

การวิเคราะห์โปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงเสือ (*Mansonia uniformis*)



นางสาวอังฉรา ภูมิ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

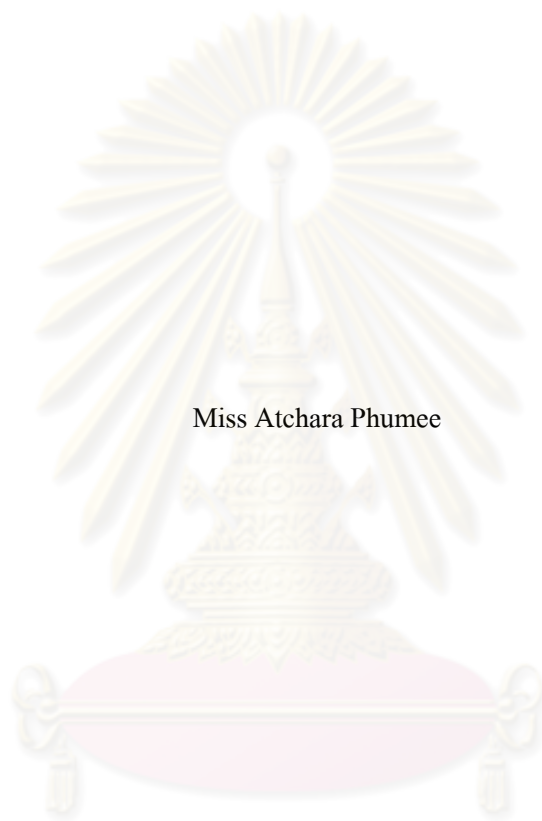
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Proteomics analysis from salivary gland of *Mansonia uniformis*



Miss Atchara Phumee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์จากค่อมน้ำลายขูดเสื่อ
(*Mansonia uniformis*)

โดย

นางสาวอังฉรา ภูมิ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง กัญญรัตน์ ทรัพย์วิเชียร

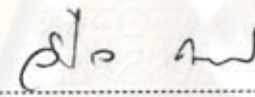
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผล็ง สิริยะเสถียร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

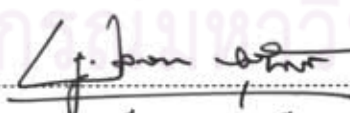

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติสร ภัทราคุลชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินชนก)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง กัญญรัตน์ ทรัพย์วิเชียร)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผล็ง สิริยะเสถียร)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. อุษาวดี ดาواره)

อัจฉรา ภูมิ : การวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์จากค่อมน้ำลายยุงเสื่อ (*Mansonia uniformis*).
 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.พญ. กัญญรัตน์ ทรัพย์วิเชียร, อาจารย์ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.นพ. เสด็จ สิริยะเสีธร, 60 pp.

โครงสร้างของค่อมน้ำลายยุงเสื่อจะอยู่เป็นคู่บริเวณส่วนนอกของขุง ค่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้และเพศเมียแต่ละข้างประกอบด้วย 3 lobes คือ median lobe 1 lobe และ lateral lobe 2 lobes แต่ค่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียนั้น lateral lobe จะประกอบด้วยบริเวณ proximal lobe และ distal lobe ซึ่งคล้ายกับโครงสร้างของค่อมน้ำลายยุงชนิดอื่นๆ การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดจากค่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้และเพศเมียอายุ 3-5 วัน ปริมาณโปรตีนที่วัดได้คือ 0.32 ± 0.03 และ 1.38 ± 0.02 ไมโครกรัม/ค่อมน้ำลาย ตามลำดับ การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนจากค่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้และเพศเมียโดยวิธี SDS-PAGE โปรตีนที่พบในค่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้ส่วนใหญ่จะพบในค่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมีย โดยค่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียพบแถบที่เห็นเด่นชัด 12 แถบขนาดประมาณ 21, 22, 24, 26, 37, 39, 44, 53, 55, 61, 72 และ 100 kDa ซึ่งแถบโปรตีนที่ไม่พบในค่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้ขนาดประมาณ 21, 22, 24, 26, 37 และ 72 kDa แต่แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในค่อมน้ำลายยุงเพศผู้มีขนาดประมาณ 83 kDa และพบว่าโปรตีนที่ขนาดประมาณ 61 และ 83 ปรากฏชัดเจนขึ้นหลังดูดกินเลือดที่ช่วงเวลาตั้งแต่ 24 ชั่วโมง และโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 kDa ลดลงหลังจากดูดกินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และปรากฏชัดเจนขึ้นเท่ากับก่อนดูดกินเลือดที่เวลา 60 ชั่วโมง และการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนพบโปรตีนทั้งหมด 16 ชนิด ซึ่งโปรตีนที่พบจะเกี่ยวข้องกับการใช้พลังงาน โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแพ้ โปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน และ โปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
 ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต อัจฉรา ภูมิ
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5174852030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : SALIVARY GLAND PROTEINS / 2D GEL ELECTROPHORESIS / MASS SPECTROMETRY / MANSONIA UNIFORMIS

ATCHARA PHUMEE : PROTEOMICS ANALYSIS FROM SALIVARY GLAND OF MANSONIA UNIFORMIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KANYARAT KRAIVICHIAN, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PADET SIRIYASATIEN, Ph.D., M.D., 60 pp.

The salivary glands of male and female *Mansonia uniformis* mosquitoes are morphologically different. Those of adult females are paired organs composed of a medial lobe and two lateral lobes with proximal and distal lobes lying in the thorax. The salivary glands of males consist of a single small lobe. The salivary glands of both sexes displayed the same morphological organization as that of other mosquitoes. The salivary gland protein of *Mansonia uniformis* were determined and analyzed. The amount of salivary gland proteins of male and female mosquitoes aged between 3-5 days after adult emergence was approximately 0.32 ± 0.03 and 1.38 ± 0.02 $\mu\text{g}/\text{pair gland}$ respectively. SDS-PAGE analysis revealed that at least 12 major protein bands were found in the female salivary glands approximately 21, 22, 24, 26, 37, 39, 44, 53, 55, 61, 72 and 100 kDa. The protein bands that are not found in the male salivary glands approximately 21, 22, 24, 26, 37 and 72 kDa, but protein bands found only in male salivary glands is approximately 83 kDa. And found that approximately 61 and 83 proteins content started to increase gradually after the female mosquito took a blood meal at 24 hours as well as approximately 37 kDa were depleted at 0, 12, 24, 36 and 48 hours and start up as before took a blood meal at 60 hours. Comparison of SDS-PAGE (1D) and 2D gel electrophoresis (2D) revealed that protein profiles obtained by 1D and 2D gel electrophoresis were similar. Interested protein analysis by LC-MS/MS showed that 16 proteins which corresponding to the energy metabolism, allergy, protein synthesis and folding as well as no function of protein.

Field of Study : Medical Science

Academic Year : 2009

Student's Signature Atchara Phumee

Thesis Advisor's Signature [Signature]

Thesis Co-Advisor's Signature [Signature]

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก รศ.พญ.กัญญรัตน์ ทรัพย์วิเชียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการศึกษางานวิจัย รวมทั้งช่วยแก้ไขในจุดบกพร่องของการเขียนงานวิจัยฉบับนี้

ขอขอบคุณฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยา กลุ่มกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องยุง ให้คำแนะนำ ข้อคิดต่างๆอันเป็นประโยชน์ และการต้อนรับที่ดีตลอดการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ โพรตีโอมิกส์ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเทคนิค Two dimension Gel Electrophoresis และ LC-MS/MS ในการปฏิบัติงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยช่วยอำนวยความสะดวกในเรื่องอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ เพื่อนๆ และทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก ตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	4
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.4 สมมติฐาน.....	4
1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ลักษณะทั่วไปของยูง.....	6
2.2 โพรตีโอมิกส์ (Proteomics).....	11
2.2.1 Two dimension gel electrophoresis (2D-gel electrophoresis).....	11
2.2.2 liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry.....	12
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
2.3.1 โครงสร้างของต่อมน้ำลายยูง.....	14
2.3.2 โปรตีนจากต่อมน้ำลายยูง.....	15
2.3.3 การแสดงออกของยีนในต่อมน้ำลายยูง.....	16
2.3.4 โปรตีนที่ต่อต้านการทำงานของขบวนการ haemostasis.....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 อุปกรณ์.....	20
3.2 วัสดุ.....	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.8.4 การย่อยเจล.....	32
3.4.9 การวิเคราะห์ผลด้วย Mass Spectrometry.....	33
3.5 การรวบรวมข้อมูล.....	33
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	33
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	34
4.1 ลักษณะ โครงสร้างของต่อมน้ำลายยูงเสือ.....	34
4.2 ปริมาณ โปรตีนทั้งหมดจากต่อมน้ำลายยูงเสือเพศผู้และเพศเมีย.....	34
4.3 รูปแบบ โปรตีนจากต่อมน้ำลายยูงเสือเพศผู้และเพศเมีย.....	37
4.4 รูปแบบ โปรตีนจากต่อมน้ำลายยูงเสือเพศเมียทั้งก่อนและ หลังดูคินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง.....	38
4.5 การศึกษารูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายยูงเสือเพศผู้ ยูงเสือเพศเมีก่อนดูคินเลือด และยูงเสือเพศเมียหลังดูคินเลือดทันที โดยวิธี 2D gel electrophoresis และหาชนิดของโปรตีนจากการวิเคราะห์ ด้วย LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT).....	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	46
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	46
5.2 อภิปรายผลการวิจัย.....	48
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	50
รายการอ้างอิง.....	51
ภาคผนวก.....	57
ภาคผนวก ก.....	58
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	60

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	สรุปข้อแตกต่างระหว่างยุง 4 ชนิด.....	8
ตารางที่ 2.2	ความแตกต่างของ genomics กับ proteomic.....	11
ตารางที่ 3.1	เจลชั้นล่าง (Resolving Gel) (12%).....	27
ตารางที่ 3.2	เจลชั้นบน (Stacking Gel) (5%).....	27
ตารางที่ 4.1	ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากต่อมน้ำลายยุงเสือดัวเต็มวัย เพศผู้และเพศเมียอายุ 3-5 วันที่เลี้ยงโดย 10% ซูโครส (n=10).....	34
ตารางที่ 4.2	แสดงหน้าที่ของโปรตีนที่ได้จากการทำ LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT).....	44



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 ตัวเต็มวัยยุงเสื่อ.....	9
รูปที่ 2.2 ไข่ยุงเสื่อ.....	9
รูปที่ 2.3 ลูกน้ำยุงเสื่อ.....	10
รูปที่ 2.4 ตัวโม่งยุงเสื่อ.....	10
รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนของเทคนิค 2D-gel electrophoresis.....	12
รูปที่ 2.6 แสดงขั้นตอนของเทคนิค LC-MS/MS.....	13
รูปที่ 2.7 แผนผังการทำงานของ LC-MS/MS.....	14
รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน (<i>Aedes aegypti</i>).....	15
รูปที่ 2.9 แสดงกระบวนการทำงานของน้ำลายของแมลงพาหะที่มีผลต่อ platelet activation และ aggregation ของโฮสต์.....	16
รูปที่ 2.10 แสดงโมเลกุลจากน้ำลายที่สามารถยับยั้งการรวมตัวของเลือด (anti-coagulation).....	19
รูปที่ 3.1 แสดงแผ่นโฟมสำหรับให้ยุงวางไข่.....	23
รูปที่ 3.2 แสดงกรงยุงสำหรับให้ยุงวางไข่.....	23
รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะของพีชน้ำแพงพวย.....	24
รูปที่ 3.4 แสดงโหลพลาสติกสำหรับเลี้ยงลูกน้ำจนกระทั่งกลายเป็นตัวโม่ง.....	24
รูปที่ 3.5 แสดงลักษณะหนวดของยุงเพศผู้ (ชาย) และ เพศเมีย (ขวา).....	25
รูปที่ 3.6 แสดงแท่งสำลี 10% ซูโครส.....	25
รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะ โครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้.....	35
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะ โครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมีย.....	36
รูปที่ 4.3 แสดงรูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแยกโดยวิธี SDS-PAGE บน 12 % เจล แล้วย้อมด้วย Silver staining.....	37
รูปที่ 4.4 แสดงรูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียซึ่งแยก โดยวิธี SDS-PAGE บน 12 % เจล แล้วย้อมด้วย Silver staining.....	39
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนจากต่อมน้ำลาย ยุงเสื่อเพศเมียทั้งก่อนและหลังดูดกินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมงโดยใช้โปรแกรม Quantity-one (BioRad).....	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.6 แสดงรูปแบบ โปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงเสื่อ โดยวิธี 2D gel electrophoresis.....	42
รูปที่ 4.7 แสดงชื่อของโปรตีนที่ได้จากการทำ LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT).....	43
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงร้อยละของหน้าที่โปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายยุงเสื่อ (<i>Mansonia uniformis</i>) ที่วิเคราะห์โดย LC-MS/MS (n=16).....	45



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BSA	=	Bovine serum albumin
°C	=	Degree Celsius
CHAPS	=	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
2D-gel	=	Two-dimensional Polyacrylamide gel electrophoresis
DTT	=	1, 4-dithiothreitol
IEF	=	Isoelectric focusing
IPG	=	Immobilized pH gradient
kDa	=	kilodaltons
M	=	Molar
ml	=	milliliter
mg	=	milligram
mM	=	millimolar
LC-MS/MS	=	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
PBS	=	Phosphate-buffered saline
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	N, N, N', N' Tetramethylethylenediamine
APS	=	Ammonium persulfate
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µM	=	micromolar
nm	=	nanometer
w/v	=	Weight by volume
v/v	=	Volume by volume
xg	=	Gravity centrifugal force

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโลกของเราประสบปัญหาภาวะโลกร้อน (global warming) ซึ่งไม่ได้นำมาแต่ความร้อนเท่านั้น แต่ยังนำภัยอันตรายมาด้วยไม่ว่าจะเป็นภัยธรรมชาติ สิ่งแวดล้อมรวมทั้งมีผลกระทบต่อปัญหาเศรษฐกิจและสังคม และยังส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของมนุษย์⁽¹⁾ เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นก่อให้เกิดการระบาดของโรคที่ติดต่อโดยแมลงเพิ่มสูงขึ้น⁽²⁾ และมีผลทำให้แมลงที่เป็นพาหะเพิ่มจำนวนเร็วขึ้น ตัวการสำคัญตัวหนึ่งคือ ยุงเพศเมียสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งเป็นพาหะนำโรคระบาดร้ายแรงหลายชนิด ยุงแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะในการเป็นพาหะของโรคที่แตกต่างกัน เช่น ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) พาหะนำโรคไข้เลือดออก (dengue) และ ไข้เหลือง (yellow fever) ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) พาหะนำโรคชิคุนกุนยา (chikungunya) ยุงรำคาญ (*Culex spp.*) พาหะนำโรคไขสมองอักเสบ (encephalitis) ยุงก้นปล่อง (*Anopheles spp.*) พาหะนำโรคไข้มาลาเรีย (malaria) และยุงเสือ (*Mansonia spp.*) พาหะนำโรคเท้าช้าง (elephantiasis)⁽³⁾ โดยเชื้อโรคส่วนใหญ่ในขณะที่อาศัยอยู่ในตัวยุงพาหะ จะมีการเจริญและพัฒนาจนเป็นระยะติดต่อ และจะเคลื่อนที่ไปในอวัยวะต่างๆของยุงพาหะเช่น เชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium spp.*) จะเคลื่อนที่เข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุงพาหะเป็นอวัยวะสุดท้ายก่อนถ่ายทอดเชื้อสู่คนหรือสัตว์ เมื่อยุงดูดกินเลือดคนหรือสัตว์จะปล่อยน้ำลายที่มีเชื้อออกมาทำให้เกิดโรคได้ แต่ในกรณีของโรคที่มีสาเหตุมาจากหนอนพยาธิ เช่น ฟิลาเรีย (*Filaria*) ซึ่งก่อให้เกิดโรคเท้าช้าง เชื้อจะอาศัยอยู่บริเวณส่วนนอกของยุงและเคลื่อนที่สู่บริเวณปากของยุงเพื่อถ่ายทอดเชื้อสู่คนหรือสัตว์บริเวณที่ยุงดูดกินเลือด ดังนั้นเชื้อส่วนมากจึงมีโอกาสที่จะมีปฏิสัมพันธ์กับต่อมน้ำลายของยุงพาหะ

จากการศึกษาโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุง เช่น *Ae. aegypti*⁽⁴⁾, *Anopheles stephensi*⁽⁵⁾, *An. gambiae*⁽⁶⁾, *An. darlingi*^(7, 8), *Culex pipiens*⁽⁹⁾, *Cx. quinquefasciatus*⁽¹⁰⁾, *Ae. togoi*⁽¹¹⁾, *Armigeres subalbatus*⁽¹²⁾ และ *An. dirus B*⁽¹³⁾ พบว่ายุงแต่ละชนิดมีลักษณะ โครงสร้างของต่อมน้ำลายที่คล้ายกัน คือ ต่อมน้ำลายจะอยู่เป็นคู่บริเวณส่วนนอกของยุง ซึ่งยุงเพศเมียนั้นแต่ละต่อมจะประกอบด้วย lateral lobe 2 lobes และ median lobe 1 lobe โดย lateral lobe แบ่งเป็น proximal lobe และ distal lobe ถูกแยกโดยบริเวณ narrow transitional region เซลล์ในบริเวณ distal lobe คล้ายกับบริเวณ median lobe ซึ่งมีหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการดูดกินเลือด ส่วนบริเวณ proximal lobe เป็นบริเวณแคบคล้ายกับต่อมน้ำลายของยุงเพศผู้ซึ่งมีหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการดูดกินน้ำตาล และบริเวณ distal lobe ของต่อมน้ำลายยุงเพศเมียเป็นบริเวณที่ใหญ่ที่สุด⁽¹⁴⁾ สำหรับยุงเพศผู้ลักษณะ โครงสร้างของต่อมน้ำลายจะประกอบด้วย lateral lobe 2 lobes และ median lobe 1 lobe ซึ่งโครงสร้างและหน้าที่ของต่อมน้ำลายยุงเพศผู้และเพศเมียนั้นจะแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้

ท่อน้ำลาย (salivary duct) ของยุงในตระกูล culicine⁽⁴⁾ จะเป็นเส้นประกอบด้วย cuticle ขยายไปตลอดความยาวของต่อม แต่ในยุงตระกูล anophelines⁽⁵⁾ จะมี cuticle เฉพาะส่วนต้นของท่อเท่านั้น ซึ่ง cuticle ที่ท่อน้ำลายนี้เชื่อว่าเป็นตัวขวางกั้นการถ่ายทอดเชื้อโรคได้ ท่อน้ำลายนี้จะต่อจากต่อมน้ำลายไปตามส่วนหัวของยุงและส่วนปลายของท่อนี้จะประกอบเป็นโครงสร้างของ proboscis⁽¹⁵⁾ และในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในยุงเสื่อ (*M. uniformis*) เพื่อศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงเสื่อ

ยุงในตระกูล *Mansonia*^(16, 17) มีลักษณะคือ บนปีกมีเกล็ดขนาดใหญ่กว่ายุงชนิดอื่น ตัวสีน้ำตาลหรือดำ ลำตัวและขาตายเหลืองสลัดน้ำตาล ไชยวาริ ปลายด้านหนึ่งแหลม รวมกันเป็นกระจุกคล้ายดอกทานตะวัน ยุงเสื่อเป็นยุงขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับยุงรำคาญ และ ยุงลาย ชอบออกหากินเวลากลางคืน ชุกชุมมากช่วงก่อนใกล้รุ่งและตอนพลบค่ำ⁽¹⁸⁾ จะพบยุงเสื่อมากในพื้นที่พรุเปิดทางจังหวัดในภาคใต้⁽¹⁹⁾ ยุงเสื่อเพศเมียหาแหล่งวางไข่ในแหล่งน้ำที่มีพืชลอยอยู่ ได้แก่ พวกจอกจอกหูหนู ผักตบชวา รวมทั้งแหล่งน้ำที่มีหญ้าบางชนิดขึ้นอยู่ ลูกน้ำมีลักษณะพิเศษอยู่ที่ท่อหายใจ siphon มีลักษณะรูปกรวยสั้น ปลายแหลมหยักคล้ายใบเลื่อยใช้เจาะติดกับต้นหรือรากพืชน้ำ มีลิ้นปิดเปิดแข็งแรงมาก หายใจโดยได้รับออกซิเจนจากเซลล์ของพืชน้ำ⁽²⁰⁾ ซึ่งยุงเสื่อเป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (filariasis หรือ elephantiasis)

โรคเท้าช้างเกิดจากหนอนพยาธิที่สำคัญ คือ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ซึ่งในประเทศไทยนั้น โรคเท้าช้างยังคงจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ ทั้งนี้แม้ว่าสถานการณ์โรคเท้าช้างในคนไทยจะมีอัตราการความชุกของโรค 0.53 ต่อแสนประชากร⁽²¹⁾ ซึ่งเชื้อ *W. bancrofti* ส่วนใหญ่จะพบที่ภาคตะวันตกติดชายแดนไทย-พม่า โดยเฉพาะจังหวัดตาก กาญจนบุรีและแม่ฮ่องสอน^(22, 23) โดยมียุง *Aedes spp.* เป็นพาหะหลัก สำหรับทางภาคใต้จะพบเชื้อ *B. malayi* โดยเฉพาะจังหวัดนราธิวาส โดยมียุง *Mansonia spp.* เป็นพาหะที่สำคัญ ได้แก่ *M. boneae*, *M. dives*, *M. uniformis*, *M. indiana*, *M. annulata* และ *M. annulifera* โดย *M. boneae* เป็นพาหะหลักพบในพรุ swamp forest และ *M. uniformis* เป็นพาหะหลักพบในพรุ open swamp ส่วนยุงชนิดอื่นๆเป็นพาหะรอง⁽²⁴⁾

จากหลักฐานการศึกษาฟอสซิล (fossil) พบว่าบทบาทระหว่างองค์ประกอบของต่อมน้ำลายยุงและปรสิตมีวิวัฒนาการร่วมกันมากกว่า 7 ล้านปี⁽²⁵⁾ ซึ่งต่อมน้ำลายยุงมีบทบาทในการดูดซึมและย่อยอาหารจำพวกน้ำตาลและเลือด ยุงได้รับน้ำตาลจากน้ำหวานของพืชและดอกไม้ โดยระหว่างที่ยุงดูดกินน้ำตาลจะปล่อยเอนไซม์ออกมาผสมกับน้ำตาลที่ยุงดูดกินเพื่อย่อยน้ำตาล⁽²⁶⁾ เช่น Amylase I , Maltase-like I⁽²⁷⁾ ยุงเพศผู้และเพศเมียนั้นต้องการน้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการบิน เหาผลาญ และช่วยในการขยายพันธุ์^(28, 29) นอกจากน้ำตาลที่เป็นอาหารแล้ว ยังมีเลือดที่เป็นอาหารสำคัญสำหรับเพศเมียด้วย โดยยุงเพศเมียจะมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญทางพันธุกรรมและทางสรีรวิทยาให้เหมาะกับการดูดกินและย่อยเลือด ซึ่งการดูดกินเลือดของยุงเพศเมียนั้นจะได้

