การวิเคราะห์โปรตีนในต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน, ยุงลายสวน และยุงแม่ไก่ โดยอิเลคโตรโฟริซิสแบบเอสดีเอสเพจ

นางสาว กุลธิดา ตั้งธงชัยวิริยะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546
ISBN 974-17-3495-6
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANALYSIS OF SALIVARY GLAND PROTEINS OF THE MOSQUITO *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* AND *Armigeres subalbatus* BY SDS-PAGE

Miss Kuntida Tangthongchaiwiriya

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Parasitology

Department of Parasitology
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-3495-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์โปรตีนในต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน, ยุงลายสวน และยุงแม่ไก่ โดยอิเลคโตรโฟริซิสแบบเอสดีเอสเพจ
โดย	นางสาว กุลธิดา ตั้งธงชัยวิริยะ
สาขาวิชา	ปรสิตวิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. อุษาวดี ถาวระ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สุรางค์ นุชประยูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. อุษาวดี ถาวระ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง กัญญรัตน์ กรัยวิเชียร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาว กุลธิดา ตั้งธงชัยวิริยะ : การวิเคราะห์โปรตีนในต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน, ยุงลายสวน และยุงแม่ไก่ โดยอิเลคโตรโฟริซิสแบบเอสดีเอสเพจ. (ANALYSIS OF SALIVARY GLAND PROTEINS OF THE MOSQUITO *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* AND *Armigeres subalbatus* BY SDS-PAGE) อ. ที่ปรึกษา : อาจารย์ นายแพทย์ ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. อุษาวดี ถาวระ 85 หน้า. ISBN 974-17-3495-6.

โรคที่เกิดจากยุงพาหะยังคงเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญทั้งในคนและสัตว์ ตัวอย่างของโรคซึ่งมียุงเป็นพาหะ เช่น มาลาเรีย, ไข้เลือดออก, ไข้สมองอักเสบ, ไข้เหลือง และโรคเท้าช้าง เป็นต้น เชื้อโรคเหล่านี้จะถูกถ่ายทอดจากยุงไปสู่สัตว์มีกระดูกสันหลังที่เป็นโฮสต์ในขณะที่ยุงเพศเมียได้ดูดกินเลือด โดยเชื้อโรคส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ในต่อมน้ำลายยุงก่อนที่จะถูกถ่ายทอดไปยังโฮสต์ใหม่ การหลั่งน้ำลายออกเข้าสู่บาดแผลที่เกิดจากการเจาะแทงผิวหนังของยุงจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่เป็นโฮสต์ซึ่งอาจช่วยให้เกิดการติดเชื้อโรคได้ง่ายขึ้น

ยุงลายบ้าน และยุงลายสวนเป็นพาหะหลักที่นำเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศไทย ยุงลายบ้านเป็นยุงชนิดที่กินเลือดคนในที่พักอาศัย ในขณะที่ยุงลายสวนเป็นยุงที่กินเลือดคนภายนอกที่พักอาศัย ตามใบไม้ ใบหญ้า โพรงไม้ ส่วนยุงแม่ไก่เป็นพาหะที่สำคัญของพยาธิหัวใจสุนัข *Dirifilaria immitis* ซึ่งยุงชนิดนี้จะกัดคนในเวลาใกล้รุ่ง และตอนพลบค่ำและจะพบได้ทั่วไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตชนบท ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับสารที่เป็นองค์ประกอบในต่อมน้ำลายของยุงเหล่านี้อาจช่วยอธิบายบทบาทของโปรตีนที่ผลิตจากต่อมน้ำลายในการถ่ายทอดเชื้อโรคได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบโปรตีนที่สังเคราะห์จากต่อมน้ำลายของยุงลายบ้าน ยุงลายสวน และยุงแม่ไก่ โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสแบบเอสดีเอสเพจ

จากการศึกษาพบว่ารูปแบบโปรตีนในต่อมน้ำลายของยุงลายบ้านและยุงลายสวนนั้นมีขนาดใกล้เคียงกันคือที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97, 89, 55, 37, 30, 24 และ 18 kDa การศึกษาเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนในต่อมน้ำลายแสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่อยู่ในน้ำลายยุงแม่ไก่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 5 วันหลังจากที่ยุงออกมาเป็นตัวเต็มวัย การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่ พบว่า มีประมาณ 9 แถบโปรตีนหลักซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68, 65, 60, 55, 40, 30, 28, 21 และ 15 kDa โดยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21 kDa จะพบที่บริเวณส่วนปลายของกลีบด้านข้างของต่อมน้ำลายยุงเพศเมียเท่านั้น และจากการวิเคราะห์โปรตีนของต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่หลังดูดกินเลือดพบว่ามีการลดลงของโปรตีน 21 kDa ซึ่งแสดงว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21 kDa นี้อาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการการดูดกินเลือดของยุง การศึกษาเพิ่มเติมในระดับโมเลกุลของต่อมน้ำลายยุงอาจชวยอธิบายกลไกที่ถูกต้องซึ่งเกี่ยวข้องในการบุกรุกของเชื้อโรคและการถ่ายทอดเชื้อโรคไปยังโฮสต์ได้

