

การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบปรตึนในพยาริปากขอ
ตัวแก่ โดย อีเล็กรโทรพอเรซิส แบบ เอสดีเอส เพจ



นางสาว รุจิริา บางกุลชรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-558-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A COMPARATIVE STUDY OF PROTEIN PATTERN
IN ADULT OF HUMAN HOOKWORM BY SDS-PAGE

MISS RUJIRA BANGKULTHUM

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the degree of Master of Science

Program of Medical Science

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-584-558-2

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



รู้จักว่า บางกลุ่กรรม : การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนในพยาธิปากขอตัวแก่ โดย
อเล็กโตรฟอเรซิส แบบ เอสดีเอส เพจ (A COMPARATIVE STUDY OF PROTEIN
PATTERN IN ADULT HUMAN HOOKWORM BY SDS-PAGE) อ.ที่ปรึกษา :

รศ.ดร. วารณี วงศ์วิเชียร, รศ.พญ. อาดา สืบหลินวงศ์, 70 หน้า.

ISBN 974-584-558-2

พยาธิปากขอชนิด *Necator americanus* อาจสามารถแบ่งเป็นชนิดย่อย ๆ โดยการศึกษา
รูปแบบโปรตีนซึ่งแยกโดย อเล็กโตรฟอเรซิสแบบ เอสดีเอส เพจ อันเป็นประโยชน์ในด้านอนุกรมวิธาน
ของพยาธิปากขอ ได้ศึกษารูปแบบโปรตีนในพยาธิปากขอตัวแก่จำนวน 38 ตัวโดยแยกศึกษาเป็นตัว ๆ แล้ว
นำรูปแบบโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือน ความต่างทั้งด้วยตาเปล่า และด้วยเครื่องเดินสี่ซีโอดีมิเตอร์
ผลการศึกษาพบว่า รูปแบบโปรตีนในพยาธิแต่ละตัว ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 14-200 Kd มีจำนวน
แถบโปรตีนเท่ากับ 36-42 แถบ และในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 31.0-66.2 Kd พบมีความหนาแน่นของ
จำนวนแถบโปรตีน 18-22 แถบ แถบโปรตีนซึ่งคมเข้มชัดเจนและพบในพยาธิทุกตัว คือโปรตีนน้ำหนัก
โมเลกุลประมาณ 17 Kd

ในพยาธิปากขอตัวเมีย สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 5 กลุ่ม โดยแบ่งตามความแตกต่างในความ
เข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 116 และ 40 Kd

ในพยาธิปากขอตัวผู้สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ คือ กลุ่มที่ 1 พยาธิที่มีโปรตีนน้ำหนัก
โมเลกุล 14 Kd เข้มชัด กลุ่มที่ 2 พยาธิกลุ่มที่มีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 82 และ 116 Kd และกลุ่มที่ 3
พยาธิที่มีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 92 Kd แต่ไม่พบ 116 Kd

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของพยาธิปากขอตัวผู้ และตัวเมีย พบว่าแถบโปรตีนส่วนใหญ่จะ
มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ยกเว้นแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 200 Kd ซึ่งจะพบเฉพาะในตัวเมียไม่พบใน
ตัวผู้จึงอาจสันนิษฐานได้ว่า โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 Kd มีส่วนเกี่ยวข้องกับอวัยวะสืบพันธุ์
ของพยาธิปากขอตัวเมียนั่นเอง.

ภาควิชา.....วิทยาศาสตร์การแพทย์.....
สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์การแพทย์.....
ปีการศึกษา...2536.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C245039 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEY WORD:

HOOKWORM / PROTEIN PATTERN / SDS-PAGE

RUJIRA BANGKULTHUM : A COMPATIVE STUDY OF PROTIEN PATTERN
IN ADULT HUMAN HOOKWORM BY SDS-PAGE. THESIS ADVISOR :
ASSO.PROF. VARUNEE VONGVICHIAN , Ph.D., ASSO.PROF. TADA
SUEBLINVONG, M.D. 70 pp. ISBN 974-584-558-2

A comparative study of human hookworm, *Necator americanus*, was performed by SDS-PAGE in order to classify them into subtypes. The protein pattern from crude extract of each of 38 worms was obtained by combined silver-coomassie staining of the SDS polyacrylamide gels. They were analysed by manual and densitometric techniques. Each protein isolate was composed of 36-42 protein bands in the molecular weight (MW) range of 14-200 Kd. There were 18-22 protein bands of MW 31-66.2 Kd which showed darker intensity. The protein with MW 17 Kd which is the darkest band was found in every isolate including male and female parasites.