สารอาหารที่ช่วยในการขยายพันธุ์ และมีการเผาผลาญเพื่อนำไปใช้ในการผลิตไข่ รวมทั้งใช้เป็นแหล่งพลังงานอีกด้วย⁽³⁰⁾

ยุงดูดกินเลือดจากคนหรือสัตว์โดยใช้ปากแบบแทงดูด (piercing sucking mouthpart) แทะผ่านผิวหนังลงไปจนพบหลอดเลือด จากนั้นจะเริ่มดูดกินเลือดให้เร็วที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงกระบวนการป้องกันการสูญเสียเลือดหลังจากการได้รับบาดเจ็บ (haemostasis) ที่จะเกิดขึ้นซึ่งกระบวนการนี้ประกอบไปด้วย การรวมตัวกันของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) การหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) และการแข็งตัวของเลือด (blood coagulation)^(31, 32) โดยยุงมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถดูดกินเลือดได้โดยที่ต่อมน้ำลายยุงจะสร้างโปรตีนที่ต่อต้านการทำงานของกระบวนการ haemostasis เช่น agglutinins, apyrase และ anti-FXa ซึ่งในต่อมน้ำลายยุงมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ platelet inhibitors, vasodilators และ anti-coagulation ทำให้เชื้อโรคใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติของโปรตีนเหล่านี้ เพื่อผ่านติดต่อเข้าไปในคนหรือสัตว์ได้โดยง่ายและจำนวนมากในแต่ละครั้งที่ยุงดูดกินเลือด⁽³³⁾

การถ่ายทอดเชื้อโรคซึ่งต่อมน้ำลายยุงเป็นอวัยวะสุดท้ายของเชื้อโรคที่อาศัยอยู่ พบว่าน้ำลายที่ยุงหลั่งออกมาในขณะที่ยุงดูดกินเลือดอาจมีบทบาทที่สำคัญในการถ่ายทอดเชื้อโรค โดยโปรตีนในน้ำลายยุงที่หลั่งเข้าสู่โฮสต์มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์และทำให้เชื้อโรคสามารถติดต่อเข้าสู่โฮสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น⁽¹³⁾ นอกจากการเป็นพาหะนำโรคแล้วยุงยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความรำคาญแก่คนและสัตว์ ทำให้เกิดการสูญเสียเลือด เกิดอาการแพ้ เกิดอาการทางผิวหนัง และอาจเกิดการติดเชื้อซ้ำเติมได้ อาการแพ้ที่เกิดจากยุงกัดเป็นปัญหาที่พบได้บ่อย มีการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นว่าการที่ยุงกัดเป็นสาเหตุการแพ้ในคน อาการแสดงที่เกิดจากยุงกัดมีหลายระดับซึ่งอาจพบได้ตั้งแต่การเกิดเป็นตุ่มคัน ตุ่มน้ำใส และในบางกรณีอาจเป็นปฏิกิริยาแพ้รุนแรง (anaphylaxis) จากการถูกยุงกัดได้อีกด้วย^(34, 35)

การศึกษาวิเคราะห์โปรตีนต่างๆที่หลั่งออกมาจากต่อมน้ำลายยุงจึงมีความสำคัญทำให้ทราบถึงความเป็นพาหะที่แตกต่างกันในการถ่ายทอดเชื้อโรคของยุงแต่ละชนิด และสามารถนำไปศึกษาเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ที่เกิดจากยุงกัดได้ นอกจากนี้การศึกษาคู่ต่อมน้ำลายในระดับโมเลกุลอาจนำมาอธิบายถึงกลไกที่เกี่ยวข้องในการบุกรุกของปรสิตและเชื้อโรคอื่นๆที่มียุงเป็นพาหะ⁽¹²⁾ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนที่สังเคราะห์จากต่อมน้ำลายของยุงเสือเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของยุงเพศเมียทั้งก่อนและหลังดูดกินเลือดในช่วงเวลาต่างๆ โดยวิธี SDS-PAGE และทำการตรวจสอบโปรตีนที่ได้โดยย้อมสีโปรตีนด้วย Silver staining จากนั้นดูแถบโปรตีนของยุงเสือเพศผู้และเพศเมีย และเพศเมียบก่อนและหลังดูดกินเลือดในช่วงเวลาต่างๆ รวมทั้งทำ 2D gel electrophoresis เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของยุงเสือเพศผู้ เพศเมียบก่อนดูดกินเลือดและเพศเมียหลังดูดกินเลือดทันที และศึกษาชนิดของโปรตีนโดยใช้ Mass spectrometry (LC-MS/MS)

1.2 คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก

รูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศเมื่อก่อนและหลังถูกกินเลือดในช่วงเวลาต่างๆที่ศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร

คำถามรอง

รูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศผู้และเทศเมียที่ศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE และ 2D gel electrophoresis มีความแตกต่างกันอย่างไร

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาโครงสร้างของต่อมน้ำลายของเสือผู้และเสือเมีย โดยกล้องจุลทรรศน์
2. เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศเมื่อก่อนและหลังถูกกินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยวิธี SDS-PAGE
3. เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือผู้และเสือเมียโดยวิธี SDS-PAGE และวิธี 2D gel electrophoresis
4. เพื่อศึกษาชนิดของโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือ โดยใช้ Mass spectrometry (LC-MS/MS)

1.4 สมมติฐาน

1. รูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศเมื่อก่อนและหลังถูกกินเลือดในช่วงเวลาต่างๆด้วยวิธี SDS-PAGE มีการเปลี่ยนแปลง
2. โปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือผู้และเสือเมียมีรูปแบบโปรตีนที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ 2D gel electrophoresis

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Dissect คือการแยกต่อมน้ำลายของเสือผู้และเสือเมีย (Dissecting needles) ในการแยกส่วนหัวออกจากส่วนอกเพื่อเก็บต่อมน้ำลายภายใต้กล้อง stereomicroscope

Proteomics เป็นวิทยาศาสตร์แขนงใหม่ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากที่มีการศึกษาหาลำดับยีนทั้งหมดในมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่น มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านนำเทคโนโลยีด้านโปรตีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้ศึกษาถึงชีววิทยาและสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งพยาธิสรีรวิทยาและพยาธิกำเนิดของโรคในผู้ป่วย โดยมีข้อมูลจากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าโปรตีโอมิกส์เป็นศาสตร์ที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง ในงานวิจัยทางการแพทย์ นำมาสู่องค์ความรู้ใหม่ ก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในโรคต่างๆ ของมนุษย์ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ โปรตีโอมิกส์ยังเป็นเครื่องมือสำคัญในการค้นหาตัวบ่งชี้โรค (biomarkers) เป้าการรักษาชนิดใหม่ (new therapeutic targets) และวัคซีน

ป้องกันโรคร้ายป้องกันไม่ได้หรือได้ผลไม่ดีพอ ซึ่งทั้งหมดดังกล่าวจะนำมาสู่การวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น ผลการรักษาที่ดีขึ้นไม่มีภาวะแทรกซ้อน และการป้องกันโรคที่มีประสิทธิผลมากขึ้น

2D gel electrophoresis เป็นการศึกษา Proteome โดยใช้เทคนิค electrophoresis ในการแยกโปรตีนออกเป็น 2 มิติ (2 Dimension) โดยมีมิติแรกนิยมใช้เทคนิค Isoelectric focusing (IEF) ซึ่งเป็นเทคนิคในการแยกสารโดยอาศัยหลักการของ isoelectric point (pI) การแยกมิติที่สองโดยใช้ Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการแยกตามขนาดของโมเลกุล โปรตีนจะแยกออกจากกันและปรากฏเป็นจุด (เมื่อนำมาzoomด้วยสี)

Mass spectrometry (LC-MS/MS) คือเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้หลักการการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออน เทคนิคนี้ใช้ในการหามวลโมเลกุล (molecular mass) องค์ประกอบของธาตุและโครงสร้าง วิธีนี้จัดเป็นเทคนิคขั้นสูงค่า Sensitivity สูงสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งแบบเจาะจงและแบบทั่วไปทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ปัจจุบันมีการใช้งาน Mass spectrometry โรงงานอุตสาหกรรมสถาบันการศึกษาห้องปฏิบัติการของเอกชนและในสถาบันวิทยาศาสตร์ต่างๆ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนที่สังเคราะห์จากต่อมน้ำลายของเสือเทศเมื่อก่อนและหลังถูกกินเลือดในช่วงเวลาต่างๆ
2. เมื่อทราบความแตกต่างของโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือ สามารถนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาเกี่ยวกับบทบาทในการก่อโรคได้เช่น อาการแพ้ที่เกิดจากขูงกัด
3. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับต่อมน้ำลายของเสือต่อไปได้ในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของยุง

ยุงจัดอยู่ใน Order Diptera เช่นเดียวกับแมลงชนิดอื่น ๆ ที่มีปีก 2 ปีก ในระยะเต็มวัย คำว่า “Diptera” มาจากรากศัพท์ di=สอง และ pteron = ปีก ยุงจัดอยู่ใน Suborder Nematocera, Family Culicidae มีเพียง 4 Genus เท่านั้นที่มีความสำคัญทางการแพทย์คือ *Anopheles spp.*, *Aedes spp.*, *Culex spp.* และ *Mansonia spp.*

ยุงเป็นแมลงที่พบได้ทั่วโลกแต่พบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่น จากหลักฐานทางฟอสซิลสามารถสันนิษฐานได้ว่า ยุงมีในโลกตั้งแต่ยุคครีตคัมบรพเมื่อประมาณ 38-54 ล้านปีมาแล้ว ปัจจุบันมียุงประมาณ 3,450 ชนิด แต่ยุงส่วนมากไม่น่าภัยอันตรายใดๆ มาสู่คน มีประมาณ 100 ชนิดเท่านั้นที่สามารถทำลายชีวิตคนได้ ยุงเป็นแมลงที่มีขนาดเล็กโดยทั่วไปมีขนาดลำตัวยาว 4-6 มิลลิเมตร บางชนิดมีขนาดเล็กมาก 2-3 มิลลิเมตร และบางชนิดอาจยาวมากกว่า 10 มิลลิเมตร ยุงมีส่วนหัว ออก และท้อง มองเห็นได้อย่างชัดเจนและสามารถแยกออกจากแมลงชนิดอื่นได้ง่าย โดยสังเกตจากรูปร่างลักษณะ ดังต่อไปนี้คือ มีปากคล้ายงวง ยื่นยาวออกไปข้างหน้า และมีปีกสำหรับบิน 1 คู่ ยุงมีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (holometabolous) ซึ่งประกอบด้วย ไข่ (egg) ลูกน้ำ (larva) ตัวโม่ง (pupa) และยุงตัวเต็มวัย (adult)

นักชีววิทยาพบว่า ยุงที่ดูดกินเลือดเป็นยุงเพศเมียเท่านั้น เพราะต้องการเลือดเพื่อใช้ในการสร้างไข่ ยุงดูดกินเลือดโดยอาศัยปากแบบแทงดูดที่แหลมเหมือนเข็มฉีดยาจะเข้าไปในเส้นเลือดได้ ผิวหนัง แล้วปล่อยน้ำลายออกมาเพื่อไม่ให้เลือดที่ยุงดูดกินแข็งตัว และถ้ายุงนั้นเป็นพาหะนำโรค เชื้อโรคที่แอบแฝงอยู่ในน้ำลายยุงก็จะเข้าสู่ร่างกายคน ส่วนสารเคมีที่มีในน้ำลายยุงสามารถทำให้คนที่ถูกยุงกัดรู้สึกคัน ทำให้เกิดการแพ้เนื่องจากยุงกัด บางคนมีอาการแพ้เพียงเล็กน้อย และบางคนอาจมีอาการแพ้ขั้นรุนแรง (Anaphylaxis) ทำให้มีอาการหน้ามืดและหายใจไม่ออกได้ ลักษณะการเป็นพาหะนำโรคต่างๆสู่คนและสัตว์ ยุงเป็นแมลงพาหะทางชีวภาพคือ นำเชื้อโรคจากโฮสต์ (host) ตัวหนึ่งไปยังโฮสต์อีกตัวหนึ่ง โดยที่เชื้อโรคมักเพิ่มจำนวนหรือมีการเจริญเติบโตภายในร่างกายของยุงด้วย ยุงสามารถนำโรคได้หลายลักษณะดังนี้ นำโรคจากคนไปสู่คน เช่น โรคไข้เลือดออก โรคมาลาเรีย โรคเท้าช้าง นำโรคจากสัตว์ไปสู่คน เช่น โรคไข้สมองอักเสบของม้า (Equine encephalitis) และนำโรคจากสัตว์ไปสู่สัตว์เช่น โรคพยาธิหัวใจ (Heartworm disease)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษายุงในตระกูล *Mansonia*⁽¹⁶⁾ มีบทบาทสำคัญทางการเป็นพาหะนำโรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ทางภาคใต้ของประเทศไทย⁽¹⁹⁾ และหลายประเทศแถบเอเชีย เช่น ประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย และชนิด *M. dives* มีรายงานว่า เป็นพาหะนำเชื้อ *W. bancrofti* ที่จังหวัดกาญจนบุรี โดยยุงตระกูล *Mansonia* มีลักษณะดังนี้

ตัวเต็มวัย มีขนาดค่อนข้างใหญ่เมื่อเทียบกับยุงสกุลอื่นๆที่มีความสำคัญทางการแพทย์ (ตารางที่ 2.1) ลำตัวปกคลุมด้วยเกล็ดกว้างใหญ่ ลักษณะกลมสีขาว น้ำตาล เทา ดำ สลับกันทั่ว ให้เห็นเป็นลายคล้ายเสื่อลายพาดกลอน ปีกมีเกล็ดเป็นแผ่นกว้างใหญ่ เรียงตัวสลับกัน ขาคกระ Scutellum 3 พู ทุกพุมีขนยาวเป็นช่อ (รูปที่ 2.1)

ไข่ ไข่แต่ละใบรูปร่างคล้ายกระสวย วางเรียงติดกันเป็นกลุ่มคล้ายดอกทานตะวันติดกับพื้นล่างของใบพืชที่ตะกับผิวน้ำ (รูปที่ 2.2)

ลูกน้ำ มีท่อหายใจ (siphon) ตรงส่วนหางแตกต่างอย่างชัดเจนกับลูกน้ำชนิดอื่นๆคือ ท่อหายใจสั้น รูปร่างคล้ายกรวย ปลายหยักคล้ายฟันเลื่อย (saw-liked) แหลมคมเหมาะต่อการเจาะหรือแทงเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชน้ำ เพื่อดึงออกซิเจนมาใช้ในการหายใจและยึดเกาะติดได้สะดวก ในการกินอาหาร (รูปที่ 2.3)

ตัวโม่ มีท่อหายใจ (trumpet) บริเวณหัวเป็นหนามแหลมและแข็งสำหรับเจาะหรือแทง พืชน้ำ (รูปที่ 2.4) ได้เช่นเดียวกันลูกน้ำที่เพิ่งฟักออกจากไข่ใหม่ๆ อาจหากินอิสระได้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ต่อมาต้องรีบยึดเกาะอาศัยรากหรือลำต้นพืชน้ำเพื่อดึงออกซิเจนมาใช้หายใจเช่นพวกจอก จอกหูหนู ผักตบชวา เป็นต้น⁽²⁰⁾

วงจรชีวิตของยุงเสื่อจะคล้ายคลึงกับยุงชนิดอื่นๆ จะแตกต่างกันเฉพาะระยะที่อยู่ใต้น้ำต้องมีพืชน้ำโดยเฉพาะวัชพืชต่างๆอยู่เสมอ ซึ่งวงจรชีวิตจะใช้เวลาประมาณ 23-30 วัน ยุงเสื่อทุกชนิดวางไข่ในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีพืชน้ำจำพวกแพงพวย ผักตบชวา กก จอก แหน หญ้า วัชพืชต่างๆ เพื่อให้ลูกน้ำและตัวโม่ยึดเกาะอาศัย ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยเนื่องจากเป็นที่ลุ่ม ฝนตกชุก ความชื้นสูง และมีแหล่งน้ำขังตลอดปี สามารถแบ่งแหล่งเพาะพันธุ์ยุงเสื่อได้ 3 แบบ ดังนี้

1. ป่าพรุเปิด (Open swamp)

เป็นแหล่งน้ำขังที่พบทั่วไป เช่น สระ หนอง คลอง บึง ที่มีพืชน้ำนานาชนิด และแสงอาทิตย์ส่องถึงพื้นน้ำ บริเวณใกล้เคียงมีต้นไม้พุ่ม สำหรับยุงเกาะพักเวลากลางวัน ยุงเสื่อชนิดที่ชอบแหล่งเพาะพันธุ์แบบนี้ ได้แก่ *M. uniformis*, *M. annulifera* และ *M. indiana*

2. ป่าพรุปิด (Swamp forest)

เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีต้นไม้พุ่มใหญ่ปกคลุมอย่างหนาแน่นภายในป่าอากาศเย็น ชื้น น้ำขังตลอดปี และแสงอาทิตย์ส่องไม่ถึงพื้นน้ำ ใบพืชร่วงหล่นทับถมกันนานหลายปี นำขังใสแต่สีคล้ำ ความเป็นด่างค่อนข้างสูงตัวอย่างเช่น ป่าพรุโต๊ะเต็ง ป่าพรุบาเจาะ จังหวัดนราธิวาส ซึ่งมีพื้นที่ประมาณ 216,900 และ 66,450 ไร่ ตามลำดับ ยุงเสื่อที่ชอบแหล่งเพาะพันธุ์แบบนี้ ได้แก่ *M. bonneae* และ *M. dives*

3. ขอบป่า (Forest verge)

เป็นรอยต่อระหว่างป่าเปิดกับป่าปิด แสงอาทิตย์ส่องถึงพื้นดินได้บ้าง ไม่ถึงพื้นดินบ้าง สามารถพบยุงเสื่อหลากหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่จะเป็นยุง *M. annulata*

ยุงเสื่อพาหะนำโรคเท้าช้าง ซึ่งเกิดจากหนอนพยาธิที่สำคัญคือ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ซึ่งในประเทศไทยนั้น โรคเท้าช้างยังคงจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ สถานการณ์โรคเท้าช้างในคนไทยจะมีอัตราความชุกของโรค 0.53 ต่อแสนประชากร⁽²¹⁾ ซึ่งเชื้อ *W. bancrofti* ส่วนใหญ่จะพบที่ภาคตะวันตกติดชายแดนไทย-พม่า โดยเฉพาะจังหวัดตาก กาญจนบุรี และแม่ฮ่องสอน^(22, 23) โดยมียุง *Aedes spp.* เป็นพาหะหลัก สำหรับทางภาคใต้จะพบเชื้อ *B. malayi* โดยเฉพาะจังหวัดนราธิวาส โดยมียุง *Mansonia spp.* เป็นพาหะที่สำคัญ ได้แก่ *M. boneae*, *M. dives*, *M. uniformis*, *M. indiana*, *M. annulata* และ *M. annulifera* โดย *M. boneae* เป็นพาหะหลักพบในป่าพรุปิด และ *M. uniformis* เป็นพาหะหลักพบในป่าพรุเปิด ส่วนยุงชนิดอื่นๆเป็นพาหะรอง⁽²⁴⁾

ตารางที่ 2.1 สรุปข้อแตกต่างระหว่างยุง 4 ชนิด

ลักษณะทั่วไป	<i>Aedes</i>	<i>Culex</i>	<i>Anopheles</i>	<i>Mansonia</i>
แหล่งเพาะพันธุ์	แหล่งน้ำสะอาดในบ้าน ได้แก่ คู่ม่าน้ำ อ่างน้ำ บ่อ ซีเมนต์ ไห กระจับปี่ กะลา ยางรถยนต์มีน้ำขัง งานรอง ขาตู้ แจกัน กาบใบพืช โปรง ไม้ เปลือกผลไม้ ฯลฯ	แหล่งน้ำขังบนดิน แอ่งหิน ท่อระบายน้ำ น้ำครำใต้ถุนบ้าน น้ำ ในทุ่งนา รอยเท้าสัตว์ ภาชนะขังน้ำสกปรก ฯลฯ	แหล่งน้ำไหลเอื่อยๆ ค่อนข้างสะอาด แอ่งหิน โพงไม้ รวมทั้งในนาข้าว ฯลฯ โดยมากอยู่ใกล้ตัว เมือง ในป่า ชายเขา	บึงน้ำที่มีพีชน้ำ เช่น จอก แหน ผักคอบขวา ป่าพรุที่มี พีชน้ำ ฯลฯ
การเกาะพัก	ลำตัวขนานกับพื้น	ลำตัวขนานกับพื้น	ลำตัวและส่วนท้องทำมุม กับผนังที่เกาะประมาณ 45°	ลำตัวขนานกับพื้น
รูปร่างลักษณะ	-ลำตัวมีเกล็ดขาวบน ด้านหลังส่วนอก -ขาไม่มีปล้องขาวสลับดำ -ปีกค่อนข้างใส	-ลำตัวมีสีน้ำตาล -ขาไม่มีปล้องขาว -ปีกค่อนข้างใส	-ลำตัวมีสีน้ำตาลค่อนข้างดำ -ปีกมีเกล็ดเห็นเป็นสีขีด สลับเข้ม	-ลำตัวมีเกล็ดหยาบสีน้ำตาล อ่อนๆ -ปีกมีเกล็ดหยาบใหญ่
	-ปากตัวเมีย palpi สองข้าง ของปากสั้น ยาวไม่ถึง 1/4 ของปาก	-ปากตัวเมีย palpi สอง ข้างของปากสั้น ยาว ไม่ถึง 1/4 ของปาก	-ปากตัวเมีย palpi สองข้าง ของปากยาวเกือบเท่าความ ยาวของปาก	-ปากตัวเมีย palpi สองข้าง ของปากยาวกว่าของ <i>Culex</i> เล็กน้อย
ลูกน้ำ	ท่อหายใจอ้วนสั้น ลอยทำมุม กับผิวน้ำ เคลื่อนไหวแบบ ควัดตัว	ท่อหายใจเรียวยาว ลอยทำมุมกับผิวน้ำ เคลื่อนไหวเป็นรูปตัว เอส (s)	ท่อหายใจไม่มี ลอยขนาน ผิวน้ำ เคลื่อนไหวตรงๆ สลับไปมา	ท่อหายใจสั้นเป็นฟันเลื้อย เกาะแหวงรากพีชน้ำ เคลื่อนไหวเป็นรูปตัวเอส (s)
ไข่	เป็นฟองเดี่ยวๆ ติดตามขอบ ภาชนะเหนือระดับน้ำ	เป็นแพลลอยอยู่บนผิวน้ำ	เป็นฟองเดี่ยวๆ ลอยบนผิวน้ำ โดยมีท่อนช่วย	เป็นแพหรือฟองเดี่ยวได้ใบ พีชน้ำหรือลอยบนผิวน้ำ
การออกหากิน	เวลากลางวันในบ้านและใกล้ บ้าน	เวลาพลบค่ำตลอดถึง เช้ามืด โดยมากหากิน นอกบ้าน	เวลากลางคืน นอกบ้าน	เวลากลางคืน นอกบ้าน
นำโรคสำคัญ	ไข่เลือดออกและฟิลาเรีย ชนิด <i>W. bancrofti</i>	ไข่สมองอักเสบ(JE) และฟิลาเรียชนิด <i>W. bancrofti</i>	มาลาเรียหรือไข้ป่าหรือไข้ จับสั้น	เท้าช้างชนิด <i>B. malayi</i> และ <i>W. bancrofti</i>