ภาควิชา ปรสิตวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

447 52052 30 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEY WORD: SALIVARY GLAND PROTEINS/ *Aedes aegypti*/ *Aedes albopictus*/ *Armigeres subalbatus*

KUNTIDA TANGTHONGCHAIWIRIYA : ANALYSIS OF SALIVARY GLAND PROTEINS OF THE MOSQUITO *Aedes aegypti*, *Ades albopictus* AND *Armigeres subalbatus* BY SDS-PAGE. THESIS ADVISOR : PADET SIRIYASATIEN, M.D., Ph.D. THESIS COADVISOR : USAVADEE THAVARA, Ph.D. 85 pp. ISBN 974-17-3495-6.

Mosquito borne diseases still remain a major health problem in both human and veterinary sectors. Diseases transmitted by mosquitoes include malaria, dengue hemorrhagic fever, Japanese encephalitis, yellow fever and filariasis. The pathogens are transmitted to a vertebrate host when the female mosquito takes a blood meal. Many pathogens take up residence in the mosquito's salivary glands before being transmitted to a new vertebrate host. The secretion of saliva into the wound made by the mosquito while probing provokes a humeral and cellular immune response in the vertebrate host which may itself facilitate the establishment of pathogen infection.

Aedes aegypti and *Aedes albopictus* mosquitoes are the major vectors of dengue viruses in Thailand. *Aedes aegypti* is the most common endophilic and anthropophilic mosquito species, while *Aedes albopictus* mosquito is the most common exophilic and anthropophilic species. *Armigeres subalbatus* is a major vector of heart dog filaria, *Dirofilaria immitis*. This is the most common early morning and early night bite mosquito and is found throughout the country especially in the rural areas. Investigation of salivary gland components of these mosquito species may elucidate the effect of the protein components on the capacity for pathogen transmission. The objectives of this study were to compare the salivary gland components of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Armigeres subalbatus* mosquitoes by SDS-PAGE.

SDS-PAGE studies showed that salivary gland protein profiles of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes are similar to 97, 89, 55, 37, 30, 24 and 18 KDa. Quantitative studies of mosquito salivary gland protein revealed that the mosquito saliva protein components of *Armigeres subalbatus* increased dramatically during the five days after emergence as adults. Protein profiles of *Armigeres subalbatus* demonstrated 9 major polypeptide bands of 68, 65, 60, 55, 40, 30, 28, 21 and 15 KDa. The 21 KDa band was found only in the distal lateral region of the mosquito salivary gland and it disappeared after the female mosquito took a blood meal. This indicates that the 21 KDa polypeptides have a major role in blood feeding. Further molecular study of mosquito salivary glands may elucidate the precise mechanism involved in pathogen invasion and transmission to the vertebrate host.

Department Parasitology Student's signature Kuntida tangthongchaiwiriya.

Field of study Medical Parasitology Advisor's signature Padet Siriyasatien

Academic year 2003 Co-advisor's signature Usavadee Thavara

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งในความกรุณาของ นายแพทย์ ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร อาจารย์ที่ปรึกษา และ ดร. อุษาวดี ถาวระ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและข้อคิดต่างๆ อันเป็นประโยชน์ตลอดจนการแก้ไขจุดบกพร่องต่างๆ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. สุรางค์ นุชประยูร ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำในการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยา กลุ่มงานกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องยุงที่ใช้ทำการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้โอกาสทางการศึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญภาพ.....ฌ

คำย่อ.....ฎ

บทที่ 1 บทนำ.....1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....37

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....47

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....70

รายการอ้างอิง.....76

ภาคผนวก.....81

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่ *Ar. subalbatus* ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ในช่วงระหว่างการเจริญเมื่อเลี้ยงโดยให้น้ำตาลเป็นอาหาร.....59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

รูปที่ 1 วงชีวิตของยุง....6

รูปที่ 2 ภาพวาดแสดงลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบต่างๆ ของยุง *Anopheles* ตัวเต็มวัยเพศเมีย....10

รูปที่ 3 ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ตัวเต็มวัย....15

รูปที่ 4 แผนที่การแพร่กระจายของยุงลายบ้าน....17

รูปที่ 5 ลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ตัวเต็มวัย และยุงลายสวน (*Aedes aegypti*) ตัวเต็มวัย....20

รูปที่ 6 ยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ตัวเต็มวัย....22

รูปที่ 7 ต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ตัวเต็มวัย....26

รูปที่ 8 แผนภาพแสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยุง โฮสต์ และพาราไซต์ ในช่วงระหว่างการดูดกิน เลือดของยุง....30

รูปที่ 9 แผนภาพแสดงลำดับขั้นของการเกิดการแข็งตัวของเลือด (coagulation) โดยเกิดจากการกระตุ้นของ factor Xa....34

รูปที่ 10 ต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่ (*Armigeres subalbatus*)....48

รูปที่ 11 รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย อายุ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน เมื่อเลี้ยงโดยให้น้ำตาลเป็นอาหาร ทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี SDS-PAGE บน 12% เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย silver....50

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

รูปที่ 12 รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุ 5 วัน dissected ต่อมน้ำลายที่เวลาต่างๆ กันหลังจากให้เลือดเป็นอาหาร ทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี SDS-PAGE บน 12% เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย silver ต่อมน้ำลายยุงเพศเมีย 10 คู่ต่อมต่อ lane.....52

รูปที่ 13 รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงลายสวน *Ae. albopictus* ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย อายุ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน เมื่อเลี้ยงโดยให้น้ำตาลเป็นอาหาร ทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี SDS-PAGE บน 10% เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย silver.....55

รูปที่ 14 รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงลายสวน *Ae. albopictus* ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุ 5 วัน dissected ต่อมน้ำลายที่เวลาต่างๆ กันหลังจากให้เลือดเป็นอาหาร ทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี SDS-PAGE บน 12% เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย silver.....57

รูปที่ 15 รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงยุงแม่ไก่ *Ar. subalbatus* ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย อายุ 5 วัน เมื่อเลี้ยงโดยให้น้ำตาลเป็นอาหาร ทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี SDS-PAGE บน 12% เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย silver.....61

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

รูปที่ 16 รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่ *Ar. subalbatus* ตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมีย อายุ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน เมื่อเลี้ยงโดยให้น้ำตาลเป็นอาหาร ทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธี SDS-PAGE บน 12% เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย silver.....63

รูปที่ 17 รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงยุงแม่ไก่ *Ar. subalbatus* ตัวเต็มวัย เพศเมีย อายุ 5 วัน dissected ต่อมน้ำลายที่เวลาต่างๆ กันหลังจากให้เลือดเป็นอาหาร ทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี SDS-PAGE บน 12% เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย silver.....65

รูปที่ 18 รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงยุงแม่ไก่ *Ar. subalbatus* ตัวเต็มวัย เพศผู้และเพศเมีย อายุ 5 วัน เมื่อเลี้ยงโดยให้น้ำตาลเป็นอาหาร ทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยวิธี SDS-PAGE บน 12% เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย silver ต่อมน้ำลายยุงเพศเมีย dissected ที่บริเวณต่างๆของต่อมน้ำลาย ใช้ 20 คู่ต่อมต่อ lane เทียบกับต่อมน้ำลายยุงเพศผู้ 15 คู่ต่อมต่อ lane และต่อมน้ำลายยุงเพศเมียทั้งต่อม 10 คู่ต่อมต่อ lane.....68

คำย่อ

^{o}C	=	degree celsius
kDa	=	kilodalton
ml	=	millilite
µm	=	micrometre
µl	=	microlitre
APS	=	Ammonium persulphate
ddH_2O	=	Double-distilled deionised water
g	=	Gram
l	=	litre
mg	=	milligram
M	=	Molar
MW	=	molecular weight
rpm	=	Revolutions per minute
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel Electrophoresis
TEMED	=	N' – tetramethylethylenediamine
Tris	=	2- amino-2 (hydroxymethyl)-propane-1, 3-diol
v/v	=	volume per volume
V	=	volt
w/v	=	weight per volume
Bis	=	N,N' – methylene – bis – acrylamide
A_{595}	=	Absorbance at a 595 nm wavelength
µg	=	Microgram
et al	=	et alii

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย