

บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัย

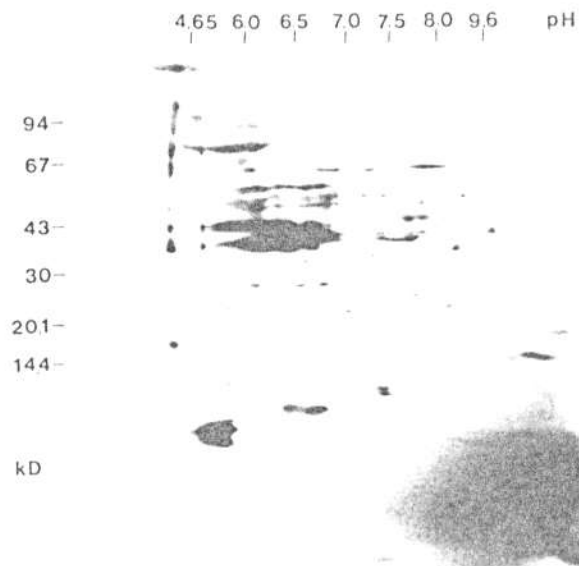
4.1 การจำแนกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิตัวจิ๊ด (*Gnathostoma spinigerum*) โดยวิธี two dimensional gel electrophoresis

เมื่อทำการแยกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด โดยวิธี two dimensional gel electrophoresis แล้วนำ 2D-PAGE gel มาย้อมด้วยสี silver stain พบว่า แอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนพยาธิตัวจิ๊ดประกอบด้วยแถบหรือจุดโปรตีน (polypeptide) ประมาณ 75 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง < 14.4 ถึง > 94 kD และมีค่า pI อยู่ระหว่าง < 4.65 ถึง > 9.6 (ภาพที่ 8 และ 9) สำหรับในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 20-30 kD ประกอบด้วยแถบหรือจุดโปรตีน ประมาณ 12 ชนิด ซึ่งมีค่า pI อยู่ระหว่าง < 4.65 -8.5 (ตารางที่ 1)

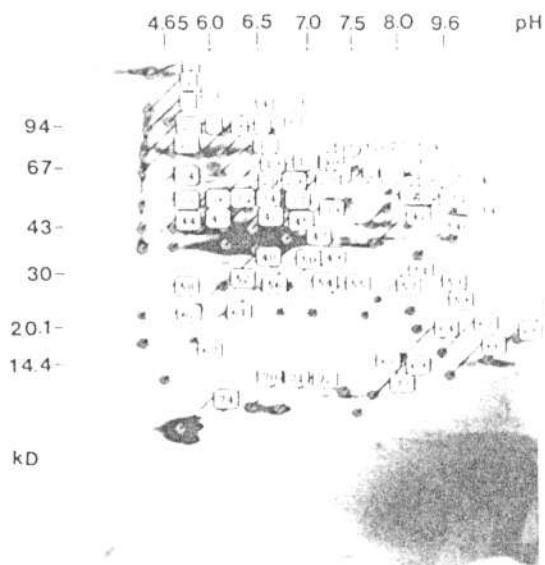
สำหรับการแยกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากตัวแก่เพศผู้และเพศเมียในวิธีเดียวกัน พบว่า แอนติเจน ที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ ประกอบด้วยแถบหรือจุดโปรตีน ประมาณ 44 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง < 14.4 ถึง > 94 kD และมีค่า pI อยู่ระหว่าง < 4.65 ถึง > 9.6 (ภาพที่ 10A และ 11A) แต่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 20-30 kD ประกอบด้วยแถบหรือจุดโปรตีน ประมาณ 5 ชนิด ซึ่งมีค่า pI อยู่ระหว่าง < 4.65 -9.0 (ตารางที่ 2) และแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย พบว่าประกอบด้วยแถบหรือจุดโปรตีนประมาณ 52 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง < 14.4 ถึง > 94 kD และมีค่า pI อยู่ระหว่าง < 4.65 ถึง > 9.6 (ภาพที่ 10B และ 11B) และในช่วงน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 20-30 kD ประกอบด้วยแถบหรือจุดโปรตีน ประมาณ 15 ชนิด ซึ่งมีค่า pI อยู่ระหว่าง < 4.65-8.7 (ตารางที่ 2)

4.2 การทำปฏิกิริยาของแอนติเจนกับซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด (proven human gnathostomiasis sera)

เมื่อทำการย้ายแถบหรือจุดโปรตีนแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด จาก 2D-PAGE gel ไปยังแผ่น nitrocellulose แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมของ



ภาพที่ 8 2D-PAGE gel แสดงการจำแนกแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้าน้ำ
ของพยาธิตัวจิ๋ว โดยวิธี two dimensional gel electrophoresis แล้วนำมาข้อมด้วย
silver stain



ภาพที่ 9 แสดงจำนวนแถบหรือจุดโปรตีนของ 2D-PAGE gel ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้าน้ำ
หน้าของพยาธิตัวจิ๋วที่นับจากคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 1 แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุล และ pI ของแถบหรือจุดโปรตีนที่อยู่ในช่วงน้ำหนัก
โมเลกุล 20-30 kD ของ 2D-PAGE gel ของแอนติเจนสกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3
ชั้นแก้วหน้าของพยาธิตัวจิ๋ว

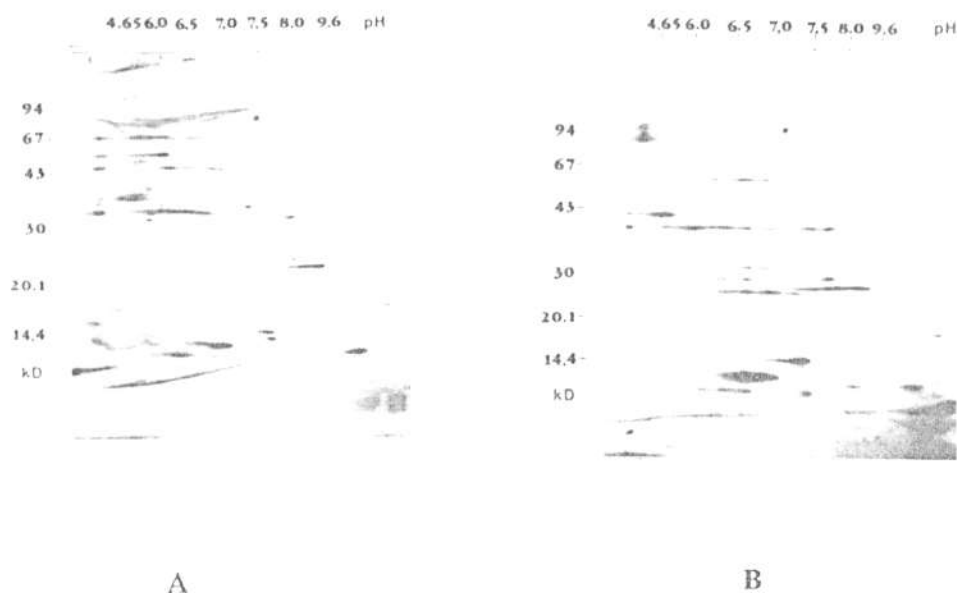
SPOT NO	MW	pI
48	28	5.6
49	28	6.2
50	28	6.6
51	26	7.8
52	24	5.2
53	23	8.3
54	23	6.4
55	23	6.9
56	23	5.7
57	22	7.6
58	22	< 4.65
59	20	8.5

ผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยวิธี immunoblotting พบว่า แอนติบอดีในซีรัมเหล่านี้ ทำปฏิกิริยากับแถบหรือจุดแอนติเจนอยู่ระหว่าง 37-63 ชนิด (ภาพที่ 12) และในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD มีแถบ หรือจุดแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย 3-16 ชนิด มีค่า pI อยู่ระหว่าง <4.65-9.5 (ตารางที่ 3) ซึ่งมีแถบหรือจุดแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23-25 kD และค่า pI 8.3-8.5 ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยเพียง 5 ตัวอย่าง (83.3 %) (ตารางที่ 3 และภาพที่ 13)

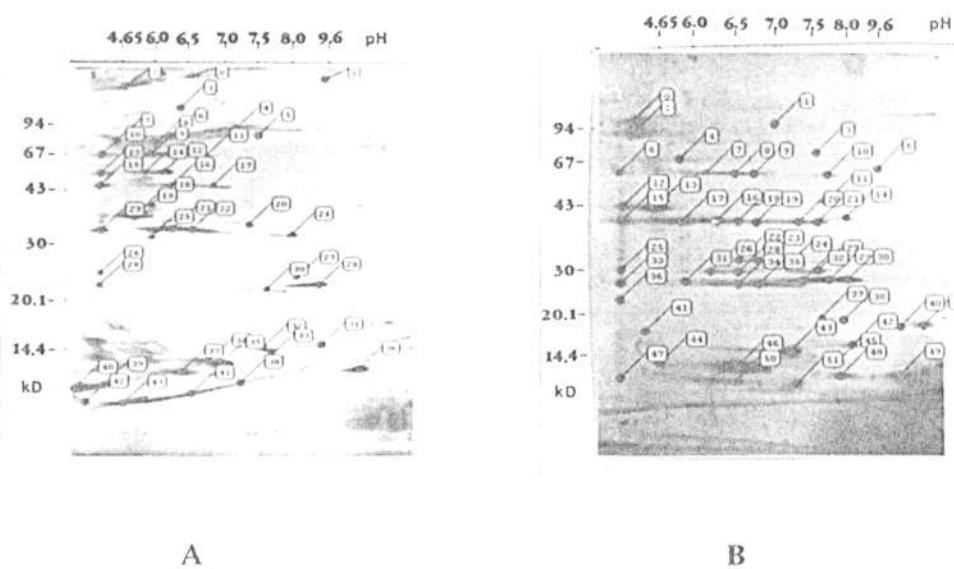
สำหรับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้และเพศเมีย เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืดที่ได้ตัวพยาธิยืนยัน จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่า แอนติบอดีในซีรัมเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนของแอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ อยู่ระหว่าง 11-27 ชนิด (ภาพที่ 14) และแอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิตัวแก่เพศเมียอยู่ระหว่าง 21-27 ชนิด (ภาพที่ 15) สำหรับแถบหรือจุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ พบว่ามีระหว่าง 1-3 ชนิด ซึ่งมีค่า pI อยู่ระหว่าง 6.0-7.8 และแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย มีอยู่ระหว่าง 1-4 ชนิด มีค่า pI อยู่ระหว่าง < 4.65-7.5 (ตารางที่ 4) แต่ไม่มีแถบหรือจุดโปรตีนของแอนติเจนทั้ง 2 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 23-25 kD และค่า pI ระหว่าง 8.3-8.5 ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด

4.3 การทำปฏิกิริยาของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้น้ำของพยาธิตัวจืดกับซีรัมของผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายโรคพยาธิตัวจืด (presumptive human gnathostomiasis sera)

ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายโรคพยาธิตัวจืด จำนวน 5 ราย เป็นผู้ป่วยที่มีอาการทางสมอง และให้ผลบวกค่าไตเตอร์สูงกับการตรวจโดยวิธี ELISA ที่ใช้แอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนพยาธิตัวจืด ผลการทดสอบซีรัมกับแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้น้ำของพยาธิตัวจืด โดยวิธี immunoblotting พบว่าทำปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนแอนติเจนประมาณ 30-63 ชนิด (ภาพที่ 16) ในแอนติเจนช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD มีแถบหรือจุดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4-17 ชนิด (ตารางที่ 5) และมีแถบหรือจุดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 23-25 kD และค่า pI 8.3-8.5 ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย 4 ราย (80%) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 17)



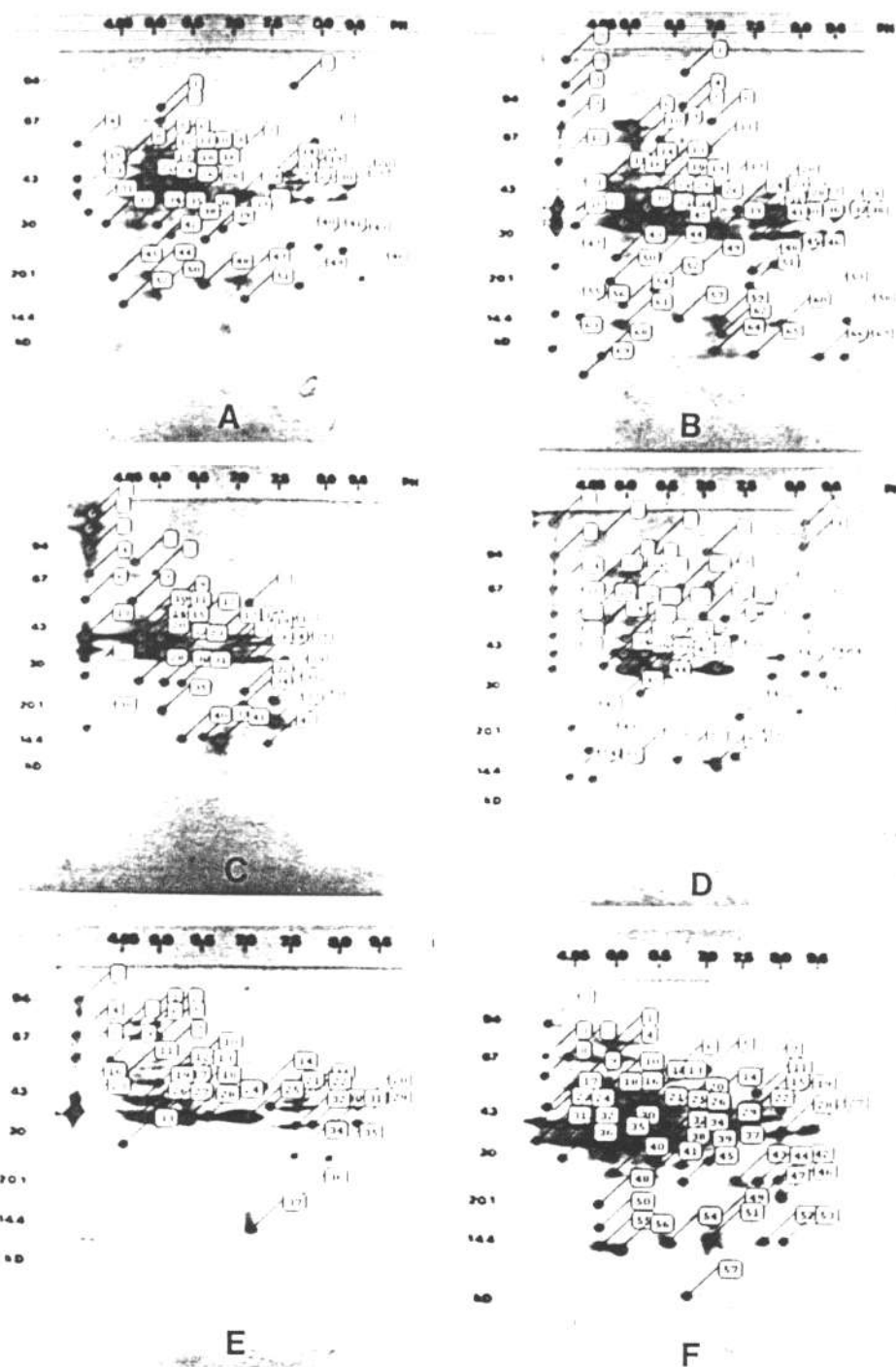
ภาพที่ 10 2D-PAGE gel แสดงการจำแนกแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ (A) และพยาธิตัวแก่เพศเมีย (B) ที่ย้อมด้วย silver stain