รูปที่ 2.1 ตัวเต็มวัยยุงเสื่อ⁽³⁶⁾



รูปที่ 2.2 ไข่งเสื่อ⁽³⁷⁾



รูปที่ 2.3 ลูกน้ำยุงเสื่อ⁽³⁸⁾



รูปที่ 2.4 ตัวโม่ยุงเสื่อ⁽³⁹⁾

2.2 โปรตีโอมิกส์ (Proteomics)

Proteome คือโปรตีนทั้งหมดที่มีในรหัสพันธุกรรม ส่วนคำว่า Proteomic เป็นการศึกษาโปรตีนในแง่ต่างๆ ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ เป็นการศึกษาชนิด สมบัติ และหน้าที่ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ เพื่อดูว่าสารนั้นๆมีการสร้างโปรตีนชนิดไหนและโปรตีนเหล่านั้นมีโครงสร้างหน้าที่และการทำงานร่วมกันอย่างไร รวมถึงจำแนกกระบวนการต่างๆที่มีโปรตีนเกี่ยวข้องเช่น ตรวจสอบมาตรฐานของโรค ซึ่งการเกิดโรคเป็นการแสดงออกอย่างหนึ่งของโปรตีน นอกจากนี้โปรตีนยังเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการออกฤทธิ์ของยา การรักษาโรค และสามารถประยุกต์ใช้กับงานวิจัยทางการแพทย์ โดยใช้เทคนิคแยกโปรตีน 2 มิติ (Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis) หรือด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แยกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกัน แล้วนำไปศึกษาวิเคราะห์ค้นหาต่อว่าเป็นโปรตีนชนิดใด ปริมาณเท่าใด ด้วยเทคโนโลยี Mass Spectrometer และ Bioinformatics เนื่องด้วยเทคโนโลยีได้พัฒนาการก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ทำให้การวิเคราะห์โปรตีโอมเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว มีความไว ความแม่นยำสูง เช่น การวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค Top-down Proteomics หรือการตรวจการกระจายตัวของโปรตีนบนชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค MALDI-Tissues Imaging หรือการพัฒนา LC-MS/MS และ Software เพื่อตรวจหา Biomarker และชีวโมเลกุลต่างๆ

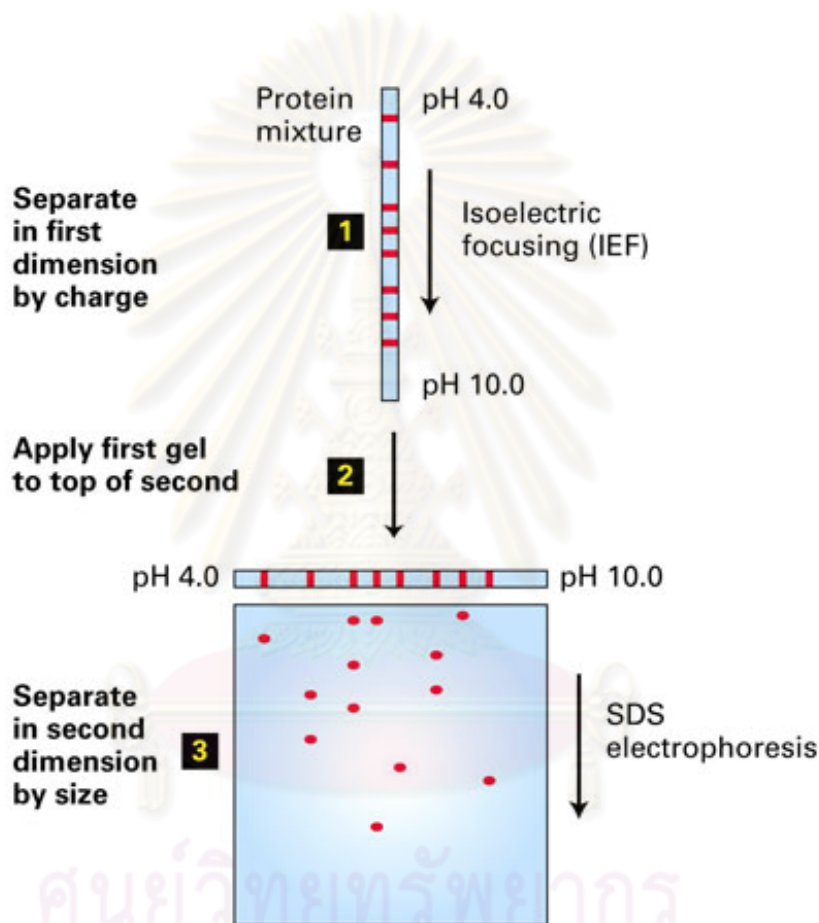
ตารางที่ 2.2 ความแตกต่างของ genomics กับ proteomic

Genomics (DNA)	Proteomic (Protein)
เป็นการศึกษาที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอด
สามารถเพิ่มจำนวนได้	ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้
มีความซับซ้อนน้อย	มีความซับซ้อนมาก ต้องมีกระบวนการ post-translation
ความสามารถในการละลายดี	ความสามารถในการละลายมีความแตกต่างกัน

2.2.1 Two dimension gel electrophoresis (2D-gel electrophoresis)

ซึ่งวิธี electrophoresis คิดค้นโดย Tiselius มากกว่า 50 ปี หลังจากนั้นปี ค.ศ.1956 Smithies และ Poulik ได้ใช้กระดาษ และเจลจากแข็งเป็น solid support เป็นครั้งแรก จนถึงปี ค.ศ.1975 O'Farrell ได้คิดค้นวิธี 2D gel electrophoresis ซึ่งนิยมใช้มาจนถึงปัจจุบัน ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนโดยอาศัยคุณสมบัติ 2 ประการ คือ isoelectric point และขนาดโมเลกุลของโปรตีน โดยที่ isoelectric point คือ ค่า pH ที่ทำให้ประจุรวมของโมเลกุลเป็นศูนย์ 2D gel electrophoresis จะทำการแยกโปรตีนโดยใช้ gel electrophoresis ใน 2 มิติที่ตั้งฉากกัน โดยมิติแรกนั้นจะแยกโปรตีนในเจลที่เป็น immobilized pH gradient gel เพื่อเป็นการแยกโปรตีนที่มีค่า isoelectric point ที่ต่างกันออกจากกัน เรียกมิติแรกว่า

isoelectric focusing และมิติที่สองเป็นการแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุลโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (รูปที่ 2.5) หลังจากการแยกและย้อมสีแล้ว จะได้รูปแบบโปรตีนที่มีลักษณะเป็นจุด (spot) กระจายอยู่ทั้งแผ่นเจล การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี 2D gel electrophoresis นี้ จะได้ข้อมูลมากกว่าการทำ SDS-PAGE เพราะนอกจากจะรู้ว่าโปรตีนนั้นๆมีขนาดโมเลกุลเท่าใดแล้ว ยังได้ข้อมูลว่าโปรตีนนั้นมีค่า isoelectric point เท่าไรด้วย และสามารถแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันออกจากกันได้ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้เมื่อเทียบกับเทคนิค SDS-PAGE

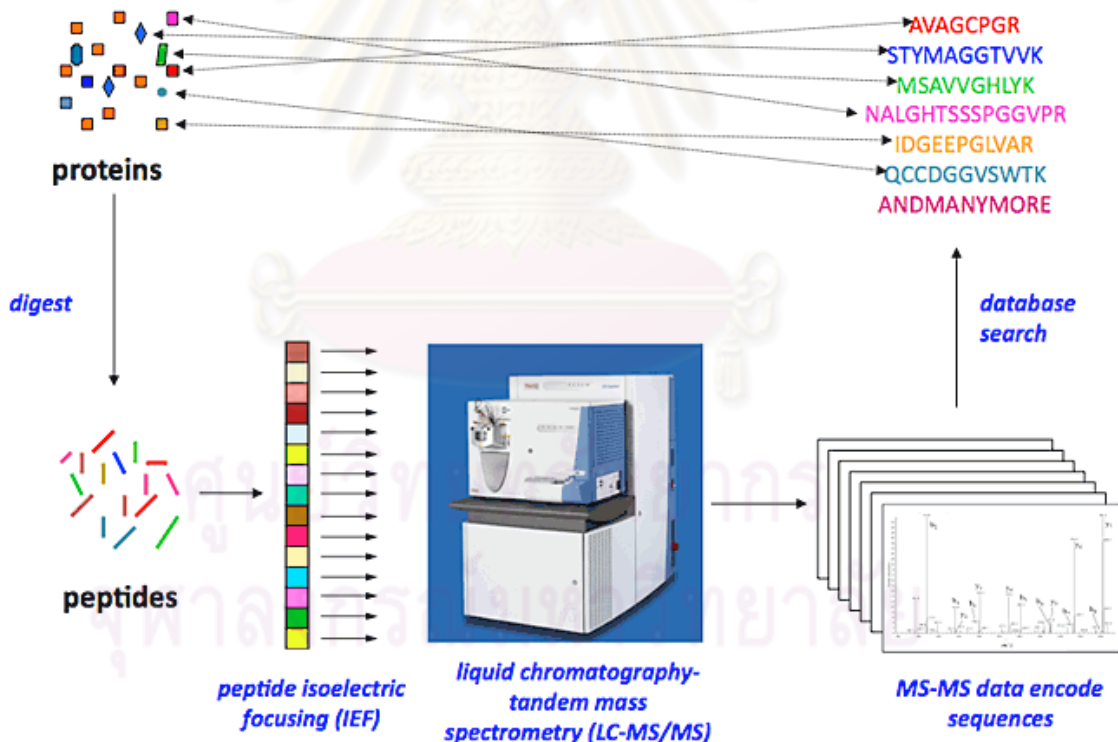


รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนของเทคนิค 2D gel electrophoresis ⁽⁴⁰⁾

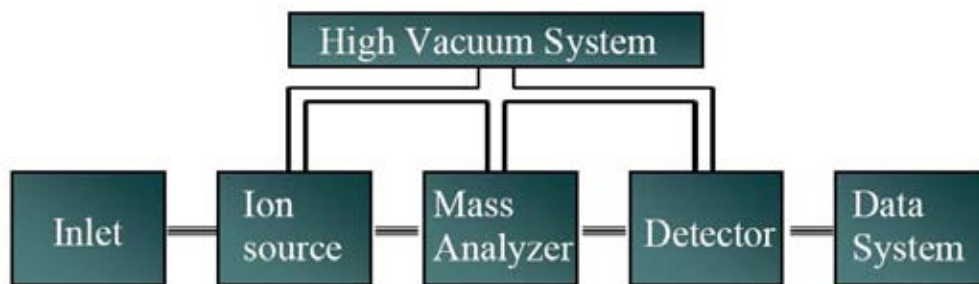
2.2.2 liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry

(LC-MS และ LC-MSMS) ใช้วิเคราะห์องค์ประกอบของสารแบบใหม่ เป็นวิธีการตรวจสอบองค์ประกอบของสารที่มีความถูกต้องและแม่นยำ การแยกสารด้วย LC เป็นกระบวนการเกิดขึ้นภายใต้สภาวะบรรยากาศทั่วไป แต่กระบวนการทำงานของ MS จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่เป็นสุญญากาศเท่านั้น ดังนั้นจึงมีระบบเชื่อมต่อระหว่างระบบของ LC และ MS ซึ่งเรียกว่า Interface ระบบเชื่อมต่อ Interface ทำหน้าที่กำจัดตัวทำละลาย ทำให้สารที่ต้องการทดสอบอยู่ในรูปของประจุ

ดังนั้นรูปแบบการ Transition จาก LC ไป MS จะเปลี่ยนไปจากสถานะดังนี้ liquid เป็น gas และเปลี่ยนประจุจาก Neutral เป็น Ion เป็นต้น (รูปที่ 2.6) ส่วนประกอบของเครื่อง MS ประกอบด้วย (รูปที่ 2.7) ส่วนผลิตไอออน (ionization source) โดยมีวิธีการเปลี่ยนสารตัวอย่างหลายวิธี เช่น ใช้ลำแสงอิเล็กตรอนเข้าชน (electron impact) เป็นต้น เมื่อสารตัวอย่างเปลี่ยนเป็นไอออนแล้วผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) เช่น ควอดรูโพล (Quadrupole) ที่ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าและคลื่นความถี่วิทยุในการจำแนกมวล ส่วนประกอบสุดท้ายได้แก่ ส่วนตรวจวัด (detector) ทำหน้าที่เป็นฉากรับ เมื่อไอออนมาตกกระทบบจะส่งข้อมูลไปยังส่วนประมวลผล เช่นระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม เพื่อแสดงผลออกมาในกราฟที่มีชื่อเรียกเฉพาะว่า แมสสเปกตรัม (Mass Spectrum) ที่มีแกนตั้งเป็นค่า relative intensity และแกนนอนเป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z) เทคนิคนี้ใช้ในการหามวลโมเลกุล (molecular mass) องค์ประกอบของธาตุ และโครงสร้างวิธีนี้จัดเป็นเทคนิคขั้นสูงค่า Sensitivity สูงสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งแบบเจาะจงและแบบทั่วไปทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ปัจจุบันมีการใช้งาน Mass spectrometry โรงงานอุตสาหกรรมสถาบันการศึกษาห้องปฏิบัติการของเอกชนและในสถาบันวิทยาศาสตร์ต่างๆ



รูปที่ 2.6 แสดงขั้นตอนของเทคนิค LC-MS/MS ⁽⁴¹⁾

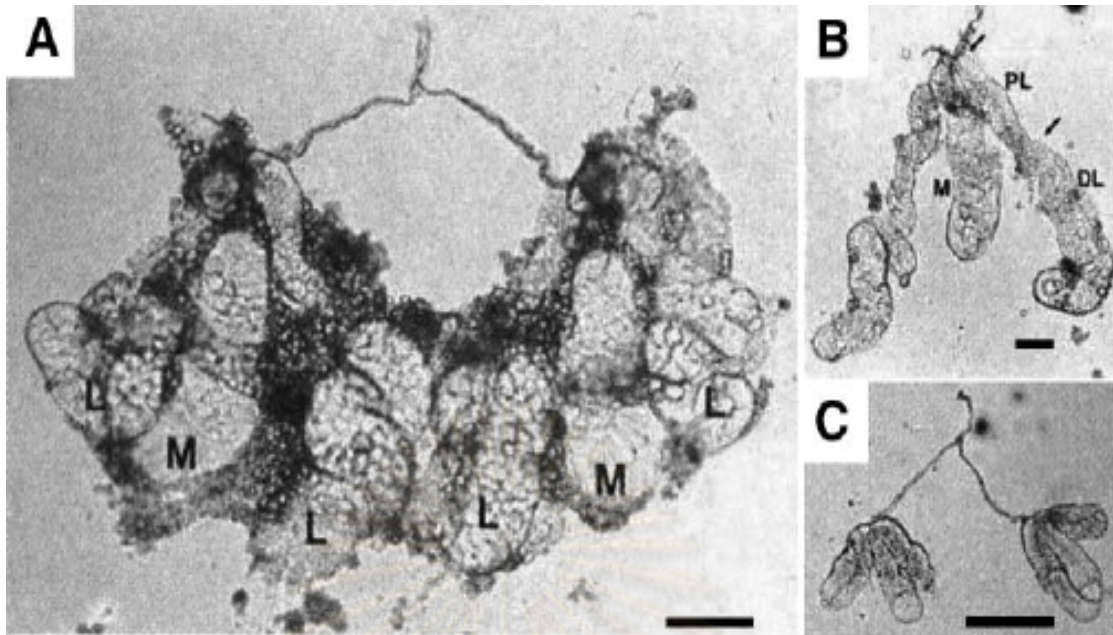


รูปที่ 2.7 แผนผังการทำงานของ LC-MS/MS ⁽⁴²⁾

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.3.1 โครงสร้างของต่อมน้ำลายยุง

Wright และ Janzen บรรยายว่าต่อมน้ำลายยุงก้นปล่องเพศเมียจะอยู่เป็นคู่บริเวณส่วนอกของยุง ซึ่งในยุงเพศเมียนั้นแต่ละต่อมจะประกอบด้วย lateral lobe 2 lobes และ median lobe 1 lobe โดย lateral lobe แบ่งเป็น proximal lobe และ distal lobe ถูกแยกโดยบริเวณ narrow transitional region เขตนี้ในบริเวณ distal lobe คล้ายกับ median lobe ซึ่งมีส่วนร่วมในการดูดกินเลือด ส่วนบริเวณ proximal lobe เป็นบริเวณแคบคล้ายกับต่อมน้ำลายของยุงเพศผู้ ซึ่งมีส่วนร่วมในการดูดกินน้ำตาลและบริเวณ distal lobe ของต่อมน้ำลายยุงเพศเมียเป็นบริเวณที่ใหญ่ที่สุด ⁽¹⁴⁾ ต่อมา Meola และ Spielman พบว่าต่อมน้ำลายยุง *An. stephensi* จะอยู่เป็นคู่บริเวณอกขนานข้างกับหลอดอาหาร แต่ละต่อมมี 3 lobes คือ lateral 2 lobes และ median 1 lobe ในยุงเพศเมีย lateral lobe แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ proximal lobe, intermediate lobe และ distal lobe ส่วน median lobe นั้นจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ short neck region และ distal lobe ซึ่งส่วน proximal lobe ของแต่ละ lobe จะถูกกระตุ้นโดย axon ที่มาจากปมประสาทซึ่งอยู่ระหว่าง fore-gut และ mid-gut ต่อมน้ำลายแต่ละ lobe จะมี central duct ที่บุด้วยเยื่อผิวชั้นเดียว และเปิดรวมกันที่ฐานของปากยุง ⁽⁴³⁾ James และ Stark บรรยายว่าต่อมน้ำลายของยุง *Ae. aegypti* จะอยู่เป็นคู่ ซึ่งโครงสร้างและหน้าที่ของต่อมน้ำลายยุงเพศผู้และเพศเมียนั้นจะแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ ท่อน้ำลาย (salivary duct) ของยุงในตระกูล culicine ⁽⁴⁾ จะเป็นเส้นประกอบด้วย cuticle ขยายไปตลอดความยาวของต่อม แต่ในยุงตระกูล anopheline จะมี cuticle เฉพาะส่วนต้นของท่อเท่านั้นซึ่ง cuticle ที่ต่อมน้ำลายนี้เชื่อว่าเป็นตัววางกั้นการถ่ายทอดเชื้อโรคได้ ท่อน้ำลายนี้จะต่อจากต่อมน้ำลายไปตามส่วนหัวของยุงและส่วนปลายของท่อนี้จะประกอบเป็นโครงสร้างของ proboscis (รูปที่ 2.8) ⁽¹⁵⁾



รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของต่อมน้ำลายของลายบ้าน (*Ae. aegypti*) **A:** ต่อมน้ำลายของเพศเมีย 1 คู่ เชื่อมต่อกันด้วยต่อมน้ำลายหลัก บริเวณรอบๆต่อมจะเห็น fat body **B:** ต่อมน้ำลายของเพศเมีย 1 ซ้างประกอบด้วย บริเวณ DL=distal lobe, M=median lobe และ PL=proximal lobe **C:** ต่อมน้ำลายของเพศผู้ 1 คู่⁽¹⁵⁾

2.3.2 โปรตีนจากต่อมน้ำลายของ

Racioppi กล่าวว่าในต่อมน้ำลายของมีการสร้างโปรตีนขึ้นหลายชนิดและอัตราการสร้างโปรตีนในต่อมน้ำลายจะสูงสุดในวันที่ 2 ของการเจริญเป็นตัวเต็มวัย ของมีการสร้างโปรตีนในต่อมน้ำลายสูงไปจนถึงสัปดาห์ที่ 2 แล้วจะเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 3⁽⁴⁴⁾ โดยโปรตีนที่พบจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิด อายุและเพศ โปรตีนที่ผลิตออกมามีความสัมพันธ์กับการดูดกินอาหารของยุงเช่น Apyrase มีบทบาทในการดูดกินเลือดของยุงเพศเมีย จะหลั่งออกมาเวลาดูดกินเลือดเป็นตัวยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด มีการศึกษา apyrase จากต่อมน้ำลายของยุง *Ae. aegypti* และ ยุง *Cx. quinquefasciatus* โดยใช้วิธี Immunoblot และใช้ anti-apyrase serum จับจำเพาะพบว่ามื่อน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกัน ประมาณ 70 kDa และได้มีการศึกษาในต่อมน้ำลายของ *Ae. albopictus* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61 kDa และ α -glucosidase จะเกี่ยวข้องกับการดูดกินน้ำตาลจะถูกหลั่งออกมามากเมื่อยุงดูดกินน้ำตาล มีการศึกษาต่อมน้ำลายของยุง *Ae. aegypti* พบโปรตีนหลักประกอบด้วย α -amylase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97 kDa และ α -glucosidase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68 kDa ซึ่งสังเคราะห์ในทุก lobe ของเพศผู้และที่ส่วน proximal lobe ของเพศเมีย⁽⁴⁵⁾

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของ *Ae. aegypti* และ *Cx. quinquefasciatus* เพศเมียทั้งก่อนและหลังดูดกินเลือดโดยวิธี SDS-PAGE นำมา ย้อมสีโปรตีนด้วยสี Coomassie Brilliant Blue พบว่าโปรตีนจากต่อมน้ำลายของ *Ae. aegypti* เพศเมียหลังดูดกินเลือดมี 6 แถบที่ลดลงซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35, 37, 45, 47, 70 kDa และสูงมากกว่า 118 kDa ขณะเดียวกันโปรตีนจากต่อมน้ำลายของ *Cx. quinquefasciatus* เพศเมียหลังดูดกินเลือดพบ 4 แถบที่ลดลงมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20, 26, 36 และ 38 kDa⁽⁴⁶⁾ โปรตีนจากต่อมน้ำลายของ *Ae. aegypti* และ *Ae. albopictus* มีขนาดใกล้เคียงกันคือ มี น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97, 89, 55, 37, 30, 24 และ 18 kDa โปรตีนจากต่อมน้ำลายของแม่ ไก่ (*Ar. subalbatus*) พบ 9 แถบหลักคือ 68, 65, 60, 55, 40, 30, 28, 21 และ 15 kDa โดย แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21 kDa พบว่ามีการลดลงของโปรตีนหลังดูดกินเลือดซึ่ง อาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการดูดกินเลือดของยุง⁽¹²⁾ โปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายของ *An. dirus B* เพศเมีย พบแถบหลัก 7 แถบมีมวลโมเลกุล 63, 44, 43, 35, 33, 30 และ 18 kDa ในส่วนของยุงเพศผู้มีแถบเหมือนกับบริเวณ proximal lobe ของยุงเพศเมีย และการ วิเคราะห์ด้วยวิธี 2D gel electrophoresis พบมวลโมเลกุลเฉลี่ย 35 kDa ที่ PI 4 และวัด ปริมาณโปรตีนในยุงเพศเมียอายุ 3-10 วันพบว่ายุงเพศเมียมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 10 เท่า ของปริมาณโปรตีนเฉลี่ยของยุงเพศผู้⁽¹³⁾