The female worms were further characterized into 5 groups according to their differences in the intensity of protein bands at MW 116 and 40 Kd. The male worms were classified into 3 groups. The first male group was the worm which contained the outstanding protein band at MW 14 Kd. The second group was composed of the dark bands of MW 82 Kd and 116 Kd. The third group was the worm which carried the dark band at MW 82 Kd without the band of MW 116 Kd. The comparison of the protein pattern between the male and female adult hookworm showed that the female parasite carried a dark protien band of MW 200 Kd. Others were alike. This 200 Kd band which found exclusively in the female hookworm might be involved with the sexual organ of the worm.

ภาควิชา.....MEDICAL SCIENCE.....

สาขาวิชา.....MEDICAL SCIENCE.....

ปีการศึกษา.....2536.....

ลายมือชื่อนิติ.....Rujira Bangkultum.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....Varunee Vongvichian.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....Pada Sueblinvong.....



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เพราะได้รับความเมตตา อนุเคราะห์และเอื้อเฟื้อ จากอาจารย์หลายท่าน เริ่มตั้งแต่ท่านอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. วารุณี วงศ์วิเชียร ภาควิชาปรสิตวิทยา และรศ.พญ. ธาดา สิบหลินวงศ์ หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ท่านทั้งสองกรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น คำแนะนำ เพื่อแก้ปัญหาต่าง ๆ รวมทั้งกำลังใจซึ่งมีค่ายิ่งแก่ผู้วิจัยตลอดมา อาจารย์อีกหลายท่านในภาควิชาชีวเคมี ซึ่งกรุณาสับสนุนอุปกรณ์วิจัย สารเคมี และคำแนะนำตลอดการทดลองครั้งนี้ คือ ดร.จิระพันธ์ กริ่งไกร ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์ และดร.วิไล อโนมะศิริ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอย่างสูง รศ.นพ.พิสัย กรีชัยวิเชียร ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อจ.นพ.วิเชียร เจริญลาภ ผู้อำนวยการ ร.พ.เวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ในการแนะนำช่วยเหลือ เก็บตัวอย่างพยาธิ และโดยเฉพะอย่างยิ่ง นพ.สง่า อามารุง ผู้อำนวยการ โรงพยาบาลพระเทพวิทยาสนา จังหวัดกาญจนบุรี ที่กรุณาให้ความสะดวกที่พัก และ อาหาร แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่จังหวัดกาญจนบุรี

ขอขอบพระคุณ ผศ.วิไล ศักดิ์ศิริสัมพันธ์, อาจารย์ไพศาล ยิ่งยวด และเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลต่าง ๆ ด้วย

สุดท้ายนี้ วิจัยเล่มนี้เกิดขึ้นได้เนื่องจากความเมตตาและให้โอกาสศึกษาจาก รศ.พญ.ชนิษฐ บูรณศิริ ประธานกรรมการหลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ (พศ.2532-2535) และ รศ.พญ. บังอร ชมเดช ประธานกรรมการหลักสูตร (ปัจจุบัน) หัวหน้าการพยาบาล ข้าราชการและ เจ้าหน้าที่ห้องผ่าตัดออร์โทปิดิกส์ โรงพยาบาลรามาริบัติทุกท่าน ขอขอบพระคุณอย่างยิ่ง และขอขอบคุณทุก ๆ คน ในครอบครัวของผู้วิจัยด้วยความซาบซึ้งยิ่ง.