ภาพที่ 11 แสดงจำนวนแถบหรือจุดโปรตีนของ 2D-PAGE gel ของแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ (A) และพยาธิตัวแก่เพศเมีย (B) จากเครื่องคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 2 แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุล และค่า pI ของแถบหรือจุดโปรตีนที่อยู่ในช่วงน้ำหนัก
โมเลกุล 20-30 kD ของ 2D-PAGE gel ของแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้
และตัวแก่เพศเมีย

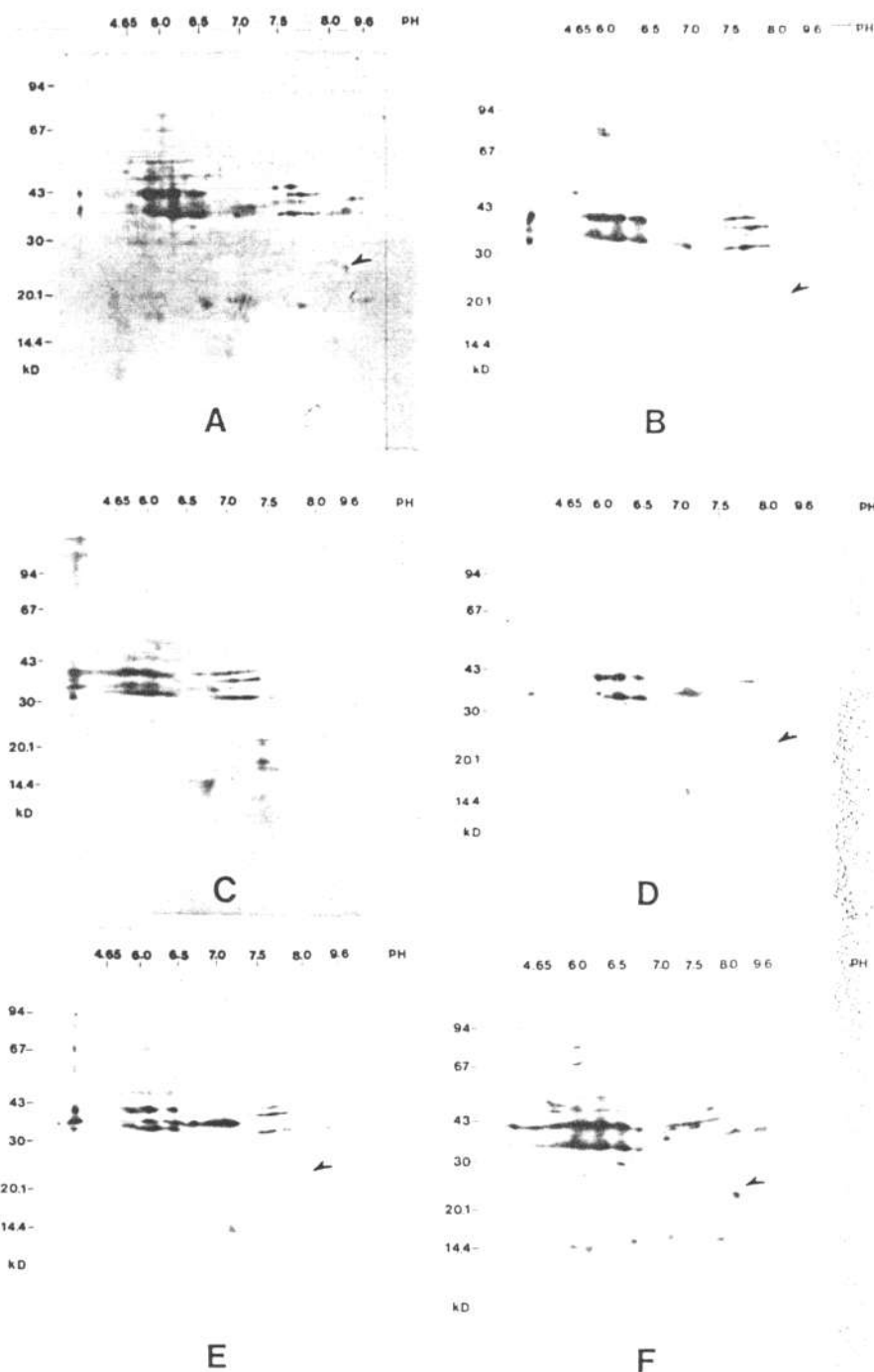
แอนติเจนจากพยาธิตัวแก่เพศผู้			แอนติเจนจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย		
SPOT NO	MW	pI	SPOT NO	MW	pI
26	27	4.5	22	29	6.6
27	26	8.0	23	29	7.0
28	25	9.2	24	27	7.2
29	25	4.6	25	27	4.4
30	23	7.9	26	27	6.0
			27	27	7.8
			28	27	6.6
			29	25	8.0
			30	25	8.7
			31	25	5.6
			32	25	7.5
			33	25	4.4
			34	24	6.6
			35	24	7.0



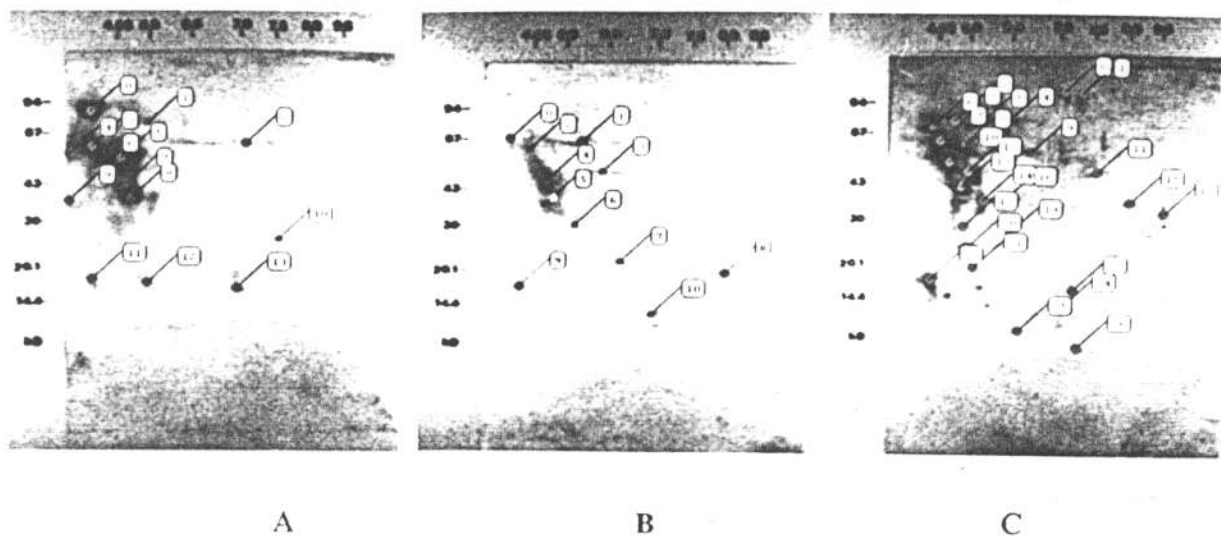
ภาพที่ 12 จำนวนแถบหรือจุดโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจากแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้าวหน้า ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด 6 ราย (A, B, C, D, E และ F เป็นภาพของผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ)