2.3.3 การแสดงออกของยีนในต่อมน้ำลายยุง

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดกินน้ำตาลของยุง คือ α -glucosidase, Amylase (*Amy I*) และ Maltase-like I (*Mal I*) จะแสดงออกในต่อมน้ำลายของยุงเพศผู้และเพศเมียแสดงว่าทั้ง 2 ยีนจะเกี่ยวข้องกับการดูดกินน้ำตาล ส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดกินเลือด Apyrase (*Apy I*) และ D7 เป็นยีนที่แสดงออกอย่างจำเพาะในต่อมน้ำลายของยุงเพศเมีย Apyrase (*Apy I*) หลั่ง โปรตีนซึ่งเปลี่ยน ATP และ ADP ให้เป็น AMP และฟอสเฟต เป็นเอนไซม์ที่ขยับยั้งการ รวมตัวของเกล็ดเลือด โดย Apyrase (*ApyI*) พบได้ในแมลงที่ดูดกินเลือดเช่น ยุง (mosquitoes)^(47, 48) ตัวเรือด (bed bugs)⁽⁴⁹⁾ ไร้น้ำดำ (Black flies)⁽⁵⁰⁾ เห็บ (ticks)^(51, 52) หมัด (fleas)⁽⁵³⁾ และ ไร้น้ำทะเล (Culicoides)⁽⁵⁴⁾ เป็นต้น มีการศึกษา Apyrase ในต่อมน้ำลายของยุงโดย วัดระดับของ Apyrase⁽⁵⁵⁾ ในต่อมน้ำลายของ *Ae. aegypti* ที่ติดเชื้อมาลาเรีย *P. gallinaceum* พบว่าระดับของ Apyrase มีน้อยกว่ายุงที่ไม่ติดเชื้อซึ่ง Apyrase จะพบมากบริเวณ distal lobe ของต่อมน้ำลายของยุงเพศเมียนั้น⁽⁵⁶⁾ ไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาทางระดับโมเลกุลของ เอนไซม์ Apyrase ในยุง *An. gambiae* พบว่าเกิด homologue กับ ยุง *Ae. aegypti*⁽⁵⁷⁾ และมีการ ศึกษา Immunofluorescence เกี่ยวกับการกระจายตัวของเอนไซม์ Apyrase ในต่อมน้ำลายของ *Ae. aegypti* และ *Cx. quinquefasciatus*⁽¹⁰⁾ พบว่าเอนไซม์นี้มีมากที่สุดเฉพาะที่ บริเวณ distal lobe ส่วนในยุง *Ae. albopictus* แสดงให้เห็นว่า Apyrase มีการกระจายที่

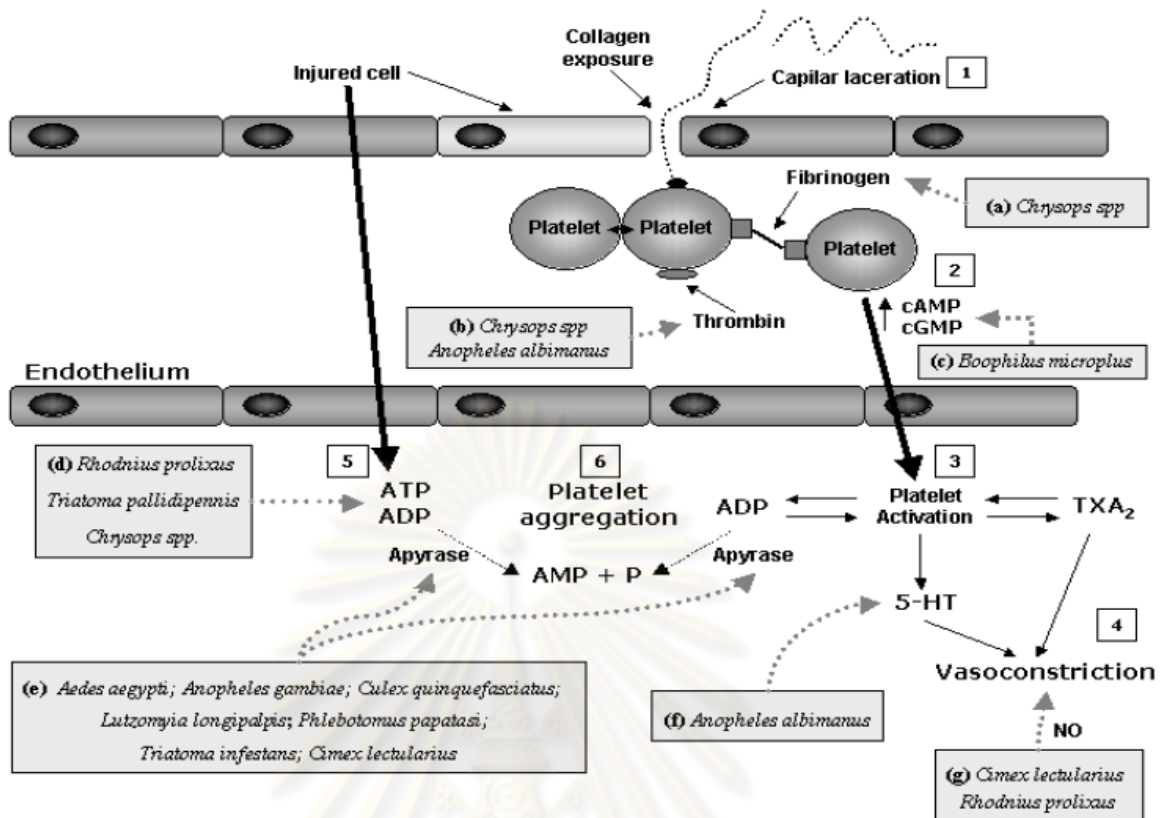
แตกต่างกันในยุงสองชนิดพบในบริเวณ distal lobe 80% และพบที่ median lobe อีก 20%⁽⁵⁸⁾ ต่อมาการศึกษา activity ของเอนไซม์ Apyrase และ α -glucosidase ของยุงเพศเมีย พบว่า Apyrase พบมากที่สุดในส่วนของ distal lobe แต่ α -glucosidase พบมากที่สุดที่ proximal lobe⁽¹³⁾ และในส่วนของยีน D7 เป็นยีนที่มีการแสดงออกที่จำเพาะต่อตอมน้ำลาย ยุงพบครั้งแรกในยุง *Ae. aegypti*^(59, 60) และต่อมาพบในยุง *An. gambiae* ยีน D7 เป็นยีนที่จำเพาะในยุงเพศเมียแสดงออกใน median lobe และ distal lobe ของตอมน้ำลายยุง โดยยีนนี้จะผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37 kDa

2.3.4 โปรตีนที่ต่อต้านการทำงานของขบวนการ haemostasis

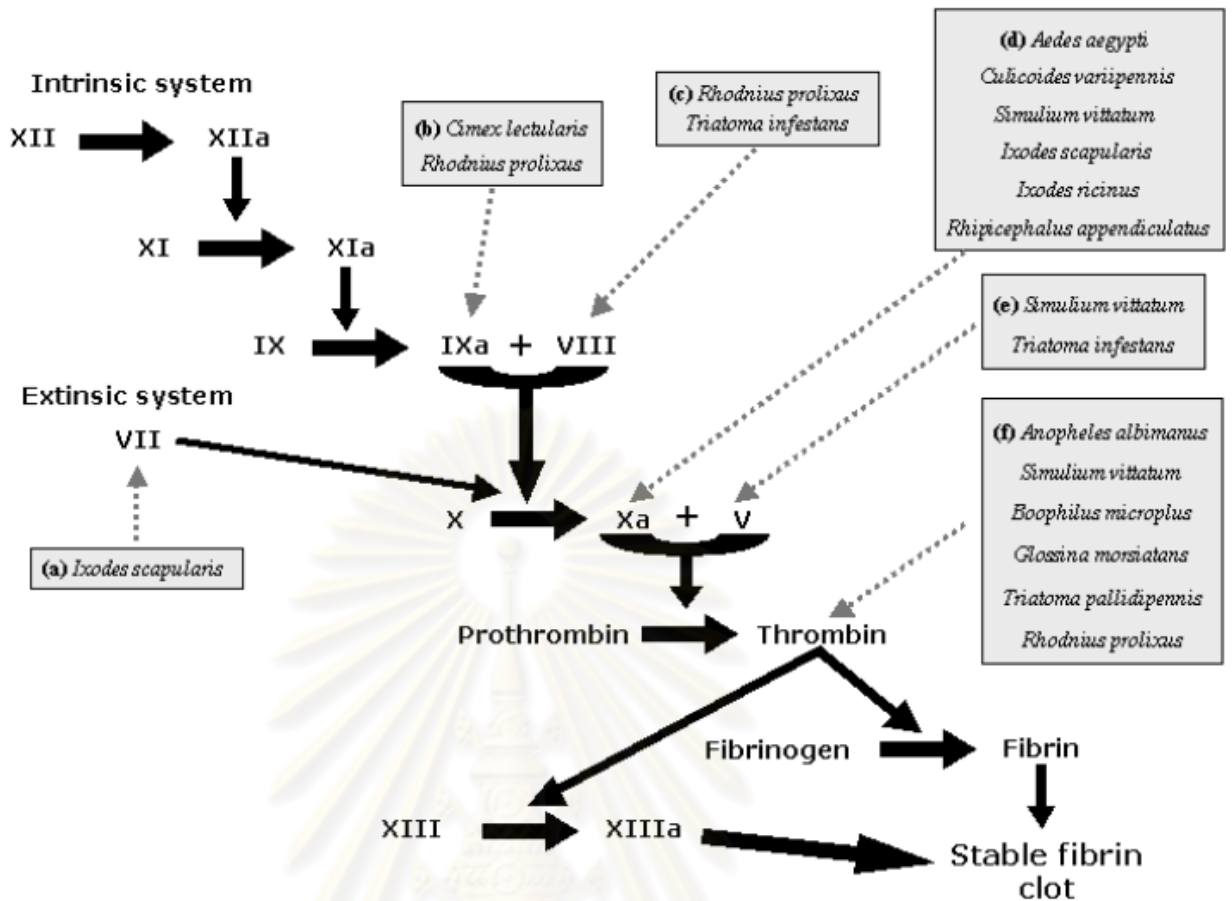
น้ำลายของแมลงที่ดูดกินเลือดมีโปรตีนที่มีหน้าที่ในการต่อต้านขบวนการบาดเจ็บ (haemostatic) การอักเสบ (inflammatory) และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (immune-responses) ของโฮสต์ และเป็นสิ่งสำคัญในการช่วยถ่ายถอดเชื้อโรคจากยุงเข้าสู่โฮสต์เช่น เชื้อปรสิต ไวรัส และแบคทีเรีย เป็นต้น โปรตีนนี้ประกอบด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด (platelet inhibitors) การขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilators) และการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulation) มีการศึกษาในน้ำลายยุง *A. albimanus* พบว่าไปยับยั้ง α -thrombin เพื่อไม่ให้เกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation)⁽⁶¹⁾ ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่มีส่วนในการยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดในแมลงที่ดูดกินเลือดหลายชนิดและพบว่ามีการยับยั้งที่แตกต่างกันในแมลงแต่ละชนิด (รูปที่ 2.9) และในส่วนของ การยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulation) มีหลายกลไกในการป้องกันการแข็งตัวของเลือดซึ่งในน้ำลายของแมลงที่ดูดกินเลือดที่พบย่อยประกอบไปด้วย factors V, Xa และ II (thrombin) การยับยั้งการแข็งตัวของเลือดนั้นขึ้นอยู่กับกลไกของแมลงชนิดนั้นๆ (รูปที่ 2.10)⁽⁶²⁾

การสังเคราะห์โปรตีนต่างๆเหล่านี้เริ่มขึ้นเมื่อยุงกลายเป็นตัวเต็มวัย แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โปรตีนในยุงต่างชนิดกันแสดงให้เห็นว่ายุงบางชนิดมีโปรตีนปรากฏในตอมน้ำลายตั้งแต่วันแรกที่เป็นตัวเต็มวัย⁽⁶³⁾ และเจริญเต็มที่จนปรากฏโปรตีนทั้งหมดในวันที่ 3 หรือวันที่ 5 หลังจากเจริญเป็นตัวเต็มวัย⁽⁶⁴⁾

เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนจากตอมน้ำลายและกระบวนการถ่ายถอดเชื้อโรคของยุงเสื่อ ยังไม่มีข้อมูลที่กว้างขวางมากนักจึงได้จัดทำงานวิจัยขึ้นนี้ขึ้นเพื่อประโยชน์ในควบคุมชนิดของยุงเสื่อและสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับตอมน้ำลายยุงเสื่อต่อไปได้ในอนาคต



รูปที่ 2.9 แสดงกระบวนการทำงานของน้ำลายของแมลงพาหะที่มีผลต่อ platelet activation และ aggregation ของโฮสต์: (1) เมื่อแมลงดูดกินเลือดจะทำให้โฮสต์เกิดการบาดเจ็บ และกระตุ้น collagen (2) เกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือด การแข็งตัวของเลือด และการหดตัวของหลอดเลือดเพื่อป้องกันการบาดเจ็บของโฮสต์ แมลงที่ดูดกินเลือดสามารถยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดโดยป้องกันการเกิด fibrinogen โดยไปยับยั้ง thrombin ใน *An. albimanus* และ *Chrysops spp.* หรือไปกระตุ้น cAMP/cGMP ใน *Boophilus microplus* (3) thromboxane A₂ กระตุ้น Platelet และ degranulation ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (4) แต่ไม่มีผลต่อ *Cimex lectularius* และ *Rhodnius prolixus* ในการป้องกันการตอบสนองต่อการบาดเจ็บของโฮสต์ได้ (5) *Rhodnius prolixus*, *Triatoma pallidipennis* และ *Chrysops spp.* สามารถจับกับ ADP หรือ (6) ใช้ Apyrase เพื่อป้องกันการรวมตัวของเกล็ดเลือดใน *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus*, *Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus papatasi*, *Triatoma infestans* และ *Cimex lectularius*



รูปที่ 2.10 แสดงโมเลกุลจากน้ำลายที่สามารถยับยั้งการรวมตัวของเลือด (anti-coagulation) เมื่อแมลงดูดกินเลือดทำให้โฮสต์บาดเจ็บและเกิดกระบวนการป้องกันตัวโดยเกิดการรวมตัวของเลือด (blood coagulation) ทั้งใน intrinsic และ extrinsic system โดยเมื่อโฮสต์ได้รับบาดเจ็บจากการกัดของแมลงโฮสต์จะกระตุ้น thrombin เพื่อเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin ทำให้เกิดการรวมตัวของเลือด ดังนั้นแมลงจึงจำเป็นต้องยับยั้งเป้าหมายที่จำเพาะดังกล่าวโดยแมลงแต่ละชนิดจะมีเป้าหมายจำเพาะเช่น factor IXa ใน *Cimex lectularis* และ *Rhodnius prolixus*, VIII ใน *Rhodnius prolixus* และ *Triatoma infestans*, Xa ใน *Aedes aegypti*, *Culicoides variipennis*, *Simulium vittatum*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus* และ *Rhipicephalus appendiculatus*, V ใน *Simulium vittatum* และ *Triatoma infestans*, VII ใน *Ixodes scapularis* และ thrombin ใน *Anopheles albimanus*, *Simulium vittatum*, *Boophilus microplus*, *Glossina morsiatans*, *Triatoma pallidipennis* และ *Rhodnius prolixus* มีผลในการยับยั้งหรือทำให้ blood-thrombin ทำงานช้าลงใน *An. albimanus*, *Simulium vittatum*, *Boophilus microplus*, *Glossina morsiatans*, *Triatoma pallidipennis* และ *Rhodnius prolixus*) เพื่อตอบสนองต่อการแข็งตัวของเลือด(coagulation)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่อง Eppendorf Centrifuge 5804R (Eppendorf)
2. เครื่อง Centrifuge micro 12 (Hanilscience Industrial)
3. ตู้แช่แข็ง Thermo Scientific 995 อุณหภูมิ -80°C (Becthai)
4. กล้อง stereomicroscope SZX9 (Olympus)
5. กล้องจุลทรรศน์ Nikon eclipse 50i (Nikon)
6. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า Power PAC 300 (Bio-Rad)
7. เครื่อง miniVE สำหรับ SDS-PAGE (Amersham Biosciences)
8. เครื่อง EttanTM IPGphor IITM (Amersham Biosciences)
9. เครื่อง ELISA Reader MULTISKAN Reader (Thermo scientific)
10. เครื่อง Mass spectrophotometry (Waters synaptTM high definition mass spectrometry system)
11. โปรแกรม (Quantity one) (BioRAD)
12. Thermo-block TDB-120 (Biosan)
13. เครื่องซั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านได้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง Sartorius AG (Gottingin)
14. เครื่องปรับค่าความเป็นกรดด่าง schott pH Meter (Schott Instrument)
15. ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติขนาด 0.1-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร และ ทิป (tip) (Eppendorf)
16. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ HEV-25/50 (Hirayama)
17. ตู้อบ BE400 (Mettler)
18. เครื่องกรองน้ำ Millipore Milli-Q plus
19. เครื่องเขย่า Rocker 25 (Labnet)
20. เครื่องสแกน hp scanjet 3670

3.2 วัสดุ

1. สไลด์ขนาด 2.5x7.5 เซนติเมตร
2. กระบอกตวงขนาด 10, 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
3. กระจกน้ำแข็ง
4. ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี

5. ถุงมือยาง
6. ที่วางหลอดทดลอง
7. นาฬิกาจับเวลา
8. บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตร
9. ปากคีบ (forcep)
10. หลอด flacon tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
11. หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
12. กรงยุงอูมิเนียมขนาด 30x30x30 เซนติเมตร
13. ถาดพลาสติกขนาด 20x30x6 เซนติเมตร
14. โหลพลาสติกสำหรับใส่ลูกน้ำ และ ตัวโม่งของยุง
15. ถังมีฝาปิดสำหรับเตรียมน้ำหมัก
16. ถังพลาสติกเล็กมีฝาปิด
17. สำลี ไม้ และกระดาษทิชชู
18. ผ้าขนาด 64x34 เซนติเมตร
19. หลอดหยดขนาดใหญ่สำหรับดูดลูกน้ำและตัวโม่งของยุง
20. หลอดดูดยุงตัวเต็มวัย
21. เข็ม (Dissecting needles)
22. หลอดหยด (dropper)
23. ถังพลาสติกสี่เหลี่ยมสำหรับย้อมเจล
24. กระดาษแก้วสีใสสำหรับทำเจลแข็ง
25. กระจกขนาด 11x13 เซนติเมตร
26. ตั๋วหนีบ
27. กระดาษกรอง (filter paper)
28. IPG strip (Amersham Biosciences)
29. Strip holder (Amersham Biosciences)
30. พาราฟิล์ม (parafilm)
31. 96 well plates (Flat bottom) (costar)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

- Acrylamide PAGE 40 % (pharmacia)
- Methylenebis acrylamide (pharmacia)

- Tris [hydroxymethyl] aminomethane (Sigma)
- Mercaptoethanol (pharmacia)
- Ammonium persulphate (pharmacia)
- SDS (pharmacia)
- TEMED (N¹-tetramethylethylenediamine) (USBTM)
- Glycine (USBTM)
- Glycerol (MERCK)
- Bromophenol blue (USBTM)

3.3.2 สารเคมีสำหรับที่ใช้สำหรับย้อมสีเจล

- Ethanol (MERCK)
- Glacial acetic acid (MERCK)

3.3.3 สารเคมีสำหรับที่ใช้สำหรับย้อมสีเจลจากชุด Kits (Pharmacia)

- Glutardialdehyde (25%w/v)
- Sodium thiosulphate (5% w/v)
- Sodium acetate
- Silver nitrate solution (2.5% w/v)
- Formaldehyde (37% w/v)
- Sodium carbonate

3.3.4 สารเคมีสำหรับ IEF (Amersham Biosciences)

- Rehydration stock
- 1M DTT (1,4-dithiothreitol)
- IPG Buffer

3.3.5 สารเคมีอื่นๆ

- Acetone (MERCK)
- Acetronitrite (J.T.Baker, Whit group)
- Ammonium bicarbonate (Sigma)
- Methanol (MERCK)
- 2-mercaptoethanol (GE Healthcare)
- Tris hydroxymethyl aminomethane (USB)
- Trypsin (Promega)
- Water LC/MS (J.T. Baker)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเลี้ยงยุง (Mosquitoes rearing) เลี้ยงยุงเสื่อโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 28 ± 1 °C ความชื้นสัมพัทธ์ $80 \pm 5\%$ แสงสว่าง 12 : 12 (สว่าง : มืด) ชั่วโมง ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงยุงเสื่อมีดังนี้

1. หั่นโฟมเป็นชิ้นบางเล็กๆลอยโฟมกับผิวน้ำในโหลพลาสติกสำหรับวางไข่



รูปที่ 3.1 แสดงแผ่นโฟมสำหรับให้ยุงวางไข่

2. นำโหลพลาสติกสำหรับวางไข่ที่เตรียมไว้ ใส่เข้าไปในกรง ที่มียุงอายุ 3-5 วันที่พร้อมจะวางไข่โดยให้ยุงดูดกินเลือดจากหนูเป็นเวลา 30-60 นาที



รูปที่ 3.2 แสดงกรงยุงสำหรับให้ยุงวางไข่

3. นำโหลพลาสติกที่มีไข่ติดอยู่ที่โฟม นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C สังเกตดูแพไข่ที่ยุงวางไว้ จนกระทั่งออกเป็นลูกน้ำ ระยะเวลาประมาณ 5-6 วัน
4. ทำน้ำหมักโดยใช้มูลหนูตะเภาอบแห้งแล้วปั่นเป็นผง 3 ช้อนโต๊ะ ผสมน้ำ 2 ลิตร หมักไว้ 3-5 วัน หลังจากนั้นนำน้ำหมัก 3 ส่วน ผสมน้ำ 1 ส่วนใส่ในโหลพลาสติกใหญ่ และใส่ฟิซน้ำแฉงพวยที่สะอาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อน



รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะของพืชน้ำแพงพวย

5. ถ่ายตัวอ่อนลูกน้ำ 200-300 ตัว ลงโหลพลาสติกใหญ่ที่มีน้ำหมักและพืชน้ำแพงพวย



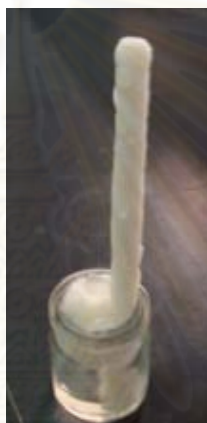
รูปที่ 3.4 แสดงโหลพลาสติกสำหรับเลี้ยงลูกน้ำจนกระทั่งกลายเป็นตัวโม่ง

6. ให้อาหาร 10% ยีสต์ 3 หรือ 4 ครั้งต่อสัปดาห์ จนกระทั่งเจริญเป็นระยะตัวโม่งซึ่งระยะนี้จะไม่กินอาหาร
7. แยกตัวโม่งใส่โหลใหม่ที่มีน้ำสะอาดและมีพืชน้ำแพงพวยที่สะอาด
8. เมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยสามารถแยกเพศผู้และเพศเมียได้โดยอาศัยลักษณะของหนวดและปากของเพศผู้จะมีหนวดใหญ่เป็นพุ่ม ปากจะแตกเป็น 3 ง่ามเพื่อไว้ดูดน้ำหวาน ในขณะที่เพศเมียปากจะตรงและแข็งแรงเพื่อไว้สำหรับดูดกินเลือด มีหนวดที่เล็ก และสั้นกว่า



รูปที่ 3.5 แสดงลักษณะหนวดของยุงเพศผู้ (ซ้าย) และ เพศเมีย (ขวา)

9. ให้อาหารคือ 10% ซูโครสซึ่งเป็นแหล่งพลังงาน โดยเท 10% ซูโครสลงบนแท่งสำลีที่เตรียมไว้พอประมาณ ใส่ไว้ในกรง เพื่อให้ยุงดูดกินน้ำตาลได้



รูปที่ 3.6 แสดงแท่งสำลี 10% ซูโครส

3.4.2 ขนาดของประชากรตัวอย่าง

ใช้ยุงเสื่อเพศผู้ 180 ตัว และยุงเสื่อเพศเมีย 190 ตัว

3.4.3 การเก็บตัวอย่าง

1. สุ่มยุงเสื่อในกรงเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัวมา dissect เพื่อเลือกต่อมน้ำลายที่สมบูรณ์ที่สุดอย่างละ 1 คู่เพื่อศึกษาโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุง
2. สุ่มยุงเสื่อในกรงเพศเมียอย่างละ 15 ตัว เพศผู้จำนวน 80 ตัว เพื่อทำการ dissect ต่อมน้ำลายยุงเพศผู้จำนวน 50 คู่ และเพศเมียจำนวน 10 คู่ก่อนและหลังดูดกินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง
3. สุ่มยุงเสื่อในกรงเพศเมียและเพศผู้อย่างละ 15 ตัว เพศผู้เพื่อทำการ dissect ต่อมน้ำลายยุงเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 10 คู่ เพื่อวัดความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนทั้งหมด
4. สุ่มยุงเสื่อในกรงเพศผู้จำนวน 80 ตัว เพศเมื่อก่อนดูดกินเลือด 25 ตัว และเพศเมียหลังดูดกินเลือดทันที 25 ตัว เพื่อทำการ dissect ต่อมน้ำลายยุงเพศผู้จำนวน 50 คู่ และเพศ

เมื่อย่างละ 20 คู่ เพื่อทำ 2D gel electrophoresis และเลือกจุดที่สนใจเพื่อหาชนิดของโปรตีน โดย Mass spectrometry (LC-MS/MS)

3.4.4 การ Dissect⁽⁶⁵⁾ ต่อมน้ำลายยูงเสือ

3.4.4.1 การ Dissect ต่อมน้ำลายยูงเสือเพื่อศึกษาโครงสร้างของต่อมน้ำลายยูง

1. เตรียมอุปกรณ์เตรียมอุปกรณ์สำหรับ dissect ต่อมน้ำลายยูง อุปกรณ์ทุกชนิดต้องเช็ดด้วย 70% Ethanol
2. เตรียมยูงโดยสุ่มยูงเสือในกรงเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัวมา dissect เพื่อเลือกต่อมน้ำลายที่สมบูรณ์ที่สุดอย่างละ 1 คู่
3. ทำการ dissect ต่อมน้ำลายยูงภายใต้กล้อง stereomicroscope และใช้หลอดหยด (dropper) หยด 1xPBS (แช่ในน้ำแข็ง) 1 หยดลงบนกระจกสไลด์
4. เมื่อได้ต่อมน้ำลายที่สมบูรณ์ที่สุดแล้ว ถ่ายรูปเก็บไว้ด้วยกล้องดิจิทัล (Sony cybershot T70) และนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกล้องดิจิทัล (Nikon, Japan) เพื่อถ่ายภาพเปรียบเทียบคุณลักษณะ โครงสร้างของต่อมน้ำลายยูง

3.4.4.2 การ Dissect ต่อมน้ำลายยูงเสือเพื่อทำ SDS-PAGE

1. เตรียมอุปกรณ์สำหรับ dissect ต่อมน้ำลายยูง โดยอุปกรณ์ทุกชนิดจะต้องเช็ดด้วย 70% Ethanol
2. เตรียมยูงโดยสุ่มยูงเสือในกรงเพศเมียอย่างละ 15 ตัว เพศผู้จำนวน 80 ตัวใส่กล่องพลาสติกที่มีฝาปิด เพื่อทำการ dissect ต่อมน้ำลายยูงเพศผู้จำนวน 50 คู่ และเพศเมียจำนวน 10 คู่ก่อนและหลังคลอดในระยะเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยทำให้ยูงสลบในน้ำแข็ง
3. วางกระจกสไลด์ที่สะอาดลงบนกล้อง stereomicroscope และใช้หลอดหยด (dropper) หยด 1xPBS (แช่ในน้ำแข็ง) 1 หยดลงบนกระจกสไลด์
4. คีบยูงที่สลบแล้ววางบนกระจกสไลด์ที่เตรียมไว้ และใช้เข็ม (Dissecting needles) 2 อันในการแยกต่อมน้ำลาย
5. เมื่อแยกต่อมน้ำลายได้แล้วนำใส่ tube ที่มี 1x PBS จำนวน 10 μ l (แช่ในน้ำแข็ง) เมื่อได้ต่อมน้ำลายยูงครบจำนวนแล้วนำไปปั่นที่ 7,000 xg, 25°C นาน 3 นาที จะเห็นว่ามีตะกอนขาวอยู่ที่ก้น tube
6. เติม 4x RSB (Reducing Sample Buffer) จำนวน 3.3 μ l นำไปปั่นที่ 7,000 xg, 25°C นาน 1 นาที
7. จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 7,000 xg, 25°C นาน 3 นาที เพื่อให้ส่วนที่ระเหยบนฝา tube ตกลงมารวมกัน
8. นำไปเก็บไว้ที่ -80°C จนกระทั่งจะใช้ต่อไป

3.4.5 การเตรียมตัวอย่างต่อมน้ำลายยูงสำหรับทำ SDS-PAGE

นำตัวอย่างต่อมน้ำลายยูงที่เก็บไว้ที่ -80°C มาไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที เมื่อครบเวลา ปั่นที่ $7,000 \times g$, 25°C นาน 3 นาทีเพื่อให้ส่วนที่ระเหยบนฝา tube ตกลงมารวมกัน หลังจากนั้นใส่ตัวอย่างในแต่ละช่องเจลตามลำดับช่องละหนึ่งตัวอย่าง โดยช่องแรกใส่โปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น $0.1-0.2 \text{ mg/ml}$ (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Molecular weight 10-170 kDa) จำนวน $4 \mu\text{l}$

3.4.6 วิธีการทำ SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีนจากตัวอย่าง แล้วทำการตรวจสอบด้วยการย้อมสี (Staining)

3.4.6.1 ขั้นตอนการเตรียมเจล (Preparation of Gel)

ในการเตรียมเจลเนื้อเจลประกอบด้วย 2 ส่วน ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Harlow and Lane โดยเตรียมตามอัตราส่วนดังนี้

ตารางที่ 3.1 เจลชั้นล่าง (Resolving Gel) (12%)

ส่วนประกอบเจล	5 (ml)	10 (ml)
ddH ₂ O	1.6	3.3
30% acrylamide mix	2.0	4.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5
10% SDS	0.05	0.1
10% ammonium persulfate	0.05	0.1
TEMED	0.002	0.004

ตารางที่ 3.2 เจลชั้นบน (Stacking Gel) (5%)

ส่วนประกอบเจล 12%	1 (ml)	2 (ml)
ddH ₂ O	0.68	1.4
30% acrylamide mix	0.17	0.33
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25
10% SDS	0.01	0.02
10% ammonium persulfate	0.01	0.02
TEMED	0.001	0.002

โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

1. ประกอบเครื่องมือและเตรียมแผ่นกระจกสำหรับใส่เจลตามคู่มือ
2. เตรียมเจลชั้นล่าง (Resolving gel) ตามส่วนผสมข้างต้น สำหรับ 10% APS และ TEMED จะเติมสุดท้ายเนื่องจากเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยา Polymerization โดย TEMED ทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง ในการเกิดอนุมูลอิสระของ APS จากนั้นอนุมูลอิสระของ APS จะทำปฏิกิริยากับโมโนเมอร์ของ อะครีลาไมด์ เกิดเป็น โพลีอะครีลาไมด์ ในรูปอนุมูลอิสระซึ่งทำให้เกิดตาข่ายร่างแหทำให้เกิดเป็นรูพรุนสำหรับแยกโปรตีน
3. หลังจากนั้นใส่ลง plate ที่เป็นแผ่นกระจกประมาณ 5.0 ml พยายามทำหน้าเจลให้เรียบและอย่าให้มีฟองอากาศโดยเติม ddH₂O จนเต็ม ทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที
4. เท ddH₂O ทิ้ง และเตรียมเจลชั้นบน (Stacking gel) ใส่ลง plate ต่อจากเจลชั้นล่างแล้วนำหัวใส่ด้านบนของเจลชั้นบนทันทีทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 30-60 นาที
5. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วนำหัวออกแล้วนำ plate ที่มีเจลใส่ใน tank
6. เติม 1X SDS-PAGE gel running buffer ใน tank ด้านในให้ท่วมพอดีเจล และด้านนอกใส่ประมาณครึ่ง tank
7. ทำการ pre-run เครื่องประมาณ 30 นาที เพื่อให้เศษเจลที่มีขนาดเล็กหลุดออกมา
8. ใส่ตัวอย่างในช่องเจลตามลำดับช่องละ 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Molecular weight 10-170 kDa) ปริมาณ 4 µl เพื่อเป็นการเปรียบเทียบ
9. ทำการต่อเข้าระบบโดยใช้โวลต์คงที่โดยในส่วนของ Stacking gel จะใช้ 40 V เวลาประมาณ 90 นาที และส่วนของ Resolving gel ใช้ 130 V เวลาประมาณ 120 นาที
10. นำเจลออกจาก plate นำไปใส่ในถาดที่มีน้ำกลั่นและนำมาย้อมด้วยสี silver staining

3.4.6.2 การตรวจสอบ Protein หลังจากการทำ SDS-PAGE

การย้อมด้วยสี silver staining โดยใช้ silver staining kit (Pharmacia Biotech)

ขั้นตอนดังนี้

1. เท ddH₂O ทิ้งและเติม Fixation (Ethanol 20 ml, Glacial acetic acid 5 ml และ ddH₂O 25 ml) นำไปวางบนเครื่องเขย่า เขย่าเบาๆ ประมาณ 60 นาที

2. ระยะเวลา Fixation เตรียม Sensitizing (Ethanol 15 ml, Glutardialdehyde (25%w/v) 0.25 ml, Sodium thiosulphate (5% w/v) 2 ml, Sodium acetate 3.4 g และเติม ddH₂O จนได้ปริมาตร 50 ml) โดยเตรียมในที่มืด หลังจากครบเวลาให้เท Fixation ทิ้งแล้วเติม Sensitizing จนท่วมเจลนำไปวางบนเครื่องเขย่า เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ 30 นาที
3. เมื่อครบเวลา ทิ้ง Sensitizing และล้างด้วย ddH₂O 3 ครั้งครั้งละ 5 นาที
4. ระยะเวลาเตรียม Silver reaction (Silver nitrate solution (2.5% w/v) 5 ml, Formaldehyde (37% w/v) 20 μ l และเติม ddH₂O จนได้ปริมาตร 50 ml) เตรียมในที่มืดห้ามถูกแสง หลังจากได้เวลาให้เท ddH₂O ทิ้งแล้วเติม Silver reaction นำไปวางบนเครื่องเขย่า เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ 20 นาที
5. ระยะเวลาเตรียม Developing (Sodium carbonate 1.25 g, Formaldehyde (37% w/v) 10 μ l และเติม ddH₂O จนได้ปริมาตร 50 ml) เตรียม Stopping (EDTA-Na₂·2H₂O 0.73 g และเติม ddH₂O จนได้ปริมาตร 50 ml)
6. เมื่อครบเวลาเท Silver reaction ทิ้ง ล้างด้วย ddH₂O 2 ครั้งครั้งละ 1 นาที
7. เทน้ำทิ้ง แล้วเติม Developing จนท่วมเจลประมาณ 2-5 นาที แล้วเติม Stopping เพื่อหยุดปฏิกิริยา
8. หลังจากนั้นนำเจลใส่แผ่นใสทั้งสองด้านนำไป scan ด้วยเครื่อง hp scanjet 3670 ความละเอียด 1000 dpi
9. เมื่อ scan เสร็จเรียบร้อยแล้วให้เก็บเจลไว้ใน ddH₂O แช่ในตู้เย็น 4°C จนกระทั่งจะทำเจลแห้ง

3.4.6.3 การทำเจลแห้ง

โดยนำเจลที่ข้อมสีแล้ว ปิดด้วยกระดาษแก้วสีที่ชุบน้ำ ซึ่งวางอยู่บนกระจกแล้วหนีบด้วยตัวหนีบทั้ง 4 ด้านทิ้งไว้ข้ามคืน พยายามทำให้กระดาษแก้วเรียบและระวังเจลขาด

3.4.6.4 การอ่านผล

โดยอ่านแถบโปรตีนของตัวอย่างเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งสามารถบอกถึงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้ว่าประมาณกี่กิโลดาลตัน

3.4.6.5 โปรแกรม Quantity One[®] 1-D Analysis Software version 4.5.2 (BIO-RAD) เพื่อหาปริมาณความเข้มของแถบโปรตีนขั้นตอนนี้

1. เข้าโปรแกรม Quantity One
2. คลิกที่ file เลือก open
3. เลือก file รูปเจลที่ต้องการในรูปแบบ file TIFF ดับเบิลคลิก
4. เลือก Volume Tools เลือก Volume Rect Tool คลิก

5. เลื่อนเมาส์ไปบริเวณแถบแบนที่ต้องการบนรูปจอ คลิกเมาส์แล้วลากเมาส์ไปบริเวณที่ต้องการ
6. เมื่อได้แถบแบนที่ต้องการครบแล้ว ให้คลิกที่ Volume analysis report
7. คลิก Done จะได้ผลออกมา แล้วคลิกที่ไอคอน export
8. คลิกที่ Tab (Excel format) และ file คลิก OK
9. Save file ในรูป .xlsx (โปรแกรม Microsoft office excel 2007)
10. เลือกค่าที่เป็น % Adj.Vol.
11. นำมา plot กราฟในโปรแกรม Microsoft office excel 2007
12. เลือก insert คลิกที่ column เลือกรูปแบบกราฟที่ต้องการคลิก
13. คลิกขวาที่กราฟแล้วคลิกที่ select data เลือกข้อมูลในส่วนที่ต้องการ
14. จะได้กราฟรูปแท่งเพื่อดูการเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนแต่ละแถบ

3.4.7 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากต่อมน้ำลายของเสือเทศผู้และเทศเมีย โดยวิธี BCA

(bicinchoninic acid) Protein Assay Reagent (Pierce, USA) (working range = 20-2,000 µg/ml) มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการ dissect ต่อมน้ำลายของอายุ 3-5 วันที่เลี้ยงด้วย 10% ซูโครส เพศผู้จำนวน 10 คู่, เพศเมียจำนวน 10 คู่ ใส่ tube แต่ละ tube ที่มี 1x PBS จำนวน 10 µl (แช่น้ำแข็ง)
2. เตรียม standard protein ที่จะทำการวัดคือ 2 mg/ml Bovine serum albumin (BSA) เตรียม 3 dilution คือ 0.2, 0.02 และ 0.002 µl/ml โดย dilute ด้วย 1x PBS
3. เตรียม 50 BCA Reagent A : 1 BCA Reagent B (Reagent mix) จำนวน 200 µl ในแต่ละตัวอย่าง
4. เตรียม 96 well plates นำแต่ละตัวอย่าง และ standard ใส่นลงในแต่ละ well plate
5. เติม Reagent mix จำนวน 200 µl ในแต่ละตัวอย่าง mix ให้เข้ากัน
6. นำไปวางไว้ที่ 37 °C, 30 นาที
7. หลังจากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm
8. จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น

3.4.8 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis

3.4.8.1 วิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับทำ 2D gel electrophoresis

ทำการ dissect ต่อมน้ำลายของเพศผู้จำนวน 50 คู่ เพศเมียบก่อนดูคินเลือดจำนวน 20 คู่ และขุมเพศเมียบหลังดูคินเลือดทันทีจำนวน 20 คู่ นำใส่ tube แต่ละ tube ที่มี 1x PBS จำนวน 10 µl นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที

ทำการตกตะกอนเซลล์ แล้วนำตะกอนมาละลายที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย 10% (w/v) TCA ใน acetone และ 0.07% (w/v) 2-mercaptoethanol ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ -20°C ซ้ำคืน นำไปปั่นที่ 340 xg นาน 15 นาที และล้างตะกอนด้วย acetone ก่อนเก็บตะกอนโดย vortex ทุกๆ 15 นาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นที่ 960 xg นาน 15 นาที นำตะกอนโปรตีนมาละลาย lysis buffer (Tris base 30 mM, Thiourea 2M, Urea 7 M และ CHAPS 4% (w/v)) ปริมาตร 90 μl ผสมให้เข้ากัน และ นำโปรตีนที่ได้วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA (Pierce, USA)

3.4.8.2 วิธีทำ 2D gel electrophoresis

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ร่วมมือกับ Genome Institute, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมตัวอย่างต่อมน้ำลายขุ่นที่กล่าวไว้ข้างต้น
2. First dimension separation: isoelectric focusing (IEF) เลือกแผ่นฟิล์ม (IPG strip) ขนาด 7 เซนติเมตร pH 3-10
3. เตรียม strip holder ที่เหมาะสมกับ IPG strip ล้าง strip holder ด้วย ddH₂O หลายๆ ครั้งจนสะอาดและทิ้งไว้ให้แห้ง
4. เตรียม Rehydration solution (Rehydration stock (8 M urea 2% CHAPS, bromophenol blue 25 ml) 189 μl , 1M DTT 10 μl และ IPG buffer solution 1 μl)
5. เตรียมตัวอย่าง 10 μl และ Rehydration solution 115 μl ผสมให้เข้ากัน
6. แกะพลาสติกที่เคลือบ IPG strip โดยลอกตามลูกศรอย่างระมัดระวัง และนำ IPG strip ใส่ใน strip holder ที่มีตัวอย่างและ Rehydration solution อยู่ให้มีฟองอากาศ
7. นำไปวางบน Ettan™ IPGphor II™ โดยวางขั้วให้ตรงกัน ขั้วบวกของ IPG strip วางให้ตรงกับขั้วบวกของ Ettan™ IPGphor II™ เปิดเครื่องไว้ที่ 20V, 20°C ซ้ำคืน
8. เมื่อได้เวลาปิดเครื่องและนำตัวอย่างออกมา สามารถเก็บ IPG strip ไว้ใน petri dish ที่ -80°C ได้จนกระทั่งจะทำ Second dimension separation: SDS-PAGE
9. Second dimension separation: SDS-PAGE เตรียมเจล 12% Resolving Gel 10 ml ดัง ตารางที่ 3.1 โดยไม่มี Stacking gel
10. นำ IPG strip ล้างด้วย First Equilibration with reductant (SDS Equilibration buffer และ dithiothreitol (DTT)) 15 นาที และ Second Equilibration with alkylating agent (SDS Equilibration buffer และ iodoacetamide (IAA)) 15 นาที
11. ล้าง IPG strip ด้วย 1xSDS PAGE running buffer ก่อนทำ SDS-PAGE

12. นำ IPG strip ใส่งไประหว่างกระจกทั้งสองแผ่น โดยใช้ pipette tips ดันลงไประหว่างกระจกสองแผ่นด้วยความระมัดระวัง
13. ใส่น้ำโปรตีนมาตรฐาน (Protein Ladder , Molecular weight 15-200 kDa, fermentus) 4 μ l ใน 0.5x0.5 เซนติเมตร filter paper เพื่อเปรียบเทียบ
14. เติม Agarose sealing mixture (1xTAE buffer 1 ml, Agarose 0.01 g, 1% Bromophenol blue 2 μ l) 1 ml บน strip และ filter paper ทิ้งไว้ 10-15 นาที
15. ทำการรันเจล SDS-PAGE ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วข้างต้น
16. ย้อมสีโปรตีนด้วย silver staining

3.4.8.3 การวิเคราะห์จุดโปรตีนที่มีความแตกต่าง

นำรูปแบบของเจลจากการสแกน มาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของจุดโปรตีนด้วยโปรแกรม Image master™ 2D platinum Version 5.0 เพื่อหาจุดโปรตีนที่สนใจและเมื่อได้จุดโปรตีนที่สนใจจึงนำมาย่อยด้วยสารละลาย trypsin ต่อไป

