvong, T. 1994. A comparative study of protein pattern in adult of human hookworm by SDS-PAGE. Chulalongkorn university, Medical Science. 70 p.

Blouin, M. S., Yowell, C.A., Courtney, C.H. and Dame, J.B. 1997. *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* are distinct species based on mtDNA evidence. Int. J. Parasitol. 27: 1383-1387.

Cuquerella, M., Gomez-Mu-noz, M.T., de la Fuente, C., Carrera, L. and Alunda, J.M. 1993. Lamb serum recognition of infective larvae and adult *Haemonchus contortus* antigens. Vet. Parasitol. 49: 255-264.

De Graaf, D.C., Berghen, P., Hilderson, H., De Cock, H. and Vercruysse, J. 1993. Identification and purification of *Cooperia oncophora*-specific antigens to improve serological diagnosis. Int. J. Parasitol. 23: 141-144.

Dineen, J.K. 1963. Antigenic relationship between host and parasite. Nature. 197 : 471 - 472.

Fernando, S.T. and Soulsby, E.J.L. 1970. Immunological studies of *Mecistocirrus digitatus* infection in calves. Res. Vet. Sci. 11: 175-182.

Gomez-Mu-noz, M.T., Cuquerella, M. and Alumda, J.M. 1996. Identification and partial purification of a 26 kilodalton antigen of adult *Haemonchus contortus.* Int. J. Parasitol. 26: 311-318.

Kaufmann, J. 1996. Parasites of cattle. In: Parasitic Infections of Domestic Animals. Birkhauser verlag, Basel p. 29-54.

Laemmli, U.K. 1970. Clevage of structures of proteins during assembly by head of bacteriophage - T4. Nature (London) 227: 680-685.

Maleewong, W. 1995. Diagnosis of *Paragonimus heterotremus* infection by gene probe and immunological methods. Mahidol University. 260 pp.

Nieuwland, M.G.B., Ploeger, H.W., Kloosterman, A. and Parmentier, H.K. 1995. Systemic antibody responses of calves to low molecular weight *Cooperia oncophora* antigens. Vet. Parasitol. 59: 231-239.

Parmentier, H.K., Ploeger, H.W., Nieuwland, M.G., Souren, P.J., Van Pinxteren, L.A., Rietveld, F.W., De Vries Reiligh, G. and Kloosterman, A. 1995. Low molecular weight *Cooperia oncophora* antigens: characterization and humeral immune responses in calves mono-infected with 100,000 infective larvae. Vet. Parasitol. 59: 219-230.

Poot, J., Kooyman, F.N.J., Dop, P.Y., Schallig, H.D.F.H., Eysker, M. and Cornelissen, A.W.C.A. 1997. Use of cloned excretory/ secretory low-molecular-weight protines of *Cooperia oncophora* in a serological assay. J. Clin. Microbiol. 35: 1728-1733.

Schallig, H.D.F.H., van Leeuwen, M.A.W. and Hendrikx, W.M.L. 1994. Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus.* Parasitology 108: 351-357.

Schallig, H.D.F.H., Moyo, D.Z., Hendrikx, W.M.L. and Eysker, M. 1996. Bovine humoral immune responses to *Haemonchus placei* excretory secretory antigens. Vet. Parasitol. 65: 289-296.

Van Aken, D., Vercruysse, J., Dargantes, A.P., Lagapa, J.T., Raes, S. and Shaw, D.J. 1997. Pathophysiological aspects of *Mecistocirrus digitatus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in calves. Vet. Parasitol. 69 : 255 - 263.

Van Aken, D., Vercruysse, J. Daargantes, A., Valdes, L. Flores, A. and Shaw, D.J. 1998. Development of immunity to *Mecistocirrus digitatus* (Nematoda: Trichostrongylidae) in calves. Parasitology 117: 83-87.

Van Dieman, P.M., Ploeger, H.W., Nieuwland, M.G.B., Rietveld, F.W., Eysker, M., Kooyman, F.N.J., Kloosterman, A. and Parmentier, H.K. 1997. Low molecular weight *Cooperia oncophora* antigens. Potential to discriminate between susceptible and resistant calves after infection. Int. J. Parasitol. 27: 587- 593.