ตารางที่ 3 ค่าน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ของแถบหรือจุดโปรตีนที่อยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนมาจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจากแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ดทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยตัวจิ๊ด 6 ราย

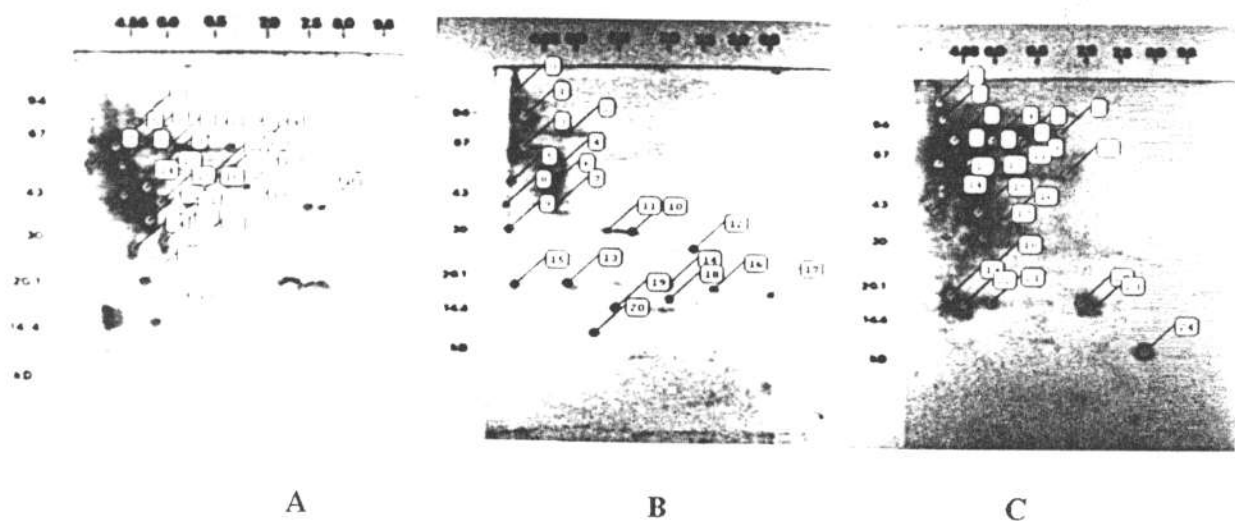
ซีรัมรายที่ 1			ซีรัมรายที่ 2			ซีรัมรายที่ 3			ซีรัมรายที่ 4			ซีรัมรายที่ 5			ซีรัมรายที่ 6		
spot no	M W	pI	spot no	M W	pI	spot no	M W	pI	spot no	M W	pI	spot no	M W	pI	spot no	M W	pI
38	29	6.9	43	25	6.0	27	28	4.2	44	28	6.4	33	28	4.8	36	29	4.6
39	28	6.4	44	25	6.4	28	27	4.8	45	26	5.6	34	26	7.6	37	29	7.2
40	26	7.8	45	24	7.7	29	26	7.6	46	25	8.5	35	25	8.4	38	29	6.5
41	25	8.5	46	24	8.5	30	27	6.2	47	24	7.5				39	28	6.9
42	24	5.8	47	22	4.4	31	27	6.4	48	21	4.6				40	26	6.2
43	24	9.2	48	22	7.6	32	25	7.3							41	25	6.4
			49	21	6.8	33	22	7.5							42	26	8.2
						34	22	7.3							43	25	7.5
						35	20	6.2							44	25	7.8
															45	24	6.8
															46	23	8.4
															47	22	7.8



ภาพที่ 13 แถบหรือจุดโปรตีนที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 23-25 kD และค่า pI ระหว่าง 8.3-8.5 (ลูกศรชี้)บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจาก แอนติเจนสกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นแก้วหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด ที่ทำปฏิกิริยากับ ซีรัมผู้ป่วยผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด 6 ราย (A, B, C, D, E และ F เป็นภาพของผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ)



ภาพที่ 14 จำนวนแถบหรือจุดโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose ที่มีแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัว
แก่เพศผู้ ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัว
จืด 3 ราย (A, B และ C เป็นภาพของผู้ป่วยรายที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ)



ภาพที่ 15 จำนวนแถบหรือจุดโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose ที่มีแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัว
แก่เพศเมีย ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิ
ตัวจืด 3 ราย (A, B และ C)

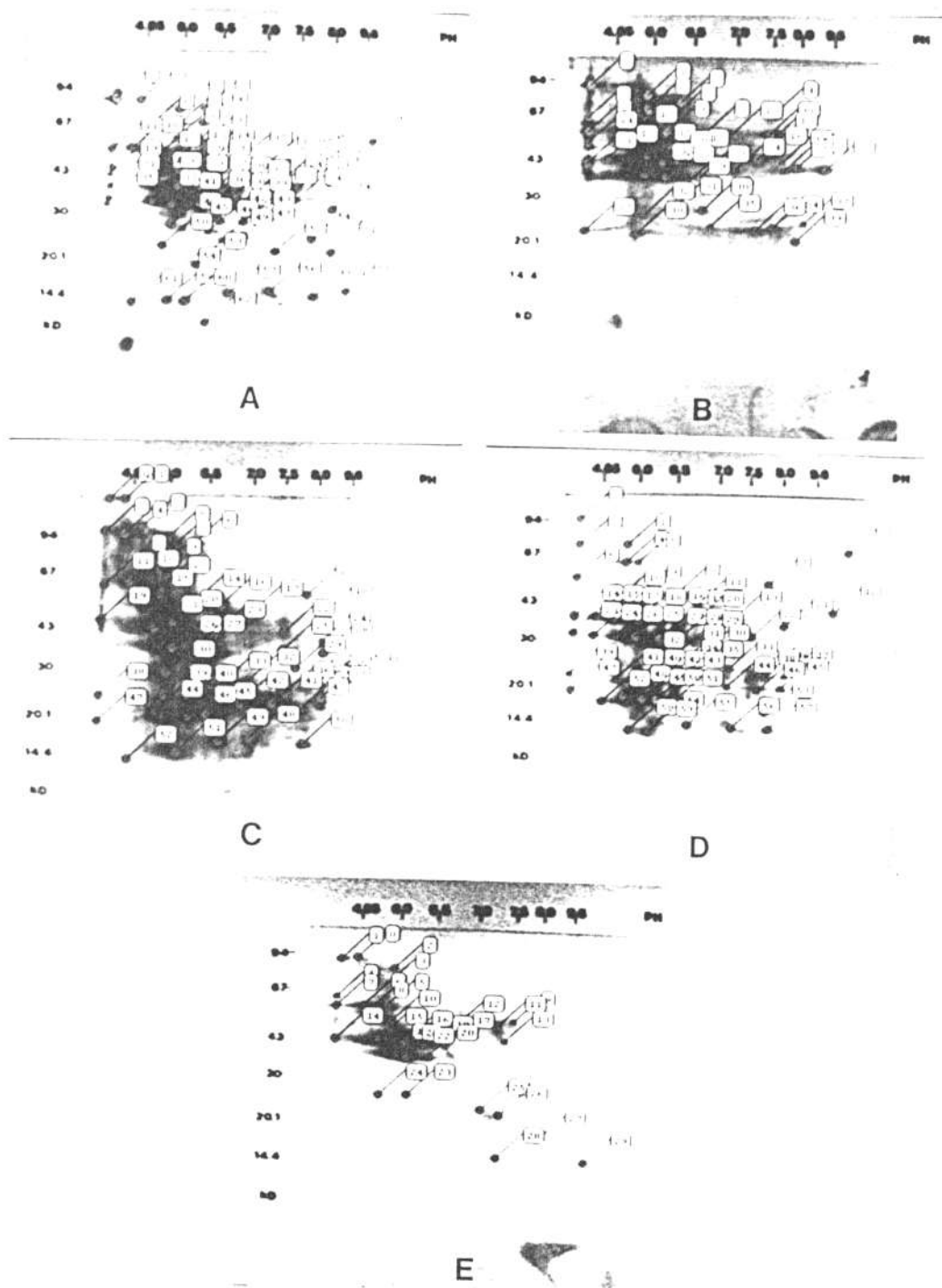
ตารางที่ 4 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ของแถบหรือจุดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในระหว่าง 20-30 kD ที่ปรากฏอยู่บนแผ่น nitrocellulose ที่มีแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ (ก) และเพศเมีย (ข) ที่ย้ายจาก 2D-PAGE gel ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด 3 ราย

แอนติเจนจากพยาธิตัวแก่เพศผู้								
ซีรัมรายที่ 1			ซีรัมรายที่ 2			ซีรัมรายที่ 3		
spot no	MW	pI	spot no	MW	pI	spot no	MW	pI
10	25	7.8	6	29	6.2	18	28	6.0
			7	22	6.8	19	25	6.4
						20	23	6.0

ก

แอนติเจนจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย								
ซีรัมรายที่ 1			ซีรัมรายที่ 2			ซีรัมรายที่ 3		
spot no	MW	pI	spot no	MW	pI	spot no	MW	pI
22	29	6.0	10	30	6.5	17	30	5.6
23	28	6.3	11	30	6.8	18	22	6.0
24	28	5.2	12	25	7.6			
25	21	5.6						

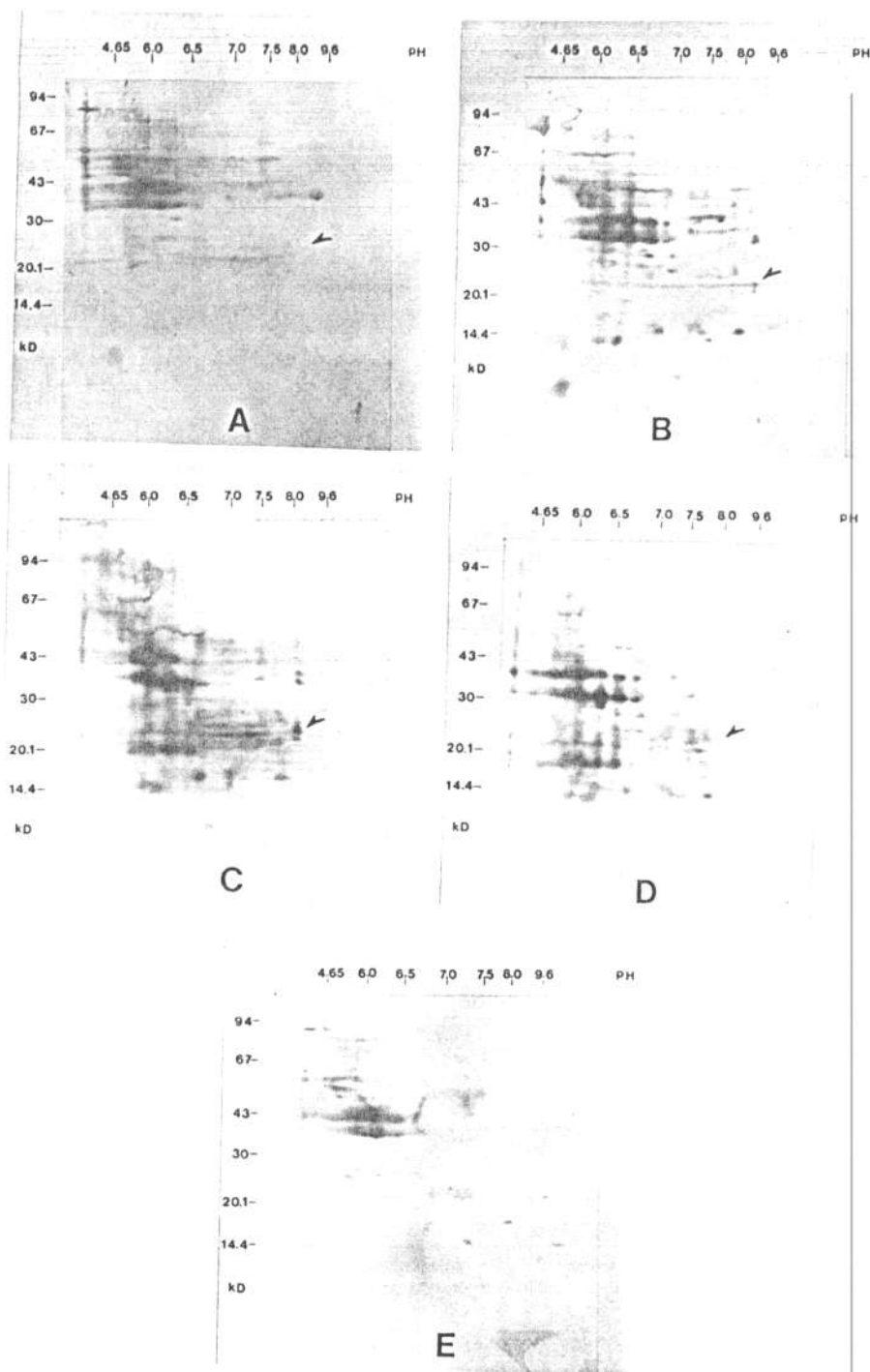
ข



ภาพที่ 16 จำนวนแถบหรือจุดโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจากแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้าวหน้า ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายโรคพยาธิตัวจิ๊ด 5 ราย (A, B, C, D และ E เป็นภาพของผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ)

ตารางที่ 5 แถบหรือจุดโปรตีนที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 20-30 kD บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจากแอนติเจนสกัดจาก ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้าวหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยที่มี อาการทางคลินิกคล้ายโรคพยาธิตัวจิ๊ด 5 ราย

ซีรัมรายที่ 1			ซีรัมรายที่ 2			ซีรัมรายที่ 3			ซีรัมรายที่ 4			ซีรัมรายที่ 5		
spot no	MW	pI	spot no	MW	pI	spot no	MW	pI	spot no	MW	pI	spot no	MW	pI
42	29	6.5	30	28	6.7	30	29	6.0	30	28	6.9	23	27	5.2
43	29	6.8	31	28	6.3	31	28	9.4	31	28	6.5	24	27	6.3
44	28	6.0	32	27	5.8	32	28	7.0	32	27	6.0	25	24	7.3
45	27	6.2	33	25	8.5	33	27	6.8	33	26	7.2	26	22	7.5
46	27	6.4	34	24	7.5	34	27	8.9	34	25	6.5			
47	26	6.8	35	24	6.8	35	27	7.9	35	25	6.8			
48	26	7.8	36	23	7.3	36	26	7.4	36	25	7.2			
49	25	6.5	37	23	<4.6	37	25	8.4	37	24	8.5			
50	24	5.8	38	22	5.8	38	25	<4.6	38	24	7.2			
51	24	8.4	39	21	8.0	39	25	6.0	39	24	<4.6			
52	24	7.3				40	25	6.3	40	23	6.0			
						41	24	7.2	41	23	5.5			
						42	24	6.8	42	22	6.4			
						43	23	7.8	43	22	6.7			
						44	22	5.6	44	21	7.3			
						45	22	6.5	45	21	8.2			
						46	22	6.3						



ภาพที่ 17 แอบริวจุดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 23-25 kD และค่า pI ระหว่าง 8.3-8.5 (ลูกศรชี้)บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจากแอนติเจนสกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด ที่ทำปฏิกิริยากับ ซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายโรคพยาธิตัวจิ๊ด 5 ราย (A, B, C, D และ F เป็นภาพของผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ)

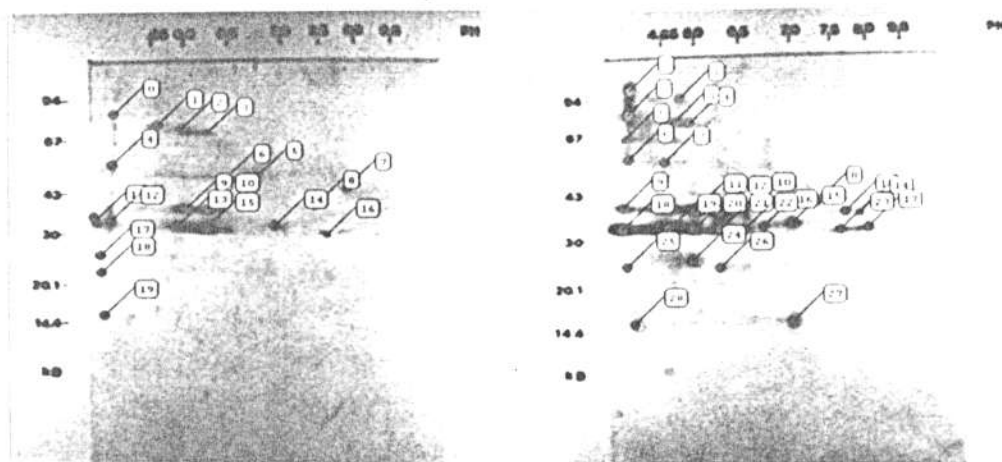
4.4 การทำปฏิกิริยาของแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจืดกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิชนิดอื่น

ซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ เป็นซีรัมจากผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง (Angiostongyliasis) 1 ตัวอย่าง และซีรัมผู้ป่วยพยาธิศึคหมู (Cysticercosis) 1 ตัวอย่าง พบว่าแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้าของพยาธิตัวจืดทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง 29 ชนิด และกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิศึคหมู 20 ชนิด (ภาพที่ 18) และในแถบหรือ จุดโปรตีนแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD พบว่าเกิดปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยพยาธิศึคหมู 2 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 23 และ 27 kD และมีค่า $pI < 4.65$ ทั้ง 2 ชนิด สำหรับการเกิดปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง 3 ชนิด ที่น้ำหนักโมเลกุล 24, 25 และ 24 kD และมีค่า $pI < 4.65, 6.0$ และ 6.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

สำหรับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้และเพศเมีย พบว่า มีแถบหรือจุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคศึคหมูประมาณ 7 ชนิดสำหรับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ และ ประมาณ 5 ชนิด สำหรับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย (ภาพที่ 19A และ ภาพที่ 20 A) และพบว่าเกิดปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD เพียง 1 ชนิดกับแอนติเจนที่สกัดจากตัวแก่เพศผู้ที่น้ำหนักโมเลกุล 22 kD และมีค่า pI 7.3 แต่ไม่พบในแอนติเจนที่เตรียมจากตัวแก่เพศเมีย และเมื่อทำปฏิกิริยากับผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่งพบว่าทำปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีน 24 ชนิด กับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ และ 21 ชนิด สำหรับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย (ภาพที่ 19A และ 20B) และในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD มีแถบหรือจุดโปรตีนประมาณ 4 ชนิด เมื่อใช้แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ในการทำปฏิกิริยา และมีประมาณ 3 ชนิดเมื่อใช้แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย แต่ไม่มีแถบหรือจุดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23-25 kD และมีค่า pI 8.3-8.7 กับแอนติเจนทั้ง 2 ชนิด (ตารางที่ 7)

4.5 การทำปฏิกิริยาของแอนติเจนจากพยาธิตัวจืดกับซีรัมรวมของคนปกติ

เมื่อนำแอนติเจนจากพยาธิตัวจืดที่แยกชนิดมาทำปฏิกิริยาโดยวิธี immunoblotting กับซีรัมรวมของคนปกติที่เตรียมจากซีรัมของคนปกติที่มีสุขภาพแข็งแรง จำนวน 10 ราย พบว่ามีการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้าของพยาธิตัวจืด เกิดแถบหรือจุดสีของโปรตีน ประมาณ 23 ชนิด , ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้ 9 ชนิด และ 11 ชนิดสำหรับแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย (ภาพที่ 21) และ



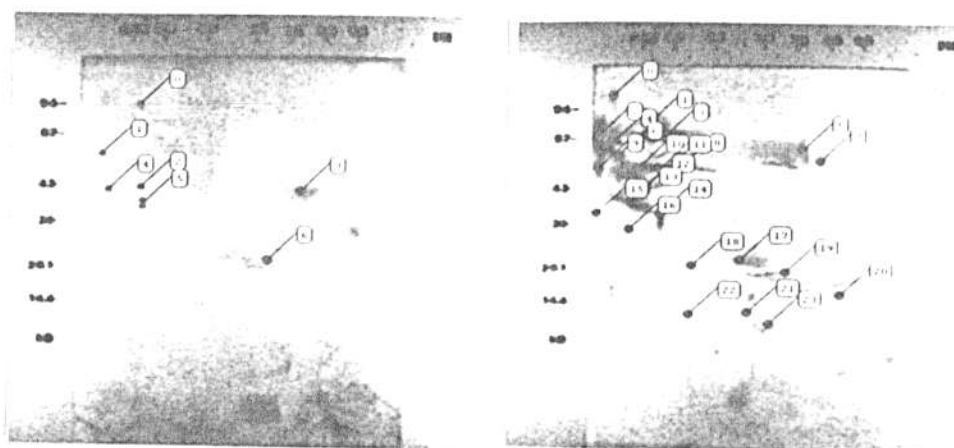
A

B

ภาพที่ 18 จำนวนแถบหรือจุดโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose ที่มีแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อน ระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิคืดหมู 1 ราย(A)และซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง 1 ราย(B)

ตารางที่ 6 แถบหรือจุดโปรตีนที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 20-30 kD บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจากแอนติเจนสกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิคืดหมู 1 ราย และพยาธิหอยโข่ง 1 ราย

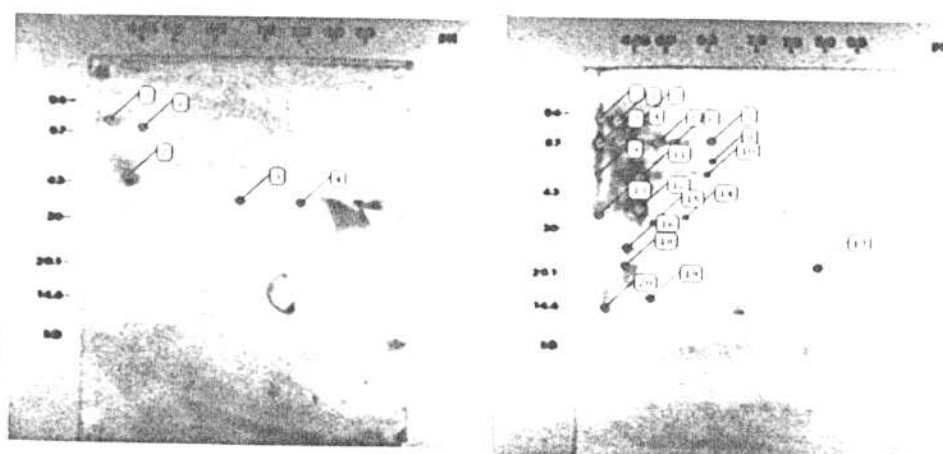
ผู้ป่วยโรคพยาธิคืดหมู			ผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง		
SPOT NO	MW	pI	SPOT NO	MW	pI
17	27	<4.65	24	25	6.0
18	24	< 4.65	25	24	< 4.65
			26	24	6.3



A

B

ภาพที่ 19 จำนวนแถบหรือจุดโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose ที่มีแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ ตัวแก่เพศผู้ ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิ ตืดหมู 1 ราย(A) และซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง 1 ราย (B)



A

B

ภาพที่ 20 จำนวนแถบหรือจุดโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose ที่มีแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ ตัวแก่เพศเมียที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิ ตืดหมู 1 ราย(A) และซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง 1 ราย (B)

ตารางที่ 7 แถบหรือจุดโปรตีนที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 20-30 kD บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจากแอนติเจนสกัดจาก พยาธิตัวแก่เพศผู้ (ก) และเพศเมีย (ข) ของพยาธิตัวจิ๊ด ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย โรคพยาธิคืดหมู 1 ราย และพยาธิหอยโข่ง 1 ราย

แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศผู้					
ผู้ป่วยโรคพยาธิคืดหมู			ผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง		
SPOT NO	MW	pI	SPOT NO	MW	pI
6	22	7.3	16	29	< 4.65
			17	22	6.8
			18	21	6.3

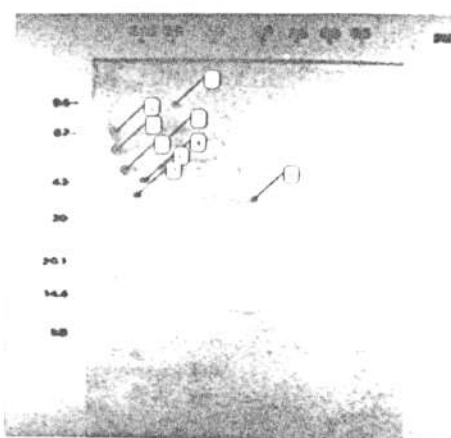
ก

แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวแก่เพศเมีย					
ผู้ป่วยโรคพยาธิคืดหมู			ผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง		
SPOT NO	MW	pI	SPOT NO	MW	pI
ไม่มี			16	27	< 4.65
			17	21	8.0
			18	21	< 4.65

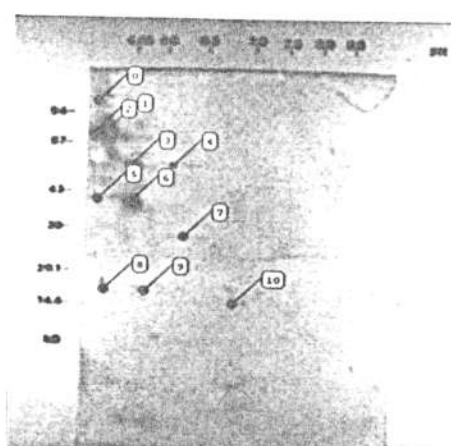
ข



A



B



C

ภาพที่ 21 จำนวนแถบหรือจุด โปรตีนบนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 2D-PAGE gel ที่เตรียมจากแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้าวหน้า (A), ตัวแก่เพศผู้ (B) และ ตัวแก่เพศเมีย (C) ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของคนปกติ 1 ตัวอย่าง

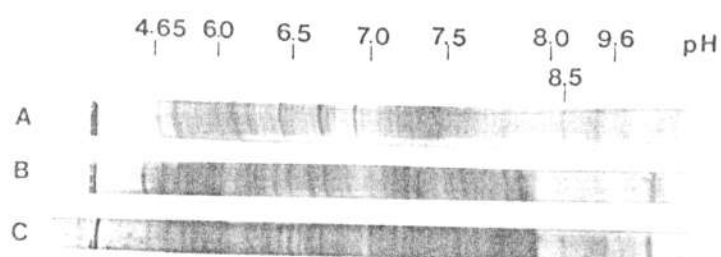
พบว่าไม่มีการทำปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 20-30 kD กับ แอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าและตัวแก่เพศผู้ แต่กับแอนติเจนที่สกัดจาก ตัวแก่เพศเมีย พบเพียง 1 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 29 kD และมีค่า pI เท่ากับ 6.2 (spot ที่ 7; ภาพที่ 21 C)

4.6 การจำแนกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจืดโดยวิธี one dimensional gel electrophoresis

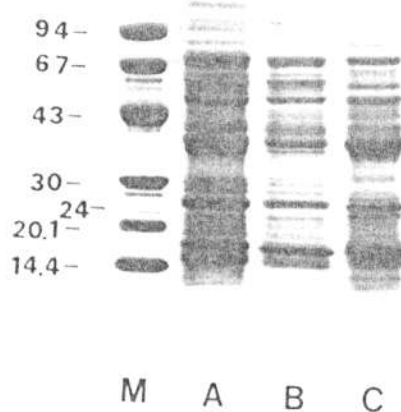
4.6.1 การจำแนกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจืด โดยวิธี Isoelectric focusing เมื่อนำแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้า, ตัวแก่เพศผู้ และตัวแก่เพศเมียของพยาธิตัวจืดมาแยกชนิดโดยวิธี isoelectric focusing และย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R 250 พบว่า แยกได้แถบโปรตีนประมาณ 46, 34 และ 38 ชนิดตามลำดับ และ พบว่ามีแถบโปรตีนที่ pH ประมาณ 8.5 ในแอนติเจน ทั้ง 3 ชนิด แต่แถบโปรตีนที่เตรียมจาก พยาธิตัวแก่เพศผู้ค่อนข้างจางมาก (ภาพที่ 22)

4.6.2 การจำแนกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจืด โดยวิธี SDS-PAGE นำแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้า, ตัวแก่เพศผู้ และ ตัวแก่เพศเมีย ของพยาธิตัวจืด มาแยกชนิดโดยเทคนิค SDS-PAGE แล้วย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R 250 พบว่า แยกได้แถบโปรตีนประมาณ 30, 18 และ 22 ชนิด ตามลำดับ และ พบว่ามีแถบ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 24 kD ในแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 23)

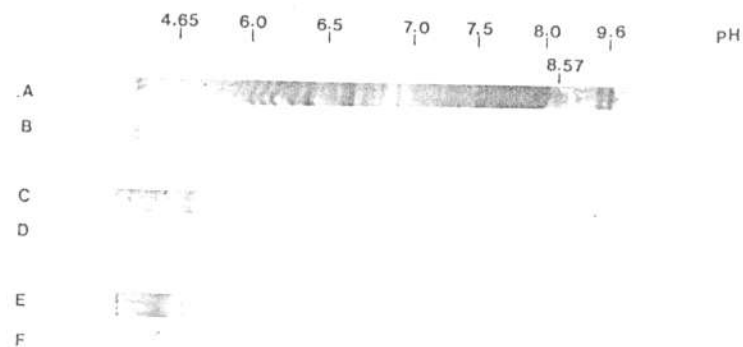
4.6.3 การทำปฏิกิริยาของแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจืดกับซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิ ตัวจืดและซีรัมรวมของคนปกติ บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายแถบโปรตีนมาจาก IEF gel แถบโปรตีนแอนติเจนที่แยกตามค่า pI ทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจืด พบว่าให้แถบปฏิกิริยาประมาณ 24, 15 และ 8 ชนิด กับแอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้า, ตัวแก่เพศผู้และตัวแก่เพศเมีย ตามลำดับ และมีแถบปฏิกิริยาที่ค่า pH ประมาณ 8.5 เฉพาะแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนของพยาธิเท่านั้น สำหรับซีรัมรวมคนปกติเมื่อนำมา ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด พบว่าเกิดแถบปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติเจนที่สกัดจากตัว อ่อนพยาธิประมาณ 7 ชนิด แต่ไม่มีแถบปฏิกิริยาที่ค่า pH ประมาณ 8.5 (ภาพที่ 24)



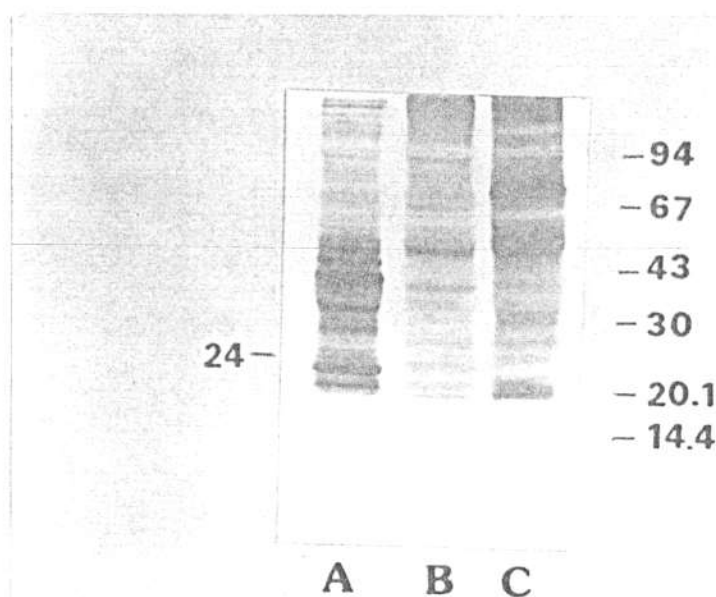
ภาพที่ 22 แถบโปรตีนของของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้วก้าวหน้า (A), ตัวแก่เพศผู้ (B) และตัวแก่เพศเมีย (C) ที่ถูกแยกชนิดโดยเทคนิค isoelectric focusing แล้วย้อมสี Coomassie brilliant blue R -250 แสดงแถบโปรตีนที่ pH ประมาณ 8.5



ภาพที่ 23 แลบบรตีนของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้วก้านหน้า (A), ตัวแก่เพศผู้ (B) และตัวแก่เพศเมีย (C) ที่แยกชนิดโดยเทคนิค ID-PAGE แล้วย้อมสี coomassie brilliant blue R-250 แสดงแลบบรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 kD (M = MW standard marker)



ภาพที่ 24 แถบโปรตีนแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้า, ตัวแก่เพศผู้ และตัวแก่เพศเมียของพยาธิตัวจิ๊ด บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก IEF gel ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด (A, C และ E ตามลำดับ) และซีรัมรวมคนปกติ (B, D และ F ตามลำดับ) แสดงแถบโปรตีนที่ pI 8.5 ที่มีเฉพาะแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าเท่านั้น

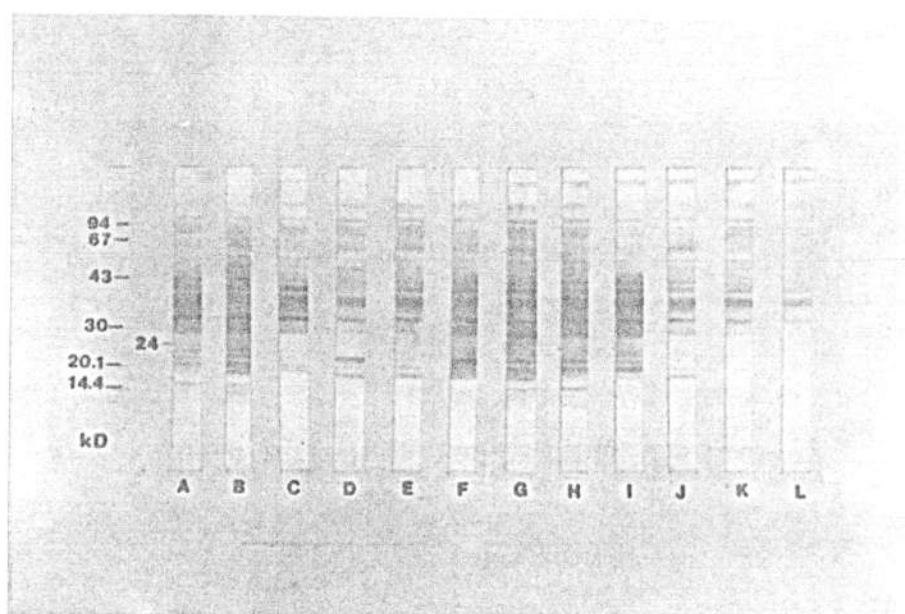


ภาพที่ 25 แถบโปรตีนแอนติเจนสกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้า, ตัวแก่เพศผู้ และ ตัวแก่เพศเมียของพยาธิตัวจิ๊ด บน nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนจาก 1D-PAGE gel ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด แสดงแถบโปรตีนที่น้ำหนัก โมเลกุลประมาณ 24 kD (ตัวเลขซ้ายมือแสดง น้ำหนักโมเลกุลที่ 24 kD และ ตัวเลขขวามือแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของ low range standard MW marker)

4.6.4 การทำปฏิกิริยาของแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจี๊ดกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจี๊ด, ซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ด, ซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิชนิดอื่น และซีรัมรวมของคนปกติ บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนมาจาก SDS-PAGE gel

แถบโปรตีนแอนติเจนที่แยกชนิดตามน้ำหนักโมเลกุล ทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจี๊ด พบว่า ให้แถบปฏิกิริยาประมาณ 22, 17 และ 20 ชนิดกับแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นแก้ว, ตัวแก่เพศผู้และตัวแก่เพศเมียตามลำดับ และให้แถบปฏิกิริยาที่น้ำหนักโมเลกุลที่ประมาณ 24 kD กับแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 25)

เมื่อนำแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นแก้วของพยาธิตัวจี๊ดจากการแยกชนิดตามน้ำหนักโมเลกุลของ SDS-PAGE gel มาทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจี๊ด 6 ราย, ซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ด 3 ราย, ซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิคืดหมู 1 ราย, ซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง 1 ราย และซีรัมรวมคนปกติ 1 ตัวอย่าง พบว่า ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD มีแถบโปรตีนประมาณ 5 ชนิด ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมตัวอย่าง ได้แก่ แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20, 21, 23, 24 และ 26 kD แต่เฉพาะแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 kD ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจี๊ดทั้ง 6 ราย และซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ดทั้ง 3 ราย แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคคืดหมู, ซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง และซีรัมรวมของคนปกติ (ภาพที่ 26 และ ตารางที่ 8)



ภาพที่ 26 แถบโปรตีนแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ชั้นก้าวหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้ายมาจาก ID-PAGE gel ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด 6 ราย (A, B, C, D, E และ F), ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายโรคพยาธิตัวจิ๊ด (G, H และ I), ซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง (J), ซีรัมผู้ป่วยโรคติดเชื้อ (K) และซีรัมรวมคนปกติ (L) แสดงแถบโปรตีน ที่น้ำหนักโมเลกุล 24 kD

ตารางที่ 8 แถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 20-30 kD ของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3
 ขั้นก้าวหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด บนแผ่น nitrocellulose ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรค
 พยาธิตัวจิ๊ด, ซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายโรคพยาธิตัวจิ๊ด, ซีรัมผู้ป่วยโรค

MW	ผู้ป่วยโรคพยาธิ ตัวจิ๊ด (6)	ผู้ป่วยที่มีอาการ ทางคลินิก (3)	ผู้ป่วยโรคพยาธิ หอยโข่ง (1)	ผู้ป่วยโรคพยาธิ เม็ดหนู (1)	ซีรัมรวมคนปกติ (1)
20	6	3	1	1	1
21	6	3	1	1	-
23	5	3	1	1	1
24	6	3	-	-	-
26	6	3	1	-	-