3.4.8.4 การย่อยเจล

1. ทำการเจาะจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างใส่ใน 96-well plate และทำการ destain ด้วยสารละลาย 3% (v/v) H_2O_2 นาน 60 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ
2. เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย H_2O_2 ออก และเติม 100% (v/v) acetonitrile ปริมาตร 200 μ l เขย่านาน 5 นาที
3. ดูด acetonitrile ออกแล้วปล่อยให้เจลแห้งนาน 5-10 นาที
4. เติมสารละลาย 10mM ammonium bicarbonate ที่มี 10mM DTT ปริมาตร 20 μ l ก่อนตั้งทิ้งไว้ 60 นาที
5. ดูด 10mM ammonium bicarbonate ที่มี 10mM DTT ออก เติมสารละลาย 10mM ammonium bicarbonate ที่มี 100mM iodoacetamide ปริมาตร 20 μ l ตั้งทิ้งไว้ในที่มีคานาน 60 นาที และ เติม 100% acetonitrile ปริมาตร 200 μ l เขย่านาน 5 นาที
6. ดูด acetonitrile ออกทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นเติมสารละลาย 5×10^4 M trypsin ใน 10mM ammonium bicarbonate ที่มี 50% acetonitrile ปริมาตร 10 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ก่อนเติม 30% acetonitrile ปริมาตร 20 μ l แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 ชั่วโมง
7. ดูดของเหลวแต่ละตัวอย่างใส่ใน 96-well plate อันใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย 50% acetonitrile ที่มี 0.1% formic acid ปริมาตร 30 μ l ใน 96-well plate อันเดิม เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

8. ดูตัวอย่างแต่ละชนิดใส่ใน 96-well plate อันใหม่ (ทำซ้ำ 2 รอบ) ทำตัวอย่างให้แห้งด้วย incubator หรือ Heat box ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงหรือข้ามคืน
9. นำตัวอย่างที่ได้เก็บไว้ที่ -80°C รอนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

3.4.9 การวิเคราะห์ผลด้วย Mass Spectrometry

นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.4.8.4 ละลายด้วยสารละลาย 0.1% formic acid ด้วย LC-MS/MS ปริมาตร 6 μl ก่อนเปิดลงใน vial และวิเคราะห์ผลโดยเครื่อง LC-MS/MS เมื่อได้ข้อมูลแล้วจะเทียบผลที่ได้กับฐานข้อมูล (MASCOT: Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) โดยเลือก MS/MS Ion Search, Database: NCBIInr, Taxonomy: other metazoa, Enzyme: Trypsin digestion และ Allow up to 1 miss cleavage เป็นต้น

3.5 การรวบรวมข้อมูล

บันทึกผลและรวบรวมผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศเมื่อยังก่อนและหลังดูดกินเลือดและขุมเสือเทศผู้ ด้วยการจดบันทึก และเก็บรวบรวมรูปถ่ายเจลเพื่อเป็นหลักฐาน

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. รูปภาพโครงสร้างของต่อมน้ำลายของเสือเทศผู้และเทศเมียเพื่อแสดงความเหมือนและความแตกต่างของโครงสร้างและองค์ประกอบของต่อมน้ำลายของเสือ
2. ตารางเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดจากต่อมน้ำลายของเสือเทศผู้และเทศเมียต่อหนึ่งคู่ต่อมน้ำลาย
3. นำเจลที่ scan ไว้มาเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศผู้และเทศเมีย รวมทั้งเปรียบเทียบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศเมื่อยังก่อนและหลังดูดเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง เมื่อพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจะนำเจลมาหาความเข้มของแบนโดยใช้โปรแกรม Quantity-one (BioRad) และทำกราฟแท่งเปรียบเทียบ
4. นำผล 2D gel electrophoresis ที่ได้มาเปรียบเทียบดูว่าโปรตีนจุดไหนที่เหมือนหรือแตกต่างกันของขุมเสือเทศผู้, เทศเมื่อยังก่อนดูดกินเลือด และเทศเมียหลังดูดกินเลือดทันที บันทึกผลการทดลอง
5. ผลจากการทำ Mass spectrometry (LC-MS/MS) นำมาวิเคราะห์เทียบผลกับฐานข้อมูล (MASCOT) เพื่อหาชนิดของโปรตีนที่สนใจ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ลักษณะโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงเสือ

ต่อมน้ำลายยุงเสือเพศผู้และเพศเมียจะอยู่เป็นคู่บริเวณส่วนอก (thorax) ขนาบข้างกับหลอดอาหาร ซึ่งลักษณะโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงเสือเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะที่แตกต่างกันคือต่อมน้ำลายยุงเสือเพศผู้มีขนาดเล็กกว่าต่อมน้ำลายของยุงเสือเพศเมียอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยต่อมน้ำลายยุงเสือเพศผู้จะประกอบด้วย 3 กลีบคือ 2 กลีบด้านข้าง (lateral lobe) และ 1 กลีบกลาง (median lobe) (รูปที่ 4.1) สำหรับต่อมน้ำลายยุงเสือเพศเมียจะประกอบด้วย กลีบกลาง (median lobe) และ 2 กลีบด้านข้าง (lateral lobe) ซึ่งแต่ละกลีบด้านข้างแบ่งออกเป็น 2 บริเวณคือ บริเวณส่วนต้น (proximal lobe) และ บริเวณส่วนปลาย (distal lobe) ซึ่งแบ่งโดยบริเวณ narrow transitional region (รูปที่ 4.2A) การศึกษาโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงเสือเพศเมียด้วยกล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 4.2B) พบว่าเซลล์บริเวณ distal lobe คล้ายกับบริเวณ median lobe และบริเวณ proximal lobe เป็นบริเวณที่แคบ ลักษณะเซลล์จะคล้ายกับต่อมน้ำลายของยุงเสือเพศผู้ โครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงเสือเพศเมียจะมีกลีบกลางที่มีขนาดสั้นและกว้างกว่ากลีบข้าง แต่สำหรับต่อมน้ำลายยุงเสือเพศผู้จะมีกลีบขนาดเท่าๆกัน

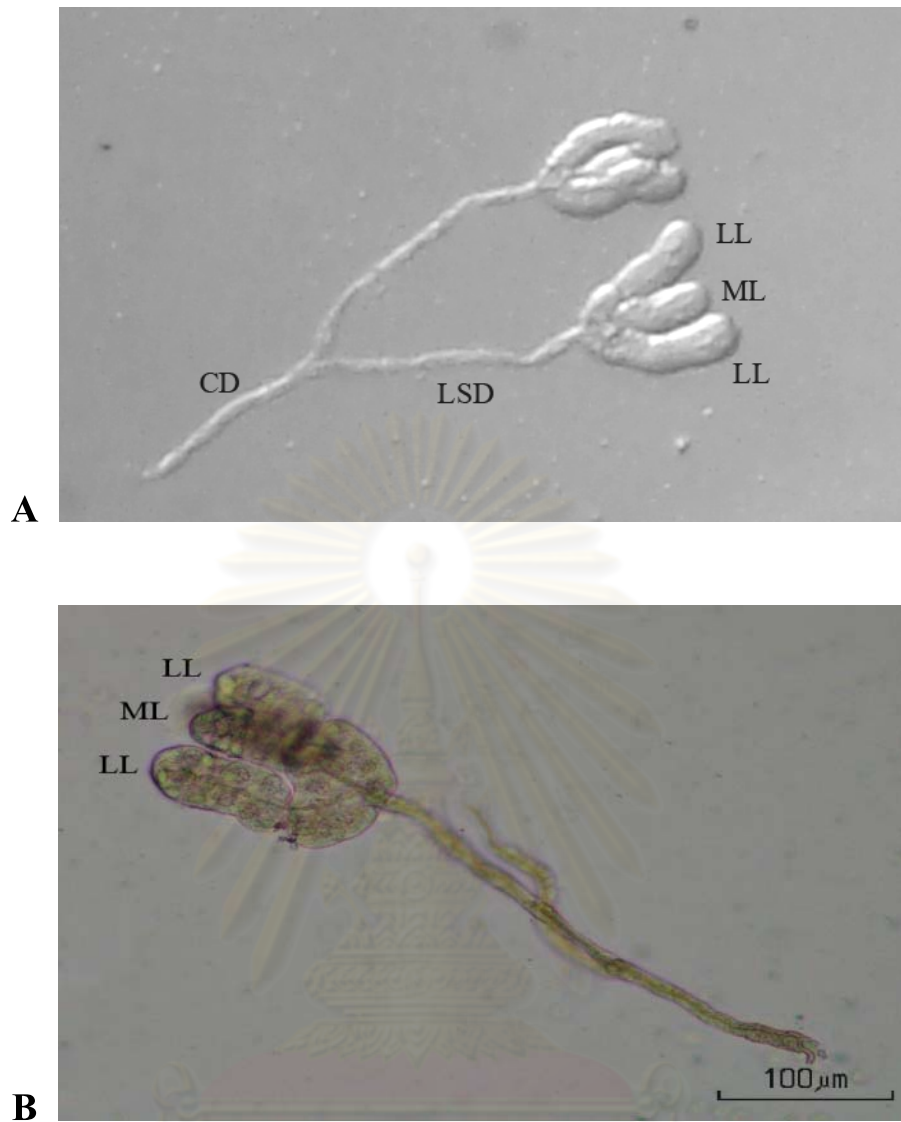
4.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากต่อมน้ำลายยุงเสือเพศผู้และเพศเมีย

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ โปรตีนทั้งหมดจากต่อมน้ำลายยุงเสือตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียอายุ 3-5 วันที่เลี้ยงโดย 10% ชูโครส (n=10)

ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{gland pair}$)*	ยุงเพศผู้	ยุงเพศเมีย
	0.32 \pm 0.03	1.38 \pm 0.02

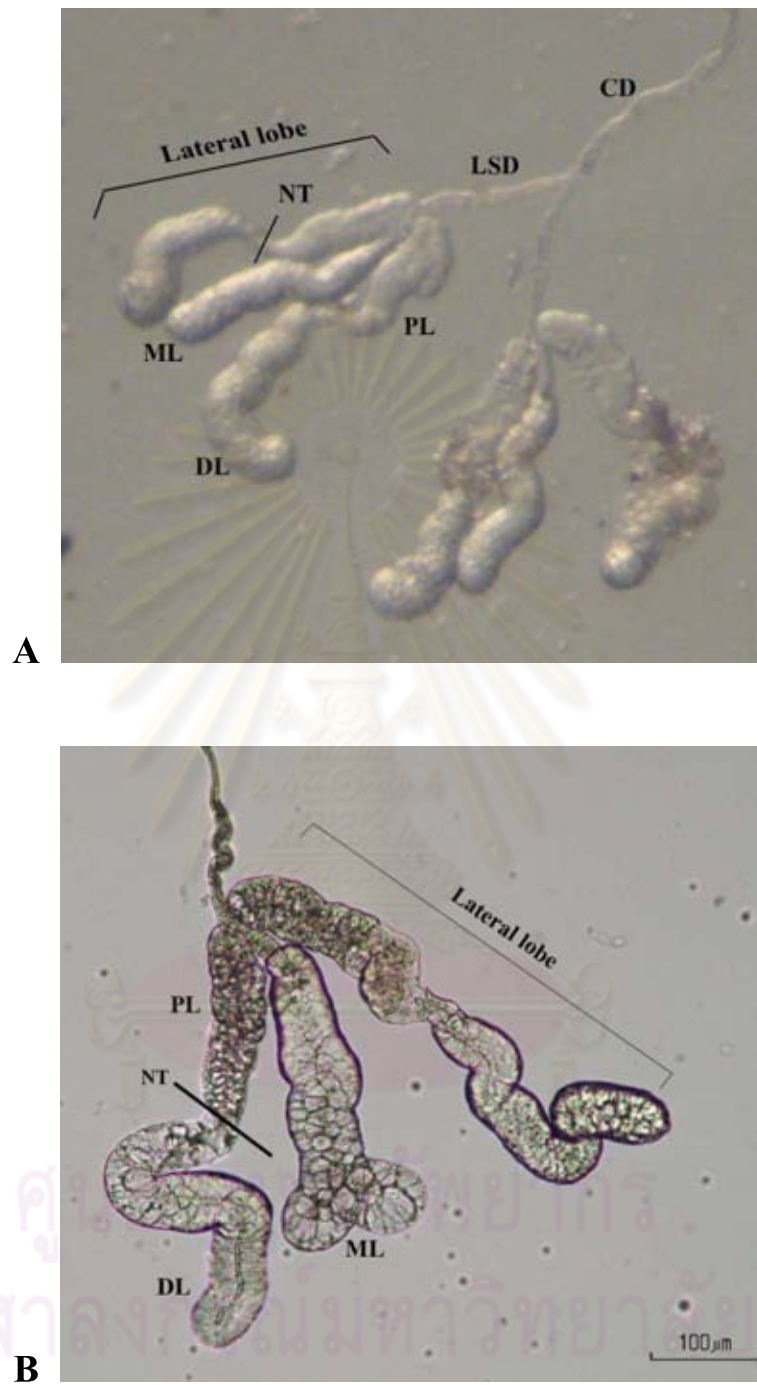
*mean \pm SD

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของยุงเสือเพศเมียมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากกว่ายุงเสือเพศผู้ประมาณ 4 เท่า



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะโครงสร้างของต่อมน้ำลายของเสื้อเพศผู้ A: ต่อมน้ำลายของเสื้อเพศผู้ 1 คู่ จากกล้อง stereomicroscope และ B: ต่อมน้ำลายของเสื้อเพศผู้ 1 ข้าง จากกล้องจุลทรรศน์ Bar represents 100 μm. (ML=Median lobe; LL=Lateral lobe; LSD=Lateral salivary duct; CD=Common salivary duct)

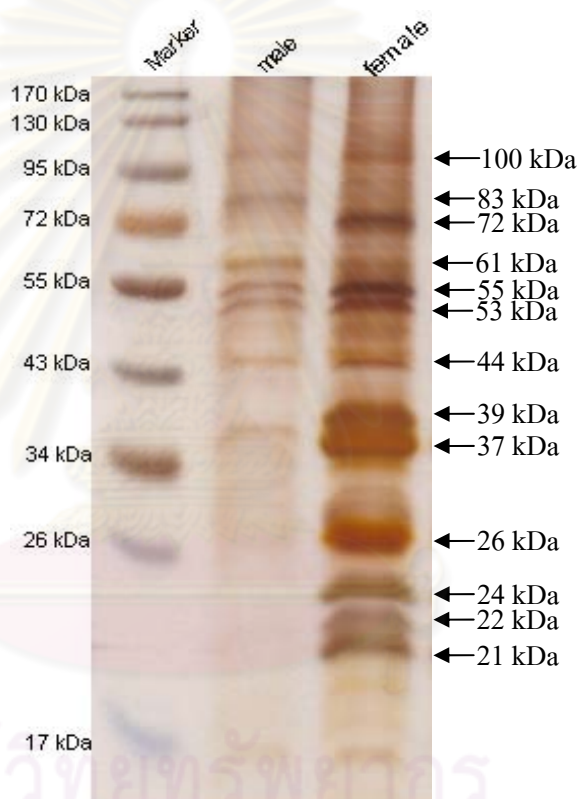
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโครงสร้างของต่อมน้ำลายขุงเสื่อเทศเมือ 1 คู่ จากกล้อง stereomicroscope และ B: ต่อมน้ำลายขุงเสื่อเทศเมือ 1 ข้าง จากกล้องจุลทรรศน์ Bar represents 100 μm. (ML=Median lobe; PL=Proximal lobe; DL; Distal lobe; NT; narrow transitional region; LSD=Lateral salivary duct; CD=Common salivary duct)

4.3 รูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้และเพศเมีย

การแยกโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้และเพศเมียโดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย Silver staining พบว่ารูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้จะพบในต่อมน้ำลายของเสือเพศเมียด้วย แถบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเพศเมียที่เห็นเด่นชัดอย่างน้อย 12 แถบขนาดประมาณ 21, 22, 24, 26, 37, 39, 44, 53, 55, 61, 72 และ 100 kDa ซึ่งแถบโปรตีนที่ไม่พบในต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้ขนาดประมาณ 21, 22, 24, 26, 37 และ 72 kDa แต่แถบโปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้แต่ไม่พบในต่อมน้ำลายของเสือเพศเมียมีขนาดประมาณ 83 kDa (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 แสดงรูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้และเพศเมียซึ่งแยกโดยวิธี SDS-PAGE บน 12 % เจล แล้วย้อมด้วย Silver staining

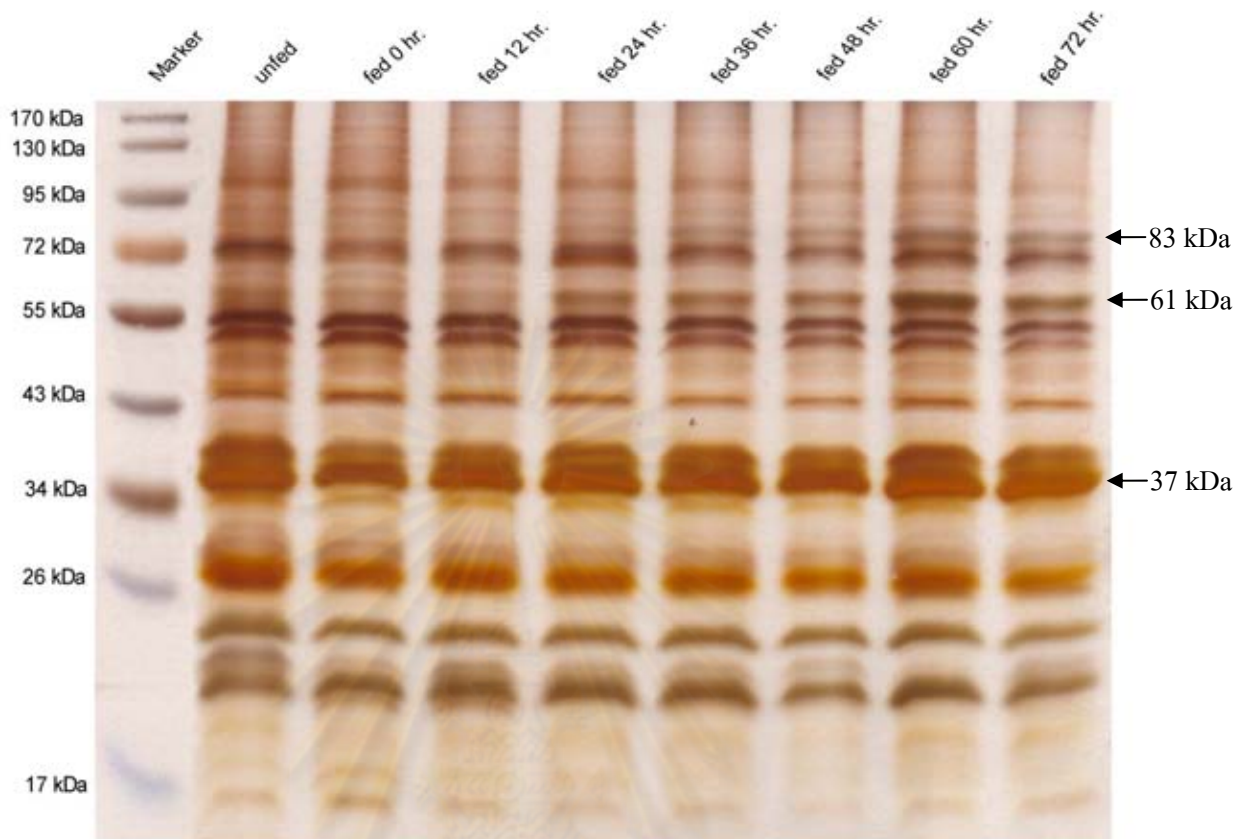
lane 1: แสดงน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (kDa)

lane 2: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้อายุ 3-5 วันเลี้ยงด้วย 10% ชูโครส จำนวน 50 คู่

lane 3: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเพศเมียอายุ 3-5 วันเลี้ยงด้วย 10% ชูโครส จำนวน 10 คู่

4.4 รูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศเมี้ยทั้งก่อนและหลังดูดกินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง

รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายของเสือเทศเมี้ยก่อนดูดกินเลือดและหลังดูดกินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง พบแถบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเทศเมี้ยก่อนและหลังดูดกินเลือดในช่วงเวลาต่างๆที่เห็นเด่นชัดอย่างน้อย 12 แถบขนาดประมาณ 21, 22, 24, 26, 37, 39, 44, 53, 55, 61, 72 และ 100 kDa (รูปที่ 4.4) และพบว่าหลังดูดกินเลือดมีแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 kDa ลดลงในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงและเริ่มปรากฏชัดขึ้นเท่ากับก่อนดูดกินเลือดที่เวลา 60 ชั่วโมง และพบว่าแถบขนาดประมาณ 61 และ 83 kDa ปรากฏชัดขึ้นหลังดูดกินเลือดตั้งแต่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงจนกระทั่ง 72 ชั่วโมง ซึ่งแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 61 kDa จะปรากฏชัดเจนในต่อมน้ำลายของเสือ แต่ของเสือเทศเมี้ยก่อนดูดกินเลือดจะเห็นแถบจางลงและปรากฏชัดขึ้นหลังดูดกินเลือดที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงจนกระทั่ง 72 ชั่วโมง แถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 83 kDa เป็นโปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายของเสือแต่ไม่พบในต่อมน้ำลายของเสือเทศเมี้ยก่อนดูดกินเลือดและหลังดูดกินเลือดจนกระทั่งช่วงเวลา 24 ชั่วโมง เริ่มปรากฏแถบชัดเจนขึ้นซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการดูดกินน้ำตาล (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.4 แสดงรูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียซึ่งแยกโดยวิธี SDS-PAGE บน 12 % เจล แล้วย้อมด้วย Silver staining

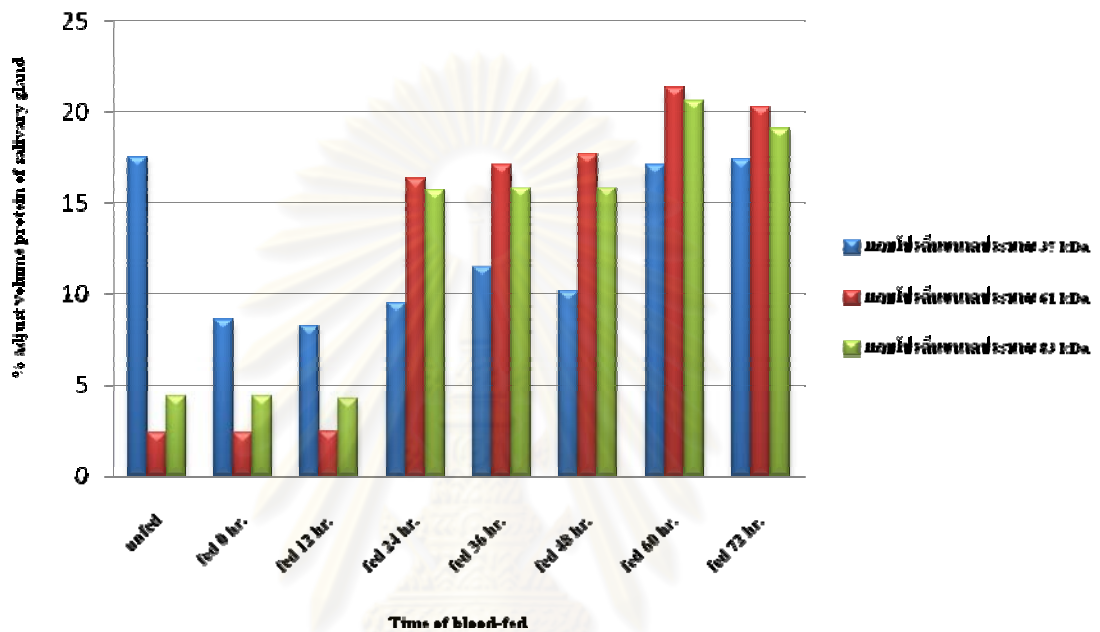
lane 1: แสดงน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (kDa)

lane 2: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียอายุ 3-5 วัน ก่อนดูดกินเลือด จำนวน 10 คู่

lane 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียอายุ 3-5 วัน หลังดูดกินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ จำนวน 10 คู่

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Protein of the unfed and blood-fed from female salivary gland *Mansonia uniformis*.

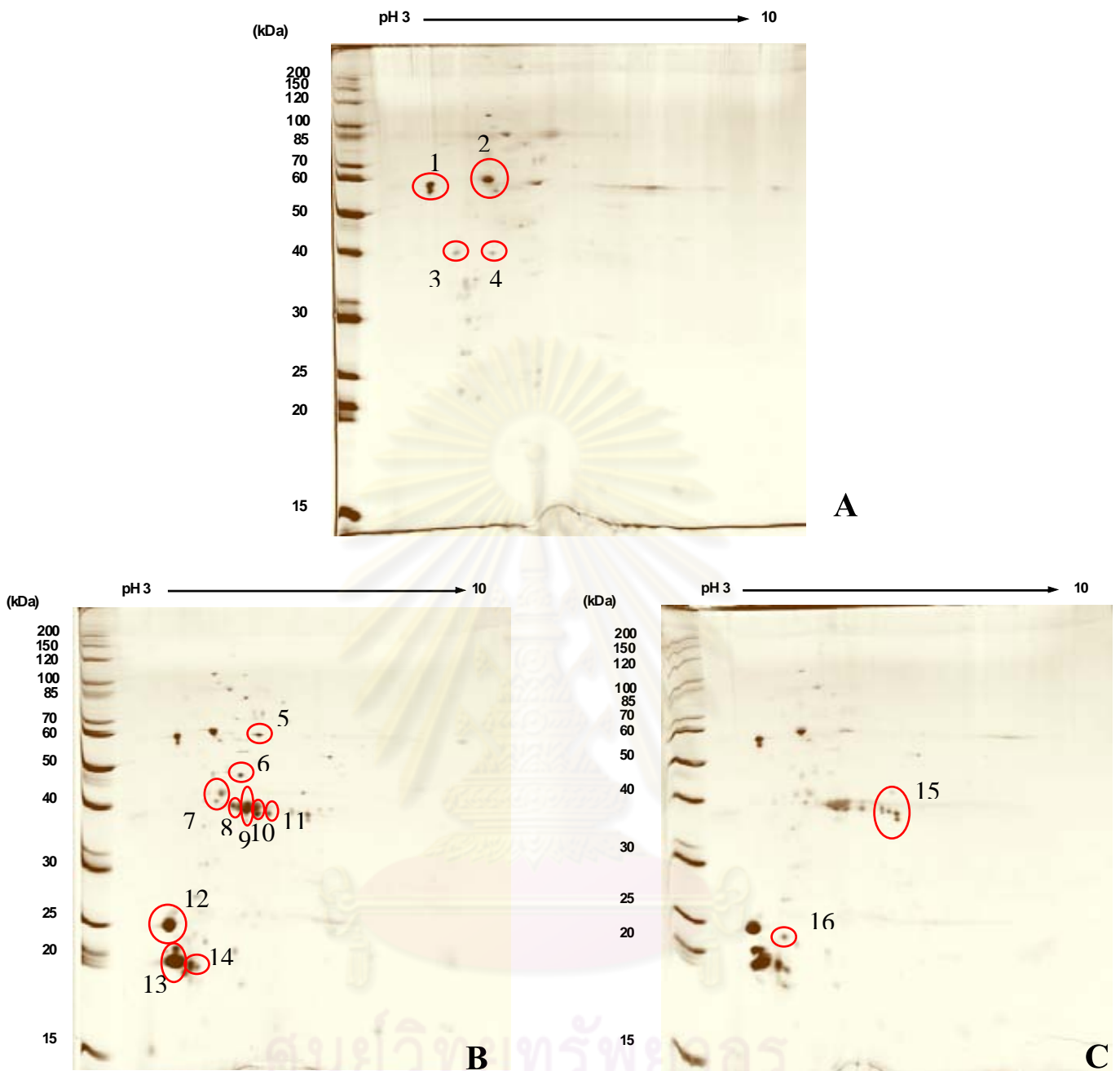


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเพชเมียทั้งก่อนและหลังดูดกินเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้โปรแกรม Quantity-one (BioRad)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การศึกษารูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเยื่อเพศผู้ เยื่อเพศเมียก่อนดูดกินเลือด และเยื่อเพศเมียหลังดูดกินเลือดทันทีโดยวิธี 2D gel electrophoresis และหาชนิดของโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT)

จากการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากต่อมน้ำลายของเยื่อด้วยวิธี 2D gel electrophoresis พบว่ารูปแบบของโปรตีนสอดคล้องกับการศึกษาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE (1D) คือ โปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายของเยื่อเพศผู้ส่วนใหญ่จะพบในต่อมน้ำลายของเยื่อเพศเมียและโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเยื่อเพศเมียหลังดูดกินเลือดจะมีโปรตีนที่ลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเยื่อเพศเมียบefore ดูดกินเลือด (รูปที่ 4.6) ซึ่งโปรตีนที่ลดลงจะอยู่ในช่วงจุดประมาณ 35-45 kDa, PI ประมาณ 4-6 หลังจากนั้นได้เลือกจุด (spot) ที่สนใจโดยเลือกจากจุดที่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย และจุดที่มีการลดลง เพื่อหาชนิดของโปรตีนโดย LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT) ได้โปรตีน 16 ชนิด (รูปที่ 4.7) ซึ่งโปรตีนบริเวณที่ลดลงของเยื่อเพศเมียหลังดูดกินเลือดจะเกี่ยวข้องกับการใช้พลังงาน (Energy metabolism) เช่น ATP-dependent RNA helicase vasa (จุดที่ 8) และ acetyl-coa carboxylase (จุดที่ 15) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแพ้ คือ venom allergen (จุดที่ 14) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้พบเฉพาะในเยื่อเพศเมียบefore ดูดกินเลือดเนื่องจากเยื่อเพศเมียบefore ดูดกินเลือดจากคนหรือสัตว์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Protein folding, Secretion และ Chaperones เช่น disulfide isomerase (จุดที่ 2) 40S ribosomal protein SA (จุดที่ 4) และ protein disulfide isomerase (จุดที่ 5) เป็นต้น ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบทั้งในต่อมน้ำลายของเยื่อเพศผู้และเพศเมียซึ่งมีส่วนในการสร้างสายโปรตีนและมีโปรตีนอื่นๆที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนและพบว่าโปรตีนจุดที่ 12 และ จุดที่ 16 เป็นโปรตีนชนิดเดียวกันคือ AGAP004768-PB (ตารางที่ 4.2) เมื่อคิดเป็นร้อยละของหน้าที่โปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายของเยื่อพบว่า โปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนมีจำนวนมากที่สุดร้อยละ 62.5 และโปรตีนที่มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการแพ้น้อยที่สุดร้อยละ 6 ของโปรตีนทั้งหมดที่พบ (รูปที่ 4.8)



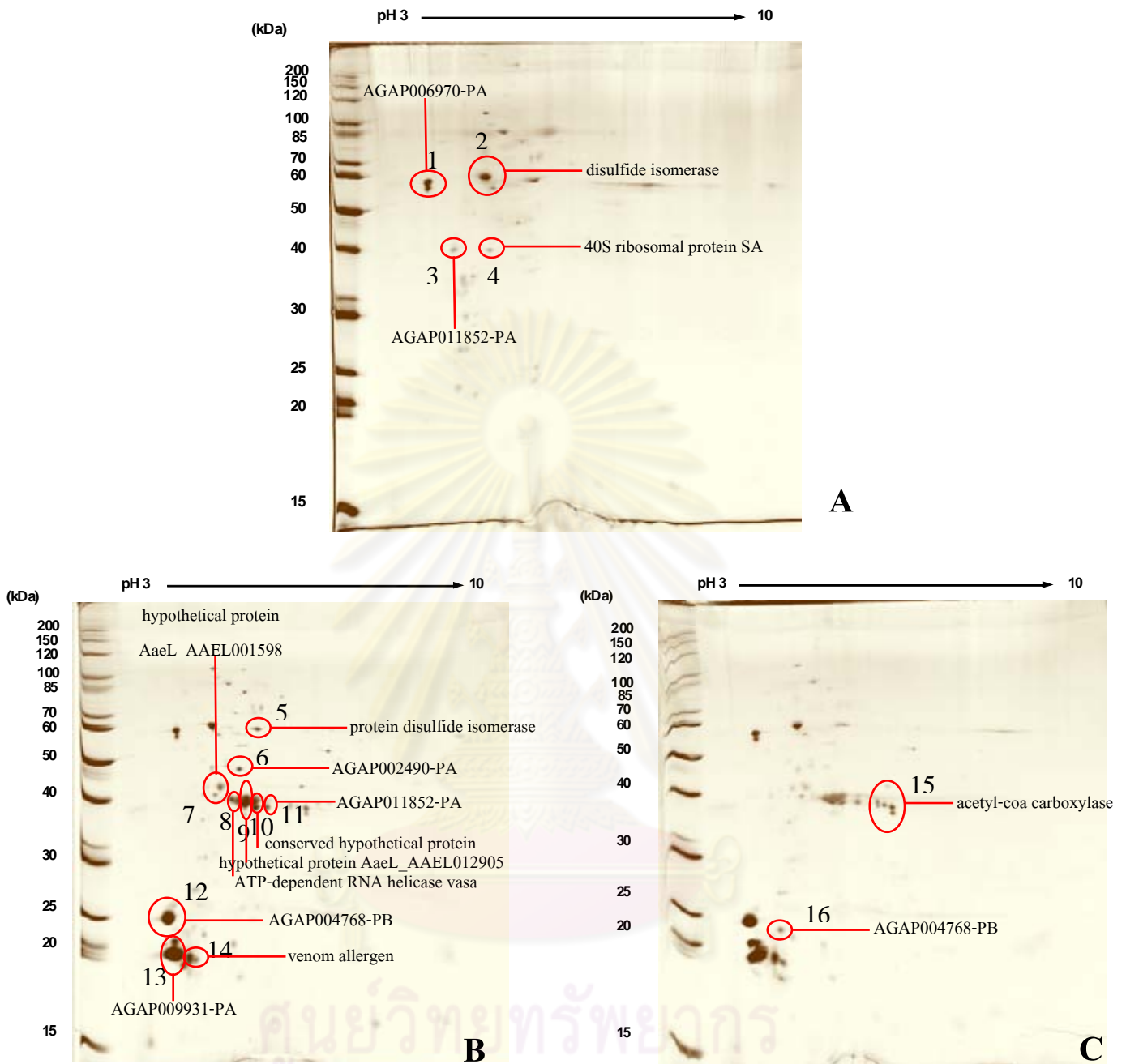
รูปที่ 4.6 แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายขงเสื่อโดยวิธี 2D gel electrophoresis

A: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายขงเสื่อเพศผู้อายุ 3-5 วัน จำนวน 50 คู่ เทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (kDa)

B: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายขงเสื่อเพศเมียอายุ 3-5 วัน ก่อนดูดกินเลือด จำนวน 20 คู่ เทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (kDa)

C: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายขงเสื่อเพศเมียอายุ 3-5 วัน หลังดูดกินเลือดทันที จำนวน 20 คู่ เทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (kDa)

วงกลม: แสดง spot ที่สนใจเพื่อส่งทำ (LC-MS/MS)



รูปที่ 4.7 แสดงชื่อของโปรตีนที่ได้จากการทำ LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT)

A: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือดงเสือพิษผู้อายุ 3-5 วัน จำนวน 50 คู่ เทียบกับน้ำหนักริโมเลกุลมาตรฐาน (kDa)

B: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือดงเสือพิษวัยอายุ 3-5 วัน ก่อนคูดกนเลือด จำนวน 20 คู่ เทียบกับน้ำหนักริโมเลกุลมาตรฐาน (kDa)

C: แสดงรูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือดงเสือพิษวัยอายุ 3-5 วัน หลังคูดกนเลือดทันที จำนวน 20 คู่ เทียบกับน้ำหนักริโมเลกุลมาตรฐาน (kDa)

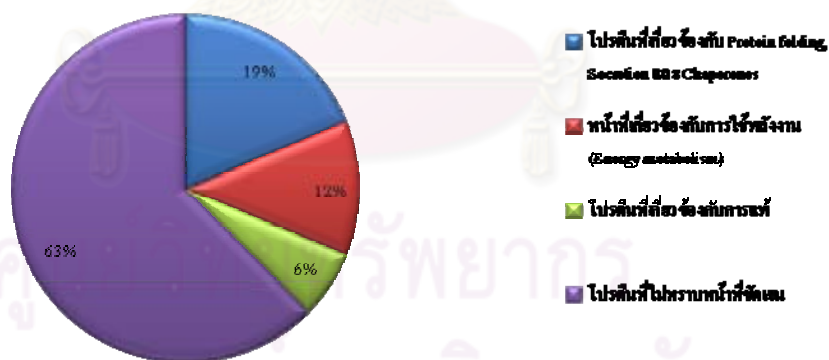
ตารางที่ 4.2 แสดงหน้าที่ของโปรตีนที่ได้จากการทำ LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT)

Spot	Accession	Name	Sequence
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Protein folding, Secretion และ Chaperones			
2	gi 170039432	disulfide isomerase [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	K.VVVVGFFK.D
4	gi 170059457	40S ribosomal protein SA [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	K.FAHYTEATPIAGR.F
5	gi 157118649	protein disulfide isomerase [<i>Aedes aegypti</i>]	K.VQETSVVGGFFQK.E
หน้าที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงาน (Energy metabolism)			
8	gi 170046392	ATP-dependent RNA helicase vasa [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	R.GRGGGGFGGGR.S
15	gi 157113072	acetyl-coa carboxylase [<i>Aedes aegypti</i>]	K.ISSDLFARGCVTTSEQGLIAAGK.I
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแพ้			
14	gi 157131073	venom allergen [<i>Aedes aegypti</i>]	R.AVGQNVAIK.V
โปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน			
1	gi 58376680	AGAP006970-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	R.SLGGSGGWSSGGLSSKGWPSSGGSK.G
3	gi 158300844	AGAP011852-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	R.LLKLTIK.Y
6	gi 158290917	AGAP002490-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	R.GVNGPVTSTTFGFRNDVLLK.L
7	gi 157120706	hypothetical protein AaeL_AAEL001598 [<i>Aedes aegypti</i>]	M.FVIDSTPAKTAK.G
9	gi 157133857	hypothetical protein AaeL_AAEL012905 [<i>Aedes aegypti</i>]	K.VHFGSCGLIHVNGVASFILVIQK.H

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงหน้าที่ของโปรตีนที่ได้จากการทำ LC-MS/MS เทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT)

Spot	Accession	Name	Sequence
10	gi 170044790	conserved hypothetical protein [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	K.LNKLNAVK.R
11	gi 158300844	AGAP011852-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	R.LLKLTIAK.Y
12	gi 158297895	AGAP004768-PB [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	R.GVAKANPDK.V
13	gi 158298917	AGAP009931-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	R.ILPLQPSVRETVVSAIQSNCGK.I
16	gi 158297895	AGAP004768-PB [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	R.GVAKANPDK.V

**ร้อยละของหน้าที่โปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายยุงเสื่อ
(*Mansonia uniformis*) ที่วิเคราะห์โดย LC-MS/MS**



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงร้อยละของหน้าที่โปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายยุงเสื่อ (*Mansonia uniformis*) ที่วิเคราะห์โดย LC-MS/MS (n=16)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์โปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือทั้งเพศผู้และเพศเมียสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ลักษณะ โครงสร้างของต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ ต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้จะมีขนาด 1 ใน 3 ของต่อมน้ำลายของเสือเพศเมีย
2. ปริมาณโปรตีนต่อหนึ่งคู่ต่อมของต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้และเพศเมียสังเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่แตกต่างกัน โดยต่อมน้ำลายของเสือเพศเมียจะสังเคราะห์โปรตีนได้มากกว่าประมาณ 4 เท่าของต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้
3. รูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้และเพศเมียจากการศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย silver staining พบว่ารูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้จะพบในต่อมน้ำลายของเสือเพศเมียด้วย แถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของต่อมน้ำลายของเสือเพศเมียมีอย่างน้อย 12 แถบขนาดประมาณ 21, 22, 24, 26, 37, 39, 44, 53, 55, 61, 72 และ 100 kDa ซึ่งแถบโปรตีนที่ไม่พบในต่อมน้ำลายของเสือเพศผู้ขนาดประมาณ 21, 22, 24, 26, 37 และ 72 kDa แต่แถบโปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายของเพศผู้แต่ไม่พบในต่อมน้ำลายของเพศเมียขนาดประมาณ 83 kDa
4. รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายของเสือเพศเมีก่อนและหลังการคลอดลูกในเลือดในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง จากการศึกษารูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย silver staining พบว่าหลังคลอดลูกในเลือดมีแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 kDa ลดลงในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงและเริ่มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆกับก่อนคลอดลูกที่เวลา 60 ชั่วโมง และพบว่าแถบขนาดประมาณ 61 และ 83 kDa ปรากฏชัดเจนขึ้นหลังคลอดลูกในเลือดตั้งแต่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมงจนกระทั่ง 72 ชั่วโมง

5. รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายของเสือเทศผู้ ยุงเสือเทศเมื่อก่อนดูคตินเลือดและยุงเสือเทศเมื่หลังดูคตินเลือดทันที ซึ่งศึกษาโดยวิธี 2D gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย silver staining พบว่ารูปแบบโปรตีนมีลักษณะสอดคล้องกับการศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE คือโปรตีนหลังดูคตินเลือดจะลดลงในช่วงจุดประมาณ 35-45 kDa, PI ประมาณ 4-6 และโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในต่อมน้ำลายของเสือเทศผู้จะพบในต่อมน้ำลายของเสือเทศเมียด้วย
6. จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วย Mass spectrometry (LC-MS/MS) และเทียบกับฐานข้อมูล (MASCOT) พบว่าโปรตีนบริเวณที่ลดลงของยุงเสือเทศเมื่หลังดูคตินเลือดจะเกี่ยวข้องกับการใช้พลังงาน (Energy metabolism) และพบในเพศเมียนั้นที่มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแพ้ (allergy) ส่วนโปรตีนที่พบในทั้งยุงเสือเทศผู้และเพศเมียจะเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสายโปรตีน (Protein folding, Secretion and Chaperones) และยังมีโปรตีนอื่นๆที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงเสื่อทั้งเพศผู้และเพศเมียพบว่ามีความแตกต่างของรูปร่างและขนาดของต่อมน้ำลายยุง โดยยุงเพศเมียจะมีต่อมน้ำลายที่ใหญ่กว่าต่อมน้ำลายยุงเพศผู้ ซึ่งทั้งเพศผู้และเพศเมียจะมีต่อมน้ำลายที่ประกอบด้วย 3 กลีบที่เหมือนกันคือ 2 กลีบด้านข้าง (lateral lobe) และ 1 กลีบกลาง (median lobe) แต่ในต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียนั้นส่วน lateral lobe จะแบ่งออกเป็นบริเวณ proximal lobe และ บริเวณ distal lobe ซึ่งมีรูปแบบเหมือนกับลักษณะโครงสร้างของยุงสายพันธุ์อื่นๆเช่น ยุงลาย ยุงรำคาญและยุงก้นปล่อง^(4,5,7,66) แต่อย่างไรก็ตามยังพบความหลากหลายของรูปร่างของต่อมน้ำลายยุงเสื่อด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในยุงชนิดอื่นๆเช่น ในยุง *An. darling*⁽⁸⁾ มีการศึกษาพบว่ามีกลีบ 1-6 กลีบ และยุง *Ae. aegypti*⁽⁴⁾ พบว่าในส่วนของกลีบด้านข้างส่วนปลาย (distal lobe) ในหนึ่งข้างจะแยกออกเป็น 2 ส่วนที่เหมือนกันเป็นต้น และจากการศึกษาโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้และเพศเมียจากกล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะของเซลล์ที่พบในต่อมน้ำลายยุงเพศผู้ทั้ง 3 กลีบจะมีลักษณะคล้ายกับบริเวณ proximal lobe ของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการดูดกินน้ำตาล บริเวณของ median lobe และ distal lobe ของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมียจะมีลักษณะเซลล์ที่เหมือนกันซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการดูดกินเลือดของยุงได้ โดยบริเวณ proximal lobe จะเป็นบริเวณที่แคบที่สุด และบริเวณ median lobe เป็นบริเวณที่กว้างที่สุดของต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมีย ซึ่งสอดคล้องกับยุงชนิดอื่นๆที่มีการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะโครงสร้างของต่อมน้ำลายยุง และพบว่าท่อน้ำลาย (salivary duct) ของยุงเสื่อจะเป็นเส้นประกอบด้วย cuticle ขยายไปตลอดความยาวของต่อมเช่นเดียวกับต่อมน้ำลายยุงในกลุ่ม culicines เป็นต้น

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้และเพศเมียนั้นต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้จะมีปริมาณโปรตีนต่อหนึ่งคู่ต่อมน้อยกว่าโปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศเมีย เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมาในยุง *An. dirus* B⁽¹³⁾ พบว่าต่อมน้ำลายยุงเพศผู้มีปริมาณโปรตีนต่อหนึ่งคู่ต่อมน้อยกว่าเพศเมียประมาณ 10 เท่าและในยุง *Ae. togoi*⁽¹¹⁾ ปริมาณโปรตีนต่อหนึ่งคู่ต่อมของเพศผู้น้อยกว่าเพศเมียประมาณ 6 เท่าเช่นเดียวกับ *Ar. subalbatus*⁽¹²⁾ ปริมาณโปรตีนต่อหนึ่งคู่ต่อมของเพศผู้น้อยกว่าเพศเมียประมาณ 9 เท่า ดังนั้นปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากต่อมน้ำลายยุงอาจจะขึ้นอยู่กับชนิดของยุง เพศของยุง และขนาดของต่อมน้ำลายยุงได้

การศึกษารูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงเสื่อเพศผู้และเพศเมีย จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (1D) และ 2D gel electrophoresis และย้อมด้วย silver staining พบว่ารูปแบบโปรตีนจากการศึกษาของทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน และมีความน่าเชื่อถือเนื่องจาก การวิเคราะห์ด้วยวิธี 2D gel electrophoresis เป็นวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ดีที่สุดในการแยกโปรตีนทั้งหมด ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า รูปแบบโปรตีนของยุงเพศผู้และเพศเมียมีรูปแบบโปรตีนที่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา^(13, 63) ในการศึกษานี้พบแถบโปรตีนที่มี