สารบัญ



	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
อธิบายคำย่อ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	6
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการ	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง	26
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	52
สรุป	57
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก	65
ประวัติผู้เขียน	70

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของพยาธิปากขอในคนทั้ง 3 ชนิด	10
ตารางที่ 2	แสดงปริมาณการสูญเสียเลือดใน 1 วันเนื่องจากพยาธิปากขอในคน ..	12
ตารางที่ 3	แสดงจำนวนเพศ และชนิดของตัวอย่างพยาธิปากขอทั้งหมด.....	28
ตารางที่ 4	แสดงค่าปริมาณการดูดแสงของโรบินเซรุ่มอัลบูมิน	33
ตารางที่ 5	แสดงความเข้มข้นของพยาธิแต่ละตัว (มค.ก./มล.)และค่าปริมาตรตัว อย่างพยาธิที่มีความเข้มข้นโรบิตินเท่ากับ 1.4 มค.ก.....	35
ตารางที่ 6	แสดงการแบ่งกลุ่มพยาธิตัวเมียแต่ละตัวโดยอาศัยความแตกต่างด้านความ เข้มของโรบิตินน้ำหนักกรัมเลกุล 116 และ 40 Kd จาก เจล.....	43
ตารางที่ 7	แสดงการแบ่งกลุ่มพยาธิตัวเมีย ตัวที่ 1-20 จัดเป็นกลุ่มที่ 1-5.....	44

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพแสดงการระบาดของพยาธิปากขอในคนตามพื้นที่ของ ทวีปต่าง ๆ	3
ภาพแสดงวงจรชีวิตของพยาธิปากขอในคน	8
รูปที่ 1 แสดง buccal capsule ของ <i>N.americanus</i>	29
รูปที่ 2 แสดง spicule ของตัวผู้ <i>N.americanus</i>	30
รูปที่ 3 แสดง ventral teeth ของ <i>A.duodenale</i>	31
รูปที่ 4 แสดง ventral teeth ของ <i>A.ceylanicum</i>	32
รูปที่ 5 กราฟเส้นตรงของโรปรตีนมาตรฐาน	34
รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานสำหรับโรปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ	37
รูปที่ 7 แสดงรูปแบบโรปรตีนของพยาธิปากขอในคนใน เอสดีเอส เจล	40
รูปที่ 8 ภาพแสดงรูปแบบโรปรตีนของพยาธิตัวเมีย	41
รูปที่ 9 กราฟ laser densitometer จากการวิเคราะห์แบบเชิงซ้อน (superimpose) ของพยาธิปากขอ ตัวเมีย 2 ตัว	42
รูปที่ 10 ภาพแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโรปรตีนของพยาธิปากขอตัวผู้ (ตัวที่ 21- 24 และตัวที่ 26-31)บนเอส ดี เอส เจล	46
รูปที่ 11 ภาพเปรียบเทียบรูปแบบโรปรตีนพยาธิตัวผู้ (ตัวที่ 32,34-41) บน เอส ดี เอส เจล	47
รูปที่ 12 กราฟจาก Densitometer แสดงการ Integrate ใน manual option จากเจลพยาธิปากขอตัวผู้	48
รูปที่ 13 ภาพแสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโรปรตีนบนเจลของพยาธิปากขอตัวเมีย กับตัวผู้	50
รูปที่ 14 กราฟ Laser densitometer จากการวิเคราะห์แบบเชิงซ้อน ของรูปแบบโรปรตีนของพยาธิปากขอตัวเมียและตัวผู้บนเจล	51

คำย่อ

ก.	กรัม.
น.น.	น้ำหนัก
นน./ปม.	น้ำหนักต่อปริมาตร
ปม.	ปริมาตร
ปม./ปม.	ปริมาตรต่อปริมาตร
มค.ก.	ไมโครกรัม
มค.ส	ไมโครลิตร
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร.
A. ABS	Absorbance
AcOH	Acetic acid
AgNO ₃	Silver nitrate
APS	Ammonium persulfate
Bis	N,N'- methylene-bis-acrylamide
BSA	Bovine Serum Albumin.
°C	Celcius degree
DDW	deionized distilled water
DW	distilled water
ed.	editor
et al.	et alii
Formalin	Formaldehyde

HCl	Hydrochloric acid
HW	Hookworm
Kd	Kilodalton
LMW, HMW	Low,High molecular weight
MeOH	Methanol
ml	millilitre
mm	millimeter
MW	molecular weight
NaOH	Sodium hydroxide
NH ₄ OH	Ammonium hydroxide
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	N,N,N',N'-tetra methylenediamine
Tris	Tris (Hydroxymethyl)aminomethane