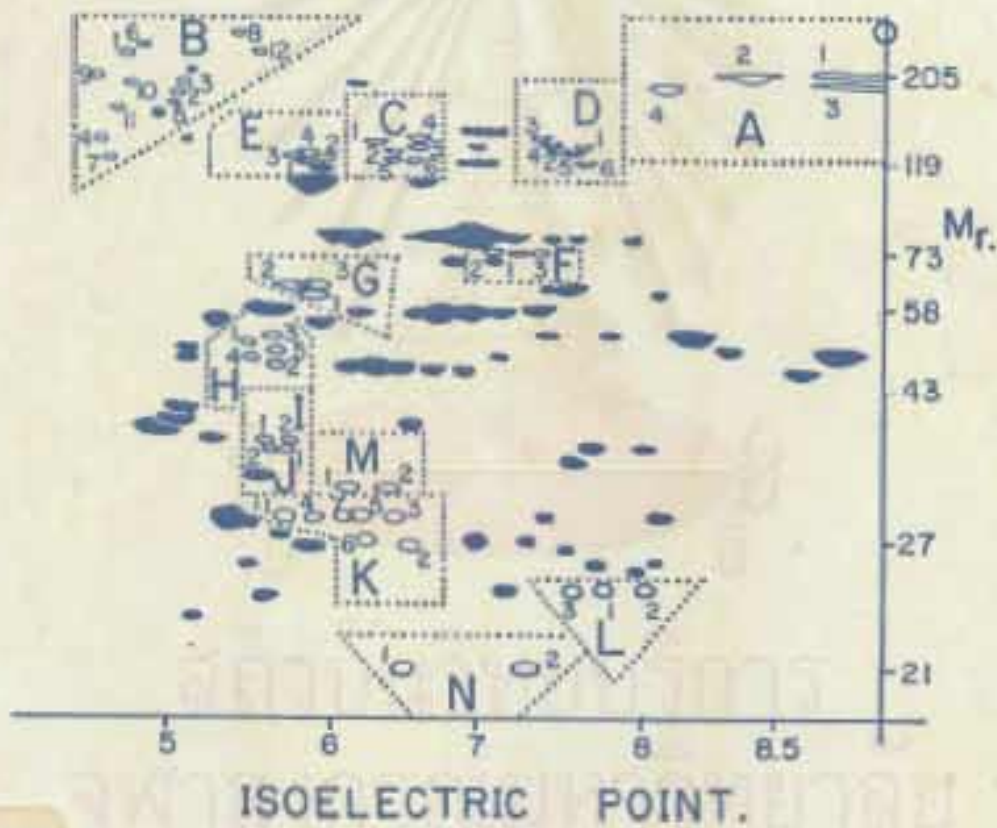




รูปแบบของโปรตีนใน PLASMODIUM FALCIPARUM
โดยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ



พ
ท 15
004668

โดย

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธาดา สืบเทพินวงศ์
รองศาสตราจารย์ สดศรี ไชยทอง
นางสาว จุฬาทันธุ์ ทิมสวัสดิ์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

รูปแบบของโปรตีนใน Plasmodium falciparum โดยอิเล็คโตรโฟรีซิสสองมิติ

โดย



รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์
รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง
นางสาว จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์

สนับสนุนโดย

งบประมาณโครงการวิจัยประจำปี 2528 และ 2529

จาก

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมษายน 2531



ก.

คำชี้แจง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ในหัวข้อเรื่อง "รูปแบบของโปรตีนใน Plasmodium falciparum โดยอิเล็คโตรฟอริซิสสองมิติ" นั้นเป็นการรวมโครงการวิจัย 2 เรื่อง เข้าด้วยกันได้แก่

1. การศึกษารูปแบบของโปรตีนในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P.falciparum โดยอิเล็คโตรฟอริซิสสองมิติ ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนประจำปี 2528 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การศึกษารูปแบบของโปรตีนใน P.falciparum ระยะต่างๆซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยอิเล็คโตรฟอริซิสสองมิติ ได้รับทุนสนับสนุนประจำปี 2529 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยที่เนื้อหาการวิจัยในโครงการแรกนั้น ใช้เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.falciparum ซึ่งผ่านการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ มาทำเป็น homogenate และสกัดส่วน soluble protein ไปแยกด้วยอิเล็คโตรฟอริซิสสองมิติ ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R จึงอาจจะมีแถบโปรตีนจากเม็ดเลือดแดงติดมาด้วย แม้จะ lyzed และล้างเม็ดเลือดก่อน lyzed parasites ก็ตาม ดังนั้นในโครงการที่สอง จึงทำการศึกษาโดยใช้สารกัมมันตรังสีได้แก่ ^{35}S -methionine incorporate เข้าในตัวเชื้อ P.falciparum แล้วจึงสกัด soluble proteins นำมาแยกด้วยอิเล็คโตรฟอริซิสสองมิติ ต่อด้วย autoradiography แถบโปรตีนที่พบใน autoradiograph จึงเกิดจากโปรตีนของเชื้อ P.falciparum เท่านั้น

ด้วยเหตุที่โครงการวิจัยทั้งสองเรื่องต่อเนื่องกันและมีเนื้อหาบางส่วนซ้อนกันอยู่ คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรจะรวมรายงานฉบับสมบูรณ์ของทั้งสองโครงการเข้าด้วยกันเพื่อประโยชน์ในด้านการเปรียบเทียบผล

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์
รองศาสตราจารย์ สดศรี ไททอง
นางสาว จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ค.

สารบัญ

หน้า

คำชี้แจง.....	ก-ข
สารบัญ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ง
สารบัญรูป.....	จ
บทคัดย่อไทย.....	ฉ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ความรู้พื้นฐานด้านอิเล็กทรอนิกส์สองมิติ.....	6
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการ.....	20
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	29
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	50
บทที่ 6 สรุป.....	58
เอกสารอ้างอิง.....	60
กิตติกรรมประกาศ.....	64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่..... กท.....
เลขที่ทะเบียน 004668
วัน,เดือน,ปี 14 ก.ย. 31

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	จำนวนสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกด้วยวิธี limiting dilution.....	30-31
ตารางที่ 2	จำนวนสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกด้วยวิธี micromanipulation.....	32
ตารางที่ 3	ผลการศึกษาโปรตีนใน <u>P.falciparum</u> ด้วย อีเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติและย้อมสีโปรตีน ด้วย Coomassie blue R.....	36-42
ตารางที่ 4	รูปแบบโปรตีนใน CH _{1.50} และ CH _{1.50} R กับ สายพันธุ์บริสุทธิ์ (Pinswasdi et al, 1987) ²¹	43
ตารางที่ 5	รูปแบบโปรตีนใน <u>P.falciparum</u> ระยะต่างๆ ซึ่งศึกษาด้วย ³⁵ S-methionine อีเล็กโตรโฟรีซิส และ autoradiography.....	45-47
ตารางที่ 6	รูปแบบโปรตีนใน <u>P.falciparum</u> ระยะต่างๆ ใน isolates และ recrudescence.....	49

สารบัญ

หน้า

รูปที่ 1	Isozyme pattern ของ <u>P.falciparum</u> โดย starch gel electrophoresis. (7)	5
รูปที่ 2	โครงสร้างของ acrylamide, bisacrylamide และ polyacrylamide.....	10
รูปที่ 3	ก Rod และ Slab gel.....	14
	ข Discontinuous buffer system ของ Orntein-Davis (14, 15)	14
รูปที่ 4	รูปแบบโปรตีนใน <u>P.falciparum</u> ศึกษาด้วย ³⁵ S-methionine, 2-D gel electrophoresis และ autoradiography.....	33
รูปที่ 5	รูปแบบโปรตีนใน isolate MS ₁ , D ₁ ซึ่งศึกษาด้วย ³⁵ S-methionine, 2-D gel electrophoresis และ autoradiography รูปแบบที่ได้สรุปในตาราง ที่ 5 หน้า 47.....	34



บทคัดย่อ

โปรตีนในแต่ละเซลล์จะถูกสังเคราะห์ขึ้นอย่างรัดกุม มีการควบคุมในระดับยีน จึงมีคุณสมบัติเฉพาะตัวสำหรับแต่ละเซลล์หรือแต่ละชนิดของสัตว์และพืช ดังนั้น การศึกษารูปแบบของโปรตีนซึ่งถือเป็น gene product จึงอาจใช้เป็น marker ของเซลล์หรือสัตว์แต่ละชนิดได้ วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อนำรูปแบบโปรตีนซึ่งศึกษาโดยเทคนิค 2-D electrophoresis มาเป็น marker ของแต่ละสายพันธุ์บริสุทธิ์ของ P.falciparum โดยได้ศึกษารูปแบบโปรตีนของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P.falciparum ในตัวอย่างที่เป็น isolate และสายพันธุ์บริสุทธิ์รวม 70 ตัวอย่าง และศึกษาโปรตีนใน P.falciparum โดยใช้ ^{35}S -methionine incorporation, 2-D electrophoresis และ autoradiography อีก 50 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่าการใช้ ^{35}S -methionine incorporation และ autoradiography นั้นไวกว่าการย้อมด้วย Coomassie blue R โดยแยกโปรตีนของ P.falciparum ออกเป็น 14 กลุ่มและแต่ละกลุ่มยังแยกย่อยออกไปอีก 1-7 ชนิดย่อย และพบว่า รูปแบบโปรตีนใน P.falciparum ซึ่งเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานานกว่า 3 ปี ยังคงที่ จึงสรุปว่าความแตกต่างในรูปแบบโปรตีนของ P.falciparum สามารถใช้เป็นเครื่องแสดงลักษณะเฉพาะประจำตัวปรสิตได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Cellular protein synthesis is a highly regulated process which is controlled at the gene level. Protein belonged to any specific animal or plant cell exhibits a very specific function and property and can be used as a specific biological character for a given organism. The purpose of this study is to use the protein pattern obtained by 2-D gel electrophoresis as a specific marker for each clone of P.falciparum. 70 in vitro cultured infected red blood cell samples of either isolates or clones of P.falciparum were subjected to 2-D electrophoresis another 50 samples were ^{35}S -methionine incorporated before 2-D gel electrophoresis and autoradiographic analysis. The result had shown that the ^{35}S -methionine incorporation and autoradiography were more sensitive than the Coomassie blue R staining method. P.falciparum proteins were classified into 14 groups, each group subdivided into 1-7 subgroups. A clone of P.falciparum which has been maintained by in vitro cultured within the laboratory for more than 3 years exhibited a constant protein pattern. It was therefore summarised that the protein pattern could certainly be used as a biological character for P.falciparum clone.



บทที่ 1

บทนำ

โรคมาลาเรียที่แพร่ระบาดในคนเกิดจากเชื้อปรสิตจำพวก protozoa ใน genus Plasmodium ซึ่งมี 4 species ที่สำคัญได้แก่ Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae และ Plasmodium ovale⁽¹⁾ แต่เชื้อมาลาเรียที่พบได้ชุกที่สุดและเป็นต้นเหตุก่อโรคในคนได้แก่ Plasmodium falciparum (P.falciparum) กับ P.vivax^(1, 2, 3) การแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียเกิดขึ้นได้โดยอาศัยยุงก้นปล่อง (Anopheles) เป็นพาหะ

ในประเทศไทย มาลาเรียยังคงระบาดในหลายจังหวัดทั่วทุกภาค ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัดจันทบุรี โดยเฉพาะที่อำเภอโป่งน้ำร้อนจะพบผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียได้เกือบตลอดทั้งปี ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยจะเป็นพวกใช้แรงงานซึ่งอพยพหรือย้ายถิ่นฐานจากภาคอีสาน และเป็นที่เข้าใจว่ากลุ่มคนเหล่านี้ไม่มีภูมิคุ้มกัน (antibodies) ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย ความเจ็บไข้ที่เกิดขึ้นนอกจากกระทบต่อการทำมาหากินของผู้ใช้แรงงานเหล่านี้แล้ว ยังก่อให้เกิดความสูญเสียต่อรัฐในการที่ต้องบริการตรวจรักษาด้วย จึงได้มีความพยายามในการที่จะกำจัดโรคมาลาเรียควบคู่ไปกับการหาทางเสริมสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียให้ได้ ได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อนำไปสู่การผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคมาลาเรียในหลายแง่มุม การศึกษาที่สำคัญด้านหนึ่งได้แก่การศึกษาด้านชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียที่เป็นปัญหาคือ P.falciparum ในการตรวจเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อ P.falciparum ซึ่งทำโดยเจาะเลือดจากปลายนิ้วป้ายบนแผ่นกระดาษสไลด์ ย้อมสี Giemsa แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้น นักชีววิทยาสามารถจะแยกเชื้อปรสิตที่ก่อโรคในคนทั้ง 4 ชนิดออกจากกันได้ แต่ไม่มีผู้เชี่ยวชาญคนใดจะบอกได้ว่า เชื้อที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงแต่ละเม็ดแต่ละตัวซึ่งต่างก็เป็น P.falciparum นั้นมีคุณสมบัติการติดยา antigenicity และอื่นๆ เหมือนหรือต่างกัน ดังนั้นการศึกษาด้านชีววิทยาของ P.falciparum จึงเป็นสิ่งจำเป็น

ในปี ค.ศ.1970, Carter⁽⁴⁾ แยกเชื้อมาลาเรียที่พบในสัตว์ฟันแทะ (rodent malaria) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ P.berghei, P.chabaudi, P.vinckei และ P.yoelii ออกจากกันได้โดยอาศัยความแตกต่างในรูปแบบไอโซไซม์ (isozyme pattern) ของเอ็นไซม์ 4 ตัวที่มีอยู่ในเชื้อปรสิต เอ็นไซม์ทั้ง 4 ตัวได้แก่ glucose phosphate isomerase (GPI; EC 5.3.1.9), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD; EC 1.1.1.44), lactate dehydrogenase (LDH; EC. 1.1.1.27) และ glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.2) นอกจากนี้จะสามารถแยก plasmodium ทั้ง 4 ชนิดออกจากกันแล้ว Carter⁽⁴⁾ ยังใช้รูปแบบ ไอโซไซม์แยก P. yoelii ออกเป็น 3 ชนิดย่อย P. vinckei ออกเป็น 5 ชนิดย่อย และ P. chabaudi ได้ 6 ชนิดย่อย ต่อมา Carter และคณะ^(5,6) ศึกษาารูปแบบของเอ็นไซม์ GPI, 6-PGD, GDH และ LDH ในเชื้อมาลาเรียซึ่งเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียในประเทศ Gambia และ Tanzania. โดยใช้เทคนิคสตาร์ชเจล อิเล็กโตรโฟเรซิสและทราบว่า P. falciparum ที่เก็บตัวอย่างได้นั้นเมื่อแยกโดยไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ GPI จะได้ 2 ชนิดย่อยเรียก P. falciparum GPI₁ และ P. falciparum GPI₂ และโดยไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ LDH สามารถแบ่ง P. falciparum เป็น P. falciparum LDH₁ กับ P. falciparum LDH₂ ส่วน P. falciparum จากประเทศ Gambia เมื่อแยกไอโซไซม์ของ 6-PGD จะได้ P. falciparum ที่มี 6-PGD 3 แบบ ได้แก่ 6-PGD₁, 6-PGD₂ และ 6-PGD₃ ส่วนตัวอย่างจากประเทศ Tanzania ไม่พบ P. falciparum ที่มี 6-PGD₂ และ 6-PGD₃.

ในประเทศไทย Thaithong และคณะ⁽⁷⁾ ได้ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ใน P. falciparum 6 เอ็นไซม์ได้แก่ GPI, GDH, LDH, 6-PGD, ADA (adenosine deaminase ; EC 3.5.4.4) และ PepE (peptidase E; EC 3.4.11 or 13) ตัวอย่างเชื้อปรสิตที่นำมาศึกษาได้จากผู้ป่วยมาลาเรียในแถบจังหวัด ชลบุรี จันทบุรี

สระบุรี กาญจนบุรี สงขลา และตาก จากรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI สามารถจำแนก P.falciparum ออกเป็น 3 ชนิดย่อยคือ GPI₁, GPI₂, และ GPI₃ ส่วนไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GDH, 6PGD, LDH และ PepE ไม่มีความแตกต่าง แม้จะเปลี่ยนเทคนิคจากสตาร์ช เจล อิเล็กโตรฟอริซิส ไปเป็นโพลีอะคริลละไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสก็ตาม^(๑) รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ทั้ง 6 ดังแสดงในรูปที่ 1 ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อจะจำแนก P.falciparum ให้ละเอียดกว่าการจำแนกโดยใช้รูปแบบไอโซซัยม์ เช่น Perrin และคณะ^(๑) ศึกษารูปแบบของ antigen บนผิวของเม็ดเลือดแดงซึ่งถูกรุกทำลายด้วย P.falciparum เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1981, Trait^(๑๐) ได้ใช้เทคนิคศึกษารูปแบบโปรตีนโดยอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติมาใช้วิเคราะห์โปรตีนจากเชื้อ P.falciparum และสามารถพบความแตกต่างในรูปแบบโปรตีนจากเชื้อ P.falciparum ที่แยกจากผู้ป่วยต่างคน ต่อมา Fenton และคณะ^(๑๑) ใช้เทคนิคของการแยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติศึกษารูปแบบของโปรตีนในเชื้อ P.falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์ และพบว่าสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมาลาเรียหนึ่งรายนั้น (อาจจะได้หลายสายพันธุ์บริสุทธิ์ต่อหนึ่งตัวอย่าง) จะให้รูปแบบโปรตีนที่เฉพาะ ดังนั้นจึงสามารถใช้รูปแบบของโปรตีนเป็นเครื่องหมายประจำตัว (biological character) ของแต่ละสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ โดยที่คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาของ P.falciparum อยู่แล้วจึงสังเกตเห็นว่าการนำเทคนิคแยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติน่าจะมีประโยชน์ต่อการจำแนกเชื้อ P.falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยมาลาเรียซึ่งตั้งอยู่ที่ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยที่สายพันธุ์เหล่านี้แยกมาจากตัวอย่างเลือดซึ่งเจาะจากผู้ป่วยมาลาเรียในจังหวัดต่างๆของประเทศไทย และทำการวิจัยเป็นสองระยะต่อเนื่องกัน

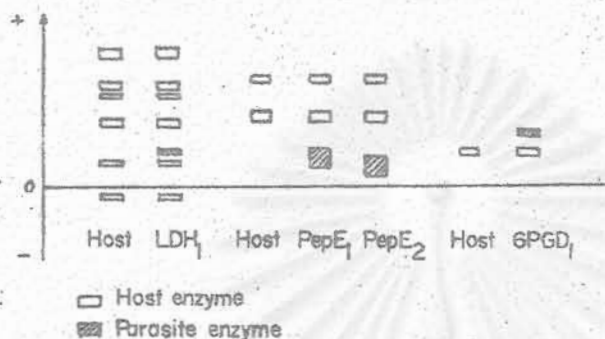
ระยะแรกใช้ crude extract ของ P.falciparum มาแยกโปรตีน โดย 2-D-gel electrophoresis ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R ดังนั้นจึงอาจจะมี host (red blood cell) protein ติดมาได้

ระยะที่สองใช้ ^{35}S -methionine incorporate เข้าในน้ำเลี้ยงเชื้อ P.falciparum ทำ crude extract เอาส่วน soluble protein มาแยกด้วย 2-D-gel electrophoresis แล้วทำ autoradiography จึงได้แถบซึ่งเป็นของโปรตีนจากปรสิตโดยเฉพาะ

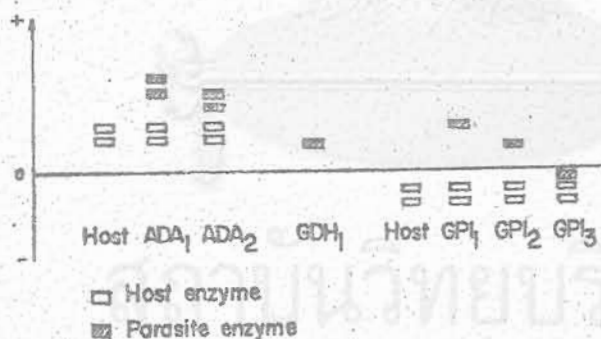
ประโยชน์ที่ได้จากการเริ่มโครงการวิจัยนี้คือ ปัจจุบันที่ศูนย์วิจัยมาลาเรียร่วมองค์การอนามัยโลก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้การแยกโปรตีนด้วย 2-D-gel electrophoresis และ autoradiography และรูปแบบของโปรตีนที่แยกได้เป็น biological character ประจำตัวของสายพันธุ์บริสุทธิ์นอกจากนี้ยังได้ทำการวิจัยผลของยาต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนและอื่นๆ ฯลฯ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแบบไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ LDH, PepE และ 6PGD ที่พบใน
เชื้อ *P.falciparum* โดยศาสตราจารย์ ดร. ธีรศักดิ์ ตรีพรวิบูลย์ (Thaithong,
Sueblinvong & Beale, 1981)



รูปแบบไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ ADA, GDH และ GPI ที่พบในเชื้อ
P.falciparum โดยศาสตราจารย์ ดร. ธีรศักดิ์ ตรีพรวิบูลย์ (Thaithong,
Sueblinvong & Beale, 1981)



รูปที่ 1 Isozyme pattern ของ *P.falciparum* โดย starch gel
electrophoresis⁽⁷⁾

บทที่ 2

ความรู้พื้นฐานด้านอิเล็กโทรฟอรีซิสสองมิติ

2.1 หลักการของอิเล็กโทรฟอรีซิส

โมเลกุล ส่วนของโมเลกุล หรือสารที่มีประจุใดก็ตาม เมื่อถูกนำไปวางในสนามไฟฟ้า จะเกิดการเคลื่อนที่ได้ อาจเรียกโมเลกุลเหล่านี้ว่า polyelectrolytes และ แบ่งเป็น strong หรือ weak polyelectrolytes ได้ขึ้นกับการแตกตัวได้มาก หรือน้อยและแตกตัวแล้วจะมีประจุสุทธิ + หรือ - ก็ขึ้นกับจำนวนการแตกตัวของ acidic หรือ basic groups ที่มีอยู่ในโมเลกุล เช่น nucleic acid เมื่อแตกตัวจะได้ strong polyacids ส่วน poly-L-lysine ให้ weak polybases และ protein เป็น polyampholytes เป็นต้น การที่โปรตีนให้ polyampholytes ได้เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโน ซึ่งมีทั้งหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group, COO^-) และหมู่อะมิโน (amino group, NH_3^+) ดังนั้น ถ้ามีหมู่อะมิโนมากและแตกตัวจะทำให้ประจุสุทธิเป็น + แต่ถ้ามีหมู่คาร์บอกซิลิกแตกตัวมากกว่าจะทำให้ประจุสุทธิเป็น - ถ้าทั้งสองหมู่แตกตัวเท่ากัน โปรตีนจะมีประจุ 0 การแตกตัวของหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลิกของโปรตีนขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายซึ่งโมเลกุลของโปรตีนละลายอยู่ pH ที่ทำให้โมเลกุลของโปรตีนแตกตัวแล้วจะมีประจุสุทธิเป็น 0 เรียกว่า isoelectric point ของโปรตีนนั้นๆ จากคุณสมบัติทางประจุของ polyelectrolytes ทำให้สามารถแยก polyelectrolytes ออกจากกันในสนามไฟฟ้าซึ่งเรียกวิธีดังกล่าวว่า electrophoresis อาจจะกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า electrophoresis คือ การขนส่ง particles ผ่านตัวทำละลาย (solvent) ภายใต้สนามไฟฟ้า

เมื่อนำสารมีประจุวางไว้ในสนามไฟฟ้าแล้ว ความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารจะแปรตาม magnitude ของ electric field ซึ่งขึ้นกับแรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) ในสนามไฟฟ้า ดังอธิบายได้ด้วยสมการ 1&2

$$Eg = fv \dots\dots\dots (1)$$

E = electric field magnitude (volt/cm)

f = frictional coefficient

g = net charge

v = velocity

$$\mu = g/f = v/E \dots\dots\dots (2)$$

μ = electrophoretic mobility

ในความเป็นจริงจะเห็นว่า ความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารจะแปรตามกระแส (current) มากกว่าแปรตามแรงเคลื่อนไฟฟ้า ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารจะขึ้นกับแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ผลักโมเลกุลขณะที่โมเลกุลอยู่ในสารตัวกลางซึ่งอาจเป็น gel หรือ กระจาขมากกว่าจะแปรตามแรงเคลื่อนไฟฟ้าซึ่งปล่อยผ่านเข้าไปในระบบ และค่าของแรงเคลื่อนไฟฟ้าในตัวกลางนั้นถูกกำหนดโดยกระแสที่ผ่านเข้าไปในตัวกลางอีกทีหนึ่ง

2.2 ชนิดของอิเล็กโตรโฟรีซิส

แบ่งได้เป็น 2 ชนิด

2.2.1 Moving-boundary electrophoresis โมเลกุลของสารที่ต้องการแยกจะกระจายอยู่ทั่วไปในสารละลาย เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าจะมีการเคลื่อนที่ของโมเลกุลแยกออกจากตัวทำละลาย (solvent) เป็นวิธีสำหรับวิเคราะห์ (analytical method) ความสามารถในการเคลื่อนที่และหา isoelectric point ของโปรตีนเท่านั้น จึงไม่นิยมใช้กันทั่วไป

2.2.2 Zone electrophoresis สารตัวอย่างที่อยู่ในรูปของสารละลายจะถูกใส่เป็นจุด (spot) หรือเป็นแถบ (band) และเคลื่อนที่ในรูปร่างผ่านตัวทำละลายบนตัวกลางรองรับ (support medium) ซึ่งมีคุณสมบัติ chemically inert และ homogeneous ปัจจุบันนิยมใช้ zone electrophoresis อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีประโยชน์หลายประการเช่น

- วิเคราะห์แยกสารผสม
- ทดสอบความบริสุทธิ์ของสาร
- ตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงในการเคลื่อนที่หรือโครงสร้างของสาร

การทำ zone electrophoresis จำเป็นต้องมี support medium ซึ่งมีหน้าที่สำคัญ 2 ประการคือ ป้องกันโมเลกุลของสารจาก mechanical disturbances และป้องกันการพาความร้อน (convection) ที่เกิดจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายตัวอย่างเข้มข้นขึ้น ขณะเดียวกันตัวกลางรองรับบางชนิดสามารถดูดซับโมเลกุลบางชนิดได้และมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสาร จึงช่วยแยกสารตามขนาดของโมเลกุลได้ด้วย (molecular sieve effect)

Zone electrophoresis แบ่งเป็นหลายวิธีตามชนิดของตัวกลางรองรับดังนี้

ก. paper electrophoresis ใช้กระดาษเป็นตัวกลางรองรับ ถ้าใช้กระแส 20 v/cm เรียก low-voltage paper electrophoresis ใช้กระแส 200 v/cm เป็นพวก high-voltage paper electrophoresis นิยมใช้แยกสารโมเลกุลเล็กที่มี charge น้อยๆ เช่น กรดอะมิโน และ nucleotides

ข. cellulose acetate electrophoresis ตัวกลางรองรับเป็น cellulose acetate ซึ่งแยกดีกว่ากระดาษ เพราะ hydroxyl group ของ cellulose ในกระดาษถูกเปลี่ยนเป็น acetate จึงไม่มีผลในการดูดซับชีวโมเลกุลที่ต้องการแยก

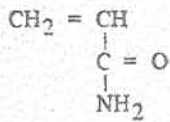
ค. gel electrophoresis ใช้น้ำ (gel) เป็นตัวกลาง ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนและกรดนิวคลีอิกได้ดีขึ้น เนื่องจาก gel ลดการแพร่ของสารตัวอย่าง และยังช่วยให้เกิดการแยกตามขนาดโมเลกุลของสารไปพร้อมกับการแยกด้วยประจุสุทธิ gel ที่นิยมใช้ ได้แก่ starch gel, agarose gel และ polyacrylamide gel

2.3 Polyacrylamide gel electrophoresis. (12, 15)

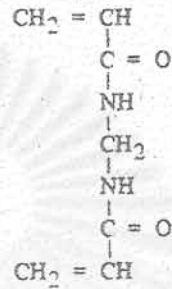
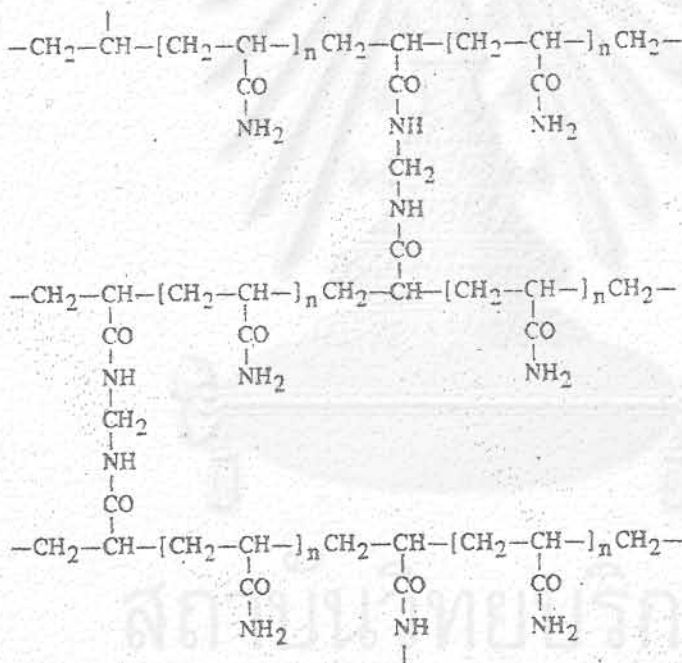
2.3.1 โครงสร้างทางเคมี Polyacrylamide gel เกิดจากการรวมตัว (polymerization) ของ acrylamide monomer เกิดเป็นสายยาว แล้วสานเป็นร่างแห (cross link) ด้วย N,N'-methylene bisacrylamide (นิยมเรียกย่อๆว่า bisacrylamide) ดังปฏิกิริยาในรูปที่ 2

2.3.2 Polymerization catalyst การรวมตัวของ acrylamide monomer จะเกิดขึ้นเมื่อเติม catalyst ที่นิยมใช้ได้แก่ ammonium persulfate หรือ riboflavin ใช้น้ำร่วมกับ N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) หรือ 3-dimethylamino-propionitrile (DMAPN) ตัวหลังนี้ไม่ค่อยนิยมกัน

ถ้าใช้ ammonium persulfate คู่กับ TEMED, TEMED ทำหน้าที่เร่งการสลายของ ammonium persulfate เพื่อให้ได้ free radicals เกิดขึ้น แล้ว free radicals จะ initiate polymerization สิ่งที่ทำให้ปฏิกิริยา



Acrylamide

*N,N'*-methylene bisacrylamide

Polyacrylamide gel

รูปที่ 2 โครงสร้างของ acrylamide, bisacrylamide
และ polyacrylamide gel

polymerization เกิดช้าได้แก่ buffer ที่เป็นกรดมาก (pH ต่ำ), O₂ จากอากาศซึ่งแก้ไขโดยเพิ่มปริมาณ ammonium persulfate, TEMED กับ degassed สารละลายเจล

ในระบบที่ใช้ riboflavin คู่กับ TEMED ต้องอาศัยแสงช่วยการสลายของ riboflavin ให้ free radicals ออกมา initiate polymerization จากกลไกจะเห็นว่าไม่จำเป็นต้องมี TEMED ในระบบ acrylamide ก็สามารถเกิด polymerization ได้ แต่ในทางปฏิบัติจะเติม TEMED เสมอเพื่อให้ได้ผลที่แน่นอน

ส่วนการเลือกจะใช้ระบบ ammonium persulfate-TEMED หรือ riboflavin-TEMED นั้น ส่วนหนึ่งของการตัดสินใจขึ้นอยู่กับความนิยมกับ availability ของสารเคมีที่มีอยู่ กรณีจำเป็นที่ต้องใช้ riboflavin-TEMED ได้แก่ การแยก native protein ด้วย discontinuous buffer system จำเป็นต้องใช้ riboflavin-TEMED แทน ammonium persulfate-TEMED เนื่องจาก native protein จะ denatured ง่ายเมื่อมี ammonium persulfate อยู่ และจะกำจัด persulfate ด้วยการทำ pre-run ไม่ได้ เนื่องจากเป็น discontinuous buffer system ส่วนดีอีกประการหนึ่งของ riboflavin-TEMED system คือ เจลจะไม่เกิด polymerization จนกว่าจะถูกแสง จึงมีเวลาสำหรับเตรียมต่างๆตามความต้องการ

2.3.3 Effective pore size ขนาดของรูพรุนในเจลจะขึ้นโดยตรงกับความเข้มข้นของ acrylamide ใน polymerization mixture ถ้าความเข้มข้นสูง acrylamide สูงขึ้น pore size จะลดลง 2.5% acrylamide gel เป็นความเข้มข้นของเจลที่มี molecular sieving ต่อสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10⁶ แต่จะอ่อนตัวมาก ต้องช่วยให้คงรูปด้วยการผสมกับ 0.5% agarose ถ้าความเข้มข้นของ acrylamide สูงถึง 30% จะได้ pore size ที่มี

sieving effect ต่อ polypeptide ขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,000 นอกจากจะขึ้นกับความเข้มข้นของ acrylamide monomer แล้ว effective pore size, ความแข็ง เหนียว การพองตัวของเจลจะขึ้นกับความเข้มข้นของ crosslinkers ด้วย ถ้าปราศจาก crosslinkers การ polymerization ของ acrylamide monomers จะได้ gel mixture ซึ่งเป็นสารละลายหนืดเท่านั้น ไม่เป็นแผ่น ปริมาณของ crosslinkers ถ้าเพิ่มขึ้นจะทำให้ effective pore size ลดลงจนเมื่อเพิ่ม crosslinkers ประมาณ 5% ของ acrylamide monomers pore size จะกลับโตขึ้นเนื่องจากเกิด cross link เป็นมัดโต รูปทรงจึงโตขึ้น

2.3.4 Rod or Slab gels เดิมการทำ polyacrylamide gel ให้เจลแข็งตัวในหลอดแก้ว จึงได้เจลเป็นแท่ง (rod) ต่อมาผู้คิดเทคนิคทำให้เจลแข็งตัวในระหว่างกระจกสองแผ่น จึงได้เป็นเจลแผ่นซึ่งมีข้อดีคือ

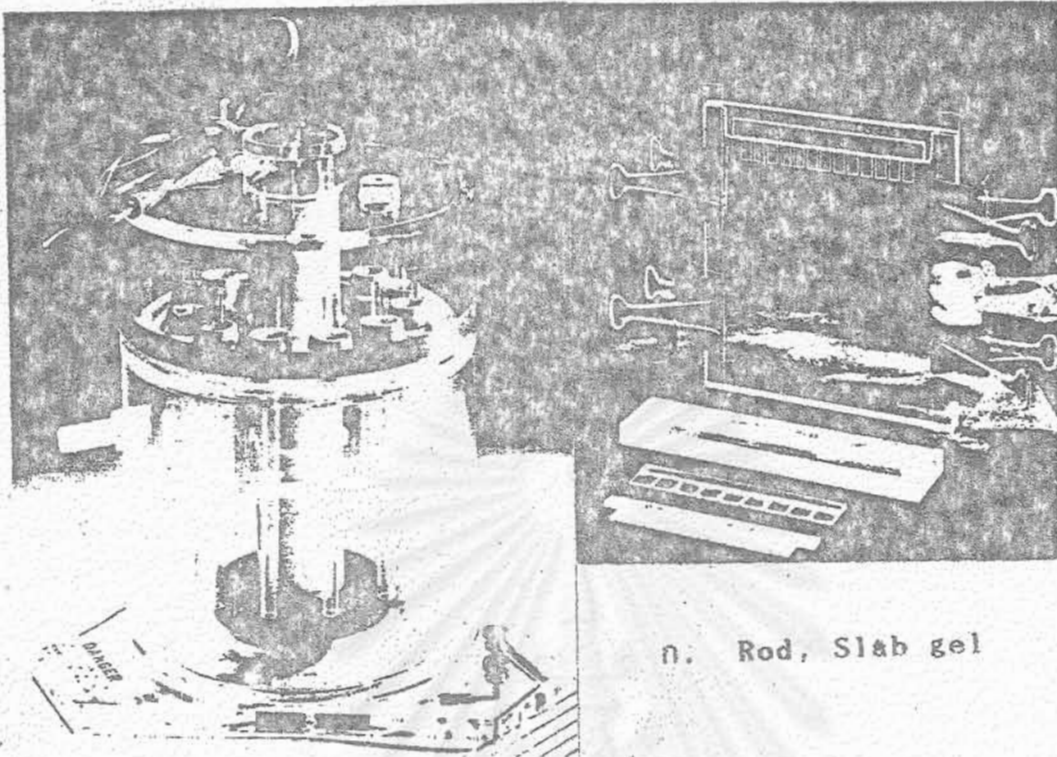
ก. สามารถใส่ตัวอย่างหลายตัวอย่างและ molecular weight marker บนแผ่นเดียวกัน ผ่านกระแสเท่าๆกันในภาวะการต้ต่างแบบเดียวกัน ดังนั้นจึงเปรียบเทียบกันง่าย ใช้เวลาน้อยกว่าเจลแท่งในการวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างเท่ากัน

ข. เจลแผ่นส่วนมากจะบางกว่าเจลแท่ง ช่วยให้ระบายความร้อนได้ดี แถบโปรตีนไม่บิดเบี้ยว

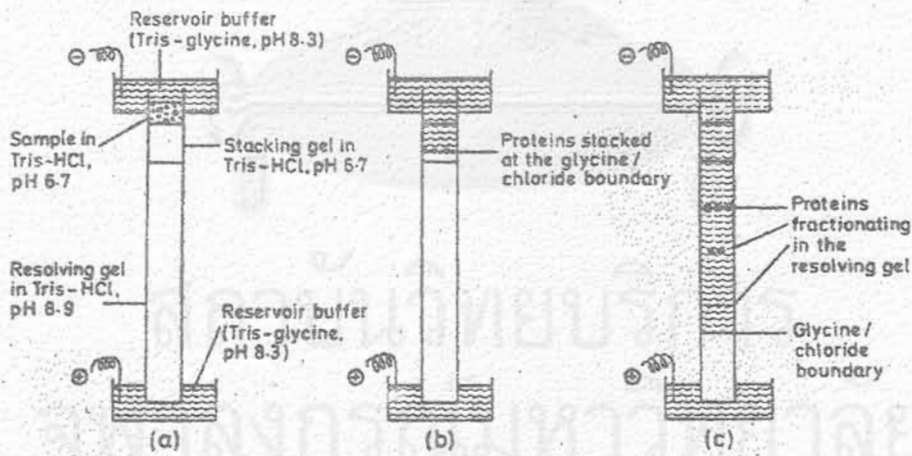
ค. เมื่อจะถ่ายรูปหรือวิเคราะห์ต่อด้วย densitometer จะได้ภาพและผลวิเคราะห์ตรงความจริงกว่าเจลแท่ง

2.3.5 Continuous Discontinuous (multiphasic) buffer system zone electrophoresis ที่ใช้ buffer เดียวกันตลอดทั้งในเนื้อเจล และใน chamber reservoirs แม้จะต่างความเข้มข้น เช่น ใน chamber reservoirs ใช้ 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 ส่วนในเนื้อเจลใช้ 1:10 ของ 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 จะเรียกว่า "continuous buffer system" ซึ่งในระบบนี้จะใส่ตัวอย่างเข้าโดยตรงใน resolving gel เพื่อแยกโปรตีน ส่วน "discontinuous buffer system" นั้น buffer ในเนื้อเจลและใน chamber reservoirs จะต่างชนิดกัน ทั้ง pH ก็ต่างกันด้วย การใส่ตัวอย่างจะเข้าไปใน stacking gel ซึ่งเป็นช่วงที่มี pore size ใหญ่ก่อน จึงจะผ่านเข้าไป resolving gel ที่ pore size เล็ก และเกิด molecular sieving

ข้อดีของ discontinuous buffer system คือ สามารถใส่ตัวอย่าง เจือจางในปริมาณมากได้ และยังคงได้ resolution ดี ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างจะถูก concentrate เป็นแถบเข้มข้นดีก่อนผ่านเข้าไป resolving gel ตัวอย่างของ discontinuous buffer system ได้แก่ Ornstein⁽¹⁴⁾ และ Davis⁽¹⁵⁾ system ซึ่งใช้ Tris/HCl pH 6.7 เป็นบัฟเฟอร์ใน stacking gel ส่วน resolving gel ใช้ Tris/HCl pH 8.9 และ Tris/glycine pH 8.3 เป็น chamber buffer (รูปที่ 3) ที่ pH 6.7 นั้น glycine แยกตัวน้อยและเคลื่อนที่ช้า (ใน stacking gel) Cl^- เคลื่อนที่เร็ว ขณะที่โปรตีนอยู่ระหว่างกลาง เมื่อผ่านกระแสเข้าไป Cl^- จะเคลื่อนเข้าหาขั้ว + ทำให้เกิดบริเวณ low conductivity ตามหลัง Cl^- และเนื่องจาก conductivity แปรกลับกับ field strength จึงทำให้บริเวณดังกล่าวเกิด high voltage gradient ซึ่งเร่งการเคลื่อนของ glycine ions ในอัตราเดียวกับ Cl^- ทำให้มี sharp boundary ระหว่าง Cl^- และ glycine เคลื่อนผ่านสารตัวอย่างจะกวาดโปรตีนตามหลัง Cl^- มารวมเป็นแถบคมชัดได้ในช่วงของ stacking gel เมื่อเข้าไป resolving gel, pH 8.9 จะทำให้ glycine แยกตัวและเคลื่อนที่เร็วกว่า



၈. Rod, Slab gel



Operation of the Ornstein-Davis discontinuous buffer system. (a) at the beginning of electrophoresis, (b) during stacking, (c) during separation in the resolving gel.

ပုံစံ ၃ ဂ. Rod, Slab gel

၈. Discontinuous buffer system ပုံစံ Ornstein-Davis



protein ขณะเดียวกัน pore size ของเจลเล็กทำให้เกิด sieving effect และความคงที่ของแรงเคลื่อนไฟฟ้าใน resolving gel จะแยกโปรตีนออกจากกันตามขนาดและประจุสุทธิ มีผู้เรียก discontinuous buffer system นี้ว่า disc gel นอกจากนี้ยังเติม SDS (sodium dodecyl sulfate) ลงในเจลบัฟเฟอร์ และ chamber buffer เพื่อเพิ่ม resolution ให้ดียิ่งขึ้นเรียกชื่อว่า SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) ระบบที่มีผู้นิยมมากได้แก่ของ Laemmli SDS discontinuous system⁽¹¹⁾

2.3.6 Dissociating or Non dissociating buffer system⁽¹²⁾ การแยกโปรตีนด้วย zone electrophoresis มักใช้ buffer ซึ่งแยกโปรตีนธรรมชาติออกเป็นหน่วยย่อย (polypeptide subunit) โดยใช้ dissociating agent ที่นิยมมากได้แก่ การเติม SDS (sodium dodecyl sulfate) พร้อมกับ thiol reagent เช่น mercaptoethanol แล้วต้ม 100°C เพื่อสลาย disulphide bond polypeptides ที่แตกตัวออกจะจับ SDS ในอัตราส่วนคงที่ 1.4 กรัม SDS ต่อ 1.0 กรัม polypeptides ทำให้ประจุเต็มของโปรตีนไม่มีผลต่อการแยกในสนามไฟฟ้าเมื่อเทียบกับประจุของ SDS โปรตีนจะถูกแยกโดย molecular sieving effect หรือตาม molecular weight ถ้าเขียนกราฟระหว่าง \log_{10} polypeptide molecular weight กับค่า Rf จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง^(17,18) และคำนวณหา molecular weight ของโปรตีนตัวอย่างได้ สำหรับค่า Rf หาได้จากสมการ

$$Rf = \frac{\text{distance migrated by protein}}{\text{distance migrated by dye}}$$

ในทางปฏิบัติควรใส่ standard protein molecular weight marker บนแผ่นเจลเดียวกับตัวอย่างที่จะศึกษา วัดการเคลื่อนที่ของแถบ marker หาค่า Rf

และเขียนกราฟเป็นกราฟมาตรฐาน หาค่า Rf ของตัวอย่าง และอ่านค่า molecular weight จากกราฟมาตรฐาน ข้อสำคัญประการหนึ่งคือ กราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรงในช่วงจำกัดของน้ำหนักโมเลกุลกับความเข้มข้นของเจลดังนี้

- 5% acrylamide น้ำหนักโมเลกุลที่จะให้กราฟเส้นตรงจะอยู่ในช่วง 25,000-200,000

- 10% acrylamide จะให้เส้นตรงในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 15,000-70,000

- 15% acrylamide จะให้เส้นตรงในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 12,000-45,000

urea-thiol reagent ใช้สลายโปรตีนได้ ถ้าใช้ 8M urea ซึ่งจะสลาย H-bond ส่วน thiol reagent สลาย disulphide bond ข้อดีของ urea คือไม่มีผลต่อประจุเดิมของโปรตีน ดังนั้นโปรตีนถูกแยกโดยความแตกต่างทางประจุและขนาดของโมเลกุล แต่การใช้ urea-thiol system มีข้อเสียคือ ไม่สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลและสลายโปรตีนได้ไม่สมบูรณ์ บัพเฟอร์ที่ใช้ในขณะที่แยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าต้องมี urea อยู่ด้วย

2.3.7 Choice of pH^(1,2) polyacrylamide gel นั้นสามารถใช้กับบัพเฟอร์ที่มี pH 2.5-11 แต่ในทางปฏิบัติมักจะใช้บัพเฟอร์ pH ระหว่าง 3-10 เนื่องจากถ้า pH >10 อาจจะทำให้เกิด deamination ต่อโปรตีนที่จะแยก สำหรับ SDS-polyacrylamide ซึ่งใช้ continuous buffer system นั้น เรื่อง pH ของบัพเฟอร์ไม่มีผลต่อการแยกของ SDS-polypeptides เนื่องจาก complex ดังกล่าวมีประจุมากอยู่แล้ว ส่วนใน discontinuous buffer system pH อาจมีผลต่อการ concentrate ของตัวอย่างในส่วน stacking gel บ้าง ในการแยก native protein ด้วย non-dissociating buffer system โดยใช้ polyacrylamide gel นั้น pH จะมีผลต่อ net charge ของ native

protein และต่อการแยกด้วยไฟฟ้า สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการเลือก pH ของบัฟเฟอร์คือ ต้องเลือกใช้ช่วง pH ที่ไม่ทำให้โปรตีนถูก denatured และมักใช้ช่วง pH ที่แคบๆ pH ของบัฟเฟอร์ที่อยู่ห่างจาก isoelectric point ของโปรตีนที่ต้องการแยกมาก โปรตีนจะมีประจุเพิ่มขึ้น เวลาที่ใช้ในการแยกสั้นลง การแพร่ของแถบโปรตีนจะเกิดน้อยทำให้ได้ความคมชัด แต่ถ้า pH ของบัฟเฟอร์ใกล้ isoelectric point และมีความแตกต่างของประจุบนโปรตีนต่างชนิดมาก จึงจะช่วยให้แยกจากกันได้ ในทางปฏิบัติพบว่าโปรตีนจำนวนมากที่มี pI ~4-7 ดังนั้นควรจะใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH 8.0-9.5 จึงจะพอเหมาะ

2.3.8 Choice of gel concentration⁽¹²⁾ ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า หรือ อิเล็กโตรฟอรีซิสประสบความสำเร็จมีสองประการ ได้แก่ pH ของบัฟเฟอร์ และ ความเข้มข้นของเนื้อเจล (gel concentration) ในเรื่องความเข้มข้นของเจลนั้น ต้องยอมรับว่าไม่มีความเข้มข้นของเจลที่ถือเป็นมาตรฐาน นั่นคือถ้ามีโปรตีนหลายชนิดในสารละลายหลายชนิดตัวอย่างซึ่งต้องการแยกจากกันด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอรีซิสแล้ว จะไม่สามารถกำหนดว่าให้ใช้ความเข้มข้นของเจล 7% เป็นมาตรฐานแยกโปรตีนผสมเหล่านั้นออกจากกันได้สมบูรณ์ อาจพบว่าตัวอย่าง 1,2,3 แยกแถบของโปรตีนออกจากกันได้ดีบางแถบ ไม่ชัดบางช่วง โดยทั่วไปเมื่อไม่ทราบว่สารละลายแต่ละตัวอย่างมีโปรตีนอะไรบ้าง มักจะเริ่มด้วย 7.5% หรือลองแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 5-15% แล้วจึงเลือกความเข้มข้นของเจลที่ให้ผลการแยกแถบโปรตีนที่ต้องการได้ชัดที่สุดไว้ใช้ต่อไป สำหรับ SDS-PAGE มีวิธีหาความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมอีกวิธีหนึ่งได้แก่ การทำ SDS-gradient polyacrylamide gel ซึ่งจะได้ประโยชน์สองประการ ประการแรก gradient gel สามารถใช้ทำ fractionate โปรตีนได้หลายขนาดน้ำหนักโมเลกุล ประการที่สอง การเปลี่ยนขนาดรูของเจลให้มีหลายขนาดบนเจลแผ่นเดียวกันนั้น ช่วยให้แถบโปรตีนคมชัด มักจะทำ gradient gel concentration ในช่วง 5-20% หรือ 6-18% ในลักษณะ linear gradient slab gel

2.3.9 Molecular weight estimation การแยกโปรตีนธรรมชาติ (native protein) ด้วยกระแสไฟฟ้านั้นอาศัย ความแตกต่างของ ขนาด และ ประจุ เป็นตัวช่วยแยก ส่วนการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำกันนั้น จะใช้ standard protein marker ใส่ในเจล ผ่านกระแสไฟฟ้า วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละแถบ เขียนกราฟความสัมพันธ์ของระยะทางเคลื่อนที่กับน้ำหนักโมเลกุล สิ่งสำคัญในวิธีการนี้คือ ชนิดของ standard protein marker ที่นำมาใช้ ควรจะมี รูปร่าง (shape), degree of hydration และ partial specific volume ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ศึกษา

ถ้าเป็นการหาน้ำหนักโมเลกุลของ denatured protein หรือ แยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ซึ่งโปรตีนถูกแยกเป็น polypeptides ก่อน และมีการจับตัวของ polypeptide กับ SDS ในอัตราคงที่ การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลมีหลักการเช่นเดียวกับของ native protein คือใช้ protein marker ใส่ใน SDS-PAGE วัดระยะทางเคลื่อนที่และคำนวณหา relative mobility (R_f) เขียนกราฟของ R_f กับ \log_{10} ของ polypeptide molecular weight marker จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของกราฟน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานไว้ใช้การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดย SDS-PAGE นั้น นิยมทำอิเล็คโตรพอรีซิสในรูปของ slab gel ซึ่งสามารถเปรียบเทียบระยะทางของทั้ง marker และ ตัวอย่างบนเจลเดียวกัน

2.4 อิเล็คโตรพอรีซิสสองมิติ

การทำอิเล็คโตรพอรีซิสเพื่อแยกโปรตีนนั้นมีพื้นฐานของหลักการอยู่ 2 อย่าง อย่างแรกเป็นการแยกโปรตีนโดยความแตกต่างของ ขนาด และ ประจุ อย่างที่สองเป็น equilibrium separation method เช่น electrofocusing ซึ่งแยกโปรตีนโดยความแตกต่างของประจุเท่านั้น แต่ไม่ว่าจะโดยพื้นฐานของหลักการใดก็พบว่า มีโปรตีนหลายตัวซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันจนทำให้แยกจากกันได้ยาก

จึงมีผู้คิดแยกโปรตีนเหล่านี้โดยใช้การผสมผสานของหลักการพื้นฐานหลายอย่างเข้าด้วยกัน เกิดเทคนิคเรียก อิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติ โดยให้สองมิตินั้นมีทิศทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนตั้งฉากกัน การผสมผสานหลายพื้นฐานของหลักการเข้าด้วยกัน จะทำให้ตอบคำถามได้พร้อมกันหลายคำถาม เช่น การทำ SDS-PAGE ในมิติที่สอง ช่วยบอกถึงน้ำหนักโมเลกุลของจุดโปรตีนที่สนใจได้ หรือทำ isoelectrofocusing ในมิติแรกจะช่วยให้ทราบ pI ของโปรตีนและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ส่วนใหญ่ว่าเป็น basic หรือ acidic amino acids เป็นต้น แต่ถึงกระนั้นก็ตาม อิเล็กโตรฟอริซิสก็ไม่อาจรับรองได้ว่า แต่ละจุดที่ปรากฏบนเจลนั้นเป็นโปรตีนเพียง 1 ชนิด

เจลในมิติแรกนิยมทำเป็นเจลแท่ง (rod gel) และแยกโปรตีนโดยความแตกต่างของประจุเท่านั้น (isoelectrofocusing) แต่มีบ้างที่ทำ isoelectrofocusing ในรูปเจลแผ่น (slab gel) แล้วตัดเป็นแถบ (strip) สำหรับทำมิติที่สอง ข้อดีของการทำ slab gel ในมิติแรกคือ ทุกตัวอย่างที่ต้องการเปรียบเทียบ จะอยู่บนแผ่นเจลเดียวกัน ดังนั้นจึงผ่านภาวะการแผ่ต่างๆ เหมือนกันหมด แต่ข้อเสียคือ การเคลื่อนย้ายจับต้อง slab gel strip อาจจะยากกว่าเจลแท่ง ส่วนมิติที่สองนั้นจะทำเป็น slab gel ทั้งหมด เนื่องจากต้องนำเจลแท่งมาวางตามยาวบนเจลแผ่น ใช้กระแสไฟฟ้าไล่แถบโปรตีนจากเจลแท่งให้เข้ามาในเจลแผ่น ซึ่งนิยมใช้ SDS-slab gel จึงสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของจุดโปรตีนที่สนใจได้

อิเล็กโตรฟอริซิสเป็นการแยกสารที่มีประจุด้วยกระแสไฟฟ้า หลักการพื้นฐานของการแยกอาศัยความแตกต่างของ ขนาด และ ประจุสุทธิบนโมเลกุล อาจจะทำโดยใช้หลักการพื้นฐานเดียว (อิเล็กโตรฟอริซิสมิติเดียว) หรือผสมผสานหลายหลักการเข้าด้วยกันเป็นอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติ ทั้งนี้ด้วยจุดประสงค์คือ ต้องการแยกโปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันมากซอกออกจากกัน และอาจได้คำตอบเกี่ยวกับ น้ำหนักโมเลกุล หรือ ประเภทของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่พ่วงมาด้วย

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

3.1 วัสดุ

3.1.1 ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* ใช้ตัวอย่างเชื้อ *P.falciparum* ทั้งตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยโดยตรงมาเพิ่มจำนวนด้วยการเพาะในจานเลี้ยง ตัวอย่างเหล่านี้แต่ละตัวอย่างเรียก isolate (ไอโซเลท) แต่ตัวอย่างซึ่งได้จากการนำแต่ละไอโซเลทไปแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) โดยวิธี limiting dilution และ วิธี micromanipulation จำนวนไอโซเลทที่ศึกษารวม 42 ไอโซเลท และสายพันธุ์บริสุทธิ์อีก 67 สายพันธุ์บริสุทธิ์

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ใช้สารเคมีที่เป็น analytical grade เป็นอย่างต่ำ

- สารเคมีสำหรับการเตรียมโพลีอะคริลละไมด์เจล (polyacrylamide) ใช้ของบริษัท LKB เท่านั้น
- SDS (BRL, extrapure grade)
- Ampholine pH 3-10 pH 5-8 (LKB)
- ³⁵S-methionine (Amersham)
- Enhancer (Dupont)
- Tris (Fuka)
- X-ray film (X-100, Fuji)

3.2 วิธีการ

3.2.1 การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ ในระยะต้นของงานวิจัยนี้ ทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเรียก limiting dilution¹⁹⁾ ซึ่งมีหลักการคือ เจือจางตัวอย่างเชื้อปรสิตที่ทราบจำนวนเชื้อแน่นอนไปจนกระทั่งได้ 1 ตัวต่อหลอด แล้วนำไปเพาะในจานเลี้ยงจนเพิ่มจำนวนและระยะตามต้องการ จึงนำมาศึกษาโปรตีนด้วยอิลีคโตรโพรสิสสองมิติ

ส่วนการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยวิธี micromanipulation มีหลักการคือ ใช้ capillary tube ซึ่งถูกดึงให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในหลอดแก้วประมาณ 4-7 μ อาศัยเครื่อง micromanipulator นี้ ดุดเม็ดเลือดแดงที่ฝัเชื้อบริสุทธิ์ครั้งละ 1 เซลล์ใส่ในน้ำเลี้ยงเชื้อและนำไปเพาะในงานเลี้ยงต่อไป

3.2.2 สารละลายต่างๆที่ใช้ในการเตรียมเจล อิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติซึ่งใช้ศึกษาโปรตีนในเชื้อ P. falciparum ในเม็ดเลือดแดงครั้งนี้ ใช้วิธีของ O'Farrell^(๒๐) ในมิติแรก(first dimension) เป็น electrofocusing tube gel ส่วนมิติที่สอง(second dimension) เป็น SDS-slab gel

First dimension เตรียมสารละลายต่างๆในรูปของ stock solutions ดังนี้

- ก. lysis buffer ประกอบด้วย 2.0% NP-40
9.5 M Urea
2.0% Ampholine pH 5-7 ใช้
1.6% และ pH 3-10 ใช้ 0.4%
5.0% Mercaptoethanol

การเตรียม lysis buffer มักเตรียมเพียงครั้งละ 10 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดแก้วเก็บไว้ใช้ โดยคะเนว่าใช้ 1-2 หนักหมดหลอด ที่แบ่งไว้ควรเก็บ -20°C

ข. 30% Acrylamide-Bisacrylamide หรือเตรียมสารละลายเจนนีให้มี final concentration ของ Acrylamide 28.38% ส่วน Bisacrylamide 1.62% เตรียมครั้งละ 20 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บที่ 4°C ไว้ใช้

ค. 10% Noridet-P-40 (NP-40)

ง. Anode solution 0.01 M H_2PO_4

จ. Cathod solution 0.02 M NaOH

ฉ. Sample overlayer ประกอบด้วย 9M urea และ 1% Ampholine (สำหรับสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใช้ Ampholine pH 5-7 เพียง 80 μ l และ pH 3-10 อีก 20 μ l) สารละลายนี้ใช้ overlayer เมื่อใส่สารตัวอย่างใน pre-run tube gel 10 μ l ต่อ tube gel

ช. 8 M urea ใช้ overlayer บน polyacrylamide gel solution ขณะกำลัง set gel ใช้ 20 μ l ต่อหนึ่ง tube gel

ฅ. Equilibration buffer เมื่อทำ electrofocusing ใน first dimension เสร็จ ให้แต่ละแท่งเจลออกใส่ใน equilibration buffer แล้วเก็บตู้เย็นไว้ที่ -20°C Equilibration buffer ประกอบด้วย 75% glycerol, 5% Mercaptoethanol 2.3% SDS และ 10% (v/v) stacking buffer. (ง)

Second dimension

ฉ. Running buffer ประกอบด้วย 0.25 M Tris, 0.1% SDS และ 0.192 M glycine สำหรับใส่ใน buffer reservoir

ค. Resolving gel buffer ใช้ 1.87 M Tris/HCl pH 8.7

ฅ. Stacking gel buffer คือ 1.25 M Tris/HCl pH 6.75

ฉ. 30% Acrylamide solution ในเจลของ second dimension นี้จะใช้อัตราส่วนของ acrylamide และ bisacrylamide ต่างจากใน tube gel โดยใช้ 29.2% acrylamide และ 0.8% bisacrylamide

ค. 10% SDS

ฅ. 1% agarose ใน equilibration buffer (ง) ใช้ปิดทับบนแท่งเจลซึ่งวางบน slab gel ในช่วงของ second dimension ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้แท่งเจลเคลื่อนที่และไม่ให้มีฟองอากาศแทรกระหว่างแท่งเจลกับโพลีอะคริลิไซด์เจลแผ่น เพื่อให้กระแสผ่านเจลได้สม่ำเสมอและการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากเจลแท่งมาสู่เจลแผ่นได้ดี

3.2.3 วิธีเตรียมโพลีอะคริลละไมด์เจล

3.2.3.1 เจลแท่ง ใช้หลอดแก้วกลางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน ~3 มิลลิเมตรครึ่งละ 10 หลอด จะต้องแช่หลอดแก้วในน้ำยา cleansing solution 1 คืน แช่ใน 2 N NaOH 1 คืน ล้างน้ำกลั่นหลายครั้งจนสะอาด อบแห้ง เก็บในที่มืดชิดป้องกันฝุ่นไว้ใช้ต่อไป

เมื่อจะเตรียมเจลแท่ง ให้ทำเครื่องหมายที่ 11 เซนติเมตรห่างจากปลายหลอดด้านใดด้านหนึ่งไว้ เพื่อหยอดเจลที่มีส่วนผสมดังต่อไปนี้ลงถึงขีดที่ทำไว้ ส่วนประกอบของสารละลายเจลปริมาตร 10 มิลลิเมตร ประกอบด้วย

urea	5.5	กรัม
10% NP-40 (ค)	2.0	มิลลิลิตร
30% Acrylamide (ข)	1.33	มิลลิลิตร
Ampholine pH 5-7	0.4	มิลลิลิตร
pH 3-10	0.1	มิลลิลิตร
H ₂ O	1.97	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน อาจต้องอุ่นในอ่างน้ำอุ่นจนกว่า urea จะละลายหมดแล้วเติม

10% (NH ₄) ₂ SO ₄	10	ไมโครลิตร
TEMED	7	ไมโครลิตร

เมื่อหยอดใส่หลอดแก้ว ต้อง overlay ด้วย 8 M urea solution (จ) ตั้งเจลให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง สิ่งที่ต้องระวังมากคืออย่าให้มีฟองอากาศในเนื้อเจล

3.2.3.2 เจลแผ่น การเตรียมเจลแผ่นสำหรับกระจกขนาด 18x18 เซนติเมตร หน้า 3 มิลลิเมตรนั้น จะเตรียมเจลเป็นสองตอนอยู่ระหว่างกลางของกระจกและ spacer ตอนล่างคือส่วนของเจลซึ่งทำหน้าที่แยกแถบโปรตีน หรือ resolving gel จะเตรียมก่อนและสูง 12 เซนติเมตร ส่วนตอนบนสูง

ประมาณ 3-4 เซนติเมตร เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ปรับการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนและ concentrate โปรตีนเรียก stacking gel ส่วนประกอบที่ใช้สำหรับการเตรียม เจล 1 แผ่น เป็นดังนี้

Resolving gel (10% gel concentration) :

Resolving buffer (μ)	7	มิลลิลิตร
30% Acrylamide (ฐ)	11.65	มิลลิลิตร
H ₂ O	15.7	มิลลิลิตร
10% SDS (ท)	0.35	มิลลิลิตร
TEMED	0.007	มิลลิลิตร
4% Ammonium persulfate	0.28	มิลลิลิตร

Stacking gel (4.3% gel concentration) :

stacking buffer (μ)	1	มิลลิลิตร
30% Acrylamide (ฐ)	1.6	มิลลิลิตร
H ₂ O	8.33	มิลลิลิตร
10% SDS (ท)	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
4% Ammonium persulfate	0.28	มิลลิลิตร

3.2.4 การศึกษาโปรตีนในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P.falciparum ด้วย อิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ นำเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P.falciparum มาเลี้ยงในจานเพาะเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อปรสิตให้สูงประมาณ 10% เก็บตัวอย่างเชื้อระยะ schizont มาใส่ lysis buffer (ก) แล้ว freeze (-85°C), thaw (อุณหภูมิต้อง) 2-3 ครั้ง นำไปปั่นแยกส่วนเชื้อหุ้มเซลล์ออกด้วย Sigma 101 M microfuge 2', 15,000 rpm ที่อุณหภูมิต้อง ใช้เฉพาะส่วน supernate ตัวอย่างละ 5-50 μl ต่อหนึ่งเจลแท่ง (จะใช้ปริมาตรของสารละลายปรสิตมากหรือ



น้อยขึ้นอยู่กับจำนวน โปรตีน โดยทั่วไปจะใส่ไม่เกิน 30 มิลลิกรัมของโปรตีนต่อหนึ่ง เจลแท่ง)

เมื่อทิ้งเจลแท่งซึ่ง overlay ด้วย 8 M urea ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง 1-2 ชั่วโมงแล้ว ใช้ Pasteur pipette ดูด 8 M urea ออก overlay ด้วย Lysis buffer (ก) ทิ้งไว้อีก 1-2 ชั่วโมง นำเจลแท่งไปจัดวางใน electrophoresis chamber ใช้ 0.1 M H₂PO₄ เป็น anode buffer (ง) และ 0.02 M NaOH เป็น cathod buffer (จ) ต้องระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ระหว่างผิวของเจลแท่งกับบัฟเฟอร์ pre-run เจลแท่งด้วยกระแสไฟฟ้าตรงขนาด ต่างๆดังนี้

200	โวลต์นาาน	15	นาที
300	โวลต์นาาน	30	นาที
400	โวลต์นาาน	30	นาที

เมื่อครบเวลา pre-run ให้ปิด power supply และ load ตัวอย่างสารละลาย ปริมาตรตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตรบนผิวของเจลแท่ง overlay ด้วย 10 ไมโคร ลิตรของสารละลาย (จ) ปล่อยกระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสมิติ แรก ใช้กระแสขนาด 400 โวลต์นาาน 14-16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเจลแท่ง ออก extrude เจลใส่ equilibration buffer (ฉ) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทิ้งเขย่า 10 นาที จึงเก็บที่ 4°C ถ้าหากยังไม่แยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสมิติที่ สอง

ในกรณีที่สองจะทำกาการแยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสมิติที่สอง เมื่อ เตรียมเจลแผ่นคือ SDS-gel ซึ่งประกอบด้วยส่วน stacking gel และ resolving gel เรียบร้อยแล้ว ดูดสารละลายที่ overlay ออกหมด ในกรณีนี้ overlay ด้วย n-butanol ต้องดูด n-butanol ออกและล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจนหมดกลิ่น

ต้ม 1% Agarose ใน equilibration buffer (๗) ให้ละลาย เมื่อทิ้งให้อุ่นประมาณ 45°C ใช้ Pasteur pipette ดูด 1% Agarose หยอดบน ผิวด้านบนของ stacking gel ก่อน จึงนำเจลแท่งซึ่งแช่ใน equilibration buffer มาวางบน stacking gel หยอดด้วย 1% Agarose ซ้ำอีกครั้งเพื่อป้องกันไม่ให้เจลแท่งเคลื่อน นำแผ่นเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber ซึ่งบรรจุ running buffer (๗) ปลั๊กกระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโปรตีนโดยใช้ขนาด 68 mA คงที่ ซึ่งจะได้ความต่างศักย์ที่อ่านจากเครื่องจ่ายกระแส 180 โวลท์ ใช้เวลาจนกระทั่ง marker dye (ประกอบด้วย equilibration buffer 5 มิลลิลิตร 75% glycerol 5 มิลลิลิตร และ 0.1 % Bromphenol blue 1 มิลลิลิตร) ซึ่ง load ใน second dimension ต่อท้ายเจลแท่งเคลื่อนที่ถึงขอบล่างของเจลแผ่น ปิดเครื่อง นำเจลแผ่นไปย้อมสี

3.2.5 การย้อมโปรตีนบนเจลแผ่นด้วย Coomassie blue R-250

3.2.5.1 ส่วนประกอบของสีย้อม 250 มล. จะประกอบด้วย

Coomassie blue R-250	0.625	กรัม
Methanol	125.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	19.0	มิลลิลิตร
Distilled H ₂ O ครบ	250.0	มิลลิลิตร

เก็บสีใส่ขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.2.5.2 ส่วนประกอบ Destaining solution 1
250.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Methanol	125.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	19.0	มิลลิลิตร
Distilled H ₂ O ครบ	250.0	มิลลิลิตร

3.2.5.3 ส่วนประกอบ Destaining solution 2

ปริมาตร 2 ลิตร ประกอบด้วย

Methanol	100.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	150.0	มิลลิลิตร
Distilled H ₂ O ครบ	2000.0	มิลลิลิตร

นำเจลแผ่นใส่กล่องย้อม เทสารละลายย้อมให้ท่วมแผ่นเจล ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 ชั่วโมง หรือนานกว่าก็ได้ เมื่อครบเวลาเทสีกลับใส่ขวดเดิม (สีจะใช้ซ้ำได้) แล้วล้าง back ground โดย Destaining 1 จนกระทั่งใส จึงเปลี่ยนเป็น Destaining 2 และเก็บเจลแผ่นใน Destaining 2 หรือนำไปถ่ายรูป อ่านผล หรืออาจทำให้แห้งและเก็บไปวิเคราะห์ผลต่อ

3.2.6 การศึกษารูปแบบโปรตีนใน *P. falciparum* ระยะต่างๆโดย อิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ การศึกษานี้จะเป็นการศึกษาโปรตีนของตัวปรสิตโดยตรง จึงต้องอาศัยสารกัมมันตภาพรังสี (radioisotope) ได้แก่ ³⁵S-methionine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีกัมมันตภาพรังสี ใส่เติมลงในน้ำเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยง *P. falciparum* ในน้ำเลี้ยงดังกล่าว จะพบเชื้อปรสิตซึ่งมีระยะต่างๆตั้งแต่ ring form จนถึง schizont และอาจมี gametocyte ปนอยู่ด้วย เชื้อปรสิตจะดึงเอา ³⁵S-methionine ร่วมกับสารอาหารและกรดอะมิโนอื่นเข้าไปสังเคราะห์โปรตีน เส้นไซม์ ฯลฯ ทำให้โปรตีนภายในเชื้อปรสิตติดกัมมันตภาพรังสีเข้าด้วย เมื่อแยกปรสิตมาทำเป็นสารละลายโปรตีน แยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส และต่อด้วย autoradiography รูปแบบของโปรตีนที่เห็นใน autoradiograph จะเป็นแบบแผนของโปรตีนที่เกิดจาก *P. falciparum* ในระยะต่างๆของสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ศึกษา

3.2.6.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายปรสิตที่ติดฉลากด้วย ³⁵S-methionine เนื่องจาก ³⁵S-methionine ที่ซื้อแต่ละครั้งจะมีความเข้มข้นแตกต่างกัน จะทราบได้จากฉลากที่ติดมากับขวด ต้องนำมาทำให้มีความเข้มข้น 50 μ Ci ต่อ 10 μ l เพื่อสะดวกต่อการใช้ สำหรับเชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงใน

petri dish เล็ก (ปริมาตรบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร) และเม็ดเลือดแดงติดเชื้อสูง 10 % (10 % parasitemia) และส่วนใหญ่อยู่ในระยะต้นของ trophozoite ให้เติม 10 μ l ของ 35 S-methionine ในน้ำเลี้ยง ผสมให้เข้ากัน incubate 37°C เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง นำมาแยกเอาตัวปรสิตออก และทำเป็นสารละลายโปรตีนของปรสิต แยกแถบโปรตีนด้วยอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติดังในข้อ 3.2.4

3.2.6.2 Autoradiography เมื่อแยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรฟอริซิสมิติที่สองใน SDS-gel แล้ว คัด stacking gel ออก ทำเครื่องหมายบนแผ่นเจลตามต้องการ fix โปรตีนบนแผ่นเจลด้วยสารละลายซึ่งประกอบด้วย 10% TCA (W/V), 10% (V/V) glacial acetic acid และ 50% (V/V) methanol ต้องแช่เจลใน fixing solution อย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรืออาจแช่ overnight หรือมแช่เบาๆ ล้างด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง แล้วแช่ใน Enhancer อีก 1 ชั่วโมงพร้อมทั้งแช่เบาๆ เมื่อเท Enhancer ออก ให้แช่เจลในน้ำเย็นจัดทันที แช่ต่ออีก 1 ชั่วโมง นำเจลไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel drier ของ LKB

ส่วนการ expose film จะใช้แบบ sandwich technique ต้องทำในห้องมืด นำ X-ray film ธรรมดาขนาด 8x10 นิ้ว หรือ 10x12 นิ้ว (ใส่แผ่นเจลได้ 2 แผ่น) วางใน X-ray film cassette ซึ่งมี intensifying screen อยู่ด้วย วางแผ่นเจลทั้งบน X-ray film จัดให้แผ่นเจลอยู่กับที่ด้วยเทปใส วาง X-ray film อีกแผ่นประกบ ปิด cassette จดวันเดือนปีที่กะว่าจะนำ film ออกล้างไว้บนฝาด้านนอกของ cassette นำ cassette ไปเก็บที่ -70°C ควรใส่ถุงพลาสติกปิดเพื่อป้องกันความชื้น เมื่อครบกำหนดวันที่ expose film แล้วนำออกล้างที่ละแผ่น ต้องล้างฟิล์มด้วยมือเนื่องจากต้องตรวจดูว่าฟิล์มเข้มตามต้องการหรือไม่ ในกรณีที่ฟิล์มแรกให้ผลไม่ชัดเจน สามารถนำ cassette ไปใส่ -70°C expose ต่อ แล้วล้างใหม่ ไม่อาจจะล้างด้วยเครื่องล้างฟิล์มอัตโนมัติเนื่องจากไม่สามารถตั้งเวลาคงที่ได้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ของ P.falciparum จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วย ด้วยวิธี limiting dilution นั้นได้ทำใน 10 isolates และได้ 60 สายพันธุ์บริสุทธิ์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ส่วนตารางที่ 2 แสดงสายพันธุ์บริสุทธิ์ 7 สายพันธุ์ซึ่งแยกจาก TM₁₀₀ isolate ของ P.falciparum ด้วยวิธี micromanipulation

4.2 ผลการศึกษาโปรตีนในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P.falciparum ด้วย อิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ

ภายหลังจากทำให้เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P.falciparum แตก และทำเชื้อ P.falciparum เป็นสารละลายปรสิต (homogenate) และศึกษาโปรตีนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติแล้วย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue R จะได้แถบและจุดของโปรตีนซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่ม ตั้งชื่อด้วยอักษรภาษาอังกฤษเป็น A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, และ N^(*) นอกจากนี้แต่ละกลุ่มยังแบ่งเป็นแถบย่อยซึ่งตั้งชื่อเป็นตัวเลขห้อยท้าย เช่น A₁, A₂ และ A₃ เป็นต้น สำหรับกลุ่มหรือแถบของโปรตีนที่แสดงความแตกต่างระหว่าง isolate หรือ สายพันธุ์บริสุทธิ์ของ P.falciparum เรียงรวมเป็น classified protein นั้นได้แก่ กลุ่มที่ไม่ลงสีทึบในรูปที่ 4 ส่วนกลุ่มโปรตีนที่ไม่แสดงความแตกต่าง หรือ ไม่อาจใช้เป็นตัวบ่งความแตกต่างระหว่าง isolate หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ของ P.falciparum จะลงสีทึบในรูปที่ 4

กลุ่มโปรตีนที่พบได้ใน isolate และสายพันธุ์บริสุทธิ์ส่วนใหญ่ที่ศึกษาโดยวิธีนี้ได้แก่ C, D, E, F, G, I, J, และ N ส่วนที่พบได้บ้างในบาง isolate หรือ

ตารางที่ 1 จำนวนสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกด้วยวิธี limiting dilution

Isolates	สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้	รวมสายพันธุ์ บริสุทธิ์
CH ₁₅₀	CH ₁₅₀ /1, CH ₁₅₀ /3, CH ₁₅₀ /4, CH ₁₅₀ /5, CH ₁₅₀ /6, CH ₁₅₀ /7, CH ₁₅₀ /8, CH ₁₅₀ /9, CH ₁₅₀ /10	9
CH ₁₅₀ R	CH ₁₅₀ R/2, CH ₁₅₀ R/3, CH ₁₅₀ R/4, CH ₁₅₀ R/5, CH ₁₅₀ R/6, CH ₁₅₀ R/7	6
CH ₁₅₀ /D	CH ₁₅₀ /D ₂	1
T ₀	T ₀ /94, T ₀ /99, T ₀ /100, T ₀ /107	4
*T ₀ /94 S ₃₀₀ (*Recloned)	T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₁ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₂ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₃ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₄ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₅ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₆ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₇ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₈ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₉ , T ₀ /94 S ₃₀₀ C ₁₀	10
TM ₄	TM ₄ C ₁ , TM ₄ C ₃ , TM ₄ C ₄ , TM ₄ C ₅ , TM ₄ C ₆ , TM ₄ C ₁₄ , TM ₄ C ₁₇ , TM ₄ C ₂₄ , TM ₄ C ₃₂ , TM ₄ C ₃₅ , TM ₄ C ₄₄	11
TM ₅₂	TM ₅₂ C ₄ , TM ₅₂ C ₉ , TM ₅₂ C ₁₀	3

ตารางที่ 1 จำนวนสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกด้วยวิธี limiting dilution (ต่อ)

Isolates	สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้	รวมสายพันธุ์ บริสุทธิ์
TM _{๕๐} (I)	TM _{๕๐} (I)C _๕ , TM _{๕๐} (I)C _{๑๐} , TM _{๕๐} (I)C _{๑๑} , TM _{๕๐} (I)C _{๑๒} , TM _{๕๐} (I)C _{๑๓} , TM _{๕๐} (I)C _{๑๔} , TM _{๕๐} (I)C _{๑๕}	7
TM _{๕๐} (III)	TM _{๕๐} (III)C _๕	1
MS _{๕๐} D _๐	MS _{๕๐} D _๐ C _๑ , MS _{๕๐} D _๐ C _๒ , MS _{๕๐} D _๐ C _๓ , MS _{๕๐} D _๐ C _๔ , MS _{๕๐} D _๐ C _๕ , MS _{๕๐} D _๐ C _๖ , MS _{๕๐} D _๐ C _๗ , MS _{๕๐} D _๐ C _๘	8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

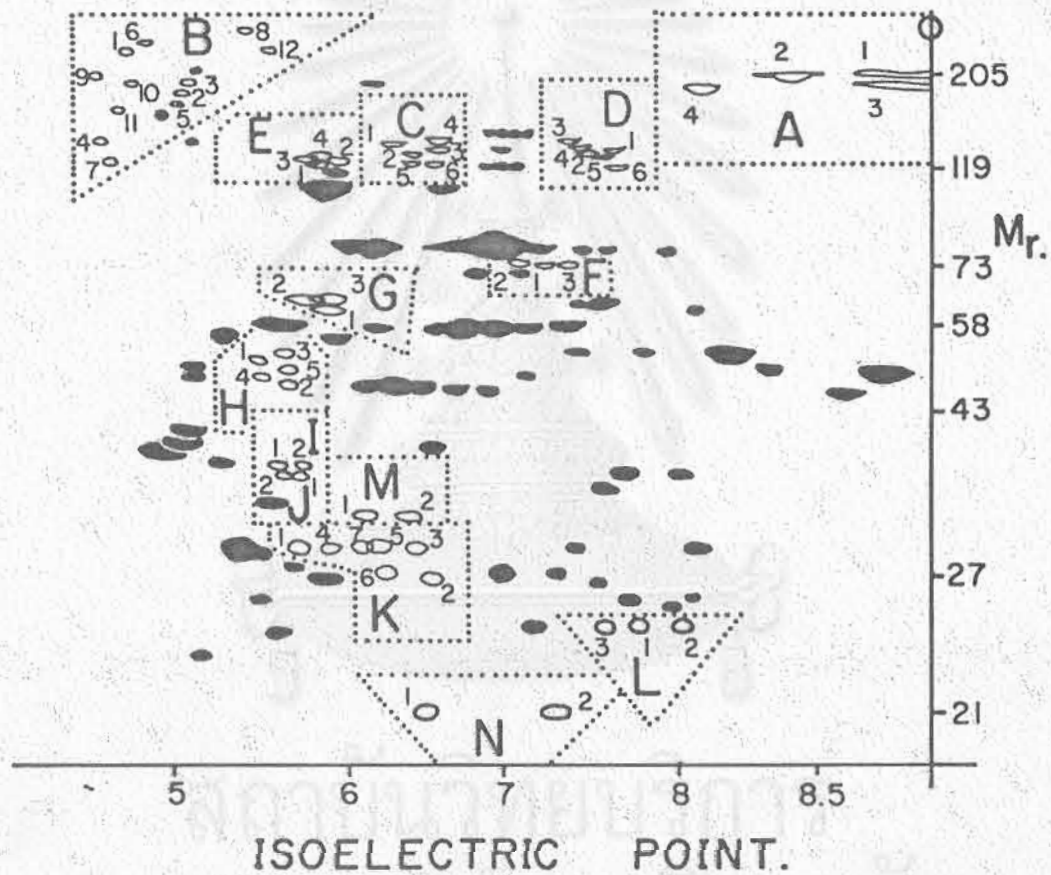
ตารางที่ 2 สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกด้วยวิธี micromanipulation

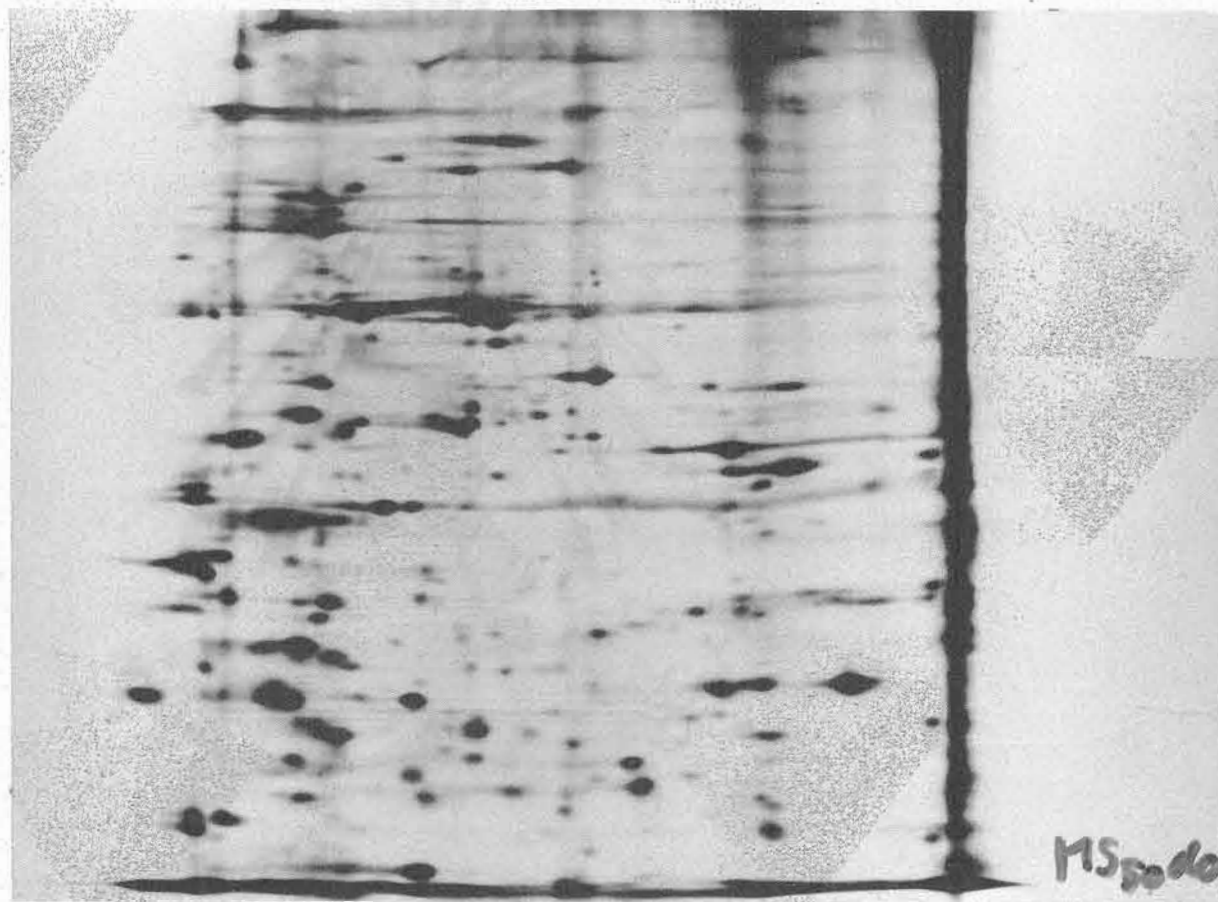
Isolates	สายพันธุ์บริสุทธิ์	รวม
TM ₁₀₈	TM ₁₀₈ C ₁ , TM ₁₀₈ C ₂ , TM ₁₀₈ C ₃ , TM ₁₀₈ C ₄ TM ₁₀₈ C ₅ , TM ₁₀₈ C ₆ , TM ₁₀₈ C ₇	7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 รูปแบบโปรตีนใน P.falciparum ศึกษาด้วย ^{35}S -methionine, 2-D gel electrophoresis และ autoradiography, กลุ่ม classified protein ไม่ลงสีที่บ่งชี้ความแตกต่างของ P.falciparum ได้ส่วน unclassified proteins ลงสีที่บ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 5. รูปแบบโปรตีนใน isolate MS, D. ซึ่งศึกษาด้วย ^{35}S -methionine, 2-D-gel electrophoresis และ autoradiography, รูปแบบที่ได้สรุปในตารางที่ 3, หน้า 42.



สายพันธุ์ปรสิตบางตัวอย่าง ได้แก่ A,K,L และ H กลุ่มของโปรตีน เช่น กลุ่ม C นั้นถ้ามาจาก isolate ของ P.falciparum มักจะพบเป็นแถบย่อยๆ เช่น พบ C₁ และ C₂ พร้อมกัน ในสายพันธุ์ปรสิตจะพบแถบย่อยเพียงชนิดเดียวต่อสายพันธุ์ปรสิต เช่น พบเฉพาะ C₁ ในสายพันธุ์ปรสิตตัวอย่างแรก และพบ C₂ ในอีกตัวอย่างของสายพันธุ์ปรสิตเป็นต้น ผลจากการศึกษาของทั้ง isolate และ clones ของ P.falciparum โดยวิธีข้างต้นอยู่ในตารางที่ 3 จำนวน isolate และ clones ที่ศึกษารวมทั้งสิ้น 62 ตัวอย่าง ซึ่งนอกจากจะเป็นการดูแบบแผนของโปรตีนโดยอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติ เพื่อใช้รูปแบบโปรตีนที่ได้ในการบอกลักษณะประจำตัวของ P.falciparum แต่ละตัวอย่างแล้ว ยังได้อาศัยรูปแบบของโปรตีนศึกษาเชื้อที่ดื้อยาซึ่งเจาะจากผู้ป่วยไข้กลับ (recrudescence) เชื้อที่ดื้อยาโดยการชักนำในจานเพาะเลี้ยง (drug induction หรือ drug pressure) และเชื้อที่ถูกเลี้ยงในจานเพาะเป็นเวลานานเป็นปี ด้วย

4.2.1 รูปแบบโปรตีนที่ศึกษาในตัวอย่าง P.falciparum ซึ่งเจาะเลือดเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยมาลาเรียไข้กลับ (recrudescence)⁽²¹⁾ หนึ่งรายซึ่งเป็นผู้ป่วยชายจากจันทบุรี ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย Mefloquine 1 g ครั้งเดียว และอยู่ที่โรงพยาบาลพระปกเกล้าจันทบุรีตลอด 21 วันที่เฝ้าดู เมื่อนำตัวอย่างเลือดก่อนให้ยา (CH₁₋₅₀) และตัวอย่างเลือดขณะเกิดอาการไข้กลับ (CH₁₋₅₀R) ไปแยกสายพันธุ์ปรสิตและศึกษาโปรตีนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียโดยอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติ ย้อมสี Coomassie blue R พร้อมทั้งศึกษาโปรตีนของ P.falciparum ระยะต่างๆ และ autoradiography พบว่า ทั้ง isolate CH₁₋₅₀ และ CH₁₋₅₀R มีกลุ่มย่อยของโปรตีนที่ไม่พบในสายพันธุ์ปรสิตซึ่งแยกได้จากแต่ละ isolate เช่น C₁ ซึ่งพบใน CH₁₋₅₀ นั้นไม่ปรากฏใน 9 สายพันธุ์ปรสิตที่แยกได้ หรือ C₂, C₃ ที่พบใน CH₁₋₅₀R แต่ไม่ปรากฏในทั้ง 6 สายพันธุ์ปรสิตที่แยกจาก isolate นี้เป็นต้น (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาโปรตีนใน *P.falciparum* ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R

Isolates or clones	Protein patterns								
	C	D	E	F	G	I	J	N	A,H,K,L
CH ₁₅₀	C ₂ , C ₅	D ₂ , D ₅	E ₁	F ₀ , F ₂ (F ₃)	G ₁	I ₁	J ₁	N ₁ (N ₂)	A ₄ , H ₁ , K ₂ , L ₁ , L ₂ , H ₁
CH _{150/1}	C ₂	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
CH _{150/4}	C ₅	D ₃	E ₁	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	-
CH _{150/5}	C ₂	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
CH _{150/6}	C ₂	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
CH _{150/7}	C ₅	D ₀	E ₁	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	-
CH _{150/8}	C ₅	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
CH _{150/9}	C ₂	D ₀	E ₁	F ₁	G ₀	I ₁	J ₁	N ₁	-
CH _{150/10}	C ₂	D ₁	E ₁	F ₂	G ₁	I ₁	J ₁	N ₁	-

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาโปรตีนใน *P.falciparum* ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R (ต่อ)

Isolates or clones	Protein patterns								
	C	D	E	F	G	I	J	N	A,H,K,L
CH ₁₅₀ /R C3	C ₅ , C ₆	D ₂ , D ₅ D4	E ₁	F ₂	G ₁ , G ₂	I ₁	J ₁	N ₁ , N ₂	-
CH ₁₅₀ /R ₂	C ₂	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	I ₁	-	-	-
CH ₁₅₀ /R ₃	-	-	-	F ₁ , F ₂	-	-	-	-	-
CH ₁₅₀ /R ₄	C ₇	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₂	-
CH ₁₅₀ /R ₅	C ₁	D ₁	E ₁	F ₁ , F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
CH ₁₅₀ /R ₆	C ₂	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₂	-
CH ₁₅₀ /R ₇	C ₂	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₂	-
CH ₁₅₀ /D	C ₁	D ₂ , D ₅	-	F ₁ , F ₂ F ₃	G ₁ , G ₂	I ₁	J ₁	N ₁	-
CH ₁₅₀ /D ₂	C ₂	D ₂	E ₁	F ₁ , F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาโปรตีนใน *P.falciparum* ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R (ต่อ)

Isolates or clones	Protein patterns								
	C	D	E	F	G	I	J	N	A,H,K,L
T ₀	C ₂	D ₄	E ₁	F ₁ ,F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
T _{0/04}	C ₂	D ₅	E ₂	F ₃	G ₂	-	-	N ₁	-
T _{2/06}	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	-
T _{3/108}	C ₂	D ₅	E ₄	F ₂	G ₂	-	-	N ₂	-
T _{3/107}	C ₁	D ₄	E ₁	F ₂	G ₂	I ₂	J ₂	N ₁	-
TM ₁	C ₂	D ₄	E ₁	F ₁	G ₂	I ₁	J ₁	N ₁	H ₂
TM ₄	C ₃	D ₅	E ₁	F ₃ ,F ₄	G ₁	-	-	N ₁	-
TM ₄ R	C ₂ ,C ₅	D ₅	E ₁	F ₃ ,F ₄	G ₁	-	-	N ₁	+
TM ₄ D	C ₅	D ₅	E ₁	F ₃	G ₁	-	-	N ₁	-
TM ₄ C ₁	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	A ₂

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาโปรตีนใน *P.falciparum* ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R (ต่อ)

Isolates or clones	Protein patterns								
	C	D	E	F	G	I	J	N	A,H,K,L
TM ₁ C ₂	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	A ₁ , A ₃
TM ₁ C ₁	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	-
TM ₁ C ₃	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	-
TM ₁ C ₅	C ₁	D ₄	-	F ₂	-	-	-	N ₁	-
TM ₁ C _{1,4}	C ₁	D ₄	-	F ₂	-	-	-	N ₁	-
TM ₁ C _{1,7}	C ₅	D ₅	-	F ₃	G ₁	-	-	N ₁	-
TM ₁ C _{2,4}	C ₅	D ₅	-	F ₃	G ₁	-	-	N ₁	A ₄
TM ₁ C _{3,2}	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	-	-	-
TM ₁ C _{3,5}	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	-	-	-
TM ₁ C _{4,4}	C ₅	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	-

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาโปรตีนใน *P. falciparum* ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R (ต่อ)

Isolates or clones	Protein patterns								
	C	D	E	F	G	I	J	N	A,H,K,L
TM _{5,2} C ₄	C ₂	D ₂	-	F ₁	G ₁	-	-	N ₁	-
TM ₅	C ₂	D ₂	E ₁	F ₁	G ₂	-	-	N ₁	-
TM ₅	C ₂	D ₅	E ₄	F ₁	G ₁	-	-	N ₁	-
TM _{1,3}	C ₂	D ₅ , D ₂	E ₄	F ₁ , F ₂ F ₃	G ₂	-	-	N ₁	-
TM _{2,5}	C ₂	D ₄	-	F ₁ , F ₂	G ₁ , G ₂	-	-	-	-
TM _{2,5}	C ₂	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	-	N ₂	-
TM _{2,5} U ₂	C ₂ , C ₅	D ₂	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
TM _{5,2}	C ₂	D ₂ , D ₄	E ₁	F ₁	G ₁	-	-	N ₁	-
TM _{5,2} R	C ₂	D ₄	E ₁	F ₁	G ₁	-	-	N ₁	-
TM _{5,2} D	C ₂	D ₄	-	F ₁	G ₁	-	-	N ₁	-

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาโปรตีนใน *P.falciparum* ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R (ตบ)

Isolates or clones	Protein patterns								
	C	D	E	F	G	I	J	N	A,H,K,L
TM ₄	C ₂	D ₂	-	F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
TM ₄ R	C ₅	D ₅	-	F ₁	G ₁	-	-	N ₁	-
PM ₃	C ₂ , C ₅	D ₁	E ₁	F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
PM ₂₅	C ₂	D ₅	E ₁	F ₁ , F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
PM ₂₅ R	C ₂ , C ₅	D ₅	E ₁ , E ₂	F ₁ , F ₂	G ₁	-	-	N ₁	-
PM ₂₅ DO	C ₂ , C ₅	D ₂	E ₂ , E ₄	F ₁ , F ₃	G ₁	-	-	N ₁	-
PM ₂₅ DO ₁	C ₂	D ₂	E ₄	F ₃	G ₁	-	-	N ₁	-
PM ₂₅ DO ₂	C ₂	D ₂	E ₄	F ₃	G ₁	-	-	N ₁ , N ₂	-
PM ₂₅ DO ₃	C ₂	D ₂	E ₄	F ₃	G ₁	-	-	N ₁	-
GBA	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₁	T ₂	J ₂	N ₁	L ₁ , L ₂

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาโปรตีนใน *P.falciparum* ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R (ต่อ)

Isolates or clones	Protein patterns								
	C	D	E	F	G	I	J	N	A,H,K,L
GBC	C ₁	D ₁	E ₁	F ₂	G ₁	I ₂	J ₂	N ₁	A ₁ , L ₁ , L ₂
C _{2,4,1}	C ₂	D ₁	-	F ₁	G ₁	-	-	-	A ₁
MS ₅ , R	C ₂ , C ₅	D ₂	E ₁ , E ₂	F ₂	G ₂	-	-	N ₁	-
MS ₅ , DO	C ₁ , C ₂ C ₅	D ₂ , D ₄	E ₁ , E ₂ E ₃	F ₁ , F ₂ F ₃	G ₁ , G ₂	-	-	N ₁	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 ผลการศึกษาแบบโปรตีนใน P.falciparum เพื่อใช้บอกลักษณะ (character) ประจำตัวเชื้อ เพื่อที่จะใช้รูปแบบโปรตีนซึ่งศึกษาโดยอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติเป็นเครื่องหมาย (marker) ประจำตัวของ P.falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์ จึงต้องศึกษารูปแบบของโปรตีนใน P.falciparum ที่ปรากฏ ใน 2-D gel electrophoresis เป็นระยะๆ ในเชื้อที่เลี้ยงในงานเพาะระยะยาวที่ใช้คือ T₁₀₀ ซึ่งเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกจาก isolate T. ด้วยวิธี limiting dilution และเลี้ยงในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยมาลาเรียตั้งแต่ พ.ศ. 2527 (ค.ศ.1984) และเริ่มศึกษาโปรตีนตั้งแต่ 26 ตุลาคม 2527, 21 พฤศจิกายน 2527 ถึงปัจจุบัน พบว่ารูปแบบของโปรตีนที่ได้คงที่ (ดังแสดงในตารางที่ 3) ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยมาลาเรียจึงใช้รูปแบบโปรตีนของ T₁₀₀ เป็นมาตรฐานไว้เทียบกับรูปแบบโปรตีนจากสายพันธุ์ใหม่ๆ โดยเฉพาะเมื่อเกิดความไม่แน่ใจว่าจุดหรือแถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจลแผ่นควรจัดอยู่ในกลุ่มย่อยใด จะทดสอบซ้ำโดยนำเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ T₁₀₀ ผสมกับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.falciparum ที่สงสัย ทำเป็นสารละลายประสมแล้วนำไปแยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติ จากรูปแบบโปรตีนที่คงที่ของ T₁₀₀ จะช่วยพิสูจน์ชนิดของกลุ่มย่อยของจุด หรือ แถบโปรตีนที่สงสัย ได้ถูกต้องแม่นยำขึ้น

4.3 ผลการศึกษาโปรตีนใน P.falciparum ระยะต่างๆ โดยอาศัย

³⁵S-methionine, อิเล็กโตรฟอริซิสสองมิติ และ autoradiography การนำ P.falciparum มาเลี้ยงในงานเพาะซึ่งให้น้ำเลี้ยงเชื้อ (media) ที่ผสม

³⁵S-methionine หนึ่งวงจรชีวิต ก่อนจะนำไปศึกษาโปรตีนดังในข้อ 3.2.6 นั้น P.falciparum จะจับ ³⁵S-methionine จากน้ำเลี้ยงเชื้อไปใช้สังเคราะห์โปรตีน ขณะที่เม็ดเลือดแดงไม่เกิดขบวนการนี้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิค autoradiography แสดงผลการแยกจุด หรือ แถบของกลุ่มย่อยของโปรตีนแทนการย้อมด้วย Coomassie blue R ในตารางที่ 5 ได้สรุปผลการศึกษาโปรตีนใน P.falciparum ด้วยเทคนิคข้างต้น ซึ่งทำใน P.falciparum ทั้ง isolate



ตารางที่ 5 รูปแบบโปรตีนใน *P.falciparum* ระยะต่างๆ ซึ่งศึกษาด้วย ^{35}S -methionine
 มิเล็คโตรโพรซีซีสสองมิติ และ autoradiography

Isolates or Clones	Protein patterns												
	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	A,P
T _{0/04}	C ₂	D ₅	-	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K ₅	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁ , A ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₁	C ₂	D ₅	E ₁	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K	L ₁	M	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₂	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K ₅	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₃	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H ₃ , H ₅	I ₂	J ₂	K ₅	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₄	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K	L ₁	M	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₅	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H	I ₂	J ₂	K	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₆	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H	I ₂	J ₂	K	L ₁	M	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₇	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H	I ₂	J ₂	K	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₈	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K ₅	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₉	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
T _{0/04} S ₃₀₀₀ C ₁₀	C ₂	D ₅	E	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₁ C ₁	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	-	I ₁	J ₂	K ₇	L ₁	M ₁	N ₁	A ₂
TM ₁ C ₂	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	H ₃	I ₁	J ₂	K ₇	L ₁	M ₁	N ₂	P ₁
TM _{5/2} C ₀	C ₂	D ₂	-	F ₃	G ₁	-	I ₁	J ₂	K ₁	-	M ₁	N ₁	-
TM _{5/2} C ₁₀	C ₂	D ₂	-	F ₁	G ₁	-	-	-	-	L ₁	M ₁	N ₁	-
TM _{7/4} R	C ₂	D ₂	-	F ₁	G ₁	H	I ₁	J ₂	K ₄	L	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{7/5}	C ₂	D ₂ , D ₅	-	F ₁ , F ₂	G ₁ , G ₂	H ₃	I ₁ , I ₂	J ₂	K ₄ , K ₅	L ₁	M ₁	N ₁	A ₂ , P ₁
TM _{7/8} R	C ₂	D ₅	-	F ₂	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K ₄ , K ₅	L ₁	M ₁	N ₁	A ₂ , P ₁
TM _{9/0}	-	-	-	F ₁	G ₁	H ₃	I ₁ , I ₂	J ₂	K ₄ , K ₅	-	M ₁	N ₁	P ₁

ตารางที่ 5 รูปแบบโปรตีนใน *P. falciparum* ระยะต่างๆซึ่งศึกษาด้วย ^{35}S -methionine อิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และ autoradiography (ต่อ)

Isolates or Clones	Protein patterns												
	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	A,P
TM ₀ R ₁	C ₂	D ₂ , D ₃	-	F ₁	G ₁	H ₁	I ₁	J ₂	K ₇	L	M	N ₁	-
TM ₀ R ₂	C ₂	D ₄ , D ₇	E ₁	F ₁	G ₁	H ₃	I ₁ , I ₂	J ₂	K ₇	L ₃	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ MP	C ₂	D ₄ , D ₇	-	F ₁	G ₁	H ₁	I ₁ , I ₂	J ₂	K	L	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ (I)C ₄	C ₂	D ₇	E ₁	F ₁	G ₁	H ₄	I ₂	J ₂	K ₄	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ (I)C ₁₀	C ₁	D ₂	E	F ₁	G ₁	H	I ₂	J ₂	K ₇	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ (I)C ₁₁	C ₁	D ₂	E ₁	F ₁	G ₁	H ₁	I ₂	J ₂	K ₇	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ (I)C ₁₂	C ₁	D ₂	E	F ₁	G ₁	H ₁	I ₂	J ₂	K ₇	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ (I)C ₁₃	C ₁	D ₂	E ₂	F ₁	G ₁	H ₂	I ₂	J ₂	K ₇	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ (I)C ₁₄	C ₂	D ₂	-	F ₁	G ₁	H ₁	I ₂	J ₂	K ₇	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ (I)C ₁₅	C ₂	D ₂	-	F ₁	G ₁	H	I ₂	J ₂	K	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₀ (III)C ₈	C ₂	D ₇	E	F ₁	G ₁	H ₁	I ₂	J ₂	K ₄	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₁ 05	C ₂	D ₂ , D ₄	E ₁	F ₁	G ₁ , G ₂	H ₂ , H ₅	I ₁	J ₂	K ₂	-	M ₁	N ₁ , N ₂	P ₁ , P ₂
TM ₁ 05 R	C ₂	D ₂ , D ₄	E ₁	F ₁	G ₁ , G ₂	H ₄ , H ₅	I ₁	J ₂	K	L ₂	M ₁	N ₁	P ₁
TM ₁ 05 C ₁	C ₂	D ₂	E ₃	F ₁	G ₂	H ₃ , H ₅	I ₁	J ₂	K	L ₂	M ₁	N ₂	P ₂
TM ₁ 05 C ₂	C ₂	D ₂	E ₁	F ₁	G ₂	H ₃	I ₁	J ₂	K ₁	-	M ₁	-	P ₂
TM ₁ 05 C ₃	C ₂	D ₂	E	F ₁	G ₂	H	I ₁	J ₂	K ₁	L ₂	M ₁	N ₂	P ₂
TM ₁ 05 C ₄	C ₂	D ₅	E ₁	F ₁	G ₂	H	I ₁	J ₂	K ₅	L ₂	M ₁	N ₂	P ₂
TM ₁ 05 C ₅	C ₂	D ₂	E ₁	F ₁	G ₂	H	I ₁	J ₂	K	L ₂	M ₁	N ₂	P ₂
TM ₁ 05 C ₆	C ₂	D ₂	E ₂	F ₁	G ₁	H	I ₁	J ₂	K ₅	L ₂	-	N ₂	P ₂
TM ₁ 05 C ₇	C ₂	D ₄	E ₂	F ₁	G ₁	H ₅	I ₁	J ₂	K ₅	L ₂	M ₁	N ₁	P ₁

ตารางที่ 5 รูปแบบโปรตีนใน *P.falciparum* ระยะต่างซึ่งศึกษาด้วย ^{35}S -methionine
อีเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ และ autoradiography (ต่อ)

Isolates or Clones	Protein patterns												
	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	A,P
MS ₅ R	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	-	I ₁	J ₂	K ₃	L ₁	M ₁	N ₁	A, P ₁
MS ₅ D ₀	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	H ₃	I ₁	J ₂	K ₃	L ₁	M	N ₁	P ₁
MS ₅ D ₀ C ₁	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	H	I ₁	J ₂	K ₃	L ₁	M	N ₁	P ₁
MS ₅ D ₀ C ₂	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	H ₃	I ₁	J ₂	K ₃	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
MS ₅ D ₀ C ₃	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	H ₃	I ₁	J ₂	K ₃ , K ₇	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
MS ₅ D ₀ C ₄	C ₁	D ₄	E	F ₂	G ₂	-	I ₁	J ₂	K ₃ , K ₇	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
MS ₅ D ₀ C ₅	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	H ₃	I ₁	J ₂	K ₃ , K ₇	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁ , P ₂
MS ₅ D ₀ C ₆	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	H	I ₁	J ₂	K ₃ , K ₇	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
MS ₅ D ₀ C ₇	C ₁	D ₄	-	F ₂	G ₂	H	I ₁	J ₂	K ₃	L ₁	M	N ₁	P ₁
MS ₅ D ₀ C ₉	C ₁	D ₄	E ₃	F ₂	G ₂	H	I ₁	J ₂	K ₃	L ₁	M	N ₁	P ₁

และ clones รวม 50 ตัวอย่าง ได้กลุ่มโปรตีนที่พบบ่อยและใช้บอกความแตกต่างของ isolate และ clone ทั้งหมด 13 กลุ่ม เรียกชื่อแต่ละกลุ่มด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ดังนี้ C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N, และ P⁽²¹⁾ ส่วนกลุ่ม A เป็นโปรตีนที่พบในบางตัวอย่างของ P.falciparum การแบ่งกลุ่มเป็นดังรูปที่ 4⁽²¹⁾

4.3.1 ผลการศึกษารูปแบบโปรตีนใน P.falciparum ระยะต่างๆใน isolate และ recrudescence ตัวอย่างเชื้อ P.falciparum จากผู้ป่วย (isolate) และเมื่อเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยคนเดิมในอีก 21 วัน หลังจากให้การรักษาด้วย single dose (1 กรัม) ของ Mefloquine แล้ว ปรากฏว่าผู้ป่วยมีอาการไข้กลับและตรวจพบเชื้ออีกคล้ายใน 4.2.1 นั้น ผลการศึกษาแบบโปรตีนใน TM₀₀, TM₀₀R และ TM₀₀₀, TM₀₀₀R ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้รับจากโรงพยาบาล คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าทั้ง 4 ตัวอย่างยังคงให้โปรตีนกลุ่มย่อย กลุ่มละ 1-2 ชนิด แสดงว่าแต่ละตัวอย่างไม่ใช่สายพันธุ์บริสุทธิ์ และกลุ่มย่อยของโปรตีนไม่อาจใช้บอกถึงกลไกการเกิดไข้กลับในระดับโมเลกุล จึงได้ลองแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ในตัวอย่าง recrudescence ของ TM₀₀R กับ TM₀₀₀R, เปรียบเทียบกับ TM₀₀ (ดังแสดงในตารางที่ 6) ผลยังคงไม่อาจจะสรุปถึงกลไกระดับโมเลกุลของการเกิดไข้กลับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 รูปแบบโปรตีนใน *P.falciparum* ระยะต่างๆ ใน Isolates และ Recrudescence

Isolates or Recrudescence	Protein patterns												
	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	A,P
TM _{7,8}	C ₂	D ₂ , D ₅	-	F ₁ , F ₃	G ₁ , G ₂	H ₅	I ₁ , I ₂	J ₂	K ₄ , K ₆	L ₁	M ₁	N ₁	A ₂ , P ₁
TM _{7,8} R	C ₂	D ₅	-	F ₃	G ₂	H ₅	I ₂	J ₂	K ₄ , K ₆	L ₁	M ₁	N ₁	A ₂ , P ₁
TM _{3,6}	-	-	-	F ₁	G ₁	H ₃	I ₁ , I ₂	J ₂	K ₄ , K ₆	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{3,6} R ₁	C ₂	D ₂ , D ₃	-	F ₁	G ₁	H ₁	I ₁	J ₂	K ₇	L	M	N ₁	-
TM _{3,6} R ₁ C ₄	C ₂	D ₇	E ₁	F ₁	G ₁	H ₄	I ₂	J ₂	K ₄	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{3,6} R ₁ C _{1,0}	C ₁	D ₂	E	F ₁	G ₁	H	I ₂	J ₂	K ₇	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{3,6} R ₁ C _{1,1}	C ₁	D ₂	E ₁	F ₁	G ₁	H ₁	I ₂	J ₂	K ₇	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{3,6} R ₁ C _{1,2}	C ₁	D ₂	E	F ₁	G ₁	H ₁	I ₂	J ₂	K ₇	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{3,6} R ₁ C _{1,3}	C ₁	D ₂	E ₂	F ₁	G ₁	H ₅	I ₂	J ₂	K ₇	-	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{3,6} R ₁ C _{1,4}	C ₂	D ₂	-	F ₁	G ₁	H ₁	I ₂	J ₂	K ₇	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{3,6} R ₁ C _{1,5}	C ₂	D ₂	-	F ₁	G ₁	H	I ₂	J ₂	K	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{3,6} R ₃ C ₂	C ₂	D ₇	E	F ₁	G ₁	H ₁	I ₂	J ₂	K ₄	L ₁	M ₁	N ₁	P ₁
TM _{1,0,8}	C ₂	D ₂ , D ₄	E ₁	F ₁	G ₁ , G ₂	H ₂ , H ₅	I ₁	J ₂	K ₁	-	M ₁	N ₁ , N ₂	P ₁ , P ₂
TM _{1,0,8} R	C ₂	D ₂ , D ₄	E ₁	F ₁	G ₁ , G ₂	H ₄ , H ₅	I ₁	J ₂	K	L ₂	M ₁	N ₁	P ₁

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรียทั้งชนิดของสัตว์ฟันแทะ และเชื้อมาลาเรียที่พบในคนได้เปลี่ยนจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ และจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมาสู่การใช้วิธีทางชีวเคมี เช่น การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ในเชื้อมาลาเรียของสัตว์ฟันแทะโดย Carter, 1970^(๔๑) และเชื้อ *P.falciparum* ในคน^(๕,๖,๗) ในระยะแรกอาศัยเทคนิค starch gel electrophoresis สำหรับศึกษา การใช้รูปแบบไอโซไซม์เพื่อจำแนก *P.falciparum* ซึ่งทำเป็นประจำ (routine) ในห้องปฏิบัติการห้องศูนย์วิจัยมาลาเรียฯ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นั้น เปลี่ยนมาใช้เทคนิค cellulose acetate electrophoresis ซึ่งมีข้อดีกว่า starch gel electrophoresis^(๕๒) หลายประการดังนี้

ก. ประหยัดเวลา : การแยกไอโซไซม์ด้วย cellulose acetate electrophoresis ใช้เวลาน้อยกว่า starch gel electrophoresis เนื่องจากไม่ต้องเตรียมแผ่น starch gel ล่วงหน้า นอกจากนี้ช่วงเวลาที่ใช้ในการแยกแถบไอโซไซม์ของแต่ละเอ็นไซม์ เช่น GPI, ADA, 6-PGD, LDH กินเวลาเพียง 10-20 นาทีเท่านั้น เวลาที่ใช้ย้อมแถบไอโซไซม์สั้นกว่าเพียงเอ็นไซม์ละ 3-8 นาที

ข. ประหยัดตัวอย่างเชื้อปรสิต ใช้ตัวอย่างเชื้อปรสิตที่ทำเป็นสารละลายครั้งละ 1-2 ไมโครลิตรที่ติดบน sample applicator แล้วตะบนแผ่น cellulose acetate ก็เพียงพอสำหรับศึกษาไอโซไซม์ได้ หรือ ตัวอย่างสารละลายเชื้อปรสิต 5 ไมโครลิตรใช้ศึกษาไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ได้ถึง 3 ตัว ดังนั้นจึงอาจใช้ปรสิตที่เพาะในหลุมของ microtiter plate มาศึกษาได้

ค. ประหยัดสารเคมีที่ใช้ย้อมแถบไอโซไซม์ เนื่องจากแผ่น cellulose

acetate มีขนาดเล็กกว่า starch gel จึงใช้สารละลายสีย้อม (activity staining) เพียง 2 มิลลิลิตรต่อแผ่น โดยให้ผลเด่นชัดเท่าหรือดีกว่า starch gel ซึ่งต้องใช้สารละลายสีมากถึง 50 มิลลิลิตร

ข้อเสียของ cellulose acetate electrophoresis คือ ราคาของแผ่น cellulose acetate ค่อนข้างแพงถึงแผ่นละ ~100 บาท แต่ในงานประจำวันอาจจะจัดให้แต่ละแผ่นของ cellulose acetate บรรจุตัวอย่างที่จะศึกษาได้ครั้งละ 24 ตัวอย่าง ถ้าทราบระยะทางที่แน่นอนระหว่างแถบ ไอโซซีเอ็มที่วิ่งห่างจากจุดเริ่มต้น

การจำแนก P.falciparum โดยอาศัยความแตกต่างในรูปแบบของ ไอโซซีเอ็มนั้น จะจำแนกได้ไม่ละเอียด เช่น ถ้าจำแนกโดยความแตกต่างในรูปแบบของ GPI ไอโซซีเอ็ม จะแบ่ง P.falciparum ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรีเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่มี GPI₁ และ GPI₂ หรือถ้าแบ่งตามรูปแบบของ ADA ก็ได้ 2 จำพวกคือ ADA₁ และ ADA₂ เช่นกัน⁽⁷⁾ ที่ศูนย์วิจัยมาลาเรียยังคงใช้รูปแบบไอโซซีเอ็มช่วย screen บอกความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ ถ้าพบรูปแบบของ GPI เป็น GPI₁+GPI₂ จะชี้บ่งว่าตัวอย่างเลือดนั้นมี P.falciparum อย่างน้อย 2 ชนิดย่อย แต่ถ้าพบ GPI₁ หรือ GPI₂ อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น แสดงว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นมี homology ของไอโซซีเอ็ม และถ้าตัวอย่างนั้นได้จากการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ ตัวอย่างดังกล่าวน่าจะเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ จึงเห็นได้ว่าการใช้รูปแบบไอโซซีเอ็มในการแสดงลักษณะเฉพาะของเชื้อปรสิตนั้นมีข้อจำกัด และไม่ละเอียดพอกับความต้องการ ดังนั้นจึงมีผู้ใช้วิธีศึกษารูปแบบโปรตีนในเชื้อปรสิตเพื่อประโยชน์ในการใช้แสดงลักษณะเฉพาะตัวของสายพันธุ์บริสุทธิ์

5.1 การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วย limiting dilution และ micromanipulation หลักการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยวิธี limiting dilution ได้แก่การ

นำเชื้อ *P. falciparum* ที่ทราบจำนวนแน่นอนมาเจือจางเป็นชั้นๆ ตามที่คำนวณจนได้ 1 ปริสติดต่อตัวอย่าง แล้วจึงเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณขึ้นมาเป็นตัวอย่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงมีโอกาสผิดพลาดที่จะได้ตัวอย่างที่ไม่ใช่สายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ง่าย เช่น เกิดผิดพลาดในขั้นตอนของการเจือจาง โดยอาจคัดปรสติดขึ้นมา 2-3 ตัว หรืออาจได้ตัวอย่างที่เป็น multiple infection นั่นคือ เม็ดเลือดแดง 1 เม็ดต่อตัวอย่าง แต่ภายในเม็ดเลือดแดงมีปรสติดอยู่ 2 ตัว เป็นต้น แม้จะได้ทดสอบความเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ของแต่ละตัวอย่างโดยการศึกษารูปแบบของไอโซซัยม์ก็ตาม โอกาสที่จะได้ตัวอย่างซึ่งไม่ใช่สายพันธุ์บริสุทธิ์ยังคงค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าขณะที่ปรสติดสองสายพันธุ์บริสุทธิ์ถูกเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงกันจะเติบโตด้วยอัตราเร็วต่างกัน ดังนั้นขณะที่ sampling ตัวอย่างมาศึกษารูปแบบไอโซซัยมนั้น จึงพบรูปแบบไอโซซัยม์ของสายพันธุ์ที่เติบโตเร็วแสดงออกให้ตรวจพบ หรือทั้งสองสายพันธุ์อาจมี homology ของไอโซซัยม์ในเอ็นซัยม์ที่ศึกษาก็ได้ เนื่องจากความจำกัดของการจำแนกสายพันธุ์ด้วยไอโซซัยม์ ส่วนการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยวิธี micro-manipulation นั้น จะนำตัวอย่างเม็ดเลือดที่ติดเชื้อ *P. falciparum* มาเจือจางก่อนจะตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อาศัยหลอดแก้ว capillary ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน $< 7 \mu$ คัดแยกเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. falciparum* เพียง 1 ตัวต่อหนึ่งเม็ดเลือดแยกใส่จานเพาะเลี้ยง ดังนั้นการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยวิธี micromanipulation จึงให้ผลที่เชื่อถือได้ว่าตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงได้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์จริง

5.2 การศึกษารูปแบบของโปรตีนในเชื้อ *P. falciparum* ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติ ตั้งแต่ Trait⁽¹⁰⁾ นำวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติของ O'Farrell⁽²⁰⁾ มาใช้ศึกษารูปแบบโปรตีนใน *P. falciparum* เป็นต้นมา ได้มีผู้นำวิธีดังกล่าวมาใช้ศึกษาความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนกันอย่างแพร่หลาย ผลการศึกษารูปแบบโปรตีนที่ทำในงานวิจัยนี้ ระยะเวลาที่ใช้วิธีเตรียมเจลและสารละลายต่างๆแบบเดียวกับ O'Farrell⁽²⁰⁾ และ Trait⁽¹⁰⁾ แต่การย้อมโปรตีนในเจลแผ่นใช้

ย้อมด้วย Coomassie blue R ไม่ได้ใช้ ^{35}S -methionine ผลที่ได้ปรากฏใน 4.2 ซึ่งพบว่า จำนวนกลุ่มย่อยของโปรตีนที่ตรวจพบมีเพียง C, D, E, F, G, I, J, และ N นอกจากนี้แต่ละกลุ่มก็แยกย่อยได้เพียง 1-3 ชนิด เช่น พบ F, หรือ F., I, เท่านั้นเป็นต้น ดังในตารางที่ 3 และ 4 ทั้งนี้อาจเนื่องจากสาเหตุเช่น

1. กลุ่มย่อยอื่นๆของโปรตีนใน *P. falciparum* มีปริมาณน้อยจึงไม่อาจจะตรวจพบโดยวิธีดังกล่าวข้างต้น

2. การย้อมด้วย Coomassie blue R ไม่ไวพอที่จะย้อมติดโปรตีนปริมาณน้อยๆ ที่อยู่บนเจลแผ่น

ผลของรูปแบบโปรตีนที่แสดงในตารางที่ 3 และ 4 น่าจะเกิดจากการใช้สีย้อม Coomassie blue R ซึ่งไม่ไวพอที่จะย้อมติดโปรตีนที่มีอยู่น้อยบนเจลแผ่น ทั้งนี้เนื่องจาก Coomassie blue R มีความจำกัดในการติดสีให้เห็นได้คือ ต้องมีโปรตีนอย่างน้อย 50 นาโนกรัมขึ้นไป ส่วน silver stain จะย้อมติดแถบโปรตีนความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 นาโนกรัม และใน fluorography ต้องการเพียง 1 dpm ของ radiolabelled protein เท่านั้น⁽²³⁾ แม้วิธีย้อมโปรตีนด้วย silver stain จะไวกว่า Coomassie blue R ถึง 100 เท่า แต่เทคนิคการย้อมยุ่งยากสิ้นเปลืองมาก ส่วน fluorography นั้นต้องอาศัยสารกัมมันตรังสีและขั้นตอนอีกมากมาย ดังนั้นในระยะแรกผู้วิจัยจึงตัดสินใจเลือกใช้วิธีย้อมด้วย Coomassie blue R ซึ่งผลที่ได้ก็สามารถใช้บอกลักษณะของโปรตีนได้ดีละเอียดกว่าการจำแนกด้วยไอโซซิมม์ แต่เกิดปัญหาใหม่ขึ้นมา นั่นคือวิธีที่ใช้ดังกล่าวใน 3.2.5 ซึ่งทำโดยนำเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ *P. falciparum* อยู่ภายในเซลล์ (*P. falciparum* เป็น intracellular parasite) มาศึกษาโปรตีน แม้การเตรียมตัวอย่างสารละลายโปรตีนจะมีขั้นตอนแยกตัวเชื้อมาลาเรียออกจากเม็ดเลือดแดงโดยทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วย saponin และล้างโปรตีนหลายครั้งก่อนจะทำให้เชื้อโปรตีนแตกตัวเป็นสารละลาย และนำไปแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสก็ตาม แต่มีความเป็นไปได้สูงกว่า ในตัวอย่างสารละลายเชื้อโปรตีนนำมาศึกษานั้นมีการปนเปื้อน หรือ เหลือ

ค้างของโปรตีนจากเม็ดเลือดแดง ดังนั้นแถบหรือจุดของโปรตีนบนเจลแผ่นหลังอิเล็กโตรโฟรีซิสมิติที่สอง จึงอาจเป็นแบบแผนผสมของโปรตีนจากทั้งเชื้อ *P. falciparum* และเม็ดเลือดแดง และความแตกต่างในรูปแบบโปรตีนที่วิเคราะห์ได้อาจเกิดจากเชื้อปรสิตที่ต้องการ หรือจากโปรตีนของเม็ดเลือดแดงซึ่งมีความแตกต่างกันในเชื้อชาติ หมู่เลือด HLA type และความผิดปกติของเชื้อเม็ดเลือดแดงเป็นต้น ดังนั้นในช่วงหลังของโครงการวิจัย จึงได้เปลี่ยนมาใช้ ^{35}S -methionine incorporation เข้าสู่ *P. falciparum* เพื่อให้ปรสิตจับ ^{35}S -methionine เข้าสู่ส่วนต่างๆของโมเลกุลโปรตีนดังใน 3.2.6 ดังนั้นผลที่ปรากฏในตารางที่ 5 และ 6 จึงเกิดจากความแตกต่างในโปรตีนจากตัวปรสิต *P. falciparum* ทั้งที่เป็น isolate และ สายพันธุ์บริสุทธิ์อย่างแท้จริง ทั้งนี้เนื่องจากเม็ดเลือดแดงซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่และออกมาอยู่ในกระแสเลือดจะไม่มีสารสังเคราะห์โปรตีนอีก จึงไม่มีแถบ หรือจุดบนแผ่น X-ray film หลังจาก autoradiography ที่จะมาจาก ^{35}S -methionine ที่อยู่ในโมเลกุลโปรตีนของเม็ดเลือดแดงปรากฏให้เห็น การใช้ ^{35}S -methionine, 2-D electrophoresis ตามด้วย autoradiography ในการศึกษาความแตกต่างในรูปแบบโปรตีนนี้ นอกจากจะให้ความจำเพาะของแหล่งที่มาของโปรตีนแล้ว ยังมีความไวกว่าวิธีย้อมด้วย Coomassie blue R หลายเท่า เห็นได้จากจำนวนกลุ่มย่อยของโปรตีนที่พบใน *P. falciparum* ทั้ง isolates และ สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ศึกษาด้วยวิธีนี้ ซึ่งอยู่ในตารางที่ 5 เพิ่มกลุ่ม H, M และ P นอกจากนี้แต่ละกลุ่มยังพบชนิดย่อยๆได้มากขึ้น เช่น กลุ่ม H พบ H₁, H₂, H₃, H₄ และ H₅ เป็นต้น

รูปแบบของโปรตีนของ *P. falciparum* ที่แยกได้มากมายนี้ ทำให้นำมาใช้ในการจำแนก *P. falciparum* ได้ละเอียดยิ่งขึ้น ในขณะที่ศึกษาที่ยังไม่ได้มีการพิสูจน์ลงไปแน่ชัดว่า โปรตีนแต่ละกลุ่มนั้นมาจากส่วนไหนของตัวเชื้อปรสิต หรือมาจากกระยะใดในวงจรชีวิตของ *P. falciparum* แต่เนื่องจาก *P. falciparum* ซึ่งถูกเลี้ยงในงานเพาะในห้องปฏิบัติการนั้นทุกขณะที่สุ่มตัวอย่างมาทำสไลด์ และตรวจ

ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบลักษณะที่เรียกว่า asynchronous นั่นคือพบทุกระยะของวงจรชีวิต intraerythrocytic stages เช่น ring forms, trophozoites, schizonts และ gametocyte (บางครั้ง) ของ P.falciparum ปน ๆ กันอยู่ ดังนั้นแถบ จุดของกลุ่ม และกลุ่มย่อยโปรตีนของ P.falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์หนึ่งจึงเป็น โปรตีนผสมของระยะต่าง ๆ ของปรสิต

5.3 การใช้รูปแบบโปรตีนเป็น biological character ของ P.falciparum ผลการวิจัยที่ปรากฏในตารางที่ 3, 4, 5 และ 6 ล้วนแสดงให้เห็นว่าสามารถนำรูปแบบโปรตีนที่พบในปรสิตแต่ละ isolate และสายพันธุ์บริสุทธิ์มาใช้แสดงลักษณะเฉพาะของ isolate หรือ สายพันธุ์บริสุทธิ์นั้นๆ หรือ ใช้เป็น identification card นั้นเอง เช่นถ้าเป็น T_{0,00} จะต้องพบรูปแบบโปรตีน C₂, D₅, F₃, G₂, H₅, I₂, J₂, K₂, L₁, M₁, N₁, P₁ และ A. มิฉะนั้นจะไม่ใช้สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เรียกว่า T_{0,00} ในทางกลับกัน ถ้าเห็นรูปแบบโปรตีน C₂, D₅, F₃, G₂, H₅, I₂, J₂, K₂, L₁, M₁, N₁, P₁ และ A. ก็สามารถบอกได้เลยว่าตัวอย่างปรสิตนั้นคือ T_{0,00} แต่ทั้งนี้ต้องมีข้อแม้ว่าทุกครั้งที่ศึกษาโปรตีนจาก T_{0,00} ต้องควบคุมภาวะทุกอย่างเหมือนกันทุกครั้ง ตั้งแต่ % ปรสิต วิธีเตรียมตัวอย่างปรสิต pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ทุกตัว ขนาดของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ระยะเวลาที่ผ่านกระแสไฟฟ้า ปริมาณของสารกัมมันตรังสีที่ใส่เหล่านี้เป็นต้น นอกจากนี้จะต้องทำซ้ำหลายๆ ครั้งจนกว่าจะได้ผลคงที่ จึงจะเก็บไว้เป็นข้อมูลประจำตัวได้ สำหรับผลที่แสดงในตารางที่ 3, 4, 5 และ 6 นั้น ทุกตัวอย่างจะต้องทำซ้ำมา 2-3 ครั้งขึ้นไป และตัวอย่างใดที่เกิดปัญหาในการแยกกลุ่มย่อย จะวิเคราะห์ซ้ำโดยนำตัวอย่างนั้นมาผสมกับ T_{0,00} ซึ่งถือเป็นตัวอย่างอ้างอิงหรือมาตรฐานที่ใช้อยู่ที่ศูนย์วิจัยมาลาเรียฯ นอกจากนี้ยังได้ส่งตัวอย่างไปให้ห้องปฏิบัติการที่ Institute of Animal genetics, Edinburgh, UK วิเคราะห์ และนำผลมาเปรียบเทียบกับที่วิเคราะห์ได้ที่ศูนย์มาลาเรียฯ เป็นการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ด้วย ผลการทดสอบความคงที่ในรูปแบบของโปรตีนของ P.falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์คือ

T₀,... โดยการเพาะเลี้ยง T₀,... เป็นปฏิกิริยาในห้องปฏิบัติการและติดตามรูปแบบของโปรตีนเป็นระยะซึ่งพบว่าคงที่ตลอดมา จึงสรุปได้ว่ารูปแบบโปรตีนของ *P. falciparum* สามารถจะใช้แสดงลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์โปรตีนแต่ละชนิดจะถูกควบคุมโดยยีน ถ้าไม่มีการผ่าเหล่า (mutation) เกิดขึ้น รูปแบบของโปรตีนจะคงที่

5.4 การศึกษารูปแบบโปรตีนในเชื้อมาลาเรียที่ได้จากผู้ป่วยใช้กลับ (recrudescence) ผลการศึกษารูปแบบโปรตีนในผู้ป่วย recrudescence ซึ่งส่วนใหญ่มีอาการใช้กลับเนื่องจากได้รับการรักษาด้วย Mefloquine 1 กรัมครั้งเดียว ตัวอย่าง CH₁,... และ CH₁,...R ซึ่งถูกแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์และศึกษารูปแบบโปรตีน พบว่าสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งจาก CH₁,... และ CH₁,...R แสดงกลุ่มย่อยโปรตีนที่ไม่พบใน isolate Pinswasdi et al.⁽²²⁾ ได้อธิบายกลไกการเกิด recrudescence ไว้ 2 แบบ ดังนี้

1. เกิดการผ่าเหล่าในยีนของเชื้อปรสิตขึ้นจริง ซึ่งอาจเป็นผลจากยา หรือ อาจเกิดขึ้นเอง ดังนั้นการแสดงออกของเชื้อจึงออกมาในรูปดื้อยา และผู้ป่วยเกิดอาการใช้กลับ ซึ่งถ้าเกิดจากกลไกนี้ เชื้อปรสิตที่ก่อให้เกิดใช้กลับจะต้องดื้อต่อ Mefloquine จนไม่อาจจะกำจัดได้ด้วยทำให้ Mefloquine ซ้ำ และน่าจะพบกลุ่มโปรตีนที่แปลกๆ ออกไปอีกหลายกลุ่ม ซึ่งไม่ใช่สิ่งที่เกิดขึ้นในราย CH₁,... CH₁,...R รวมทั้งรายอื่นๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 6

2. กลไกแบบที่สองตั้งสมมุติฐานว่าเชื้อที่ค่อนข้างดื้อยา Mefloquine คงจะมีอยู่ในตัวผู้ป่วยตั้งแต่ต้นที่ติดเชื้อมา เมื่อได้รับการรักษาได้ยาครั้งแรก ปรสิตที่ไวต่อยาจะถูกกำจัดหมด ส่วนปรสิตที่ดื้อยายังอยู่รอดและค่อยเพิ่มจำนวนขึ้นจนก่อให้เกิดอาการใช้กลับ ผลการศึกษารูปแบบโปรตีนแสดงถึงความแปลกแยกในกลุ่มย่อยของโปรตีนในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ตั้งแต่ก่อนรักษา และเมื่อเกิดใช้กลับ ชี้นำถึง

การได้ mixed infection ในผู้ป่วย หมายถึงผู้ป่วยมาลาเรียหนึ่งรายเมื่อติดเชื้อ P.falciparum จะได้รับหลายสายพันธุ์ของ P.falciparum เข้าไปพร้อมกัน จึงสรุปว่ากลไกการเกิดซ้ำกลับ หรือ recrudescence คงจะเป็นแบบที่สอง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุป

คณะผู้วิจัยได้นำเทคนิคการแยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสสองมิติมาใช้ เพื่อแสดงลักษณะเฉพาะของเชื้อปรสิตก่อโรคมาลาเรียชนิด P.falciparum โดยได้ทำการศึกษาพอสรุปได้ดังนี้

6.1 ศึกษารูปแบบโปรตีนในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P.falciparum 62 ตัวอย่างซึ่งมีทั้ง isolates และ สายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยการแยกโปรตีนโดย 2-D electrophoresis ตามวิธีของ O'Farrell^(๑๙๗๕) ย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue R แยกโปรตีนที่พบประจำได้ 8 กลุ่ม ที่พบบ้างในบางตัวอย่างอีก 4 กลุ่ม

6.2 ศึกษารูปแบบโปรตีนของ P.falciparum โดยเฉพาะโดยใช้ ³⁵S-methionine, 2-D electrophoresis และ autoradiography อีก 50 ตัวอย่าง (isolates + clones) พบโปรตีนรวม 14 กลุ่ม แต่กลุ่ม A นั้นพบได้ในบางตัวอย่าง

6.3 ศึกษาความคงตัวของรูปแบบโปรตีนโดยใช้ T₀... ซึ่งเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยมาลาเรียฯ นานกว่า 3 ปี ขึ้นไป ติดตามรูปแบบโปรตีนเป็นระยะ พบว่าไม่เปลี่ยนแปลง จึงใช้ T₀... เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์สำหรับอ้างอิงรูปแบบโปรตีน

6.4 ศึกษารูปแบบโปรตีนใน P.falciparum ที่เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยไข้กลับ ทำให้เชื่อว่ากลไกการเกิดไข้กลับน่าจะเกิดจากผู้ป่วยมาลาเรียติดเชื้อ P.falciparum ครั้งละหลายสายพันธุ์และบางสายพันธุ์ทนยาซึ่งให้เพียงครั้งเดียวได้ จึงเพาะตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมาอีกในร่างกายจนกระทั่งก่อให้เกิดอาการไข้กลับ

แม้โครงการวิจัยส่วนนี้ จะแล้วเสร็จก็ตาม เทคนิคการแยกโปรตีนใน P.falciparum โดยใช้ ^{35}S -methionine incorporation, 2-D electrophoresis และ autoradiography ยังคงถูกนำมาใช้อยู่ที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยร่วมองค์การอนามัยโลก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อดำเนินการวิจัยด้านชีววิทยาของ P.falciparum เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปประยุกต์กับการวิจัยถึงกลไกการดื้อยา การผลิตวัคซีนและอื่นๆ ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Lucas AO, Gilles HM, "Malaria" In : Taylor S, ed. A Short Textbook of Preventive Medicine for the Tropics. The English University Press Limited, 1972.
2. Maegraith B, "Malaria" In : Clinical Tropical Diseases. 7th ed. Blackwell Scientific Publication, 1980 pp 240.
3. Florde JJ, "Malaria" In : Petersdorf RG, ed, Harrison's Principle of Internal Medicine, 10th ed, Mcgraw-Hill Book Company. 1983 pp 1187-1193.
4. Carter R, "Enzyme variation in Plasmodium berghei" Trans Roy Soc Trop Med Hyg 64 : 401-406, 1970.
5. Carter R, and McGregor IA "Enzyme variation in Plasmodium falciparum in Gambia" Trans Roy Soc Trop Med and Hyg 67 :830-837, 1973.
6. Carter R and Voller A. "The distribution of enzyme variation in population of Plasmodium falciparum in Africa" Trans Roy Soc Trop Med and Hyg 69 : 371-376, 1975.
7. Thaithong S, Sueblinwong T and Beale GH. "Enzyme Typing of some isolates of Plasmodium falciparum from Thailand" Trans Roy Soc Trop Med and Hyg 75 : 268-270, 1981.

8. ธาดา สืบหลินวงศ์ และสดศรี ไทยทอง "รายงานฉบับสมบูรณ์ : เรื่อง การศึกษาเอ็นไซม์ LDH, GPI, GDH, 6-PGD และ Peptidase E ในเชื้อมาลาเรียชนิด Plasmodium falciparum ด้วยวิธี starch gel เทียบกับวิธี acrylamide gel electrophoresis" เสนอ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2526.
9. Perrin LH, Dayal R and Loche M "Antigenic characterization of plasmodium using monoclonal antibodies", Geneva : World Health Organization. Document WHO/MAL/81. 938 : 1-11, 1981.
10. Trait A "Analysis of protein variation in Plasmodium falciparum by two dimensional gel electrophoresis" Mol Biochem Parasitol 2: 205-218, 1981.
11. Fenton B, Walker A and Walliker D "Protein variation in clones of Plasmodium falciparum detected by two dimensional electrophoresis" Mol Biochem Parasitol 16 : 173-183, 1985.
12. Hames BD "An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis" In : Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach eds Hames BD and Rickwood D, IRL Press, Oxford, 1981 pp 1-91.
13. Freifelder D "Electrophoresis" In: Physical Biochemistry, Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2nd Edition, WH Freeman and Company, San Francisco, 1982 pp 276-322.
14. Ornstein L, "Disc electrophoresis I. Background and theory" Ann NY Acad Sci 121 : 321-49, 1964.

15. Davis BJ "Disc electrophoresis II, Method and application to human serum proteins" . Ann NY Acad Sci 121 : 404-27, 1964.
16. Laemmli UK "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" Nature (London) 227 : 680-5, 1970.
17. Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr, "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel." Biochem Biophys Res Commun 28 : 815-20, 1967.
18. Weber K, Osborn M, "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" J Biol Chem 244:4406-12, 1969.
19. Rosario V "Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites" Science 212 : 1037-1038, 1981.
20. O'Farrell PH "High-resolution Two dimensional electrophoresis of proteins" J Biol Chem 250 : 4007-4021, 1975.
21. Pinswasdi C, Thaithong S, Beale GH, Fenton B, Webster HK and Pavanand K" Polymorphism of proteins in malaria parasites following Mefloquine treatment" Mol Biochem Parasitol 23 : 159-164, 1987.
22. Bullini L "Enzyme variants in the identification of parasites and vectors : Methodological aspects of the electrophoretic approach" In : Tropical

Diseases Research Series : 5, eds. Newton BN and Michal F, UNDP/World Bank/WHO, Schwabe & Co, AG, Basel 1982 pp 53-69.

23. Anderson NL "High-resolution; Two dimensional electrophoresis as a method of identifying organism and cell type" In : Tropical Diseases Research Series : 5, eds. Newton BN and Michal F, UNDP/World Bank/WHO, Schwabe & Co, AG, Basel, 1982 pp 107-113.
24. Rosario V "Biochemical aspects of the characterization of Malaria parasites" In : Tropical Disease Research Series : 5, eds. by Newton BN and Michal F, UNDP/World Bank/WHO, Schwabe & Co AG, Basel 1982 pp 157-176.

กิติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีส่วนช่วยสนับสนุนให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้
ดังรายนามต่อไปนี้

1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งจัดสรรเงินทุนสนับสนุนปี พ.ศ. 2528 และ 2529
2. หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาติให้ดำเนินการวิจัยได้
3. หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาติให้ดำเนินการวิจัยได้
4. นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยมาลาเรียร่วมองค์การอนามัยโลก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่ง