น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa ซึ่งพบเฉพาะที่ต่อมน้ำลายของเพศเมียเท่านั้นเช่นเดียวกับยุงแม่ไก่ (*Ar. subalbatus*)⁽¹²⁾ ซึ่งพบแถบโปรตีนที่บริเวณ distal lobe ของยุงเพศเมียเท่านั้น อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนนี้อาจมีส่วนในการดูดกินเลือดและอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการแพ้เนื่องจากถูกยุงกัด มีการศึกษาโปรตีนที่จำเพาะกับยุง *Cx. quinquefasciatus* เพศเมียพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35.7 และ 28.3 kDa ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดูดกินเลือดของยุง⁽⁶⁷⁾ ซึ่งโปรตีนในช่วงดังกล่าวพบได้ในต่อมน้ำลายของยุงเพศเมียเท่านั้นเช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้พบอีกว่าโปรตีนหลังดูดกินเลือดมีแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 kDa ลดลงในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และเริ่มเพิ่มขึ้นเท่ากับก่อนดูดกินเลือดที่เวลา 60 ชั่วโมง เป็นไปได้ว่าโปรตีนอาจถูกใช้ไปในเวลาที่ดูดกินเลือดซึ่งยุงจะจับโปรตีนที่อยู่ในน้ำลายเข้าสู่โฮสต์ ดังนั้นการดูดกินเลือดของยุงทำให้เกิดการใช้โปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ต่อมน้ำลายและการสูญเสียโปรตีนจากการดูดกินเลือดของยุงและนำมาซึ่งการสังเคราะห์โปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป การศึกษาครั้งนี้พบแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 kDa เปลี่ยนแปลงโดยที่โปรตีนดังกล่าวน่าจะเป็นโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์จากยีน D7⁽⁶⁸⁾ ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นในยุงเพศเมียบริเวณ median lobe และบริเวณ distal lobe พบเฉพาะในต่อมน้ำลายของเพศเมียเท่านั้นและมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการดูดกินเลือด มีการศึกษาในยุง *An. gambiae* พบโปรตีนในต่อมน้ำลายที่ขนาดประมาณ 100 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะกับต่อมน้ำลายของเพศเมียและเกี่ยวข้องกับการบวนการดูดกินเลือดซึ่งในยุงเพศเมียพบโปรตีนนี้เช่นกัน และพบเฉพาะในต่อมน้ำลายของยุงเพศเมียเท่านั้น และโปรตีนขนาดประมาณ 61 และ 83 kDa ที่ปรากฏชัดเจนขึ้นหลังจากดูดกินเลือดที่เวลา 24 ชั่วโมงอาจเกี่ยวข้องกับการดูดกินน้ำตาลได้โดยเฉพาะโปรตีนที่ขนาดประมาณ 83 kDa ที่พบชัดเจนในต่อมน้ำลายของเพศผู้ มีการศึกษาโปรตีน α -glucosidase และ Apyrase ในต่อมน้ำลายของ *Ae. albopictus*⁽⁴⁸⁾ พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้จะพบในระดับต่ำเมื่อยุงเจริญเป็นตัวเต็มวัยใหม่ๆและจะค่อยๆเพิ่มขึ้นตามอายุของยุงซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอาจจะเกี่ยวข้องกับอายุของยุง ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาต่อโดยเปรียบเทียบโปรตีนจากต่อมน้ำลายของยุงตามอายุของยุง

การวิเคราะห์โดย LC-MS/MS ได้โปรตีนทั้งหมด 16 โปรตีนซึ่งมีทั้งที่ทราบหน้าที่และไม่ทราบหน้าที่ โดยโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนที่ลดลงจะอยู่ในช่วงจุดประมาณ 35-45 kDa, PI ประมาณ 4-6 นั้นเป็นไปได้ที่จะเป็นโปรตีน ATP-dependent RNA helicase vasa, hypothetical protein AaeL_AAEL012905, conserved hypothetical protein และ AGAP011852-PA เป็นต้น โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายของชนิดอื่นๆซึ่งมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ มีการวิเคราะห์ LC-MS/MS โดยทำการเปรียบเทียบระหว่าง In-solution digestion และ In-gel digestion จากต่อมน้ำลายของ *An. gambiae*⁽⁶⁹⁾ พบว่าการทำแบบ In-solution digestion ให้ผลที่ดีกว่า In-gel digestion เนื่องจาก In-solution digestion ไม่ต้องทำการย่อยเจลก่อน แต่สำหรับการทำ electrophoresis จะต้องย่อยเจลก่อนจึงอาจทำให้ตัวอย่างสูญเสียได้ ซึ่งโปรตีนที่พบจะเกี่ยวข้องกับ

D7-related proteins, pheromone/odorant-binding domain (OBP) หรือ lacked any conserved domains/motifs ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการดูดกินเลือดของยุง ในการดูดกินเลือดของยุงนั้น ยุงจะมีตัวรับสัญญาณเช่น ตัวรับสัญญาณเคมี ตัวรับสัญญาณภาพและตัวรับสัญญาณความร้อนเพื่อ ดูดกินเลือดจากโฮสต์เช่น ยุงสามารถรับรู้ก๊าซคาร์บอน ไดออกไซด์และกรดแลคติกได้ไกลถึง 100 ฟุต ดังนั้นคนที่หายใจแรงหรือคนที่เหงื่อออกง่ายจะถูกยุงกัดได้บ่อยกว่า เป็นต้น ต่อมาได้มีการศึกษาโปรตีนโอมิกส์จากต่อมน้ำลายยุง *Ae. aegypti*⁽⁷⁰⁾ พบโปรตีนที่น่าสนใจคือโปรตีน malate dehydrogenase, ADP,ATP carrier protein, D7protein family และ certain salivary allergens จากการศึกษาโปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงก่อนหน้านี้ โปรตีนส่วนใหญ่ที่พบจะเกี่ยวข้องกับ cytoskeleton maintenance, transporter function หรือ nuclear regulation และ secreted proteins เป็นต้น

5.3 ข้อเสนอแนะ

มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับต่อมน้ำลายของยุงหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการดูดกินเลือด แต่สำหรับยุงเสื่อ (*M. uniformis*) นั้นยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนจากต่อมน้ำลาย ดังนั้นการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงเสื่อนี้ ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญและมีผลต่อการพิจารณาคือ จำนวนของต่อมน้ำลายในแต่ละ lane ของรูปแบบโปรตีนถ้าหากบาง lane มีจำนวนต่อมน้ำลายมาก หรือน้อยกว่ากันก็จะส่งผลในการพิจารณาเปรียบเทียบผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงควรระมัดระวังและควบคุมขั้นตอนในการ dissect ให้มีจำนวนต่อมน้ำลายเท่ากัน

ควรจะตัดแถบแบนที่ขนาดประมาณ 37 kDa ที่มีรูปแบบที่ลดลงหลังจากดูดกินเลือดโดยวิธี SDS-PAGE ไปทำ LC-MS/MS เพื่อให้รู้ว่าแถบแบนนั้นคือโปรตีนชนิดอะไรมีผลต่อการดูดกินเลือดจริงหรือไม่ และควร dissect ต่อมน้ำลายยุงตามช่วงอายุของยุงเพื่อดูว่าโปรตีนที่ขนาดประมาณ 61 และ 83 kDa ว่าเพิ่มขึ้นหลังดูดกินเลือด หรือเพิ่มขึ้นตามอายุของยุง

ข้อมูลดังกล่าวที่ได้จากการศึกษาค้างนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงเสื่อในระดับโมเลกุลของโปรตีนที่สนใจ ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นถึงกลไกในการป้องกันการแข็งตัวของเลือดในยุงเสื่อเพศเมียขณะดูดกินเลือด และอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ที่เกิดจากยุงกัดหรือนำไปใช้ในการอธิบายกลไกที่เกี่ยวข้องในการบุกรุกของพาราไซต์ ตลอดจนอาจเป็นแนวทางในการศึกษาป้องกันการถ่ายทอดเชื้อพาราไซต์ผ่านทางยุงพาหะ และ สามารถทำการศึกษาต่อในด้านของจีโนมิกส์โดยทำห้องสมุด DNA (cDNA library construction) ของต่อมน้ำลายยุงเสื่อได้ต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

- (1) Diaz, J.H. Global climate changes, natural disasters, and travel health risks. J Travel Med. 13 (November-December 2006): 361-372.
- (2) Paz, S., and Albersheim, I. Influence of warming tendency on *Culex pipiens* population abundance and on the probability of West Nile fever outbreaks (Israeli Case Study: 2001-2005). Ecohealth. 5 (March 2008): 40-48.
- (3) Brower, V. Vector-borne diseases and global warming: are both on an upward swing? Scientists are still debating whether global warming will lead to a further spread of mosquitoes and the diseases they transmit. EMBO Rep. 2 (September 2001): 755-757.
- (4) Janzen, H.G., and Wright, K.A. The salivary glands of *Aedes aegypti* (L.): an electron microscope study. Can J Zool. 49 (October 1971): 1343-1346.
- (5) Wright, K. A. The anatomy of salivary glands of *Anopheles stephensi* Liston. Canad.J. Zool. 47 (1969): 579-587.
- (6) Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., and Ribeiro, J.M. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. J Exp Biol. 205 (August 2002): 2429-2451.
- (7) Moreira, C.K., Marrelli, M.T., Lima, S.P., and Marinotti, O. Analysis of salivary gland proteins of the mosquito *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 38 (September 2001): 763-767.
- (8) Moreira, C.K., and Bijovsky, A.T. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. J. Tissue and Cell. 31 (June 1999): 264-273
- (9) Barrow, P.M., Mcciver, S.B., and Wright, K.A. Salivary glands of female *Culex pipiens*: morphological changes associated with maturation and blood feeding. Canad. J. Zool. 107 (1975): 1153-1160.
- (10) da Cunha Sais, T., and others. Morphological aspects of *Culex quinquefasciatus* salivary glands. Arthropod Struct Dev. 32 (October 2003): 219-226.
- (11) Jariyapan, N., and Harnnoi, T. Preliminary study of salivary gland proteins of the mosquito *Aedes togoi* (Theobald). Chiang Mai Med. Bull. 41 (2002): 21-28.
- (12) Siriyasatien, P., and others. Analysis of salivary gland proteins of the mosquito *Armigeres-subalbatus*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 36 (January 2005): 64-67.

- (13) Jariyapan, N., and others. Salivary gland proteins of the human malaria vector, *Anopheles-dirus* B (Diptera: Culicidae). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 49 (January-February 2007): 5-10.
- (14) Rodriguez, M.H., and Hernandez-Hernandez Fde, L. Insect-malaria parasites interactions: the salivary gland. Insect Biochem Mol Biol. 34 (July 2004): 615-624.
- (15) James, A.A. Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands. J Exp Biol. 206 (November 2003): 3817-3821.
- (16) สรรวษ สุวัฒน์ทัฬพะ. โรคเท้าช้าง. วารสารมาลาเรีย. 28 (2536): 3-12.
- (17) สุภัทร สุจริต และ ประมวลมัลย์ สุจริต. ยุงแมนโซเนีย Mansonia และ Coquillettia. ใน กัญวิทยาทางการแพทย์, หน้า 264-266. พิษณุการพิมพ์: กรุงเทพมหานคร, 2531.
- (18) จักรวาล ชมภูศรี. ยุงแมนโซเนียพาหะโรคเท้าช้าง. ใน อุษาวดี ถาวรระ (บรรณาธิการ), ชีววิทยานิเวศวิทยาและการควบคุมยุงในประเทศไทย, หน้า 91-99. ดีไซน์ จำกัด: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี, 2548.
- (19) Gass, R.F., Deesin, T., Surathin, K., Vutikes, S., and Sucharit, S. Observations on the feeding habits of four species of *Mansonia* (Mansonioides) mosquitoes in Southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 13 (January 1982): 211-215.
- (20) Ruth, L.M., Nélia, T.F., and Neusa, H. *Mansonia spp.* (Diptera: Culicidae) associated with two species of macrophytes in a Varzea lake, Amazonas, Brazil. Entomotropica. 18 (April 2003): 21-25.
- (21) กองโรคเท้าช้าง. สรุปผลการปฏิบัติงานกัญวิทยาโรคเท้าช้าง ปีงบประมาณ 2541. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข (2541).
- (22) Bhumiratana, A., and others. Field trial of the ICT filariasis for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infections in an endemic population of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 30 (September 1999): 562-568.
- (23) Tritteraprapab, S., Nuchprayoon, I., Porksakorn, C., Poovorawan, Y., and Scott, A.L. High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants in Thailand. Ann Trop Med Parasitol. 95 (July 2001): 535-538.
- (24) กองโรคเท้าช้าง. รายงานประจำปี 2545. สำนักโรคติดต่อหน้าโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข (2545).
- (25) Joy, D.A., and others. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. Science. 300 (April 2003): 318-321.

- (26) Eliason, D.A. Feeding Adult Mosquitoes on Solid Sugars. Nature. 19 (October 1963): 200-289.
- (27) James, A.A., Blackmer, K., and Racioppi, J.V. A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. Gene. 75 (January 1989): 73-83.
- (28) Foster, W.A. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. Annu Rev Entomol. 40 (1995): 443-474.
- (29) Nayar, J.K., and Sauerman, D.M. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes. Part 1. Utilization of sugar for survival. J Med Entomol. 12(April 1975): 92-98.
- (30) Clements, A.N. The biology of mosquitoes. Vol I: Development, nutrition and reproduction. London: Chapman & Hall, 1992.
- (31) Ribeiro, J.M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? Infect Agents Dis. 4 (September 1995): 143-152.
- (32) Law, J.H., Ribeiro, J.M., and Wells, M.A. Biochemical insights derived from insect diversity. Annu Rev Biochem. 61 (1992): 87-111.
- (33) Rossignol, P.A., Ribeiro, J.M.C., and Spielman, A. Increase intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 33 (1984): 17-20.
- (34) Oka, K. Correlation of *Aedes albopictus* bite reaction with IgE antibody assay and lymphocyte transformation test to mosquito salivary antigens. J Dermatol. 16 (October 1989): 341-7.
- (35) Peng, Z., Li, H., and Simons, F.E. Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. J Allergy Clin Immunol. 101 (April 1998): 498-505.
- (36) Rabu. *Mansonia uniformis*. [Online]. 2008. Available from:
<http://bahangdkk.blogspot.com/2008/02/fenomena-gunung-es-pada-populasi-lalat.html>
[2009, December]
- (37) Cameron, E. W., and Stephen, L. D. The department of medical entomology. [Online]. 2010. Available from:
http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/mosquitphotos_coquillettidia_mansonia.html [2009, December]

- (38)Cameron, E. W., and Stephen, L. D. The department of medical entomology. [Online]. 2010.
Available from:
http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/coquillettidia_linealis_larvae.html
[2009, December]
- (39)Cameron, E. W., and Stephen, L. D. The department of medical entomology. [Online]. 2010.
Available from:
http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/mansonia_uniformis_pupa.html
[2009, December]
- (40)Nemanja, I. BCCB Final Exam Answers. [Online]. 2007. Available from:
<http://teamwork.jacobs-university.de:8080/confluence/display/~nivanovski/BCCB+Final+Exam+Answers> [2009, December]
- (41)VICC. Vanderbilt-Ingram Cancer Center. [Online]. 2009. Available from:
<http://www.vicc.org/jimayersinstitute/technologies/> [2009, December]
- (42)Jim, C. Understanding Chemistry. [Online]. 2000. Available from:
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspecmenu.html> [2010, January]
- (43)Ravi Dhart, N.K. Role of mosquito salivary glands. Current Science 85 (November 2003): 1308-1313.
- (44)Racioppi, J.V., and Spielman, A. Secretory proteins from the salivary glands of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. Insect Biochem. 17 (1987): 503-511.
- (45)Grossman, G.L., and James, A.A. The salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, express a novel member of the amylase gene family. Insect Mol Biol. 1(1993): 223-232.
- (46)Siriya-satien, P., and others. Decrease of mosquito salivary gland proteins after a blood meal: an implication for pathogenesis of mosquito bite allergy. J Med Assoc Thai. 88 (September 2005): 255-259.
- (47)Ribeiro, J.M., Sarkis, J.J., Rossignol, P.A., and Spielman, A. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. Comp Biochem Physiol B. 79(1984): 81-86.
- (48)Marinotti, O., de Brito, M., and Moreira, C.K. Apyrase and alpha-glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 113 (April 1996): 675-679.

- (49)Valenzuela, J.G., Chuffe, O.M., and Ribeiro, J.M.C. Apyrase and anti-platelet activities from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. Insect Biochem Mol Bio. 21 (1996): 557–562.
- (50)Cupp, M.S., Cupp, E.W., Ochoa-A, J.O., and Moulton, J.K. Salivary apyrase in New World blackflies (Diptera: Simuliidae) and its relationship to onchocerciasis vector status. Med Vet Entomol. 9 (1995): 325–330.
- (51)Ribeiro, J.M.C., Endris, T.M., and Endris, R. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. Comp Biochem Physiol A. 100 (1991): 109–112.
- (52)Mans, B.J., Gaspar, A.R., Louw, A.I., and Neitz, A.W.H. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). Exp Appl Acarol. 22 (1998): 353–366.
- (53)Ribeiro, J.M.C., Vaughan, J.A., and Azad, A.F. Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. Comp Biochem Physiol B. 95 (1990): 215–219.
- (54)Perez de Leon, A.A., and Tabachnick, W.J. Apyrase activity and adenosine diphosphate induced platelet aggregation inhibition by the salivary gland proteins of *Culicoides variipennis*, the North American vector of bluetongue virus. Vet Parasitol. 61 (1996): 327–338.
- (55)Wekesa, J.W., Copeland, R.S., and Mwangi, R.W. Effect of *Plasmodium falciparum* on blood feeding behavior of naturally infected *Anopheles* mosquitoes in western Kenya. Am J Trop Med Hyg. 47 (October 1992): 484-488.
- (56)Champagne, D.E., Smartt, C.T., Ribeiro, J.M., and James, A.A. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. Proc Natl Acad Sci U S A. 92 (January 1995): 694-698.
- (57)Arca, B., and others. A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol. 11 (February 2002): 47-55.
- (58)Rossignol, P.A., Ribeiro, J.M., and Spielman, A. Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 33(January 1984): 17-20.
- (59)Roditi, I., and Liniger, M. Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. Trends Microbiol. 10 (March 2002): 128-134.

- (60)Argentine, J.A., and James, A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 25 (May 1995): 621-630.
- (61)Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M., and Ribeiro, J.M. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. Biochemistry. 38 (1999): 11209–11215.
- (62)Andrade, B.B., Teixeira, C.R., Barral, A., and Barral-Netto, M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. An Acad Bras Cienc. 77 (December 2005): 665-693.
- (63)Poehling, H.M. Distribution of specific proteins in the salivary gland lobes of culicidae and their relation to age and blood sucking. J Insect Physiol. 25 (1979): 3-8.
- (64)Brennan, J.D.G., Kent, M., Dhar, R., Fujioka, H., and Kumar, N. *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. Proc Natl Acad Sci. 97 (2000): 13859-13864.
- (65)Strome, C.P.A., DeSantis, P.L., Leef, J.L., and Beaudoin, R.L. A convenient technique for the dissection of mosquito salivary glands. Methods in Cell Science. 6 (1980): 9-11.
- (66)Ribeiro, J.M.C., Rossignol, P.A., and Spielman, A. Role of mosquito saliva in blood vessel location. J Experimental Biology. 108 (1984): 1–7.
- (67)Nascimento, E.P., dos Santos Malafrente, R., and Marinotti, O. Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Arch Insect Biochem Physiol. 38 (2000): 763-767.
- (68)James, A.A., Blackmer, K., Marinotti, O., Ghosn, C.R., and Racioppi, J.V. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. Mol Biochem Parasitol. 44 (February 1991): 245-253.
- (69)Drio, E., and others. A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. Proteomics. 5 (2005): 3765–3777.
- (70)Almeras, L., and others. Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. Vector Borne Zoonot Dis. Epub ahead of print; DOI: 10.1089=vbz.2009.0042 (2009).



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการเตรียมสาร

1. 1X Phosphate-Buffered saline (PBS) ปริมาตร 1000 ml

NaCl	8.0	g
KCl	0.2	g
KH ₂ PO ₄	0.24	g
Na ₂ HPO ₄	1.44	g
ddH ₂ O	400-500ml	

ปรับ pH 7.4 ด้วย conc. HCl แล้วเติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 1000 ml

2. 30% Acrylamide mix 100 ml (30.8%T , 2.7%C bis solution)

40% Acrylamide	75	ml
Bis acrylamide	0.8	g ละลาย ddH ₂ O ปริมาตร 25 ml

3. 1.5 M Tris (pH 8.8)

Tris base	181.71	g
ddH ₂ O	400-500ml	

ปรับ pH 8.8 ด้วย conc. HCl แล้วเติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 1000 ml

4. 1 M Tris (pH 6.8)

Tris base	121.14	g
ddH ₂ O	300	ml

ปรับ pH 6.8 ด้วย conc. HCl แล้วเติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 1000 ml

5. 10% SDS

SDS	10	g
-----	----	---

เติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 100 ml

6. 10% APS (Amonium per sulphate)

APS	0.1	g
-----	-----	---

เติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 1 ml

7. SDS-PAGE gel running buffer (10X buffer)

Tris base	29	g
Glycine	145	g
SDS	10	g
ddH ₂ O	600	ml

ปรับ pH 8.3 ด้วย conc. HCl แล้วเติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 1000 ml

8. Reducing sample buffer (4X RSB)

0.0625M Tris-HCl pH 6.8	8%	(w/v)
SDS 40% (v/v) glycerol & 0.005% Bromophenol blue		
SDS	0.8	g
Glycerol	4.0	ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	5.0	ml
Bromophenol blue	0.5	ml
2-mercaptoethanal (2-ME)	1.0	ml

9. 70% Ethanol 100 ml

100% Ethanol	70	ml
ddH ₂ O	30	ml

10. Rehydration buffer

Urea	13.5	g
CHAPS	1	g
Bromophenol blue	50	μl

เติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 25 ml

11. SDS Equilibration buffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.8	50	ml
Urea	360.35	g
Glycerol	345	ml
SDS	20	g
Bromophenol blue	400	μl

เติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 1000 ml

12. Agarose sealing mixture

1xTAE buffer	50	ml
Agarose	0.5	g
1%Bromophenol Blue	100	μl

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอัจฉรา ภูมิ
วัน/เดือน/ปี เกิด	วันอาทิตย์ที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529
ที่อยู่ปัจจุบัน	145 หมู่ 8 ต.มะนาวหวาน อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี 15140
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะสหเวชศาสตร์ สาขาเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จ.กรุงเทพมหานคร
E-mail address	am_ajc@hotmail.com



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย