



การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของโปรตีน Glutathione S-Transferase จากพยาธิใบไม้เลือด

*Schistosoma mekongi*

โดย

นางสาววรรณวิษา เป็นสมุท



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของโปรตีน Glutathione S-Transferase จากพยาธิ  
ใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE  
FROM *SCHISTOSOMA MEKONGI*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for Master of Science (Animal Science)  
Graduate School, Silpakorn University  
Academic Year 2019  
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของโปรตีน Glutathione S-  
Transferase จากพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*  
โดย วรรณวิษา เป็นสมุท  
สาขาวิชา สัตวศาสตร์ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท  
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิชญ์ภักดี

---

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรพรรณ แสนภูมิ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นรินทร์ ปรียวิชญ์ภักดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จรรยาโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไกร มีมล )

60751201 : สัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*, กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอร์ส (GST), อิชิคูไฮบริไดเซชัน (ISH)

นางสาว วรรณวิษา เป็นสมุทรร: การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของโปรตีน Glutathione S-Transferase จากพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นรินทร์ ปริยวิชญากิติ

พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* (*S. mekongi*) เป็นหนึ่งในห้าสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพยาธิใบไม้เลือด Schistosomiasis ในมนุษย์ และมีการระบาดในลุ่มแม่น้ำโขงในทางตอนใต้ของสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวและทางตอนเหนือของกัมพูชา แม้ว่าในประเทศไทยไม่มีรายงานของผู้ป่วยแต่ในเขตแม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี เป็นแหล่งอาศัยของหอยซึ่งเป็นโฮสต์กลางในการติดต่อของโรคนี้ ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบการติดเชื้อในหอยแต่ก็มีโอกาสที่จะได้รับการติดเชื้อพยาธิ ดังนั้นมาตรการควบคุมโรคนี้จึงมีความจำเป็น Praziquantel เป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโรคพยาธิใบไม้เลือด Schistosomiasis แต่ยังคงมีปัญหาการติดเชื้อซ้ำจากการรักษา และมีรายงานของการดื้อยาเกิดขึ้น ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนโดยเลือกจากแอนติเจนที่มีศักยภาพ ซึ่งเป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของพยาธิ จึงเป็นหนึ่งในวิธีการที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคนี้ กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอร์ส (GST) เป็นหนึ่งในแอนติเจนที่มีความสำคัญการกำจัดสารพิษในพยาธิ การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษา GST จาก *S. mekongi* (SmekGST) โดยทำการโคลนนิ่ง สร้างเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน ศึกษาการกระจายตัวและคุณสมบัติของกิจกรรมแอนติเจน

กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอร์ส ตัวที่ 1 (SmekGST1 789 base pair) และ กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอร์ส ตัวที่ 2 (SmekGST2 654 base pair) ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ได้ถูกโคลนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จาก complementary DNA (cDNA) ที่ได้จากพยาธิในระยะตัวเต็มวัย ลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีขนาด 218 กรดอะมิโน และ 211 กรดอะมิโนตามลำดับ โดยมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน และ 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ กรดอะมิโนในตำแหน่ง G-site ระหว่างSmekGST1 และ SmekGST2 พบว่ามีความแตกต่างกัน สำหรับการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA-X พบว่าโมเลกุล SmekGST1 และ SmekGST2 มีความคล้ายกับ GST ในกลุ่ม GST 26 กิโลดาลตัน และ 28 กิโลดาลตันของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. ตามลำดับ โดยโปรตีนทั้งสองจัดอยู่ในกลุ่มของ mu สำหรับการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ได้ทำการศึกษาดูด้วยเทคนิค *In Situ Hybridization* (ISH) พบว่า mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ปรากฏในพาเรงคิมา และชั้น tegument

โดยพบว่าเนื้อเยื่อของพยาธิในระยะ 3 สัปดาห์ มีการแสดงของยีน GST มากที่สุด และค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ rSmekGST1 และ rSmekGST2 มีค่าเท่ากับ  $71.03 \pm 2.24$  ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน และ  $118.77 \pm 1.30$  ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปว่า SmekGST1 และ SmekGST2 อยู่ในกลุ่มของ mu ซึ่งมีความคล้ายกับ GST ในกลุ่ม GST 26 กิโลดาลตัน และ 28 กิโลดาลตันของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. ตามลำดับ mRNA ของทั้งสองยีนมีการแสดงออกเหมือนกันที่พาเรงคิมา และชั้น tegument ของพยาธิระยะตัวอ่อน และตัวเต็มวัย สำหรับ rSmekGST1 และ rSmekGST2 มีความสามารถทางชีวเคมีที่สามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับสารตั้งต้น 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ได้



60751201 : Major (Animal Science)

Keyword : *Schistosoma mekongi*, Glutathione S-Transferase (GST), In Situ Hybridization (ISH)

MISS WANWISA PEONSAMUT : IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE FROM *SCHISTOSOMA MEKONGI* THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR NARIN PREYAVICHYAPUGDEE, Ph.D.

*Schistosoma mekongi* is one of five major causative agents of human schistosomiasis and is endemic to communities along the Mekong River in southern Lao People's Democratic Republic (Laos) and northern Cambodia. Eventhough, there is no infected case report of this disease in Thailand. But Mool river in Ubonrachathanee, is a habitat of non-infected snails intermediate host in, which are prompt to be infected. So, the control measures against this disease is in need. Praziquantel is an effective drug for the treatment of schistosomiasis but reinfection and the drug resistance of the parasite have become a problem. Development of vaccine from candidate antigens which essential for survival of the parasite should be one of the strategies to control the disease. Glutathione S-Transferase (GST) is one of an essential enzyme in parasite for the detoxification of xenobiotics. This study, GST from *S. mekongi* were cloned, expression, localization and characterization their enzyme activity.

GST1 from *S. mekongi* (SmekGST1, 789 bp) and GST2 from *S. mekongi* (SmekGST2, 654 bp) were cloned by polymerase chain reaction (PCR) from complementary DNA (cDNA) from an adult fluke. Their putative peptides composed of 218 and 211 amino acids, with a molecular weight of 27 and 28 kDa, respectively. The amino acid sequences in G-site motif of SmekGST1 and SmekGST2 were difference from each other. Phylogenetic analysis through the Bio Edit program (NEIGHBOR-Joining with 1,000 replicates) showed that SmekGST1 and SmekGST2 were in cluster with the 26 and 28 kDa sized, mu class GSTs. The localization of SmekGST1 and SmekGST2 in each stage of of *S. mekongi* were performed in parasite sections by *In Situ* Hybridization technique. The mRNA of SmekGST1 and SmekGST2 were present in parenchyma and tegument in juvenile and adult stage of

the parasite, with the most intense of positive signal in 3-weeks old juvenile. The specific activity of rSmekGST1 and SmekGST2 were  $71.03 \pm 2.24 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein and  $118.77 \pm 1.30 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein respectively.

Results from this study demonstrated that SmekGST1 and SmekGST2 were in mu class of GSTs family. The mRNA of both genes was present in parenchyma and tegumental cell of juvenile and adult stage. The rSmekGST1 and rSmekGST2 have biochemically function which can catalyze at least one reaction with universal CDNB substrate.





## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นรินทร์ ปรียวิษณุภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รองศาสตราจารย์ ดร. จรุงโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการ คำแนะนำ ในระหว่างการดำเนินการทดลอง ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนการตรวจสอบและแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และบุคลากรทุกท่านในคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ประสบการณ์ต่างๆที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย รวมทั้งช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้สารเคมี และอุปกรณ์การวิจัยต่างๆ ตลอดระยะเวลาการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ นางสาวมะนาว แสงเฟื่อง นักศึกษาระดับปริญญาเอก คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการดำเนินงานทดลอง และคอยให้คำปรึกษา แนะนำในการดำเนินงานทดลอง

ขอขอบคุณ นางสาวนิตา สันติมานะวงศ์ และพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนในห้อง K458 หน่วยวิจัย เพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) มหาวิทยาลัยมหิดล ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และช่วยอำนวยความสะดวกตลอดการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยให้ความสนับสนุนในด้านต่างๆ และคอยให้กำลังใจมาโดยตลอด จนสามารถดำเนินงานทดลองและทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

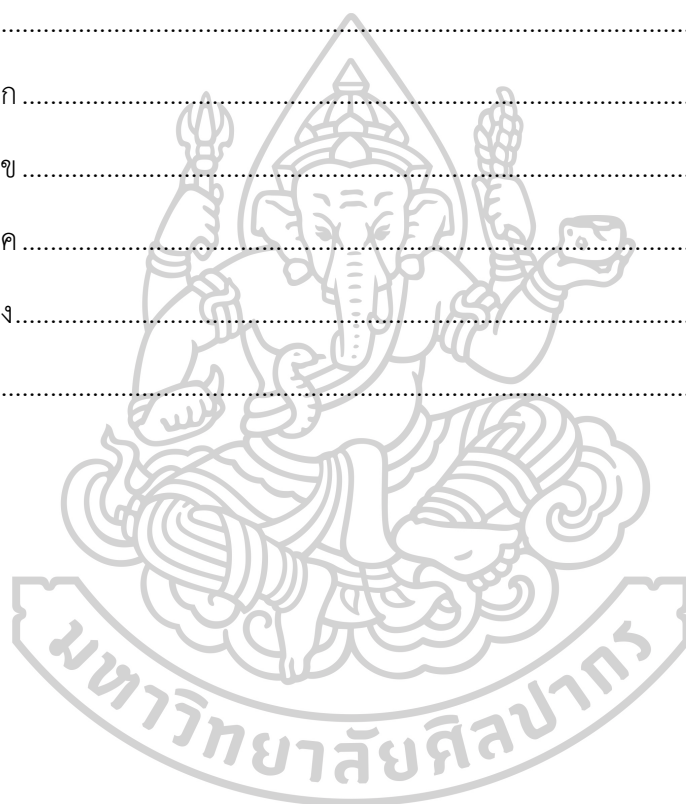
วรรณวิษา เป็นสมุทรา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
3. สมมติฐานของการศึกษา .....	3
4. ขอบเขตของการศึกษา .....	3
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	4
1. โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis).....	4
2. พยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma mekongi</i> .....	9
3. กลูตาไธโอน เอส ทรานสเฟอเรส (Glutathione S-Transferase).....	10
4. การประยุกต์ใช้โปรตีนกลูตาไธโอน เอส ทรานสเฟอเรส ในการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาและ การเป็นวัคซีน .....	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	15
1. อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	15
2. วิธีการทดลอง.....	16
2.1 เนื้อเยื่อและ cDNA ของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> .....	16

2.2 การออกแบบ Primer สำหรับโคลนยีนกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส .....	16
2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (DNA; Deoxyribonucleic Acid) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	17
2.4 การโคลนยีนกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส .....	17
2.5 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ .....	20
2.6 การออกแบบ Primer สำหรับผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส (Recombinant Glutathione S-Transferase; rGST) .....	20
2.7 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส 26 กิโลดาลตัน และ 28 กิโลดาลตัน (rSmekGST1 และ rSmekGST2) .....	20
2.8 การศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์ของโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส .....	22
2.9 วิธีการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (mRNA) ของกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส บนเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ด้วยเทคนิค <i>In Situ Hybridization</i> .....	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	25
1. ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST .....	25
2. ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ .....	39
3. ผลการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส จากพยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma mekongi</i> .....	39
4. ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ของโปรตีนกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส .....	41
5. ผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอของกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma mekongi</i> โดยวิธี <i>In Situ Hybridization</i> .....	45
5.1 พยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 3 สัปดาห์ .....	45
5.2 พยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 5 สัปดาห์ .....	45
5.3 พยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะตัวเต็มวัย .....	45
6. วิจารณ์ผลการทดลอง .....	48

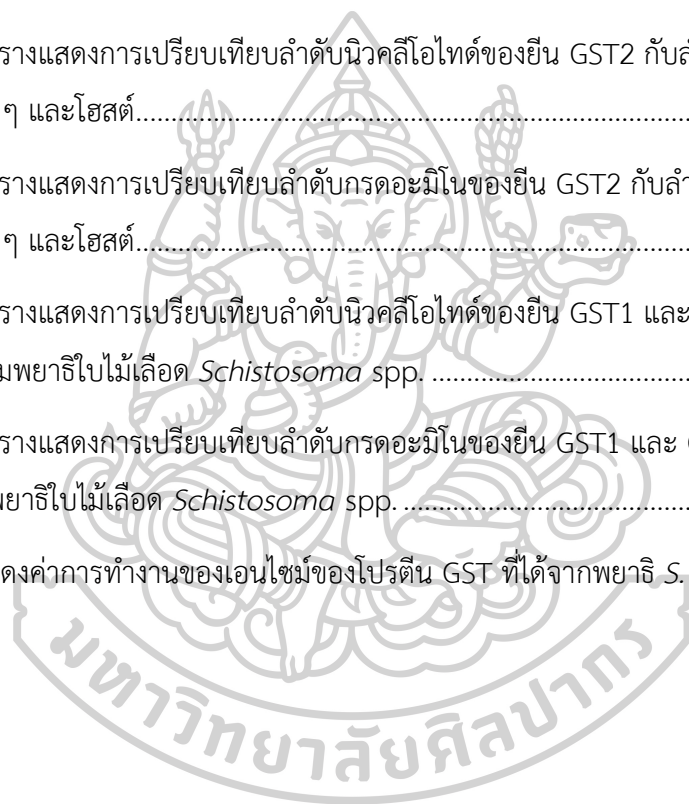
6.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน rSmekGST1 และ rSmekGST2 .	48
6.2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ rSmekGST1 และ rSmekGST2 .....	50
6.3 การศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ GST บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ด้วยเทคนิค <i>In Situ</i> Hybridization.....	50
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	52
รายการอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	62
ภาคผนวก ก.....	63
ภาคผนวก ข.....	65
ภาคผนวก ค.....	73
ภาคผนวก ง.....	83
ประวัติผู้เขียน.....	85



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GST1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิดต่างๆ และโฮสต์.....	33
ตารางที่ 2 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน GST1 กับลำดับกรดอะมิโนของพยาธิชนิดต่างๆ และโฮสต์.....	34
ตารางที่ 3 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GST2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิดต่างๆ และโฮสต์.....	35
ตารางที่ 4 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน GST2 กับลำดับกรดอะมิโนของพยาธิชนิดต่างๆ และโฮสต์.....	36
ตารางที่ 5 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GST1 และ GST2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มพยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma</i> spp. ....	37
ตารางที่ 6 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน GST1 และ GST2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มพยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma</i> spp. ....	38
ตารางที่ 7 แสดงค่าการทำงานของเอนไซม์ของโปรตีน GST ที่ได้จากพยาธิ <i>S. mekongi</i> .....	42



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma</i> spp.....	7
ภาพที่ 2 โครงสร้างของ GSH .....	11
ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekGST1 ของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงรหัสเริ่มต้น (ATG) และรหัสหยุด (TAA).....	25
ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekGST28 ของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงรหัสเริ่มต้น (ATG) และรหัสหยุด (TAA).....	26
ภาพที่ 5 โครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน SmekGST1 ประกอบด้วย $\beta$ -stands (แถบสีเหลือง), $\alpha$ -helix (แถบสีชมพู) และ turns ของ peptide backbone (แถบสีน้ำเงิน) ที่ทำนายโดยโปรแกรม I-TASSER .....	27
ภาพที่ 6 โครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน SmekGST2 ประกอบด้วย $\beta$ -stands (แถบสีเหลือง), $\alpha$ -helix (แถบสีชมพู) และ turns ของ peptide backbone (แถบสีน้ำเงิน) ที่ทำนายโดยโปรแกรม I-TASSER .....	27
ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบของลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST1 กับยีน GST ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์.....	30
ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบของลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST2 กับยีน GST ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์.....	31
ภาพที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบของลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST1, SmekGST2 และยีน GST ของพยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma</i> spp. ....	32
ภาพที่ 10 ผลการทำเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มของโปรตีน GST1 และ GST2 ของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> กับพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์ โดยโปรแกรม MEGA-X .....	40
ภาพที่ 11 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีน rSmekGST1 และ rSmekGST2 ของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ด้วยเทคนิค SDS-PAGE .....	41
ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของ rSmekGST (ซ้ำที่ 1).....	43

ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของ rSmekGST (ซ้ำที่ 2).....	44
ภาพที่ 14 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 3 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 3 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาเรงคิมา.....	46
ภาพที่ 15 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 5 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 5 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาเรงคิมา.....	47
ภาพที่ 16 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะตัวเต็มวัย ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 3 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาเรงคิมา.....	48
ภาพที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) กับค่า Log ฐาน 10 ของน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานใน 12.5% SDS-PAGE gel.....	84

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis) เป็นโรคที่เกิดจากกลุ่มของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุขในประเทศกำลังพัฒนา องค์การอนามัยโลกจึงจัดให้เป็นโรคระบาดที่สำคัญโรคหนึ่งที่มีระดับความรุนแรงเป็นอันดับ 2 รองจากโรคมาลาเรีย พบการระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือดในทวีปเขตร้อนและเขตอบอุ่น โดยมีรายงานการติดโรคพยาธิใบไม้เลือดของประชากรทั่วโลกในปี พ.ศ. 2559 ประมาณ 206.4 ล้านคน ที่ต้องได้รับการรักษา และยังมีประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการติดโรคพยาธิใบไม้เลือดที่ควรได้รับการป้องกันประมาณ 89 ล้านคน (Steinmann et al., 2006; De Moraes et al., 2012; Yu et al., 2012; WHO, 2002, 2018) โรคพยาธิใบไม้เลือดที่ก่อโรคในมนุษย์มีอยู่ด้วยกัน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma intercalatum* และ *Schistosoma guineensis* โดย *S. mansoni* และ *S. haematobium* พบในแถบทวีปแอฟริกาและตะวันออกกลาง สำหรับทวีปอเมริกาพบเฉพาะ *S. mansoni* ส่วน *S. japonicum* พบในแถบทวีปเอเชียเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในประเทศจีน ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย *S. mekongi* พบบริเวณชายแดนระหว่างสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และราชอาณาจักรกัมพูชาที่อยู่ใกล้เขตลุ่มน้ำโขง สำหรับ *S. intercalatum* และ *S. guineensis* พบทางตะวันตกและทางตอนกลางของทวีปแอฟริกา (Colley et al., 2014; Vonghachack et al., 2017)

พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เป็นพยาธิที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์ สุนัข และสุกร (Urbani et al., 2002; Ohmae et al., 2004; Sinuon et al., 2007) เป็นโรคที่มีการระบาดบริเวณชายแดนระหว่างสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และราชอาณาจักรกัมพูชาใกล้ลุ่มน้ำโขง (Matsumoto et al., 2002; Urbani et al., 2002; Ohmae et al., 2004; Hirose et al., 2007; Sinuon et al., 2007; Attwood et al., 2008; Fukuhara et al., 2011; Vonghachack et al., 2017; Thiangtrongjit et al., 2018) โดยมีหอย *Neotricula aperta* (*N. aperta*) เป็นโฮสต์กลางในการติดต่อสู่มนุษย์และสัตว์ ซึ่งหอย *N. aperta* จะมีอยู่ด้วยกัน 3 สายพันธุ์ คือ แอลฟา (alpha), เบต้า (beta) และแกมมา (gamma) ทั้งนี้มีการค้นพบหอย *N. aperta* สายพันธุ์แอลฟา และสายพันธุ์แกมมาบริเวณลุ่มแม่น้ำโขง ส่วนสายพันธุ์เบต้าสามารถพบได้บริเวณลุ่มแม่น้ำมูล (Ohmae et al., 2004; Sinuon et al., 2007; Vonghachack et al., 2017) แม้ว่าปัจจุบันยังไม่เกิดการระบาด



ในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังอยู่ในความเสี่ยงต่อการเกิดการระบาดของโรค Schistosomiasis โดย พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในอนาคตได้

ปัจจัยความเสี่ยงต่อโอกาสที่อาจจะเกิดการระบาดของโรคพยาธิใบไม้ในเลือดในประเทศไทย ในอนาคตได้แก่ ประเทศไทยมีหอย *N. aperta* สายพันธุ์เบต้า ที่บริเวณลุ่มแม่น้ำมูลซึ่งแม้ปัจจุบันไม่พบรายงานการติดเชื้อของ *S. mekongi* ในหอยชนิดนี้ แต่เป็นหอยชนิดที่มีศักยภาพในการติดเชื้อ ระยะเชอร์คาเรียจาก *S. mekongi* แม้ปัจจุบันประเทศไทยไม่มีรายงานผู้ติดเชื้อ แต่ปัจจุบันการเคลื่อนย้ายของประชากรแรงงานต่างชาติ รวมไปถึงการเข้ามาในประเทศไทยของนักท่องเที่ยวมีมากขึ้น ก็อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้หอย *N. aperta* สายพันธุ์เบต้า ที่แม่น้ำมูลเกิดการติดเชื้อได้ ถ้านักท่องเที่ยวหรือแรงงานดังกล่าวมีการติดเชื้อและอาจมีการถ่ายอุจจาระที่ปนเปื้อนไข่พยาธิลงในแหล่งน้ำที่มีหอย *N. aperta* สายพันธุ์เบต้า นอกจากนี้ปัจจัยการเปลี่ยนแปลงทางสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นภาวะน้ำท่วมที่เกิดขึ้นอาจส่งผลต่อการแพร่กระจายของหอย *N. aperta* สายพันธุ์เบต้ามากขึ้น ดังเช่นการเกิดน้ำท่วมครั้งใหญ่ล่าสุดในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือในปี พ.ศ. 2562 ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาติดตามเพื่อประเมินการระบาดของหอยในพื้นที่ต่อไป

สำหรับการควบคุมการติดโรคพยาธิใบไม้เลือด Schistosomiasis วิธีการที่ใช้ได้ผลได้แก่ การใช้ยากำจัดพยาธิ ยาที่มีประสิทธิภาพได้แก่ยา Praziquantel แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีรายงานการดื้อยา (Wang et al., 2012) ดังนั้นการกำจัดพยาธิ *Schistosoma* spp. โดยการใช้ยากำจัดพยาธิเพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดความยั่งยืนในการกำจัดโรคนี้ได้ในระยะยาว ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนจากแอนติเจนที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของพยาธิเป็นอีกทางเลือกที่สามารถใช้ร่วมกับยากำจัดพยาธิ ในการกำจัดพยาธิให้หมดไป GST เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของพยาธิที่ใช้ปกป้องผิวของพยาธิ จากการที่ผนังเมมเบรนของพยาธิเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxides) ซึ่งเป็นผลอันเกิดจากอนุมูลอิสระจากเม็ดเลือดขาวทำลายผนังเมมเบรน โดย GST จะกำจัดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ให้กลายเป็นสารที่ไม่เป็นพิษต่อพยาธิ ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ทำให้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถทำให้ผนังลิปิดไบเลเยอร์ของผนังเมมเบรนเกิดอนุมูลอิสระต่อไปได้ GST จึงเป็นแอนติเจนตัวหนึ่งของพยาธิที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดภายในโฮสต์ ซึ่งได้ถูกนำมาศึกษาและพบว่ามีศักยภาพในการเป็นวัคซีนต่อพยาธิตัวแบนเช่น Sexton et al. (1990) ได้รายงานว่า GST จาก *Fasciola hepatica* สามารถปกป้องแกะจากการติดพยาธิ *F. hepatica* โดยลดจำนวนพยาธิได้ถึง 57 เปอร์เซ็นต์, Morrison et al. (1996) รายงานว่าเมื่อใช้ GST จาก *F. hepatica* ร่วมกับสารส่งเสริมการกระตุ้นภูมิ Quil AVSM สามารถป้องกันการติดพยาธิ *F. hepatica* ในวัวได้, สำหรับ GST จาก *S. japonicum* ได้ถูกรายงานโดย Liu et al. (1995) และ Shuxian et al. (1995) สามารถลดปริมาณไข่ของพยาธิในสัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิ คือ หนูไม่สัสและหมู, Xu et al. (1995) ได้รายงานว่า GST26 และ GST28 สามารถลดจำนวนพยาธิและลดปริมาณไข่ใน

สัตว์ที่ติดเชื้อ *S. japonicum* ได้ และ Bergquist and Colley (1998) WHO ได้เลือก GST28 จาก *S. haematobium* ในการศึกษาเพื่อทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนต่อการติดเชื้อ *S. haematobium* โดยปัจจุบันอยู่ในการทดสอบ clinical trials phase III (Riveau et al., 2018)

การศึกษานี้จึงเลือกศึกษาโคลนยีนและสร้างโปรตีนของ GST จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และคุณลักษณะของโปรตีน เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการพัฒนาวัคซีน GST ต่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในลำดับต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 3.1 เพื่อศึกษาคุณลักษณะยีนและโปรตีน GST จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*
- 3.2 เพื่อศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์
- 3.3 เพื่อศึกษาการกระจายตัวของกรดนิวคลีอิกของ GST บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ในเลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์, 5 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย

## 3. สมมติฐานของการศึกษา

โปรตีนกลูตาไรโอน เอส ทรานเฟอร์ส จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เป็นโปรตีนที่มีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของพยาธิ จึงได้มีการศึกษาคุณลักษณะของยีนและโปรตีน รวมทั้งศึกษาการกระจายตัวบนตัวบนเนื้อเยื่อพยาธิ

## 4. ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาคุณลักษณะของยีนและโปรตีนกลูตาไรโอน เอส ทรานเฟอร์ส และการกระจายตัวบนพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

## บทที่ 2

### ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis)

โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis) หรือที่เรียกกันว่า Biharziasis เป็นโรคที่เกิดจากกลุ่มพยาธิตัวแบน (Trematode) ได้แก่ *Schistosoma* spp. จัดอยู่ใน Family Schistosomatidae ซึ่งเป็นพยาธิที่ก่ออันตรายได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากในทางเศรษฐกิจ องค์การอนามัยโลกจึงจัดให้เป็นโรคระบาดที่สำคัญโรคหนึ่งที่มีระดับความรุนแรงเป็นอันดับ 2 รองจากโรคมาลาเรีย โดยพบการระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือดในทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย (Moraes et al., 2011)

พยาธิใบไม้เลือด (Blood flukes) จะมีลักษณะที่แตกต่างไปจากพยาธิในกลุ่มของ Trematode คือ ไข่จะไม่มีฝา (non-operculated egg) ตัวอ่อนในระยะเซอร์คาเรียหางจะเป็นสองแฉก (forked tail cercaria) ไม่มีตัวอ่อนในระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) ที่เป็นระยะติดต่อเพื่อเข้าสู่โฮสต์ แต่เป็นตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียที่เป็นระยะติดต่อแทน และในตัวเต็มวัยจะมีเพศผู้และเพศเมียที่แยกกันคนละตัว โดยเพศผู้จะมีลักษณะอ้วนและสั้นกว่าเพศเมีย ด้านข้างลำตัวของเพศผู้จะม้วนพับมาที่ท้องเกิดเป็นร่อง สำหรับโอบล้อมเพศเมียเมื่อผสมพันธุ์เรียกว่า gynaecaphoric canal พยาธิใบไม้เลือดที่มีความสำคัญและทำให้เกิดโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สามารถแบ่งได้ 4 ชนิด คือ *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* และ *Schistosoma mekongi* (วิฑูรย์ ไวยนันท์ และ พิรพรรณ ตันอารีย์, 2546; ซ็อลบล วงศ์สวัสดิ์, 2555; มนะว แสงเฟื่อง, 2558; ดวงเดือน ไกรลาศ, 2560)

##### 1.1 รูปร่างลักษณะและถิ่นที่พบ

1.1.1 *Schistosoma haematobium* พบในแถบทวีปแอฟริกา ตะวันออกกลาง และอินเดีย รูปร่างลักษณะตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด  $10-15 \times 0.75-1$  มิลลิเมตร ลักษณะผิวเป็นตุ่มละเอียด (finely tuberculated) มีอวัยวะ 4-5 อัน เรียงกันเป็นกลุ่ม มี intestinal reunion อยู่กลางลำตัว ตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด  $20-26 \times 0.25$  มิลลิเมตร โดยรังไข่จะอยู่ส่วนล่างของลำตัว มีมดลูกยาว มีไข่บรรจุอยู่ 10-50 ฟอง ไข่มีลักษณะยาวรี ขนาด  $83-187 \times 40-70$  ไมโครเมตร มีหนามหนึ่งอันอยู่ที่ปลายข้างหนึ่ง (terminal spine) เปลือกสีน้ำตาลอ่อน ภายในไข่จะมีตัวอ่อนเจริญอยู่ เรียกว่า ไมราซีเดียม (miracidium)

1.1.2 *Schistosoma mansoni* พบในทวีปแอฟริกา บราซิล อียิปต์ ลิเบีย ชูदान และหมู่เกาะในทะเลคาริเบียน รูปร่างลักษณะตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด  $6-13 \times 1$  มิลลิเมตร ลักษณะผิว

เป็นตุ่มหยาบ (grossly tuberculated) มีอันทะ 6-9 อัน เรียงกันเป็นกลุ่ม มี intestinal reunion อยู่ส่วนหน้าของลำตัว ตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด  $7-17 \times 0.25$  มิลลิเมตร โดยรังไข่จะอยู่ส่วนบนของลำตัว มีมดลูกสั้น มีไข่บรรจุอยู่ 1-4 ฟอง ไข่มีลักษณะยาวรี ขนาด  $115-175 \times 45-70$  ไมโครเมตร มีหนามขนาดใหญ่หนึ่งอันอยู่ด้านข้าง (lateral spine) เปลือกสีน้ำตาลแกมเหลือง ภายในไข่มีตัวอ่อนเจริญอยู่เรียกว่า ไมราซีเดียม

1.1.3 *Schistosoma japonicum* พบในประเทศจีน (ตามกลุ่มแม่น้ำเหลือง) ไต้หวัน ลาว กัมพูชา เวียดนาม ญี่ปุ่น (เกาะฮอนชูและคิวชู) ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย รูปร่างลักษณะตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด  $12-20 \times 0.3$  มิลลิเมตร ลักษณะผิวจะเรียบ (non-tuberculated cuticle) มี intestinal reunion อยู่ส่วนท้ายของลำตัว มีอันทะ 6-7 อัน เรียงเป็นแถวเดียวกัน ตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด  $12-28 \times 0.3$  มิลลิเมตร โดยรังไข่จะอยู่กลางลำตัว มดลูกยาว มีไข่บรรจุอยู่ 50-100 ฟอง ไข่มีลักษณะกลมหรือรี ขนาด  $65-103 \times 50-72$  ไมโครเมตร ไม่มีฝาปิด มีหนามเล็กๆ อยู่ด้านข้าง (rudimentary spine) แนบติดเปลือกไข่ เปลือกสีโปร่งใสถึงเหลืองอ่อน ภายในไข่มีตัวอ่อนเจริญอยู่เรียกว่า ไมราซีเดียม

1.1.4 *Schistosoma mekongi* พบในกลุ่มแม่น้ำโขง ประเทศลาว และกัมพูชา รูปร่างลักษณะตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด  $10-18 \times 0.5-0.55$  มิลลิเมตร ลักษณะผิวเรียบ มี intestinal reunion อยู่ส่วนท้ายของลำตัว มีอันทะ 6-7 อัน เรียงเป็นแถวเดียวกัน ตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด  $14-20 \times 0.3$  มิลลิเมตร โดยรังไข่จะอยู่กลางลำตัว มดลูกยาว มีไข่บรรจุอยู่ 120-130 ฟอง ไข่มีลักษณะเช่นเดียวกับ *S. japonicum* แต่จะค่อนข้างกลมและเล็กกว่า ขนาด  $62-97 \times 50-76$  ไมโครเมตร มีหนามเล็กๆ อยู่ด้านข้าง ภายในไข่มีตัวอ่อนเจริญอยู่เรียกว่า ไมราซีเดียม

## 1.2 ลักษณะสำคัญที่แตกต่างของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

1.2.1 เพศผู้ สามารถแยกได้จากลักษณะของ tubercle ที่ผิวตัวของพยาธิ จำนวนและ arrangement ของอันทะ และตำแหน่งของ reunion ของลำไส้

1.2.2 เพศเมีย สามารถแยกได้จากตำแหน่งของรังไข่ ความยาวของมดลูก จำนวนไข่ และลักษณะของไข่

1.2.3 ไข่ไม่มีฝาปิด (non-operculated egg) สามารถแยกได้จากลักษณะของไข่ และตำแหน่งของหนาม (spine)

### 1.2.4 ขนาดของไข่

*S. haematobium* ขนาด  $83-187 \times 40-70$  ไมโครเมตร

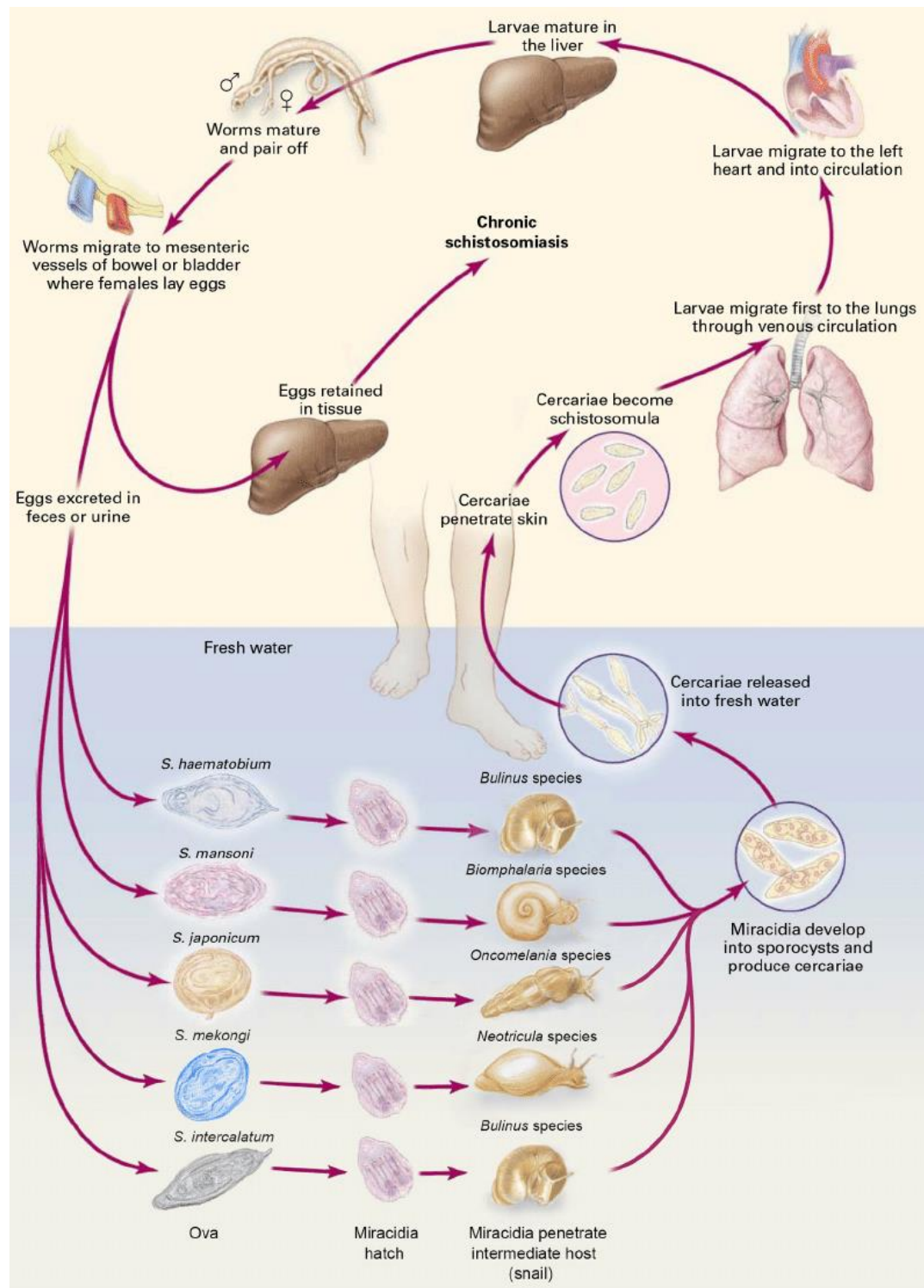
*S. mansoni* ขนาด  $115-175 \times 45-70$  ไมโครเมตร

*S. japonicum* ขนาด  $65-103 \times 50-72$  ไมโครเมตร

*S. mekongi* ขนาด  $62-97 \times 50-76$  ไมโครเมตร

### 1.3 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

พยาธิใบไม้เลือดตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียจะจับคู่กันเมื่อเข้าสู่ช่วงผสมพันธุ์ โดยพยาธิตัวเต็มวัยของ *S. japonicum* และ *S. mekongi* จะอาศัยอยู่ในเส้นเลือดดำบริเวณลำไส้เล็ก (superior mesenteric veins) *S. mansoni* จะอาศัยอยู่ในเส้นเลือดดำบริเวณลำไส้ใหญ่ (inferior mesenteric veins) *S. haematobium* จะอาศัยอยู่ในเส้นเลือดดำรอบกระเพาะปัสสาวะ (vesical & hemorrhoidal vein) เมื่อพยาธิเพศผู้และเพศเมียผสมพันธุ์กันแล้วก็จะออกไข่ในบริเวณที่อาศัยอยู่ จากนั้นไข่จะถูกปล่อยออกผ่านช่องเปิดเหนืออวัยวะดูดเกาะด้านท้อง (ventral sucker) ไข่จะเคลื่อนผ่านเนื้อเยื่อผนังเส้นเลือดโดยอาศัยปฏิกิริยาเอนไซม์ซิสเตอีน (cysteine protease) และลิวซีนอะมิโนเปปติเดส (leucine aminopeptidase) (Sung and Dresden, 1986; Xu and Dresden, 1986, 1990) ที่ปล่อยออกมาย่อยเนื้อเยื่อผนังเส้นเลือดโดยตัวอ่อนระยะไมราซีเดียในไข่ ทำให้ไข่สามารถเคลื่อนผ่านผนังเส้นเลือดเข้ามาในภายในลำไส้และฝังอยู่ที่ผนังของลำไส้ ไข่บางส่วนที่ไม่ได้เคลื่อนผ่านผนังเส้นเลือดจะลอยไปตามกระแสเลือดแล้วไปติดอยู่ที่ตับ ไข่ที่ปะปนออกมาที่บ่ออุจจาระหรือปัสสาวะจะเป็นไข่ที่เจริญเต็มที่พร้อมที่จะเจริญเป็นตัวอ่อนในระยะไมราซีเดียเมื่อไข่สัมผัสกับน้ำ การฟักออกจากไข่ใช้เวลาภายใน 2-3 นาที เคลื่อนตัวเข้าสู่หอยซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางแล้วพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะสปอโรซิสต์ (sporocyst), สปอโรซิสต์ลูก (daughter sporocyst), เรเดีย (radia) และเซอร์คาเรีย (cercaria) โดยใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 4-6 สัปดาห์ จากนั้นตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะติดต่อ (infective stage) จะไข่ออกจากเนื้อเยื่อของหอย และว่ายน้ำอยู่ในน้ำอย่างอิสระ เมื่อตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียพบมนุษย์และสัตว์ก็จะเข้าไปเกาะที่ผิวหนัง ทำการสลัดหางทิ้งแล้วไข่ออกผิวหนังทางรูขุมกลายเป็นตัวอ่อนระยะซิสโตโซมูลัม (schistosomulum) เข้าไปยังเส้นเลือดฝอย และเคลื่อนตัวไปตามกระแสเลือดเข้าสู่หัวใจห้องขวา และถูกสูบฉีดผ่านเข้าปอด จากนั้นจะเจริญอยู่ภายในปอดประมาณ 2-3 วัน จึงออกจากปอดเพื่อเข้าสู่หัวใจห้องซ้าย เคลื่อนตัวไปตามกระแสเลือดอีกครั้งเพื่อไปยังเส้นเลือดพอร์ทัล (portal vein) ของตับ พยาธิใบไม้เลือดจะเจริญเป็นตัวเต็มวัยแล้วตัวพยาธิเพศผู้และเพศเมียจะเริ่มจับคู่กัน เพศผู้จะโอบล้อมเพศเมียโดย gynaecaphoric canal เพื่อผสมพันธุ์ จากนั้นเพศผู้จะพาเพศเมียเคลื่อนตัวไปยังเส้นเลือดบริเวณลำไส้เพื่อทำการวางไข่ โดยจะใช้เวลา 6-8 สัปดาห์ ตั้งแต่ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียไข่ออกสู่ผิวหนังจนกระทั่งทำการวางไข่ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

ที่มา: Weerakoon et al. (2015)

## 1.4 พยาธิสภาพและลักษณะทางคลินิก

### 1.4.1 ระยะฟักตัว หรือระยะที่ตัวอ่อนพยาธิไชเข้าสู่ผิวหนัง

เป็นระยะที่ตัวอ่อนเซอร์คาเรียไชเข้าสู่ผิวหนัง ภายใน 24-36 ชั่วโมง ผิวหนังบริเวณที่ตัวอ่อนพยาธิไชเข้าจะเกิดการอักเสบเป็นตุ่มแดง มีผื่นคันคล้ายลมพิษ หลังจากนั้น 2-3 วัน ผื่นคันก็จะบรรเทาและหายไปได้เอง เมื่อตัวอ่อนพยาธิเคลื่อนตัวผ่านผิวหนังสู่เส้นเลือดดำเพื่อไปยังปอด และพักอยู่ที่ปอดประมาณ 2-3 วัน กลายเป็นพยาธิที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (young worms) ช่วงที่พยาธิอาศัยอยู่ในปอดจะก่อให้เกิดอาการตกเลือด (haemorrhage) ที่เนื้อปอด คือมีจุดเลือดออกเล็กๆ มี eosinophil, lymphocyte, epitheloid cell และ giant cell มาอยู่รอบบริเวณเส้นเลือดแดง pulmonary จากนั้นตัวอ่อนพยาธิจะเคลื่อนตัวผ่านกระแสเลือดไปยังตับเพื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยที่เส้นเลือดดำตับ (intrahepatic portal blood vessels) ทำให้เกิดการอักเสบ และผนังลำไส้เล็กมีเลือดคั่งร่วมด้วย ผู้ป่วยที่ได้รับตัวอ่อนพยาธิเข้าไปประมาณ 15-73 วัน จะเกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกิน (hypersensitivity) มีอาการไอ เป็นไข้ ปอดและหลอดลมเกิดการอักเสบ จุกแน่นหน้าอก หนาวสั่น ปวดศีรษะ ต่อม้ำเหลืองอักเสบ และม้ามโต เกิดลมพิษทั้งตัว หน้าและตาบวม เมื่อตรวจเลือดจะพบ eosinophil สูง อาการเหล่านี้เรียกว่า ไข้คาทายามา (Katayama fever)

### 1.4.2 ระยะวางไข่ และเข้าไปภายในลำไส้

เป็นระยะที่พยาธิตัวเต็มวัยเพศเมียซึ่งถูกผสมพันธุ์เรียบร้อยแล้วทำการวางไข่บริเวณเส้นเลือดดำ ตัวอ่อนภายในไข่พยาธิจะทำการผลิตและหลั่งสารออกมาเพื่อไปย่อยผนังเส้นเลือดดำแล้วไชผ่านออกมาอยู่บริเวณเนื้อเยื่อรอบเส้นเลือดบริเวณตับและลำไส้ ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดการอักเสบ มีเซลล์เม็ดเลือดขาว (polymorphonuclear neutrophils; PMN) มาโอบล้อมรอบๆ เกิดเป็นฝีขนาดเล็ก (pseudoabscess) จำนวนมากบริเวณลำไส้และตับ เมื่อฝีเหล่านี้แตกจะทำให้เกิดแผลอักเสบ และไข่ที่อยู่ในเส้นเลือดจะเคลื่อนผ่านโดยกระแสเลือดไปยังเส้นเลือดดำบริเวณตับ (portal vein) หากมีไข่ภายในเส้นเลือดดำบริเวณตับจำนวนมากจะทำให้เกิดการอุดตัน มีเลือดคั่งในตับ มีไข่พยาธิบางส่วนจะไชผ่านทะลุไปยัง lumen ของลำไส้และปะปนออกไปพร้อมกับอุจจาระ

### 1.4.3 ระยะการซ่อมแซมร่างกาย

เป็นระยะที่ร่างกายสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่เพื่อทำการซ่อมแซมเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดแผลจากการที่ไข่หรือตัวอ่อนพยาธิเข้าทำลายเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ จนเกิดตุ่มหนอง ระยะนี้ลำไส้จะหนาขึ้น เกิดพังผืด (fibrosis) หลอดเลือด mesenteric และ portal จะอุดตันทำให้ตับแข็งจากการแทนที่ของพังผืด อีกทั้งยังมีภาวะขาดอาหารร่วมด้วยจากการที่ผู้ป่วยเบื่ออาหาร ในระยะนี้ผู้ป่วยจะอาเจียน ถ่ายเป็นมูกเลือด บวม มีน้ำในช่องท้อง โลหิตจาง ตับและม้ามโต ปอดเกิดแผลจากการอุดตัน

ต้นของหลอดเลือดฝอย (วิฑูรย์ ไวยนันท์ และ พิรพรรณ ตันอารีย์, 2546; มะนาว แสงเฟื่อง, 2558; ดวงเดือน ไกรลาศ, 2560)

## 2. พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*

ในปี ค.ศ. 1957 มีการรายงานพบผู้ป่วยรายแรกในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวที่มีการรายงานเป็นการติดโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ต่อมาในปี ค.ศ. 1959 มีรายงานพบผู้ป่วยชาวไทยรายแรกที่ติดโรคพยาธิใบไม้เลือดที่มีลักษณะคล้ายกับพยาธิ *S. japonicum* และ ค.ศ. 1968 ได้มีรายงานพบผู้ป่วยในราชอาณาจักรกัมพูชาที่เมือง Kratie โดยมีการค้นพบแหล่งระบาดของโรคว่ามีการระบาดในแหล่งพื้นที่ลุ่มน้ำโขง ที่เกาะโขงทางตอนใต้ของสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ไปจนถึงเมือง Kratie ของราชอาณาจักรกัมพูชา ต่อมามีการค้นพบว่าผู้ป่วยที่มีการติดโรคพยาธิใบไม้เลือดที่มีลักษณะคล้ายกับพยาธิ *S. japonicum* ไม่ได้มีโฮสต์กลางเป็นหอย *Oncomelania* spp. แต่กลับพบว่ามีโฮสต์กลางเป็นหอย *Lithoglyphopsis aperta* หรือ *Tricula aperta* อีกทั้งยังมีลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัย และไข่ที่แตกต่างจากพยาธิ *S. japonicum* ในปี ค.ศ. 1978 จึงได้มีการระบุสายพันธุ์ใหม่ของพยาธิชนิดนี้เป็น *Schistosoma mekongi* (*S. mekongi*) ตามลักษณะสัณฐานวิทยาของไข่ ตัวเต็มวัย วงจรชีวิต และโฮสต์กลางที่เป็นหอย *Neotricula aperta* (*N. aperta*) (Hirose et al., 2007; Shimada et al., 2007; Vonghachack et al., 2017)

โดยจัดจำแนกอนุกรมวิธานของพยาธิ *Schistosoma mekongi* ได้ดังนี้

Kingdom: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Class: Trematoda

Subclass: Digenea

Order: Strigeidida

Family: Schistosomatidae

Genus: *Schistosoma*

Species: *Schistosoma mekongi*

### 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S. mekongi*

#### 2.1.1 ตัวเต็มวัย (Adult)

ลักษณะตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด 10-18 × 0.5-0.55 มิลลิเมตร ลักษณะผิวเรียบ มี intestinal reunion อยู่ส่วนท้ายของลำตัว มีอันทะ 6-7 อัน เรียงเป็นแถวเดียวกัน ส่วนลักษณะ



ตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด 14-20 × 0.3 มิลลิเมตร โดยรังไข่จะอยู่กลางลำตัว มดลูกยาว มีไข่บรรจุอยู่ 120-130 ฟอง

### 2.1.2 ไข่ (Egg)

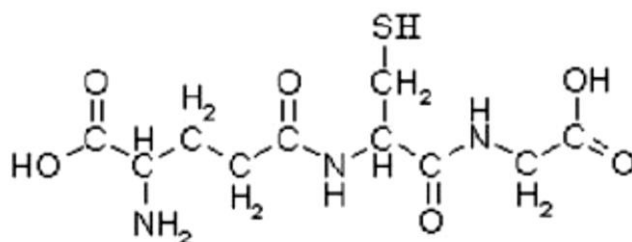
ไข่มีลักษณะคล้ายกับ *S. japonicum* แต่จะค่อนข้างกลมและเล็กกว่า มีขนาด 62-97 × 50-76 ไมโครเมตร มีหนามเล็กๆ อยู่ด้านข้าง ภายในไข่มีตัวอ่อนเจริญอยู่ เรียกว่า ไมราซีเดียม

### 2.2 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีวงจรชีวิตเช่นเดียวกับพยาธิใบไม้เลือดชนิดอื่น แต่พยาธิตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ที่ superior mesenteric vein และ portal vein โดยมีหอย *N. aperta* เป็นโฮสต์กลางในการติดต่อสู่มนุษย์และสัตว์

### 3. กลูตาไธโอน เอส ทรานสเฟอเรส (Glutathione S-Transferase)

กลูตาไธโอน เอส ทรานสเฟอเรส (Glutathione S-Transferase; GSTs) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการขจัดสารประกอบที่เป็นพิษที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อยให้สามารถละลายน้ำได้มากขึ้นแล้วกำจัดออกจากร่างกาย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระ โดยมีกลูตาไธโอน (Glutathione; GSH) เข้าจับกับสารประกอบที่เป็นพิษที่ชอบอิเล็กตรอน (electrophilic) จากนั้น GST (glutathione S-conjugates) ทำให้เกิดปฏิกิริยาการกำจัดสารพิษใน phase II (Armstrong, 1997; Paumi et al., 2001; Sheehan et al., 2001; Veal et al., 2002; Ren et al., 2015) GSH มีโครงสร้างเป็นกรดอะมิโน 3 ชนิด เรียงต่อกัน (tripeptide) ได้แก่ glutamine, cysteine และ glycine ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) (ภาพที่ 2) โดยมีหมู่ไทออล ( $\alpha$ -sulphydryl; -SH) ช่วยในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระ มาเชื่อมต่อบริเวณ cysteine เรียกว่า reduced glutathione โดย GSH ถูกสังเคราะห์ภายในเซลล์แล้วส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่หลอดเลือดเพื่อไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย โดยมีกระบวนการสร้างอยู่ด้วยกัน 2 ส่วน ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้พลังงาน ATP และการทำงานของเอนไซม์ที่เข้าจับกับโมเลกุล (Johnson et al., 2003; Preyavichyapugdee, 2007; อนุรักษ์ ลิลารุ่งระยับ และ ประสงค์ เทียนบุญพบ, 2550; ชูติมา ลิ้มมัทวาริทธิ์ และ สนทยา ลิ้มมัทวาริทธิ์, 2554)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ GSH

ที่มา: นัฐธกมล ลีลารุ่งระยับ และ ประสงค์ เทียนบุญพบ (2550)

GST มีการแบ่งกลุ่มอยู่ด้วยกัน 16 กลุ่ม ได้แก่ alpha, mu, pi, theta, sigma, zeta, omega, nu, lambda, phi, tau, delta, epsilon, iota, chi และ rho ที่ขึ้นอยู่กับตำแหน่งพื้นฐานต่างๆ ได้แก่ ลำดับกรดอะมิโน ลำดับนิวคลีโอไทด์ ความจำเพาะของสารตั้งต้น/สารยับยั้ง โครงสร้างแบบ primary, tertiary และ quaternary รวมถึงลักษณะทางภูมิคุ้มกัน โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมสามารถแบ่งกลุ่มได้ 8 กลุ่มคือ alpha, mu, pi, kappa, omega, sigma, zeta และ theta ส่วนในสัตว์ที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยน้ำนม แมลง พืช เห็ด และพยาธิสามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่มคือ mu, pi, sigma, zeta และ beta เอนไซม์เหล่านี้เป็น cytosolic protein ที่เป็นมีโครงสร้างแบบ dimeric (homodimer หรือ heterodimer) โดยแต่ละโมโนเมอร์จะประกอบด้วยกัน 2 ส่วน คือ N-terminal ซึ่งมีความคล้ายกับโครงสร้าง thioredoxin ซึ่งมีตำแหน่งที่จับกับ glutathione ที่เรียกว่าตำแหน่ง “G-site” และปลาย C-terminal ที่ประกอบด้วยส่วนที่จับกับสารตั้งต้น (Trottein et al., 1992; Sheehan et al., 2001; Preyavichyapugdee, 2007; Han et al., 2013; Kalita et al., 2017)

GST มีบทบาทในการขับล้างสารพิษออกสู่ภายนอกร่างกาย ที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 2 ของการกำจัดสารพิษ โดยทั่วไปกระบวนการการขับล้างสารพิษของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจะมีอยู่ด้วยกัน 3 ขั้นตอน ที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป โดยขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis reaction), ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) และปฏิกิริยารีดักชัน (reduction reaction) ที่เปลี่ยนสารประกอบที่เป็นพิษไม่ขั้ว ละลายน้ำไม่ได้หรือละลายได้น้อยให้เป็นสารประกอบที่มีขั้ว สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น และลดความเป็นพิษของสารประกอบลง ในขั้นตอนนี้จะมีเอนไซม์สำคัญที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยา คือ เอนไซม์ไซโตโครม พี450 (cytochrome P450; CYP450) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidation พบมากบริเวณตับ หรืออาจพบได้ที่ ไต ปอด ลำไส้ เป็นต้น ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนรูปของสารทางชีวภาพที่เกิดปฏิกิริยาการเข้าจับกันระหว่างสารเมตาบอลิท์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 กับสารประกอบภายในร่างกายเกิดเป็นปฏิกิริยาต่างๆ เช่น กลูคูโรนิเดชัน (glucuronidation),

ซัลเฟชัน (sulfation), การเติมหมู่แอสเทิล (acetylation), การเติมหมู่เมทิล (methylation), การเข้าจับของ GSH (conjugation with glutathione) และการเข้าจับของหมู่อะมิโน (conjugation with amino acids) โดยมีเอนไซม์สำคัญที่ช่วยเร่งให้เกิดปฏิกิริยา ได้แก่ กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส (glutathione S-transferases), ยูดีพี กลูคูโรโนซิลทรานเฟอเรส (UDP-glucuronosyltransferases), เอ็น แอสเทิลทรานเฟอเรส (N-acetyltransferases), เมทิลทรานเฟอเรส (methyltransferases) และซัลโฟทรานเฟอเรส (sulfotransferases) ทำให้สารที่ถูกเมทาบอลิซึมที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำสูงขึ้น และง่ายต่อการกำจัดออก ขั้นตอนที่ 3 เป็นการขับโปรตีนเพื่อช่วยในการขนส่งสารที่ถูกเมทาบอลิซึมในขั้นตอนที่ 1 และ 2 ให้เคลื่อนผ่านผนังเซลล์ออกไปรวมที่ไตและทำการกำจัดออกในรูปของปัสสาวะ (Farahnak and Barrett, 2001; Sheehan et al., 2001; Preyavichyapugdee, 2007; Ziniel et al., 2015; Kumar and Trivedi, 2018; ปณิตดา ไยภักดี และ คณาภรณ์ พจนาคม, 2547)

ในพยาธิมีการแสดงออกของโปรตีน GST เพื่อใช้ในการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันที่ถูกสร้างและส่งมากำจัดตัวพยาธิจากโฮสต์ที่พยาธิเข้าไปอาศัย การเคลื่อนย้ายถิ่นที่อยู่อาศัยภายในโฮสต์เมื่ออยู่ในระยะต่างๆ รวมทั้งการตอบสนองต่อยาที่ใช้รักษาหรือกำจัดพยาธิ ทำให้ร่างกายของโฮสต์เกิดการดีอียา โปรตีนตัวนี้จึงมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญสำหรับพยาธิ เนื่องจากพยาธิมีเอนไซม์ที่ใช้ในการขับล้างสารพิษน้อยมาก GST จึงอาจเป็นหน่วยปกป้องตัวของพยาธิเพื่อไม่ให้เกิดความเสียหาย หรือได้รับอันตรายจากปฏิกิริยาต่างๆ ที่ร่างกายของโฮสต์สร้างขึ้นเพื่อต่อต้านตัวพยาธิ GST ในพยาธิพบน้ำหนักโมเลกุลที่ 26 กิโลดาลตัน (kDa) และ 28 กิโลดาลตัน (kDa) โดยสามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ได้แก่ mu, pi และ sigma บางชนิดอาจพบกลุ่ม alpha และ omega ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาโปรตีน GST ในพยาธิโดยพบว่า มีระดับของ GST ในกระบวนกรต่างๆ ภายในร่างกายของพยาธิในกลุ่ม cestodes, digeneans มีระดับที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับพยาธิกลุ่ม nematodes (McTigue et al., 1995; Farahnak and Barrett, 2001; Sheehan et al., 2001; Preyavichyapugdee, 2007; Han et al., 2013; Moatamedi Pour et al., 2014; Ziniel et al., 2015; Kalita et al., 2017)

#### 4. การประยุกต์ใช้โปรตีนกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส ในการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาและการเป็นวัคซีน

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือดทำได้โดยการตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระและการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา เป็นต้น ซึ่งการตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระเป็นวิธีการที่มีความนิยมมาก แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญสูงในการตรวจวินิจฉัย และสามารถตรวจได้ในระยะท้ายๆ ของการติดเชื้อแล้วเท่านั้น ส่วนการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาด้วยเทคนิค ELISA

เป็นวิธีที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิใบไม้ตับในระยะต้นของการติดเชื้อพยาธิ ซึ่งมีความไวและความแม่นยำในการตรวจวินิจฉัยสูงกว่าการตรวจอุจจาระ

Awad et al. (2009) ได้ทำการศึกษาการใช้ GST เป็นแอนติเจนในการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อการติดโรคพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในโค แกะ และลา มีค่าความไว อยู่ในช่วง 60-71.8% และค่าความจำเพาะ อยู่ในช่วง 70-77.8% ต่อมา Sun et al. (2017) ได้ทำการศึกษาการใช้ GST เป็นแอนติเจนในการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อการติดโรคพยาธิตัวตืด *Taenia multiceps* (*T. multiceps*) ในแพะ มีค่าความไว 90% และค่าความจำเพาะ 92.8% และในปีล่าสุด Aguayo et al. (2018) ได้ทำการศึกษาการใช้ GST เป็นแอนติเจนในการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อการติดโรคพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* โดยทำให้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White เกิดการติดเชื้อ พบความไวที่ 94.3% และค่าความจำเพาะ 80.2%

การพัฒนาวัคซีนจากแอนติเจนที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของพยาธิ เป็นอีกทางเลือกในการรักษา โดย GST เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษของพยาธิ โดยจะกำจัด hydroperoxide ซึ่งเป็นการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องที่จะเกิดจากสารอนุมูลอิสระ GST จึงเป็นแอนติเจนตัวหนึ่งที่เป็นอีกทางเลือกในการนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้

Mbanefo et al. (2015) ได้ทำการศึกษา DNA วัคซีน GST ต่อพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ที่ให้ร่วมกับ pVR1020 (pVR1020-SjGST DNA vaccines) ซึ่งเป็น nanoparticle โดยใช้หนูโมส อายุ 6 สัปดาห์ แล้วแบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 13 ตัว ทำการฉีด pVR1020-Blank 100 ไมโครกรัม ในกลุ่มที่ 1 และฉีด pVR1020-SjGST DNA vaccines 100 ไมโครกรัม เพื่อเป็นการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งจะห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ จึงทำการติดเชื้อโดยให้ตัวอ่อนระยะ cercariae จำนวน 40 ตัวของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* จากนั้น 7 สัปดาห์หลังการติดเชื้อจึงทำการการุณยฆาตหนูโมสเพื่อตรวจสอบผล ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สามารถลดความเสียหายของเนื้อเยื่อตับจากการวางไข่ของพยาธิได้ถึง 71.3 เปอร์เซ็นต์ และลดจำนวนการวางไข่ของพยาธิเพศเมียได้ 55 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถสรุปได้ว่า การใช้ pVR1020 ร่วมกับ DNA วัคซีน GST ต่อพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* สามารถลดจำนวนการวางไข่ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ในเพศเมียได้ GST จึงมีประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนป้องกันการติดต่อของโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ได้ ต่อมา Tang et al. (2017) ได้ทำการศึกษาวัคซีนต่อพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* โดยใช้หนูโมส เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ แล้วแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อพยาธิ, กลุ่มที่ 2 มีการติดเชื้อพยาธิ, กลุ่มที่ 3 มีการติดเชื้อพยาธิ แต่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย anti-CD25 mAb, กลุ่มที่ 4 มีการติดเชื้อพยาธิ แต่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีด GST และกลุ่มที่ 5 มีการติดเชื้อพยาธิ แต่ถูกกระตุ้น

ภูมิคุ้มกันด้วยการฉีด GST ร่วมกับ anti-CD25 mAb โดยในกลุ่มที่ 4 และ 5 จะทำการฉีด GST เพื่อเป็นการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งจะห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ จึงทำการติดเชื้อโดยให้ตัวอ่อนระยะ cercariae จำนวน 40 ตัวของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* จากนั้น 5 สัปดาห์หลังการติดเชื้อจึงทำการการุณยฆาตหนูไมส์เพื่อตรวจสอบผล ส่วนหนูไมส์ในกลุ่มที่ 5 จะทำการฉีด anti-CD25 mAb ให้หลัง 2 สัปดาห์ของการติดเชื้อ แล้วจึงทำการการุณยฆาตหนูไมส์ เพื่อตรวจสอบผล ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สามารถลดจำนวนของพยาธิในกลุ่มของหนูไมส์ที่ให้ GST ร่วมกับ anti-CD25 mAb ได้ถึง 47.09%



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

##### 1.1 เชื้อแบคทีเรีย

1.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอสายผสมในการโคลนยีน (gene cloning)

1.1.2 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอสายผสมในการแสดงออกของยีน (gene expression)

##### 1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 Luria-Bertani (LB) Broth medium

1.2.2 Luria-Bertani (LB) Broth agar

##### 1.3 เอนไซม์

1.3.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI

1.3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI

1.3.3 เอนไซม์ T4 DNA ligase

1.3.4 เอนไซม์ Taq DNA Polymerase

##### 1.4 เครื่องมือ

1.4.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (The balance of quality)

1.4.2 เครื่องแยกโปรตีน (Polyacrylamide gel electrophoresis)

1.4.3 เครื่องแยกดีเอ็นเอ (Agarose gel electrophoresis)

1.4.4 เครื่องเคลื่อนย้ายโมเลกุลของโปรตีน ชนิดกึ่งแห้ง (Semi-Dry Transfer)

1.4.5 ตู้เขี่ยเชื้อ (Biosafety cabinet)

1.4.6 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

1.4.7 เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)

1.4.8 ไมโครปิเปต (Micropipette)

1.4.9 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)

1.4.10 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

1.4.11 เครื่องให้ความร้อนแบบแห้ง (Hot air oven)

1.4.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Hermale)

- 1.4.13 เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 1.4.14 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplate Reader)
- 1.4.15 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubate, N-Biotek)
- 1.4.16 เครื่องเขย่า (Shaker, Wellab)
- 1.4.17 เครื่องวัด spectrophotometrically
- 1.4.18 เครื่องเนื้อเยื่อ (Microtome)
- 1.4.19 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1 เนื้อเยื่อและ cDNA ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

เนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์, 5 สัปดาห์ และระยะตัวเต็มวัย ในพาราฟีน และ cDNA ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ใช้ตัวอย่างดังกล่าวจากโครงการวิจัย “การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมต่อพยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma mekongi* ด้วยวิธี Sandwich ELISA” ซึ่งโครงการดังกล่าวผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เอกสารใบรับรองเลขที่ FTM-ACUC023/2017

### 2.2 การออกแบบ Primer สำหรับโคลนยีนกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส

ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนของกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส 26 กิโลดาลตัน และกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส 28 กิโลดาลตันจากพยาธิ *S. japonicum* จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่สร้างโปรตีน GST1 และ GST2 เริ่มจากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน GST1 และ GST2 ไปเทียบกับข้อมูลสารสนเทศศาสตร์จากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), โปรแกรม Clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) และโปรแกรม Clustal W (<https://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) เพื่อหาความแตกต่างของยีน และนำมาใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบ primer หลังทำการเทียบข้อมูลแล้วจึงเลือกใช้ยีน *Schistosoma japonicum* GST26 isolate Anhui full length mRNA clone SJFCE3765.016|FSE001-P00009-L17, complete sequence (GeneBank accession no. FN321451.1) และ *Schistosoma japonicum* GST28 clone SJCHGC01819 unknown mRNA (GeneBank accession no. 815884.1) โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์ (primer) ได้ดังนี้

Forward primer: GST1 (5'-GTAGCGCGTATTGGTGTGGGTATA-3')

GST2 (5'-TTCACGCAATGGCTTGTGGGCAT-3')

Reverse primer: GST1 (5'-CGACATTTTTATTTAGCACAAATCATAGGTG-3')

GST2 (5'-GCTGGCAGTGTTAAAATGCCGTTG-3')

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (DNA; Deoxyribonucleic Acid) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน GST ด้วยวิธี PCR โดยออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อยีน GST โดยใช้ฐานข้อมูลสารสนเทศจาก NCBI ได้เป็น Forward primer และ Reverse primer ของ GST1 และ GST2 ดังนี้

Forward primer: GST1 (5'-GTAGCGCGTATTGGTGTGGGTATA-3')

GST2 (5'-TTCACGCAATGGCTTGTGGGCAT-3')

Reverse primer: GST1 (5'-CGACATTTTTATTTAGCACAAATCATAGGTG-3')

GST2 (5'-GCTGGCAGTGTTAAAATGCCGTTG-3')

ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X i Taq™ plus buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ i-Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่หลอด PCR ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เริ่มจากขั้นตอน Denature แยกสาย DNA เกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มสาย DNA เป้าหมาย 35 รอบ โดยเริ่มที่ขั้นตอน Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที และเมื่อทำการสังเคราะห์จนครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide ทำการเปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้โดยใช้ 100 bp DNA ladder และตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดยใช้ UV transilluminator

2.4 การโคลนยีนกลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส

2.4.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน GST กับพลาสมิด pGEM®-T easy

คัดเลือกและตัดแถบ DNA ของยีน GST1 และ GST2 ที่ได้จากการทำ PCR ออกจาก agarose gel โดยแยกชิ้น DNA ออกจากเจลด้วย PCR clean-up Gel extraction (NucleoSpin, Germany) แล้วทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักหลอด และน้ำหนักหลอดที่ใส่เจลแล้วคำนวณหาค่าน้ำหนักของเจล จดบันทึกผลน้ำหนักเจลไว้ ทำการเติมเติมบัฟเฟอร์ NTI ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศา



เซลเซียส 10-20 นาที เพื่อให้เจลละลาย ดูดสารละลายใส่คอลัมน์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทำการปั่นสารละลายซ้ำอีกครั้งแล้วจึงเทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำคอลัมน์ไปปั่นอีกครั้งเพื่อให้คอลัมน์แห้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อเสร็จจึงย้ายคอลัมน์ส่วนบนลงในหลอดใหม่แล้วเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัด DNA ออกจากเจลมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T easy vector ซึ่งเป็น Cloning vector (Promega, USA) โดยทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต ใช้ insert DNA (ยีนของโปรตีน GST) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, pGEM<sup>®</sup>-T easy vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 2X ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยห้ามทำการเขย่าเด็ดขาดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

#### 2.4.2 การนำพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยกระบวนการ Transformation

นำพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* (*E. coli*) โดยวิธี heat shock transformation โดยนำ DNA สายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube ที่มี competent cells ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำ Heat shock โดยแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เมื่อเสร็จให้ทำการเติมอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นจึงแบ่งเชื้อแบคทีเรียในหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารแข็ง LB broth ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติม Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อทำ Blue/white Screening จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

#### 2.4.3 การคัดเลือกและตรวจสอบโคลนของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิด DNA สายผสม

คัดเลือกโคลนของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม โดยคัดเลือกโคลนสีขาวที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB broth ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin, IPTG และ X-gal ซึ่งใช้เป็น selective medium ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายมีวนที่อบฆ่าเชื้อแล้วแตะโคลนสีขาวมาเลี้ยง

ในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

#### 2.4.4 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit

สกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit ตามขั้นตอนของผู้ผลิต (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรียจากโคลนนี้เดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วทำการละลายตะกอนแบคทีเรียด้วย Resuspension solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนตะกอนละลายหมด จากนั้นดูดใส่หลอด microtube แล้วเติม Lysis buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาเบาๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง เติม Neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาเบาๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสใส่ในคอลัมน์ GeneJET spin แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างโปรตีนที่เหลืออยู่ด้วย Wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำคอลัมน์ไปปั่นอีกครั้งเพื่อเอา Wash solution ออกให้หมด ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อเสร็จจึงย้ายคอลัมน์ส่วนบนลงในหลอดใหม่แล้วเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.4.5 การตรวจสอบพลาสมิดพาหะสายผสม pGEM<sup>®</sup>-T easy cloning vector ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำพลาสมิดพาหะสายผสม pGEM<sup>®</sup>-T easy cloning vector จากข้อ 2.4.4 มาทำการตรวจสอบขนาดของยีน GST ด้วยเทคนิค PCR โดยในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X i Taq<sup>™</sup> plus buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer ที่ทำการออกแบบไว้ ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, พลาสมิดพาหะสายผสม pGEM<sup>®</sup>-T easy cloning vector ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ i-Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่หลอด PCR ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เริ่มจากขั้นตอน Denature แยกสาย DNA เกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มสาย DNA เป้าหมาย 35 รอบ โดยเริ่มที่ขั้นตอน Denature ที่ 94

องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที และเมื่อทำการสังเคราะห์จนครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำพลาสมิดพาหะสายผสม pGEM®-T easy cloning vector product ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.2% (w/v) agarose gel และย้อมด้วย Ethidium bromide ทำการเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดพาหะสายผสม pGEM®-T easy cloning vector product ที่ได้โดยใช้ 100 bp DNA ladder และตรวจสอบการเรืองแสงของโดยใช้ UV transilluminator เมื่อตรวจสอบเสร็จแล้วจึงนำพลาสมิดที่สกัดได้ในข้อ 2.4.4 ส่งไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

#### 2.5 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์

หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วก็ทำการศึกษาลักษณะคุณสมบัติของยีน GST จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Clustal W และ Clustal omega จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้าง ขนาด และลักษณะทางกายภาพของยีน GST ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ExPASy Tool (<https://web.expasy.org/translate/>) และ I-TASSER program (Zhang, 2008)

2.6 การออกแบบ Primer สำหรับผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส (Recombinant Glutathione S-Transferase; rGST)

ทำการออกแบบ Primer สำหรับการผลิตโปรตีน rGST เพื่อใช้ในการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีน ดังนี้

Forward primer: GST1 (5'-CATATGGCTCCGATACTCGGCTATTGGA-3')

GST2 (5'-CATATGGCTTGTGGCATGTTAAGGTTATC-3')

Reverse primer: GST1

(5'-CTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGATGTTTCGGAGGATGGTCGCCA-3')

GST2

(5'-CTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGATGAAATGCCGTTGCATGTCTCTCTG-3')

2.7 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส 26 กิโลดาลตัน และ 28 กิโลดาลตัน (rSmekGST1 และ rSmekGST2)

ผลิตโปรตีน rSmekGST1 และ rSmekGST2 โดยใช้ primer ที่ทำการออกแบบไว้ในข้อที่ 2.6 แล้วทำการเพิ่มปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค PCR โดยในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X i Taq™ plus buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer

ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ i-Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่หลอด PCR ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เริ่มจากขั้นตอน Denature แยกสาย DNA เกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ช่วงรอบของการเพิ่มสาย DNA เป้าหมาย 35 รอบ โดยเริ่มที่ขั้นตอน Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที และเมื่อทำการสังเคราะห์จนครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide ทำการเปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้โดยใช้ 100 bp DNA ladder และตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดยใช้ UV transilluminator

จากนั้นทำการสกัดผลิตภัณฑ์ออกจากเจลเพื่อนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pET17b ที่เป็น Expression vector โดยทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต ใช้ insert DNA (ยีนโปรตีน GST26 และ GST28) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร, pET17b ปริมาตร 8 ไมโครลิตร, 10X ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยเทคนิค heat shock transformation โดยนำ DNA สายผสมที่ทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะเรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ที่มี competent cells ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำ Heat shock โดยแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เมื่อเสร็จให้ทำการเติมอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นจึงแบ่งเชื้อแบคทีเรียในหลอด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารแข็ง LB broth ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pET17b ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB broth ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายฉีดยานอบฆ่าเชื้อแล้วแตะ โคลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดพลาสมิดและนำมาทำการตรวจสอบขนาดของยีน GST ด้วยเทคนิค PCR

จากนั้นทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pET17b ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว LB-Ampicillin ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไป

เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ อยู่ในช่วง 0.6-0.9 จากนั้นทำการเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อกระตุ้นเซลล์แบคทีเรีย ให้มีการสร้างโปรตีน แล้วนำไปเขย่าต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ แบคทีเรียที่ได้เทใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร บั่นด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตกตะกอน เทสารละลายทิ้งโดยทำให้หมัดที่สุดเพื่อให้เหลือแต่ตะกอน เซลล์ ทำการรวบรวมเซลล์ที่ได้เติมสารละลาย Lysis buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนเซลล์ ละลายแล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicator เติม Ni-NTA Agarose (Thermo Fisher Scientific) ปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาผ่านคอลัมน์ ทำการแยกโปรตีนบริสุทธิ์ด้วย 250 มิลลิโมลาร์ imidazole buffer จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำการแยกด้วย 12.5% Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เพื่อตรวจสอบขนาด ของโปรตีน และนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้ไปหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford assay แล้วจึงเก็บตัวอย่างโปรตีนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2.8 การศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์ของโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส

ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส ประเมิน จากการทำงานของเอนไซม์ในการทำให้ GSH จับกับ 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) โดย วัด ค่าดูดกลืนแสงของด้วยเครื่อง UV max microplate reader ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ วัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 340 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 10 จากนั้นในการทดสอบจะทำ ทั้งหมด 5 ปฏิกิริยา ได้แก่ 1.) น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 2.) 1X Phosphate buffer saline (1X PBS), pH 6.5 ผสมใน CDNB ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ GSH ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ใช้เป็นค่า blank 3.) 1X PBS, pH 6.5 ผสมใน CDNB ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ GSH ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ บ่ม 5 นาที ก่อนใส่ FgGST ใช้เป็นค่า positive control 4.) 1xPBS, pH 6.5 ผสม ใน CDNB ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ GSH ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ บ่ม 5 นาที ก่อนใส่ rSmekGST1 5.) 1xPBS, pH 6.5 ผสมใน CDNB ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ GSH ความ เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ บ่ม 5 นาที ก่อนใส่ rSmekGST2 แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณของ CDNB ที่เข้าจับกับ GSH ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมของโปรตีน

2.9 วิธีการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (mRNA) ของ กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส บนเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค *In Situ* Hybridization

สำหรับการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (mRNA) ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ใช้ตัวติดตาม (Probe) ที่สังเคราะห์จาก

Forward primer GST1: 5'-GTAGCGCGTATTGGTGTGGGTATA-3'

Reverse primer GST1: 5'-CGACATTTTTATTAGCACAAATCATAGGTG-3'

และ Forward primer GST2: 5'-TTCACGCAATGGCTTGTGGGCAT-3'

Reverse primer GST2: 5'-GCTGGCAGTGTTAAAATGCCGTTG-3'

Probe ที่ได้ถูกติดฉลากด้วย Digoxigenin (DIG) สำหรับขั้นตอนการเตรียม Probe มีดังต่อไปนี้ ทำ PCR ที่ประกอบด้วย 10X i Taq™ plus buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, PCR DIG Labeling Mix (Roche, Germany) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ i-Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่หลอด PCR ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เริ่มจากขั้นตอน Denature แยกสาย DNA กลี๋ยวกู่ให้เป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มสาย DNA เป้าหมาย 35 รอบ โดยเริ่มที่ขั้นตอน Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที และเมื่อทำการสังเคราะห์จนครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide ทำการเปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้โดยใช้ 100 bp DNA ladder และตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดยใช้ UV transilluminator จากนั้นทำการสกัด PCR product เพื่อให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PCR clean-up Gel extraction (NucleoSpin, Germany) แล้วทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต นำ DNA Probe GST1 และ DNA Probe GST2 ที่ทำการสกัดให้บริสุทธิ์แล้วไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัด Nanodrop บันทึกค่าดูดกลืนแสงไว้

สไลด์พยาธิ *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์, 5 สัปดาห์ และระยะตัวเต็มวัย นำมาผ่านสารต่างๆ ดังนี้ Toluene 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง, 100% Ethanol 3 นาที จำนวน 2 ครั้ง, 95% Ethanol 3 นาที จำนวน 2 ครั้ง, Distilled water 2 นาที และ 1X (Tris-NaCl-EDTA; TNE) 5 นาที ซับสารแล้วใช้ปากกาวงรอบบริเวณเนื้อเยื่อ เตรียม Proteinase K 12 ไมโครลิตร ใน 1X TNE 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดให้ทั่วเนื้อเยื่อ เข้า incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นซับสารออกแล้วหยด 2X (Sodium Chloride/ Sodium Citrate; SSC) ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ซับสารออกหยด 0.5 M EDTA ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จึงหยด 2X SSC ทิ้งไว้ 5 นาที ต่อมาเตรียม Formaldehyde 37% 20 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1.98 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 5 นาที แช่ในน้ำกลั่น นาน 5 นาที แช่กรดอะซิติก 20% เย็น 20 วินาที แช่ในน้ำกลั่น นาน 5 นาที จากนั้นเตรียม Formamide 1 มิลลิลิตร ใน 20X SSC 400 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยดให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ เอาเข้า incubate 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเตรียม Hybridization buffer โดยใช้สารต่างๆ ดังนี้ 50% Deionized Formamide 500 ไมโครลิตร, 50% Dextran Sulfate (w/v) 100 ไมโครลิตร, 50X Denhardt's Solution (Sigma) 20 ไมโครลิตร, 20X SSC 200 ไมโครลิตร, 10 mg/ml Salmon Sperm DNA (Invitrogen) 25 ไมโครลิตร และใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร ใส่ DNA Probe GST26 หรือ DNA Probe GST28 โดยคำนวณให้มีความเข้มข้นของ DNA Probe เท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อ 1 สไลด์เนื้อเยื่อ ผสมให้เข้ากันแล้วนำ Hybridization buffer ที่เตรียมเสร็จไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แชน้ำแข็งทันที 1 นาที จึงหยดให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ นำเข้า incubate 42 องศาเซลเซียส โดยแยกกล่องเพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างสไลด์ที่ไม่มี DNA Probe กับมี DNA Probe และแยกสไลด์ระหว่างที่มี DNA Probe แต่ต่างชนิดกัน ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นหยด 2X SSC ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วแช่ใน 2X SSC ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที, 1X SSC ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที, 0.5X SSC ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และ 1X Buffer I นาน 5 นาที หยด Buffer II (Blocking solution) ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเตรียม Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments Sigma 1 ไมโครลิตร ใน Buffer II 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยดให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ นำเข้า incubate 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แช่ใน Buffer I นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และหยด Buffer III ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเตรียม NBT/BCIP Stock solution 20 ไมโครลิตร ใน Buffer III 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยดให้ทั่วบริเวณ โดยจะเตรียมและหยดในห้องมืด เอาเข้า incubate 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง เช็คสีของเนื้อเยื่อว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ หากยังไม่เปลี่ยนแปลงให้เจือจาง NBT/BCIP Stock solution 10 เท่า หรือ 2 ไมโครลิตร ใน Buffer III 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยดให้ทั่วบริเวณ เอาเข้า incubate 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อเอาออกจาก incubate ให้สังเกตสีของเนื้อเยื่อแล้วจึงหยด 1X TE Buffer ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อเพื่อหยุดปฏิกิริยา โดยทิ้งไว้ 15 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที, 0.5% Bismarck brown Y 5 นาที และแช่น้ำกลั่น 5 นาที เพื่อล้างส่วนเกินของสี 0.5% Bismarck brown Y จากนั้นตากสไลด์ให้แห้งจึงหยด Permount แล้วใช้ cover slip ปิด รอให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ SmekGST1 และ SmekGST2 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ 789 bp และ 654 bp ตามลำดับ เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekGST1 มีขนาดลำดับกรดอะมิโน 218 กรดอะมิโน ทำนายน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 3) และเมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekGST2 มีขนาดลำดับกรดอะมิโน 211 กรดอะมิโน ทำนายน้ำหนักโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4) โดยตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงรหัสเริ่มต้นการแปลรหัส (Translation) ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน (ATG) และรหัสหยุดการแปลรหัสให้เป็นลำดับกรดอะมิโน (TAA)

```
52 GTAGCGCGTATTGGTGTGGGTATATATACGATATTCGTTGGACAAGTCTCGA
104 ATAAGGTTACTTAGTCATGGCTCCGATACTCGGCTATTGGAAAATTAAGGGC
      M A P I L G Y W K I K G      12
156 CTTGTACAACCCACTAGACTTCTTTTGGGAATATCTTGGAGAAGAATATGAAG
      L V Q P T R L L L E Y L G E E Y E      29
208 AGCGTTTGTACGAACGCAATGAAGGTGATGCATGGCGAAACGAAAAATTAA
      E R L Y E R N E G D A W R N E K F K      47
260 ATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCTTATTATATTGACGGTGATGTTAAA
      L G L E F P N L P Y Y I D G D V K      64
312 TTGACACAATCCATGGCCATCATACTGCTTACATAGCTGACAAGCACAATGT
      L T Q S M A I I R Y I A D K H N M      81
364 TGGGAGGTTGCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTACAATGCTTGAAGGAGCAGT
      L G G C P K E R A E I T M L E G A V      99
416 TTCGGATATTAGATCTGGTGTTCAGAAATTGCATATAATAAAGACTTTGAA
      S D I R S G V S R I A Y N K D F E      116
468 ACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAACAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCG
      T L K V D F L N K L P E M L K M F      133
520 AAGATCGTTTATGCCATAAAACATATTTAAATGGTGATCGTGTAACCCATCC
      E D R L C H K T Y L N G D R V T H P      151
572 TGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTATAACATGGACCGAAAAG
      D F M L Y D A L D V V L Y M D R K      168
624 TGCTTGGATGCGTTTCCAAAACACTAGTTTGTTTAAAAAACGTATTGAAAATA
      C L D A F P K L V C F K K R I E N      185
676 TACCACAAATCAATGAGTACTTGAGATCTAGTAAGTATATAGAATGGCCTCT
      I P Q I N E Y L R S S K Y I E W P L      203
728 GCAGGGCTGGCAAGCTACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCGAAAATAAT
      Q G W Q A T F G G G D H P P K *      218
780 ATTAATTGTTGTTTGGTAAACATTATTTATCACCTATGATTGTGCTAAATA
789 AAAATGTCG
```

ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekGST1 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงรหัสเริ่มต้น (ATG) และรหัสหยุด (TAA)



```

52  TTCACGCAATGGCTTGTGGGCATGTTAAGGTTATCTATTTCAACGGACGTGG
      M A C G H V K V I Y F N G R G 15
104  ACGTGCCTGAACCAATCCGCATGATTCCTTGTGGCAGCGGGAATAGAATACGAA
      R A E P I R M I L V A A G I E Y E 32
156  GATGAAAGGATGAAATCCAAGATTGGCCATAAAATCAAACCAACCATACCTG
      D E R I E F Q D W P K I K P T I P 49
208  GAGGAAGATTGCCCATCGTGAAAATCACAGACAAAAGGGGAGATGTGAAAAC
      G G R L P I V K I T D K R G D V K T 67
260  GATGTCAGAAAAGTTTGGCTATTGCACGATTTATAGCGAGAAAACATAACATG
      M S E S L A I A R F I A R K H N M 84
312  ATGGGCGAAACAGACGAGGAGTATTTATATCGTAGAGAAGATGATTTGGCCAAG
      M G E T D E E Y Y I V E K M I G Q 101
364  TCGATGATGTTGAAAGTGAATACCATAAGACTCTCATGAAGCCACCAGAAGA
      V D D V E S E Y H K T L M K P P E E 119
416  AAGAGACAGAATCGCCAAGGAGATATTGAATGGTAAAGTTCCCATTCTTCTTT
      R D R I A K E I L N G K V P I L L 136
468  CAAGCAATTTGTGAAACCCATAAAGAGTCTACAGGTAATCTGACTGCCGGAA
      Q A I C E T L K E S T G N L T A G 153
520  ATAAGATCACCTAGCTGATGTGGTCTGATTTGCTGCCATTGATCATATAAC
      N K I T L A D V V L I A A I D H I T 171
572  TGATTTGGATAAGGAATTTTGGACTGGCAAGTATCCCTGAGATTACAAACAT
      D L D K E F L T G K Y P E I H K H 188
624  CGAAAACATTTATTGGCCACTTCACCTAAACTGGCGAAAATACTTATCAGAGA
      R K H L L A T S P K L A K Y L S E 205
654  GACATGCAACGGCATTTTAACTGCCAGC
      R H A T A F * 211

```

ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekGST28 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงรหัสเริ่มต้น (ATG) และรหัสหยุด (TAA)

สำหรับโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน SmekGST1 และ SmekGST2 ที่ทำนายโดยโปรแกรม I-TASSER (Zhang, 2008) ซึ่งโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน SmekGST1 ประกอบด้วย 4  $\beta$ -stands (แถบสี่เหลี่ยม), 9  $\alpha$ -helix (แถบสี่ชมพู) และ turns ของ peptide backbone (แถบสีน้ำเงิน) มี TM-score =  $0.91 \pm 0.06$  และ RMSD =  $2.8 \pm 2.0 \text{ \AA}$  (ภาพที่ 5) และโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน SmekGST2 ประกอบด้วย 4  $\beta$ -stands (แถบสี่เหลี่ยม), 8  $\alpha$ -helix (แถบสี่ชมพู) และ turns ของ peptide backbone (แถบสีน้ำเงิน) มี TM-score =  $0.85 \pm 0.08$  และ RMSD =  $3.4 \pm 2.4 \text{ \AA}$  (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 โครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน SmekGST1 ประกอบด้วย  $\beta$ -stands (แถบสีเหลือง),  $\alpha$ -helix (แถบสีชมพู) และ turns ของ peptide backbone (แถบสีน้ำเงิน) ที่ทำนายโดยโปรแกรม I-TASSER



ภาพที่ 6 โครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน SmekGST2 ประกอบด้วย  $\beta$ -stands (แถบสีเหลือง),  $\alpha$ -helix (แถบสีชมพู) และ turns ของ peptide backbone (แถบสีน้ำเงิน) ที่ทำนายโดยโปรแกรม I-TASSER

การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของ SmekGST1 จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับ GST26 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* (SmekGST26\_Y07663.1) ที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Vichasri-Grans et al., 1997) พยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ *S. japonicum* (SjGST26\_AAB59203.1), *S. masoni* (SmGST26\_AAA29888.1), *Fasciola gigantica* (FgGST\_AAD23997.1), *Fasciola hepatica* (Fh1GST26mu\_P56598.2, Fh47GST26mu\_P31670.3, Fh7GST26mu\_P31671.3 และ Fh51GST26mu\_P30112.3) และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของ GST จากโฮสต์ ได้แก่ *Mus musculus* (หนู) (MusGSTmu1\_NP\_034488.1) และ *Homo sapiens* (มนุษย์) (HsGSTmu1\_CAA30821.1) โดยใช้โปรแกรม Clustal W และ BioEdit ในการวิเคราะห์ พบว่า ในโมเลกุลของ GST มีตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยาที่สำคัญ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยากับ GSH หรือที่เรียกว่าตำแหน่ง GSH binding site (G-site) และตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) ที่เรียกว่า Substrate binding site (H-site) สำหรับ rSmekGST1 จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีตำแหน่งที่ประกอบกันขึ้นเป็นตำแหน่ง G-site ประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ Tyrosine ตำแหน่งที่ 7 (Tyr7), Tryptophan ตำแหน่งที่ 8 (Trp8), Arginine ตำแหน่งที่ 35 (Arg35), Tryptophan ตำแหน่งที่ 41 (Trp41), Lysine ตำแหน่งที่ 45 (Lys45), Asparagine ตำแหน่งที่ 54 (Asn54), Leucine ตำแหน่งที่ 55 (Leu55), Glutamine ตำแหน่งที่ 67 (Gln67), Serine ตำแหน่งที่ 68 (Ser68) และ Aspartic acid ตำแหน่งที่ 101 (Asp101) ซึ่งในลำดับกรดอะมิโนที่ทำการเปรียบเทียบดังกล่าวพบตำแหน่งของ G-site ที่มีความเหมือนกันทุกตำแหน่ง และพบตำแหน่งที่เป็น key residue ของ Lock and key 1 ตำแหน่ง ได้แก่ Phe52 ซึ่งเป็นตำแหน่งให้ GSH กับสารตั้งต้นเข้าจับกันเพื่อทำปฏิกิริยา สำหรับตำแหน่งของ H-site จะเป็นตำแหน่งที่มีความผันแปรกับสารตั้งต้นที่อาจแสดงถึงกลุ่มของ GST (ภาพที่ 7) และผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน SmekGST1 จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และ GST26 ของพยาธิชนิดต่างๆ และโฮสต์ ดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ที่มีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal omega พบว่า ยีนของ SmekGST1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับยีน GST26 ของ *S. mekongi* (SmekGST26\_Y07663.1 และ SmekGST26\_CAA68944.1) ที่มีการรายงานในก่อนหน้านี้ (Vichasri-Grans et al., 1997) ที่ 99.08 ทั้งในลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน สำหรับความใกล้เคียงของยีน GST 26 กิโลดาลตัน ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* ที่ต่างชนิด พบว่า มีความใกล้เคียงกับยีน GST 26 กิโลดาลตัน ของ *S. japonicum* (SjGST26\_M14654.1 และ AAB59203.1) มากที่สุด โดยมีความเหมือนในลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ 90.49 เปอร์เซ็นต์ และ 90.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของ SmekGST2 จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับ GST28 ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ *S. japonicum* (SjGST\_AAC00518.1 และ SjGST28\_AAA29890.1), *S. masoni* (SmGST28\_AAC60508.1), *S. haematobium* (ShGSTmu28\_XP\_012797862.1 และ ShGST28\_AAA29892.1), *S. bovis* (SbGST28\_AAA29893.1), *F. gigantica* (FgGSTsigma\_AFX98103.1), *Opisthorchis viverrini* (OvGST\_AAL23713.1) และ *Clonorchis sinensis* (CsGST\_ABA56496.1) และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของ GST จากโฮสต์ ได้แก่ *M. musculus* (MusGSTsigma\_AK020246.1) และ *H. sapiens* (HsGSTsigma\_BAA25545.1) โดยใช้โปรแกรม Clustal W และ BioEdit ในการวิเคราะห์ พบว่า SmekGST2 จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีตำแหน่งที่ประกอบกันขึ้นเป็นตำแหน่ง G-site ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ Tyr10, Phenylalanine ตำแหน่งที่ 11 (Phe11), Trp41, Proline ตำแหน่งที่ 54 (Pro54), Ser73 และ Asp105 (ภาพที่ 8) และผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน SmekGST2 จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และ GST28 ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์ ดังตารางที่ 3 และตารางที่ 4 ที่มีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal omega พบว่า ยีนของ SmekGST2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับยีน GST 28 กิโลดาลตัน ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* ที่ต่างชนิด พบว่า มีความใกล้เคียงกับยีน GST 28 กิโลดาลตัน ของ *S. japonicum* (SjGST\_AF044411.1 และ SjGST\_AAC00518.1) มากที่สุดที่ 94.47 เปอร์เซ็นต์ และ 91.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SmekGST1 และ SmekGST2 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับ กลุ่มพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. ได้แก่ *S. mekongi* (SmekGST26\_CAA68944.1) ที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Vichasri-Grans et al., 1997) *S. japonicum* (SjGST26\_AAB59203.1, SjGST28\_AAB03573.1 และ SjGST28\_AAA29890.1), *S. masoni* (SmGST26\_AAA29888.1), *S. haematobium* (ShGSTmu28\_XP\_012797862.1) และ *S. bovis* (SbGST28\_AAA29893.1) โดยใช้โปรแกรม Clustal W และ BioEdit ในการวิเคราะห์ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ GST26 และ GST28 มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 9) ซึ่งมีความสอดคล้องกับตารางที่ 5 และตารางที่ 6 ที่แสดงการเปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ SmekGST1 และ SmekGST2 มีความแตกต่างกันที่ 41.97 เปอร์เซ็นต์ และ 42.65 เปอร์เซ็นต์

	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	
SmekGGST1	MAPILGYWKIKGIVQPTRLILLEYLGGEEYERLYER---	NEGDAWRNEKFKLGLFPPNLYYYIDGDVKLTQSMALIRYI	75						
SmekGGST26_CAA68944.1	.....S.....	.....D...K...K...E.....	75						
SJGST26_AAB59203.1	..KF...V.....	..H.E.T...A.D...I...S.D.....	75						
SmGST26_AAA29888.1	FgGST_AAD23997.1	..PAK...R.O.V.....	75						
Fh47GST26mu_P31670.3	.....PAK...IR.A.V.F.....	.....H.G...DDREK.LGD.NM.DL.....	75						
Fh51GST26mu_P30112.3	.....PAK...R.O.V.....	.....H.G...DDREK.MS.NM.DL.....	75						
Fh7GST26mu_P31671.3	.....PAK...R.O.V.F.....	.....H.G...DDREK.FGD.NM.DL.....	75						
Fh1GST26mu_P56598.2	.....PAK...R.O.V.....	.....H.G...DDREK.LGD.NM.DL.....	75						
HsGSTmu1_CAA30821.1	.....PM...D.R.AHAI.....	.....TDSS...KK.TMGDAPD.DRSQ.L.....	74						
MusGGSTmu1_NP_034488.1	.....PM...NVR.TH.I.M.....	.....TDSS.D.KR.TMGDAPD.DRSQ.L.....	80						
	**	*	*	*	*	*	*	*	**
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$
SmekGGST1	ADKHNMIGGCPKERAETIMLEGAVSDIRSGVSRIVANKD	FEIKYDFTLNKLEMLKMPEDRLCHKTYLNGDRVTHPD	FML	155					
SmekGGST26_CAA68944.1	.....SG.....	.....S.....L.Y.....S.....	155						
SJGST26_AAB59203.1	.....A.....	.....S.....L.M.L.....EY.....	155						
SmGST26_AAA29888.1	.....G...ST.E...RVS.I...	.....AM.L.M.FV.VC.PN.EV.G.Y.KE.KT.WS.F.GDRQ...	155						
FgGST_AAD23997.1	.....G...TT.E...R.S.I...	.....AM.L.I.FG.VC.PK.EV.EEYVKE.KT.WS.F.GDRH...	155						
Fh47GST26mu_P31670.3	.....G...TT.E...R.S.I...	.....AM.L.M.FV.VC.PK.EV.G.Y.KE.TT.WSNP.GDRH...	155						
Fh51GST26mu_P30112.3	.....G...ST.E...R.S.I...	.....AM.L.I.FGLFC.PK.E.G.Y.KG.TT.WS.F.GDRQ...	155						
Fh7GST26mu_P31671.3	.....G...I.ST.E...RVS.I...	.....AV.L.O.L.S.DPK.Q.EGY.KD.TTM.WS.F.GKNP...	154						
Fh1GST26mu_P56598.2	.....R...LC.ETEE.KIRVDI...	.....NUTM.NHMDLGM.C.PE.K.PKY.EE...K.LYSEF...	160						
HsGSTmu1_CAA30821.1	.....R...HID.ETEE.IRADIV...	.....NG.M.T.MOLIMC.P...KO.PE...KTI...KM.LYSEF...	160						
MusGGSTmu1_NP_034488.1									
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$
SmekGGST1	YDALDVLVMDRKCLDAFPKLVCFKRIENIPQINEYLRSSKYIEWPLOGWQATFGGDBPPK	----	218						
SmekGGST26_CAA68944.1	.....PM.....	.....A...DK.K...A.....	218						
SJGST26_AAB59203.1	.....SO...NE...S...C...DL...	.....KN.N.R.K...D.....	218						
SmGST26_AAA29888.1	.....E...CIR.LAPO...ND...KE.S...	.....DL.K.KA.ME.E.F.K.NS.T.S...	218						
FgGST_AAD23997.1	.....ET.SIR.LAPE...E...KE.S...	.....AL.K.KA.ME.KRP.K.N.A.S.A...	218						
Fh47GST26mu_P31670.3	.....E...CIR.LAPO...ED...KE.S...	.....DL.K.KA.ME.E.F.K.NS.I.S...	218						
Fh51GST26mu_P30112.3	.....E...CIR.LAPO...D...KE.S...	.....DL.K.K.K.MK.ERF.K.HS.TSP...	218						
Fh7GST26mu_P31671.3	.....E...AIR.LEPE...H.N.QQ.MS...	.....AL.S.KA.ME.NRF.K.N.H.Q...	221						
Fh1GST26mu_P56598.2	.....V...LHRIFEP...N.KD.I.S.F...	.....GLEK.SA.MK.RFLFR.VFSKM.VW.NK...	218						
HsGSTmu1_CAA30821.1	.....I...OYRMFEP...N.RD.LA.F...	.....GLKK.SA.MK.R.AT.IFSKM.HWSNK...	218						
MusGGSTmu1_NP_034488.1									

ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบของลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGGST1 กับยีน GST ของพยาธิไป่ชนิดต่างๆ และโฮสต์

	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$
SmekGST2	-MACGHVKVIVFNCRGRAPIRMIIVAAGIEYEDERIEFQDWFKIPFGGRPIVKITDKRG--DVKIMSESLAIARF					
SjGST_AAC00518.1	.....L.....	V.F.....	.....	.....	.....	.....
ShGSTmu28_XP_012797862.1	-TGD.I.....	S.T.....	S.....	A.NH--H.W.V.....	.....	.....
ShGST28_AAA29892.1	M.TGD.I.....	S.T.....	VN.....	A.NH--H.W.V.....	.....	.....
SjGST28_AAA29890.1	.....L.....	V.F.....	.....	.....	.....	.....
SbGST28_AAA29893.1	-TGD.I.....	S.T.....	S.....	A.NH--H.W.L.....	.....	.....
SmGST28_AAC60508.1	-GE.I.....	S.T.....	VD.....	A.V.DH--H.W.L.....	.....	.....
FgGSTsigma_AFX98103.1	-DKQ.Y.LW..QF.....	LL.TC.VKF..YQFTMDQ..I.....	L.....	V.LLDV.GPD--KLRRYQ..M.....	L..	77
CsGST_ABA56496.1	-KBR.CALF..V.....	A..V.H.NDVSF..V.FDKQQ.SER.HEF..K..LIQVREESQEK..YT..M.....	V..	M.....	V..	78
OvGST_AAL23713.1	-SSEKY.IY..F.A.G.V..V.H..V.PPD.....	PAD..A.R.SEV..M.VLOVLEPDTPEK.SV..M.....	M..	M..	M..	79
MusGSTsigma_BAB32037.1	---MPNY.LL..M.....	I..Y.FAYLD.K...H...QA.....	L..F.KI.VLEVEG----	L.IHQ.....	Y..	70
	**	*	*	*	*	*
	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$
SmekGST2	LARKNMMSETEDEEYIVKEMIGQVDDYESKYHKYIMKPPEDDRIAKEIINGKVPILLQAICEITLKESTGNLTAGNKIT					
SjGST_AAC00518.1	.....D..D.....	I.....	E..D.....	I.....	KEK.S.....	V.D.V..
ShGSTmu28_XP_012797862.1	M.K..H..G..E..N..L..AE.L.HE.Y.....	E..KOK.I.....	V..DI..S..A..K.AV.D.V..	157		
ShGST28_AAA29892.1	M.K..H..G..E..N..L..AE.L.HE.Y.....	E..KOK.I.....	V..DI..S..A..K.AV.D.V..	158		
SjGST28_AAA29890.1	.....D..D.....	I.....	E..I.....	KEK.S.....	V.D.V..	152
SbGST28_AAA29893.1	M.K..H.....	N..L..E.L.HE.....	E..KOK.T.....	V..DI..S..A..K.AV.D.V..	157	
SmGST28_AAC60508.1	M.K..H.....	S..L..AE..HE.....	Q..KEK.T.....	V..NM..S..G...K.AV.D.V..	157	
FgGSTsigma_AFX98103.1	L..QFK.....	LI.RI..ECE.LYREMYTIFRT.QG.K.AKI..FKENNG.T..KIVS.S.E.S.G.KV..R..	157			
CsGST_ABA56496.1	L..KHYS..DSE.....	KI.R...CA.LDKEFVNFFAREDKKEVLEKAMG.E..R..EL..KS.S.G.KFV..V..	158			
OvGST_AAL23713.1	L..RFDL.DC.E.G..NI.R...ECE..FKEFRSFLS.ADAKEQVL..AMEYS..K..NL.SQS.S..A.KFV..C.V..	159				
MusGSTsigma_BAB32037.1	LTKNTDLA.K.AL.QCQDAVVDTL..*	FM.LFFWAEEKD-QDLKE.MFN.L.THOA.R..KOLDTY.GDK--EWF.I..YV..	150			
	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$
SmekGST2	LADVLLIAADHITDIDKKEFLTKGYPEIHKGRKHLIATSFKLAKYLSERBATAP					
SjGST_AAC00518.1	.....S.....	.....	.....	.....	.....	211
ShGSTmu28_XP_012797862.1	L..V..V.....	EN.S.R.....	D.A..P..	211		
ShGST28_AAA29892.1	L..V..V.....	EN.S.R.....	D.A..P..	212		
SjGST28_AAA29890.1	.....S.....	.....	.....	.....	.....	206
SbGST28_AAA29893.1	L..V..V.....	EN.S.R.....	D.A..P..	211		
SmGST28_AAC60508.1	L..V..V..G.....	EN.S.R.....	N.P..P..	211		
FgGSTsigma_AFX98103.1	G..LP.FTTTLF.VMEITVPG..EQ.F.KL.EFH.S.PTNCSE..KK.AK.P..	211				
CsGST_ABA56496.1	G..IC.M.SMENERRA.POL.KT..STILLAEAEVFKVL..D..VKT.PE.VL	212				
OvGST_AAL23713.1	G..LC.L.CL.VDKA.P...KE...KLEW.EAV.KEE...D.IKS.PD.P..	213				
MusGSTsigma_BAB32037.1	W..FYWDICSTLIV.KEGL.D-I...KLVSL.N-KVQAI.AISAWILK.PQ.KL	204				

ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบของลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST2 กับยีน GST ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์

```

SmGST26_AAA29888.1  ---MAPKFGYWKVKGLVQPTRLLLEHLEETVEERAVDRNEIDAWSNDKFKLGEFPNLPYVIDGD FKLQTSMAIIRVIAD 77
SjGST26_AAB59203.1  ---S.IL...I...Y...K...HL.E.D.G.K.R.K.E...V... 77
SmekGST1            ---.IL...I...Y.G.E...L.E...G...R.E...V... 77
SmekGST26_CAA68944.1 ---.IL...I...Y.G.E...L.E...G...R.E...V... 77
ShGSTmu28_XP_012797862.1  MTGDHI.VI.FNGR.RAESI.MT.VAAGVN.DERISFQDWPKIKPTIPGGR.PAVKIIDNHGHVKWME.L.A.M.K 80
SbGST28_AAA29893.1  MTGDHI.VI.FNGR.RAESI.MT.VAAGVN.DERISFQDWPKIKPTIPGGR.PAVKIIDNHGHVKWME.L.A.M.K 80
SmekGST2            MACGHV.VI.FNGR.RAE.I.MI.VAAGIE.DERIEFQDWPKIKPTIPGGR.PIVKITDKRGDVKTMSE.L.A.F.R 80
SjGST28_AAB03573.1  MACGHV.LI.FNGR.RAE.I.MI.VAAGVEF.DERIEFQDWPKIKPTIPGGR.PIVKITDKRGDVKTMSE.L.A.F.R 80
SjGST28_AAA29890.1  -----V.LI.FNGR.RAE.I.MI.VAAGVEF.DERIEFQDWPKIKPTIPGGR.PIVKITDKRGDVKTMSE.L.A.F.R 75
    *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *:: *::
KHNMLGACPKERAESMLEGAVLDIRMGVLRVRIANKEYETLKVDFLNKLPGRLMKMFEDRLSNKTYLNGNCVTHPDFMLYD 157
    G...G...Y.S...S.DF...S...EM...CH...DH... 157
    .G...T...S.S.S...DF...EM...CH...DR... 157
    .GSG...T...S.S.S...DF...EM...CH...DR... 157
    .H.M.GTEE.YYNVEK.I.QAE.LEHEYYKTLMKP.E.KQ.IIKEILN--KVPVLL.IICESIKASTGKLAVG.KVTIA 159
    .H.M.ETDE.YYNVEK.I.Q.E.LEHEVHKTLMKP.E.KQ.ITKEILN--KVPVLL.IICESLKASTGKLAVG.KVTIA 159
    .M.ETDE.YYIVERMI.Q.D.VESKYHKTLMKPPE.RDRIAKEILN--KVPILLQAI CETLKESTGNL.AGNKITLA 159
    .M.DTDD.YYI.ERMI.Q.E.VESEYHKTLMKPPE.KE.ISKEILN--KVPILLQAI CETLKESTGNL.VG.KVTIA 159
    .M.DTDD.YYI.ERMI.Q.E.VESEYHKTLIKPPE.KE.ISKEILN--KVPILLQAI CETLKESTGNL.VG.KVTIA 154
**:* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
ALDVLVMDSQCLNEFPKIVSFKKIEDLPOIKVYNSSRVIKWPLOQGWDATEFGGDTPEPK 218
    .PM.DA...C...R.AI...DK.K.K.A...Q...H... 218
    .RK.DA...C...R.NI...NE.R.K.E...Q...H... 218
    .RK.DA...C...R.NI...NE.R.K.E...Q...H... 218
D.VLIAVI.--HVTDLD.EFLTGYP.IHKHRE.I.A.PRLAKY.SDRA.PF----- 211
D.VLIAVI.--HVTDLD.EFLTGYP.IHKHRE.I.A.PRLAKY.SDRA.PF----- 211
DVLIAAI.--HITDLD.EFLTGYP.IHKHR.HL.AT.PKLAKY.SERH.AF----- 211
DVLIASI.--HITDLD.EFLTGYP.IHKHR.HL.AT.PKLAKY.SERH.AF----- 211
DVLIASI.--HITDLD.EFLTGYP.IHKHR.HL.AT.PKLAKY.SERH.AF----- 208
    : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

ภาพที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบของลำดับการต่อมีโนของยีน SmekGST1, SmekGST2 และยีน GST ของพยาธิใบไม้เลือด Schistosoma spp.

ตารางที่ 1 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GST1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพายริซินินิตต่างๆ และโฮสต์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. HsGSTmu1_X08020.1	100										
2. MusGSTmu1_NM_010358.5	69.92	100									
3. SmGST26_M31106.1	46.32	44.24	100								
4. SjGST26_M14654.1	45.33	45.33	79.06	100							
5. SmekGST1	45.03	45.12	78.92	90.49	100						
6. SmekGST26_Y07663.1	44.65	44.72	78.64	89.85	99.08	100					
7. Fh1GST26mu_A00993.1	47.21	46.29	57.14	57.95	56.29	56.17	100				
8. Fh47GST26mu_M77681.1	50.86	47.71	57.61	56.94	57.96	57.38	71.06	100			
9. Fh7GST26mu_M77680.1	51.40	47.29	57.51	56.40	58.01	57.28	69.69	87.72	100		
10. FgGST_AF112567.1	53.27	51.14	61.34	59.97	60.43	60.12	73.30	90.57	92.89	100	
11. Fh51GST26mu_M77682.1	51.14	47.81	58.44	57.03	57.95	57.71	68.79	87.50	89.47	97.26	100



ตารางที่ 2 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับการถอดมีโนของฮีน GST1 กับลำดับการถอดมีโนของพยอิชนิดต่างๆ และไฮสส์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. HsGSTmu1_CAA30821.1	100										
2. MusGSTmu1_NP_034488.1	77.98	100									
3. SmGST26_AAA29888.1	41.31	40.38	100								
4. SjGST26_AAB59203.1	43.19	43.66	79.82	100							
5. SmekGST1	44.13	44.13	81.65	90.37	100						
6. SmekGST26_CAA68944.1	44.13	44.13	80.73	89.45	99.08	100					
7. Fh1GST26mu_P56598.2	50.47	48.11	54.84	59.91	56.68	56.22	100				
8. Fh47GST26mu_P31670.3	49.30	46.95	55.50	57.34	56.42	55.96	76.96	100			
9. Fh7GST26mu_P31671.3	50.23	46.95	57.34	57.80	57.80	57.34	75.58	84.86	100		
10. FgGST_AAD23997.1	51.17	47.89	57.34	57.80	56.42	55.96	76.04	86.24	90.37	100	
11. Fh51GST26mu_P30112.3	49.77	46.95	56.88	57.80	56.88	56.42	76.04	87.16	89.45	94.95	100

ตารางที่ 3 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GST2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาลิซินชนิดต่างๆ และโฮสต์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. MusGSTsigma_AK020246.1	100											
2. HsGSTsigma_D82073.1	73.45	100										
3. FgGSTsigma_JX157879.1	43.51	42.75	100									
4. SmekGST2	43.48	43.92	50.92	100								
5. SjGST_AF044411.1	43.87	42.62	50.22	94.47	100							
6. SjGST28_M26914.1	44.88	43.48	50.38	94.29	99.48	100						
7. SmGST28_S71584.1	42.82	42.58	50.51	75.99	73.40	73.58	100					
8. SbGST28_M87800.1	44.11	42.80	50.22	75.88	73.26	73.75	91.03	100				
9. ShGST28mu_XM_012942408.1	45.27	46.10	50.94	75.16	75.79	76.17	91.67	98.43	100			
10. ShGST28_M87799.1	44.00	42.38	50.15	74.46	72.11	72.69	89.76	98.08	99.69	100		
11. CsGST_DQ179264.1	39.10	39.94	47.59	48.93	48.63	48.88	47.08	48.32	50.00	47.41	100	
12. OVGST_AY057838.1	40.31	39.95	52.65	50.92	50.88	50.20	50.38	50.13	54.09	49.94	56.91	100

ตารางที่ 4 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับการถอดมีโนของยีน GST2 กับลำดับการถอดมีโนของพยาศิชนิดต่างๆ และไฮสค์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. MusGSTsigma_BAB32037.1	100											
2. HsGSTsigma_BAA25545.1	80.40	100										
3. SmekGST2	32.16	31.66	100									
4. SjGST_AAC00518.1	31.66	31.16	91.94	100								
5. SjGST28_AAA29890.1	32.14	31.63	91.75	99.51	100							
6. SmGST28_AAC60508.1	32.16	30.15	75.36	76.30	77.18	100						
7. ShGSTmu28_XP_012797862.1	30.15	29.15	74.41	75.36	76.70	90.05	100					
8. ShGST28_AAA29892.1	30.15	29.15	74.41	75.36	76.70	90.05	100	100				
9. SbGST28_AAA29893.1	30.15	28.64	76.30	76.78	78.16	91.94	97.16	97.16	100			
10. FgGSTsigma_AFX98103.1	30.65	29.15	41.23	41.23	41.75	44.08	43.60	43.60	43.60	100		
11. CsGST_ABA56496.1	29.65	30.65	36.97	39.34	39.81	38.39	39.34	39.34	38.86	40.76	100	
12. OVGST_AAL23713.1	30.65	30.65	41.23	44.08	45.15	45.97	45.50	45.50	44.55	47.87	54.25	100

ตารางที่ 5 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GST1 และ GST2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. SmGST26_M31106.1	100								
2. SjGST26_M14654.1	79.06	100							
3. SmekGST1	78.92	90.49	100						
4. SmekGST26_Y07663.1	78.64	89.85	99.08	100					
5. ShGST28mu_XM_012942408.1	42.38	40.38	41.67	42.49	100				
6. SbGST28_M87800.1	39.94	39.00	40.29	40.93	98.43	100			
7. SmekGST2	43.75	40.99	41.97	42.31	75.16	75.88	100		
8. SjGST28_M26914.1	44.20	42.55	42.94	43.58	76.17	73.88	94.29	100	
9. SjGST28_U58012.1	45.09	42.79	43.53	45.14	76.26	73.94	94.60	99.48	100

ตารางที่ 6 ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับการถอดหมีโนของยีน GST1 และ GST2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

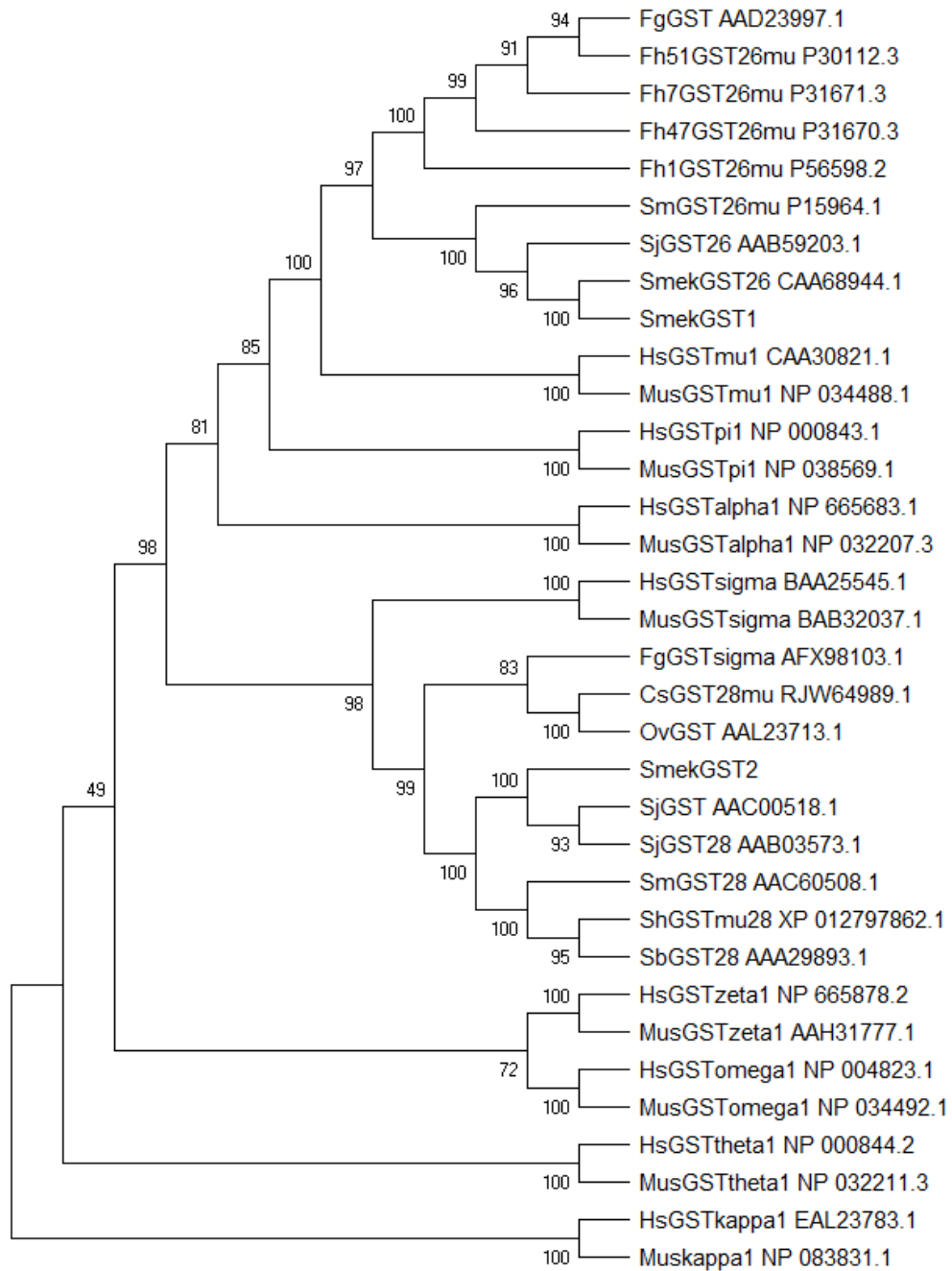
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. SmGST26_AAA29888.1	100								
2. SjGST26_AAB59203.1	92.42	100							
3. SmekGST1	75.36	77.25	100						
4. SmekGST26_CAA68944.1	74.41	76.30	90.05	100					
5. ShGSTmu28_XP_012797862.1	76.30	77.73	91.94	97.16	100				
6. SbGST28_AAA29893.1	41.23	41.71	44.08	43.60	43.60	100			
7. SmekGST2	37.91	41.23	42.65	43.60	42.18	45.02	100		
8. SjGST28_AAB03573.1	41.23	44.55	45.97	45.50	44.55	47.87	57.08	100	
9. SjGST28_AAA29890.1	26.60	29.06	26.60	27.09	27.09	25.62	24.63	22.17	100

## 2. ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

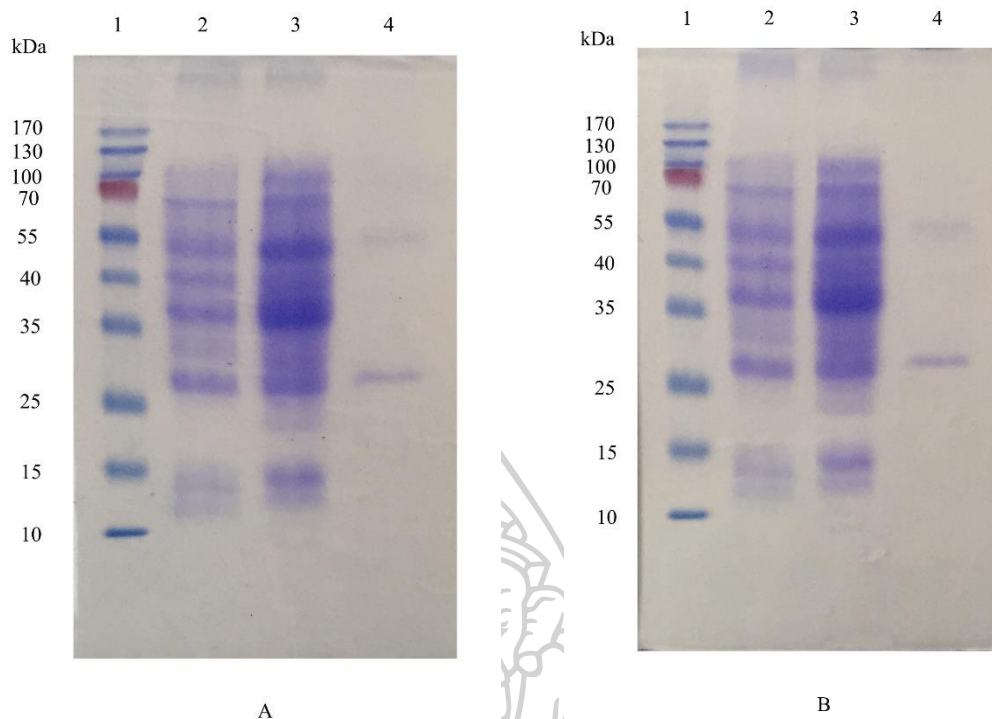
การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโน GST1 และ GST2 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์ โดยใช้โปรแกรม MEGA-X และทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของกรดอะมิโน GST26 และ GST28 ใน class ต่างๆ ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของกรดอะมิโน GST26 และ GST28 ใน class ต่างๆ ของพยาธิ *Schistosoma* spp., *Fasciola* spp., *C. sinensis*, *O. viverrini* และโฮสต์ ได้แก่ *M. musculus* และ *H. sapiens* พบว่า ยีน SmekGST1 ถูกจัดอยู่ใน GST26 กลุ่ม mu โดยมีความใกล้ชิดกับ GST26 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* (SmekGST26\_CAA68944.1) และพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (SjGST26\_AAB59203.1) ถึงแม้ว่าจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม mu แต่ก็ยังมีความแตกต่างจาก GST26 ของ *M. musculus* (MusGSTmu1\_NP\_034488.1) และ *H. sapiens* (HsGSTmu1\_CAA30821.1) สำหรับยีน SmekGST2 ถูกจัดอยู่ใน GST28 กลุ่ม mu โดยมีความใกล้ชิดกับ GST28 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (SjGST\_AAC00518.1) ถึงแม้ว่าจะถูกจัดให้อยู่ใน GST28 กลุ่ม mu แต่มีความแตกต่างจาก GST28 ของ *M. musculus* (MusGSTsigma\_BAB32037.1) (ภาพที่ 10)

## 3. ผลการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนรีคอมบิแนนท์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส จากพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*

จากการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีน GST ที่ถูกผลิตโดยการนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ pET17b เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเป็นตัวช่วยในการผลิตเพิ่มปริมาณโปรตีน GST ให้มีปริมาณมากพอ และทำการสกัดโปรตีน GST ที่เซลล์แบคทีเรียสามารถผลิตได้ออกมาทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ จากนั้นจะถูกนำมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน GST บริสุทธิ์ที่ได้โดยวิธี SDS-PAGE และทำการย้อมด้วยสี coomassie blue เพื่อให้แสดงแถบน้ำหนักของโปรตีนชัดเจนขึ้น พบว่า rSmekGST1 มีขนาดน้ำหนักโปรตีนที่ 27 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 11) และพบว่าโปรตีนของ rSmekGST2 มีน้ำหนักโปรตีนที่ 28 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 ผลการทำเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มของโปรตีน GST1 และ GST2 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์ โดยโปรแกรม MEGA-X



ภาพที่ 11 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีน rSmekGST1 และ rSmekGST2 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

(A) การย้อมด้วยสี Coomassie blue ของโปรตีน rSmekGST1 โดยแถว 1 คือน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน แถวที่ 2 พลาสมิด pET17b ในเซลล์ *E. coli* BL21 strain แถวที่ 3 คือ พลาสมิด pET17b-SmekGST1 ในเซลล์ *E. coli* BL21 strain แถวที่ 4 คือ ผลผลิตโปรตีน rSmekGST1

(B) การย้อมด้วยสี Coomassie blue ของโปรตีน rSmekGST2 โดยแถว 1 คือน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน แถวที่ 2 พลาสมิด pET17b ในเซลล์ *E. coli* BL21 strain แถวที่ 3 คือ พลาสมิด pET17b-SmekGST2 ในเซลล์ *E. coli* BL21 strain แถวที่ 4 คือ ผลผลิตโปรตีน rSmekGST2

#### 4. ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ของโปรตีนกลูตาไรโอน เอส ทรานเฟอร์ส

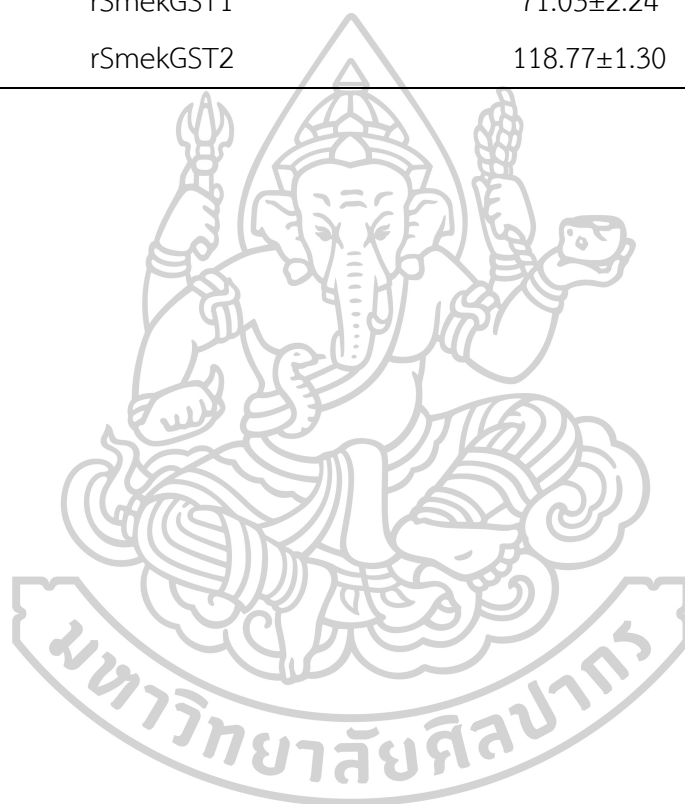
ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (Specific activity) ของเอนไซม์โปรตีน GST ที่ได้จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* คำนวณจากอัตราการเกิดผลผลิตของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาหนึ่ง ซึ่งก็คือปริมาณของสาร CDNB ที่จับกับ GSH ที่วัดจากค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ภายในเวลา 10 นาที จากการศึกษาในครั้งนี้ อัตราการเกิดของผลผลิต CDNB ที่จับกับ GSH ที่แสดงเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปในเวลา 10 นาที ของ เอนไซม์ SmekGST1 และ SmekGST2 แสดงในรูปกราฟที่ 12 และรูปกราฟที่ 13 ตามลำดับ และค่าความชันจากการเกิดปฏิกิริยาได้ถูกนำมาคำนวณ โดยได้ค่า Specific

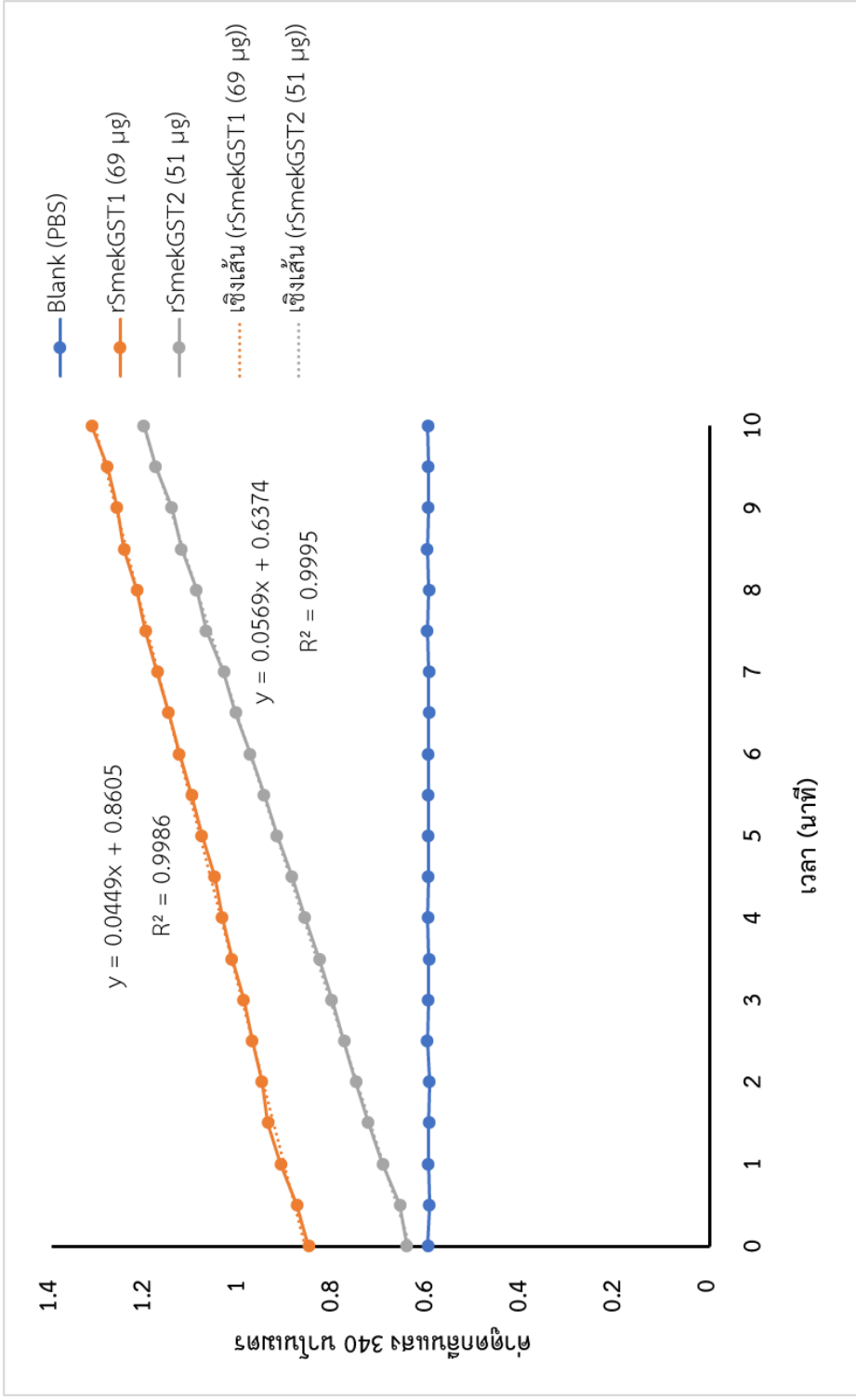


activity ของ rSmekGST1 และ rSmekGST2 มีค่าเท่ากับ  $71.03 \pm 2.24$  และ  $118.77 \pm 1.30$  ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

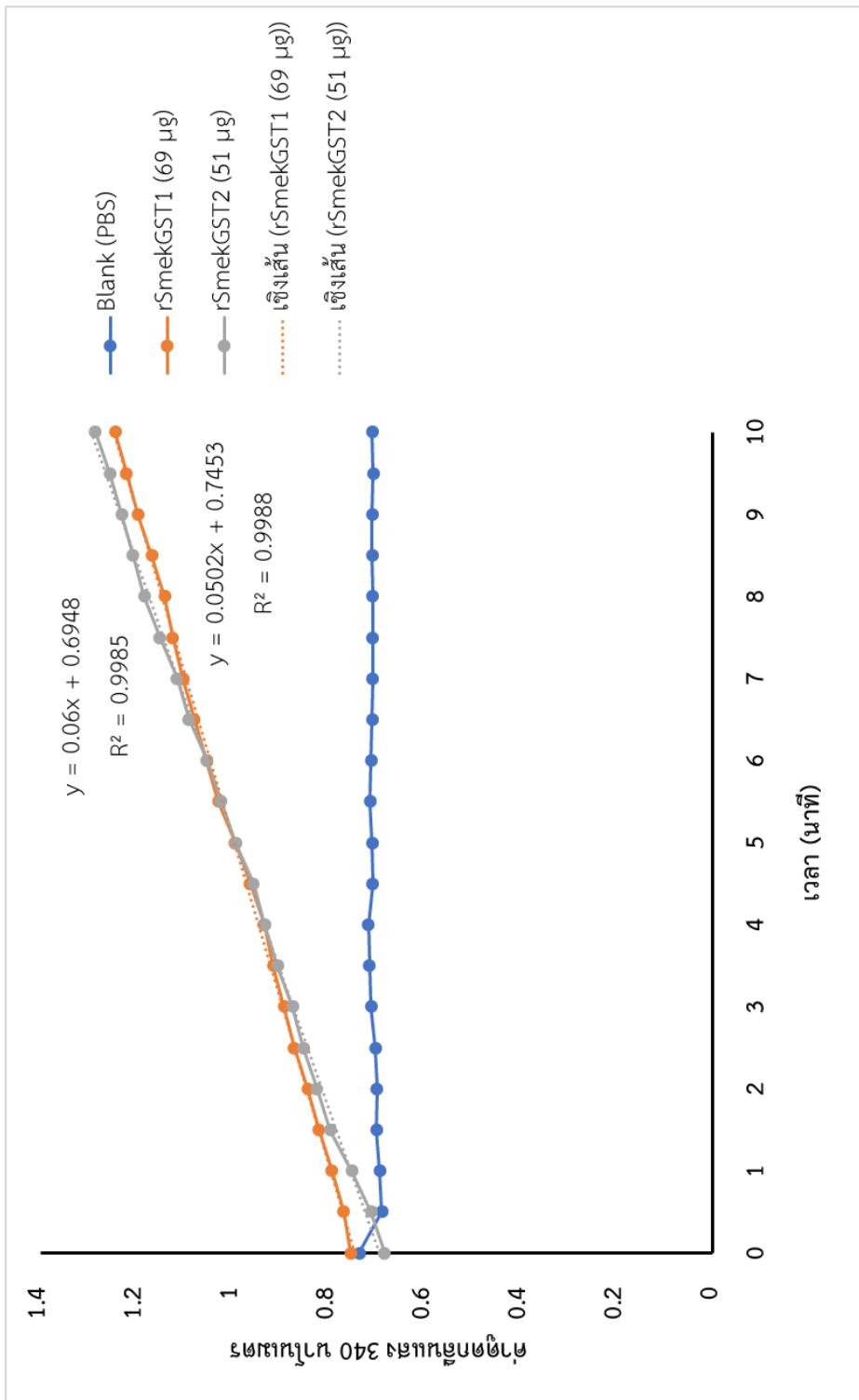
ตารางที่ 7 แสดงค่าการทำงานของเอนไซม์ของโปรตีน GST ที่ได้จากพยาธิ *S. mekongi*

	Specific activity (ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน)
rFgGST26	$9.41 \pm 0.67$
rSmekGST1	$71.03 \pm 2.24$
rSmekGST2	$118.77 \pm 1.30$





ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของ rSmekGST (ซ้ำที่ 1)



ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่ากิจกรรมการทำงานของ rSmekGST (ซ้ำที่ 2)

## 5. ผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอของกลูตาไธโอน เอสทรานเพอเรส บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* โดยวิธี *In Situ* Hybridization

การศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ GST บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค ISH โดยใช้ Probe ต่อยีน SmekGST1 และ SmekGST2 ผลการศึกษาพบว่า ยีน SmekGST1 และ SmekGST2 มีการกระจายตัวที่ตำแหน่งต่างๆ บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในระยะต่างๆ ดังนี้

### 5.1 พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์

ผลการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ระยะ 3 สัปดาห์ เนื้อเยื่อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการใส่ Probe ของยีน GST ไม่พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG โดยพบเนื้อเยื่อติดสีน้ำตาลของ Bismarck brown Y ที่ติดบนเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นสีที่ใช้สำหรับการ Counter stain บนเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 12B) ขณะที่เนื้อเยื่อที่ทำการใส่ Probe ของ SmekGST1 และ SmekGST2 พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG บนเนื้อเยื่อของเซลล์พาราคีมา และในส่วนของ tegument พบที่มีการติดสีม่วงอ่อนที่บริเวณไซโทพลาสซึม ส่วนของทางเดินอาหาร (Caecum) ไม่พบสัญญาณการติดสีของ DIG (ภาพที่ 12C และภาพที่ 12D)

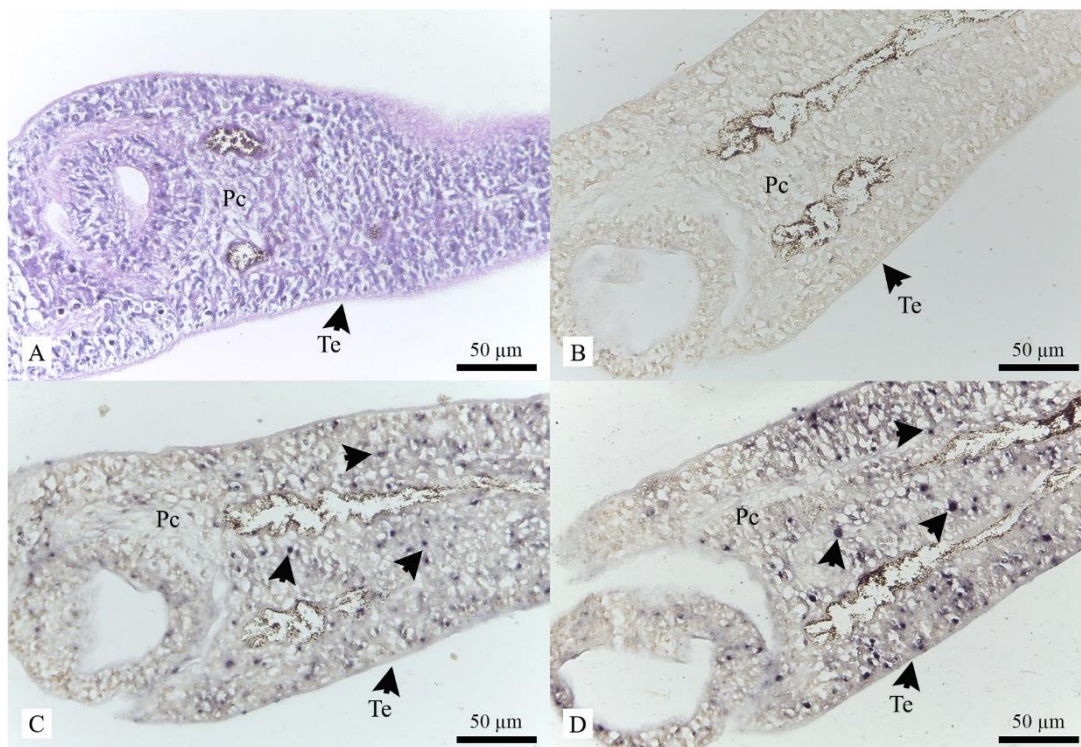
### 5.2 พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์

ผลการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ระยะ 5 สัปดาห์ เนื้อเยื่อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการใส่ Probe ของยีน GST ไม่พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG แต่พบการติดสีน้ำตาลบนเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นสีของ Bismarck brown Y ที่ใช้สำหรับการ Counter stain บนเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 13B) ในขณะที่เนื้อเยื่อกลุ่มที่ทำการใส่ Probe ของ SmekGST1 และ SmekGST2 พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG บนเนื้อเยื่อที่เป็นส่วนของเซลล์พาราคีมา อีกทั้งยังพบการติดสีม่วงอ่อนบริเวณไซโทพลาสซึมของ tegument แต่เนื้อเยื่อพยาธิในระยะนี้จะพบสัญญาณการติดสีของ DIG บนเซลล์พาราคีมา สังเกตได้ว่าบริเวณตำแหน่งทางเดินอาหารของพยาธิไม่พบสัญญาณการติดสีของ DIG (ภาพที่ 13C และภาพที่ 13D)

### 5.3 พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย

ผลการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ระยะตัวเต็มวัย เนื้อเยื่อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการใส่ Probe ของยีน GST พบการติดสีน้ำตาลของ Bismarck brown Y บนเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นสีที่ใช้ในการ Counter stain บนเนื้อเยื่อ แต่ไม่พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG (ภาพที่ 14B)

ในขณะที่กลุ่มเนื้อเยื่อที่ทำการใส่ Probe ของ SmekGST1 และ SmekGST2 พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG บนเนื้อเยื่อ ในส่วนของเซลล์พาราเรงคิมาจะติดสีม่วง และบริเวณไซโทพลาสซึมของ tegument (ภาพที่ 14C และภาพที่ 14D)



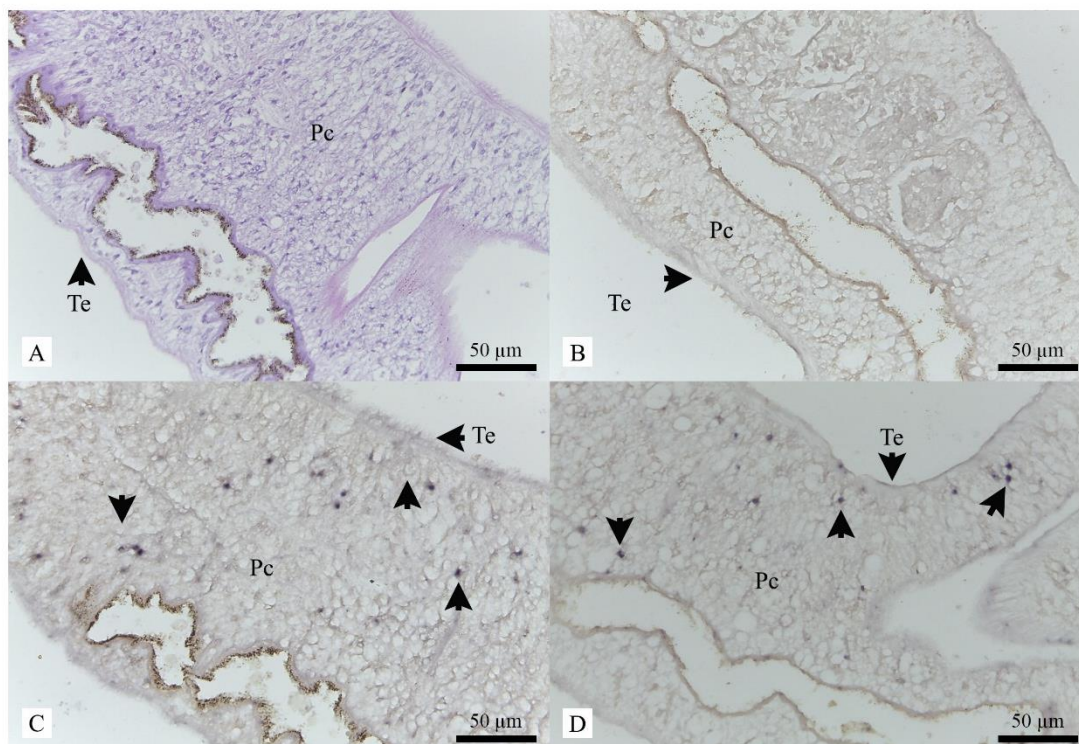
ภาพที่ 14 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาราเรงคิมา

(A) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ ที่มีการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

(B) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ เป็นกลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อติดสีน้ำตาลของ Bismarck brown Y ไม่พบการติดสีม่วงของ DIG

(C) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ แสดงภาพการติดสีม่วงของ Probe ต่อ SmekGST1 โดยพบการติดสีม่วงที่เซลล์พาราเรงคิมา และ tegument ของพยาธิติดสีม่วงอ่อนขณะที่ไม่พบการติดสีม่วงที่ทางเดินอาหารของพยาธิ

(D) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ แสดงภาพการติดสีม่วงของ Probe ต่อ SmekGST2 โดยพบการติดสีม่วงที่เซลล์พาราเรงคิมา และ tegument ของพยาธิติดสีม่วงอ่อนขณะที่ไม่พบการติดสีม่วงที่ทางเดินอาหารของพยาธิ



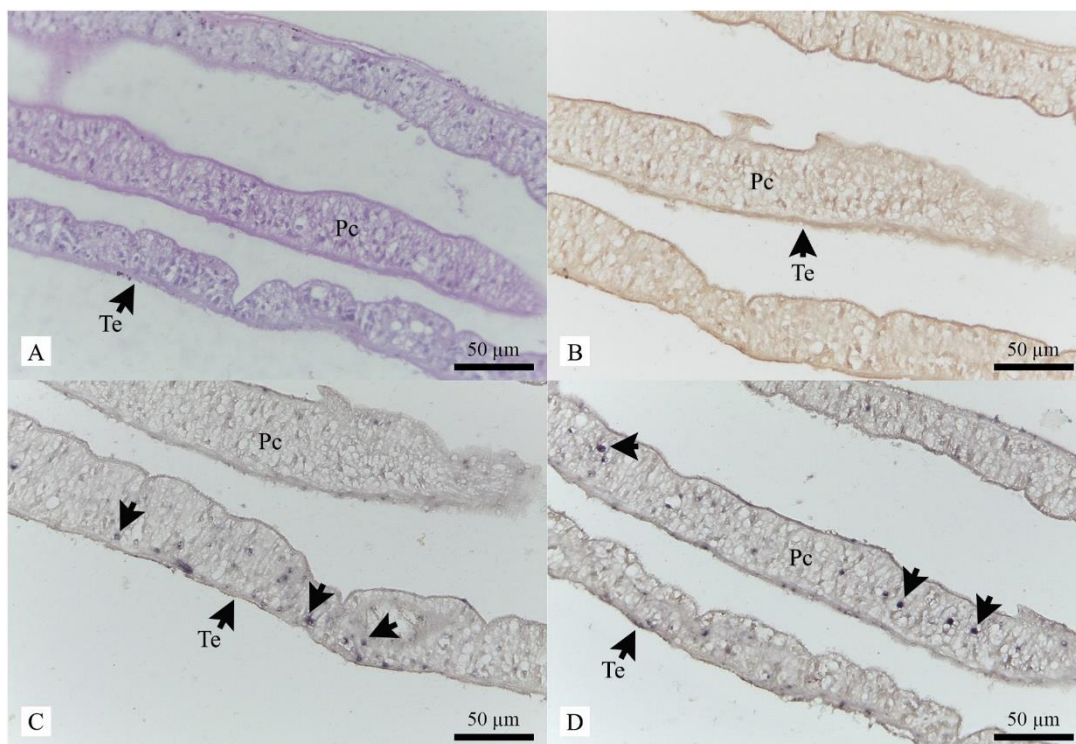
ภาพที่ 15 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาราเรคิมมา

(A) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ ที่มีการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

(B) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ เป็นกลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อติดสีน้ำตาลของ Bismarck brown Y ไม่พบการติดสีม่วงของ DIG

(C) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ แสดงภาพการติดสีม่วงของ Probe ต่อ SmekGST1 โดยพบการติดสีม่วงที่เซลล์พาราเรคิมมา และ tegument ของพยาธิติดสีม่วงอ่อน ขณะที่ไม่พบการติดสีม่วงที่ทางเดินอาหารของพยาธิ

(D) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ แสดงภาพการติดสีม่วงของ Probe ต่อ SmekGST2 โดยพบการติดสีม่วงที่เซลล์พาราเรคิมมา และ tegument ของพยาธิติดสีม่วงอ่อน ขณะที่ไม่พบการติดสีม่วงที่ทางเดินอาหารของพยาธิ



ภาพที่ 16 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาราเรคิมา

(A) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย ที่มีการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

(B) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย เป็นกลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อติดสีน้ำตาลของ Bismarck brown Y ไม่พบการติดสีม่วงของ DIG

(C) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย แสดงภาพการติดสีม่วงของ Probe ต่อ SmekGST1 โดยพบการติดสีม่วงที่เซลล์พาราเรคิมา และ tegument ของพยาธิติดสีม่วงอ่อน

(D) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย แสดงภาพการติดสีม่วงของ Probe ต่อ SmekGST2 โดยพบการติดสีม่วงที่เซลล์พาราเรคิมา และ tegument ของพยาธิติดสีม่วงอ่อน

## 6. วิจัยรณัผลการทดลอง

### 6.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน rSmekGST1 และ rSmekGST2

จากผลการเปรียบเทียบความคล้ายของยีน rSmekGST1 และ rSmekGST2 ในลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal W และ Clustal omega พบว่า SmekGST1

มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ GST26 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* (SmekGST26\_Y07663.1 และ SmekGST26\_CAA68944.1) ที่มีการรายงานในก่อนหน้านี โดยมีความเหมือนทั้งในลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ 99.08 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความใกล้เคียงกับ GST ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* ชนิดต่างๆ พบว่า มีความใกล้เคียงกับ 26 กิโลดาลตัน GST ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (SjGST26\_M14654.1 และ SjGST26\_AAB59203.1) มากที่สุด โดยมีความเหมือนในลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ 90.49 เปอร์เซ็นต์ และ 90.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง G-site พบว่า GST 26 กิโลดาลตัน ของพยาธิใบไม้ทั้ง *Schistosoma* spp. และ *Fasciola* spp. มีตำแหน่งของกรดอะมิโนทั้ง 10 ตำแหน่งที่ประกอบกันเป็นตำแหน่ง G-site ดังกล่าว มีความเหมือนกันในทุกตำแหน่ง นอกจากนี้ Kim et al. (2007) รายงานว่ากรดอะมิโน Phenylalanine ตำแหน่งที่ 51 (Phe51) ของ GST 26 กิโลดาลตันของพยาธิ *Paragonimus westermani* เป็นตำแหน่ง “key residue” ใน lock and key motif ซึ่งที่ตำแหน่งดังกล่าว พบว่าในลำดับกรดอะมิโนเดียวกันของ SmekGST1 และพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. ก็ปรากฏว่าเป็นกรดอะมิโน Phenylalanine เช่นเดียวกัน สำหรับการศึกษความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่า SmekGST1 จัดอยู่ในกลุ่มของ GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน ในกลุ่ม mu โดยคล้ายกับ GST26 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* (SmekGST26\_Y07663.1 และ SmekGST26\_CAA68944.1) และพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (SjGST26\_M14654.1 และ SjGST26\_AAB59203.1)

สำหรับ SmekGST2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงมากที่สุดกับ GST28 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (SjGST\_AF044411.1 และ SjGST\_AAC00518.1) ที่ 94.47 เปอร์เซ็นต์ และ 91.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากผลการเปรียบเทียบความเหมือนในตำแหน่ง G-site พบว่ากรดอะมิโนทั้ง 6 ตำแหน่ง มีความเหมือนกันในทุกตำแหน่งของ GST 28 กิโลดาลตัน จากพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ สำหรับการศึกษความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่า SmekGST2 จัดอยู่ในกลุ่มของ GST ขนาด 28 กิโลดาลตัน ในกลุ่ม mu โดยคล้ายกับ GST28 ของ พยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (SjGST\_AF044411.1 และ SjGST\_AAC00518.1)

สำหรับการเปรียบเทียบความคล้ายกันของ SmekGST1 และ SmekGST2 พบว่า ลำดับของนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนมีความคล้ายกันเพียง 41.97 เปอร์เซ็นต์ และ 42.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งรายงานของ Henkle et al. (1990) แสดงให้เห็นว่าความเหมือนกันของ GST 28 กิโลดาลตัน กับ GST 26 กิโลดาลตัน ของ *S. mansoni* มีความเหมือนกันเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ และแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์ของโปรตีน GST28 จาก *S. mansoni* ไม่สามารถจับกับรี



คอมบินแนนท์ของโปรตีน GST26 ของทั้ง *S. japonicum* และ *S. mansoni* แสดงให้เห็นว่าโปรตีน GST26 และ GST28 ปราศจากคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีต่อกัน และจากผลการเปรียบเทียบตำแหน่ง G-site ของทั้ง SmekGST1 และ SmekGST2 พบว่า มีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนในทุกตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า โปรตีน GST ทั้ง SmekGST1 และ SmekGST2 มีความแตกต่างกัน

#### 6.2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ rSmekGST1 และ rSmekGST2

รีคอมบินแนนท์โปรตีนของ SmekGST1 และ SmekGST2 สามารถทำปฏิกิริยากับ CDNB ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ GST โดยทั้ง 2 โปรตีน ได้แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่  $71.03 \pm 2.24$  และ  $118.77 \pm 1.30$  ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แสดงว่าโปรตีนทั้ง 2 มีคุณสมบัติทางชีวเคมี ในการทำปฏิกิริยาให้กลูตาไรโอนจับกับสารตั้งต้น CDNB ได้สารผลิตภัณฑ์ ค่าความจำเพาะของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีความใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ GST ที่ได้จากพยาธิชนิดต่างๆ ที่มีการรายงานผล ได้แก่ Tudyka and Skerra (1997) ได้รายงานค่ากิจกรรมของเอนไซม์รีคอมบินแนนท์โปรตีนของ GST จากพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ที่  $2.08 \pm 0.06$  ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน และ Kalita et al. (2017) ได้รายงานค่ากิจกรรมของเอนไซม์รีคอมบินแนนท์โปรตีนของ GST จากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantiga* ที่  $68.54 \pm 2.02$  ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน เป็นต้น

#### 6.3 การศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ GST บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค *In Situ* Hybridization

จากผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ GST บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในระยะ 3 สัปดาห์, 5 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย ด้วยเทคนิค ISH พบว่าเนื้อเยื่อพยาธิทั้ง 3 ระยะ มีการแสดงออกของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 ในตำแหน่งที่คล้ายกัน โดยพบว่าเซลล์พาราเรคิมามีการแสดงออกของยีนมากที่สุด โดยพบการติดสีทั้งที่นิวเคลียสและไซโทพลาสซึมส่วนของ tegument มีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 เช่นกัน แต่น้อยกว่า ส่วนเนื้อเยื่อพยาธิในระยะ 3 สัปดาห์ พบว่ามีการติดสีที่เข้มมากกว่าระยะอื่น สำหรับที่ตำแหน่งของทางเดินอาหารไม่พบการติดสี (ในระยะตัวเต็มวัยไม่มีผลการทดลองในส่วนของทางเดินอาหาร) จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า GST มีการแสดงออกในเซลล์พาราเรคิม่าของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ทั้ง 3 ระยะ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Henkle et al. (1990) , Trottein et al. (1990) และ Gobert et al. (1998) ที่ระบุว่าเซลล์พาราเรคิม่าของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* และ *S. mansoni* มีการปรากฏของโปรตีน GST ทั้ง 26 และ 28 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับรายงานของ Wijffels et al. (1992) ที่พบว่า GST จะถูกพบที่เซลล์พาราเรคิม่าของพยาธิตัวแบน *Fasciola* spp. เป็นส่วนมาก และจากรายงานของ Preyavichyapugdee (2007) พบว่า GST 26 กิโลดาลตัน

ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantiga* มีการปรากฏที่เซลล์พาราเรงคิมาเช่นเดียวกัน โดยมีการกระจายตัวของ GST ที่มากขึ้นแตกต่างกันในเซลล์พาราเรงคิมาของแต่ละเซลล์ โดยยังพบว่าแอนติบอดีต่อ GST 26 กิโลดาลตัน ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantiga* มีการทำปฏิกิริยาข้ามกับ GST ในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวแบบชนิดต่างๆ ได้แก่ *S. japonicum*, *S. mansoni*, *Cotylopholon cytolophorum*, *Paramphistomum cervi*, *Gigantocotyle explanatum* และ *Eurytrema pancreatum*

สำหรับผลที่พบการแสดงออกของ mRNA ของ GST ทั้ง 2 โมเลกุล ที่ชั้น tegument พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีความสอดคล้องกับรายงานของ Henkle et al. (1990) และ Liu et al. (1996) ที่พบว่าโปรตีน GST 26 และ 28 กิโลดาลตัน ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* และ *S. mansoni* มีปรากฏที่ชั้น tegument เช่นกัน โดยจะพบ GST 28 กิโลดาลตัน มากกว่า GST 26 กิโลดาลตัน แต่ผลดังกล่าวแตกต่างจากผลการศึกษาของ Porchet et al. (1994) และ Gobert et al. (1998) ที่ไม่พบการกระจายตัวของ GST ทั้ง 26 และ 28 กิโลดาลตัน ในชั้น tegument ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* และ *S. mansoni* แต่อย่างไรก็ตามในพยาธิตัวแบบชนิดอื่น พบว่ามีรายงานการปรากฏของ GST ที่ tegument ได้แก่รายงานของ Hong et al. (2002) ที่พบว่าโปรตีน GST 28 กิโลดาลตัน ของ *Clonorchis sinensis* มีการแสดงออกที่ tegument และรายงานของ Preyavichyapugdee (2007) ที่พบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน GST 26 กิโลดาลตัน ของ *F. gigantica* สามารถจับกับโปรตีน GST ของ tegumental protein โดยวิธี immunoblotting assay



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

#### 1. ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน SmekGST1 และ SmekGST2

ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST1 จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีความใกล้เคียงกับ GST 26 กิโลดาลตัน ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่มีการรายงานในก่อนหน้านี โดยมีความเหมือนในลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ 99.08 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับพยาธิใบไม้เลือดต่างชนิดกัน พบว่ามีความใกล้เคียงกับ GST ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* มากที่สุด โดยมีความเหมือนในลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ 90.49 เปอร์เซ็นต์ และ 90.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST1 จัดอยู่ใน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน ในกลุ่มของ mu โดยคล้ายกับ GST 26 กิโลดาลตัน ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum*

ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekGST2 จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีความใกล้เคียงกับ GST 28 กิโลดาลตัน ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* มากที่สุด โดยมีความเหมือนที่ 94.47 เปอร์เซ็นต์ และ 91.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่พบว่า SmekGST2 จัดอยู่ใน GST ขนาด 28 กิโลดาลตัน ในกลุ่ม mu โดยมีความใกล้เคียงกับ GST 28 กิโลดาลตัน พยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum*

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน SmekGST1 และ SmekGST2 สามารถสรุปได้ว่า ยีน rSmekGST1 และ rSmekGST2 มีความแตกต่างกัน ในลำดับของนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนที่ 41.97 เปอร์เซ็นต์ และ 42.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

#### 2. ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ rSmekGST1 และ rSmekGST2

รีคอมบิแนนท์โปรตีนของ SmekGST1 และ SmekGST2 ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ มีคุณสมบัติการเป็นเอนไซม์โดยสามารถทำปฏิกิริยาเคมีให้สารตั้งต้น CDNB จับกับกลูตาไรโอน เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ได้ และค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ SmekGST2 สูงกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ SmekGST1

### 3. การศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิค *In Situ Hybridization*

จากการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัว mRNA ของ SmekGST1 และ SmekGST2 บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิค ISH พบว่ามีการแสดงออกของ SmekGST1 และ SmekGST2 บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในทุกระยะ โดยพบการแสดงออกของยีน GST บริเวณไซโทพลาสซึม และนิวเคลียสของเซลล์พาราคีมา อีกทั้งยังสามารถพบการแสดงออกของยีน GST ได้ใน tegument แต่จะไม่พบการแสดงออกของยีน GST ในส่วนของทางเดินอาหารของพยาธิ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปว่า SmekGST1 และ SmekGST2 อยู่ในกลุ่มของ mu ซึ่งมีความคล้ายกับ GST ในกลุ่ม GST 26 กิโลดาลตัน และ 28 กิโลดาลตันของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. ตามลำดับ mRNA ของทั้งสองยีนมีการแสดงออกเหมือนกันที่พาราคีมา และ ชั้น tegument ของพยาธิ ระยะ ตัวอ่อน และ ตัวเต็มวัย สำหรับ rSmekGST1 และ rSmekGST2 มีความสามารถทางชีวเคมีที่สามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับสารตั้งต้น 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาเป็นวัคซีนต่อพยาธิ *S. mekongi* ต่อไปในอนาคต



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ชโลบล วงศ์สวัสดิ์. 2555. ปรสตีวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ธนถนการพิมพ์.
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิธี และ สนทยา ลิ้มมัทวาทิธี. 2554. ประโยชน์ทางการแพทย์ของกลูตาไทโอน และ สารที่กระตุ้นการสร้างกลูตาไทโอน. ไทยโภชนาการ. 1-16.
- ดวงเดือน ไกรลาศ. 2560. ปรสตีวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.
- นัฏฐกาล ลีลารุ่งระยับ และ ประสงค์ เทียนบุญพบ. 2550. กลูตาไทโอนและผลต่อสุขภาพ. คลินิกอาหาร และโภชนาการ. 1: 20-29.
- ปนัดดา ไยภักดี และ คณาพรรณ พจนาคม. 2547. ความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยาโดยใช้ จุลินทรีย์ 1: 15-26.
- มะนาว แสงเฟื่อง. 2558. การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของแอนติเจนที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยทาง ซีรัมวิทยาต่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- วิฑูรย์ ไวยนันท์ และ พีรพรรณ ตันอารีย์. 2546. ปรสตีวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ศักดิ์โสภการพิมพ์ กรุงเทพฯ.

### ภาษาอังกฤษ

- Aguayo, V., B. Valdes and A. M. Espino. 2018. Assessment of Fasciola hepatica glutathione S-transferase as an antigen for serodiagnosis of human chronic fascioliasis. *Acta Tropica*. 186: 41-49.
- Armstrong, R. N. 1997. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chemical Research in Toxicology*. 10: 2-18.
- Attwood, S. W., F. A. Fatih and E. S. Upatham. 2008. DNA-sequence variation among *Schistosoma mekongi* populations and related taxa; phylogeography and the current distribution of Asian schistosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2: e200-e200.
- Awad, W. S., A. K. Ibrahim and F. A. Salib. 2009. Using indirect ELISA to assess different antigens for the serodiagnosis of Fasciola gigantica infection in cattle, sheep and

- donkeys. **Research in Veterinary Science**. 86: 466-471.
- Bergquist, N. R. and D. G. Colley. 1998. Schistosomiasis Vaccine: Research to Development. **Parasitology Today**. 14: 99-104.
- Colley, D. G., A. L. Bustinduy, W. E. Secor and C. H. King. 2014. Human schistosomiasis. **Lancet (London, England)**. 383: 2253-2264.
- De Moraes, J., C. Nascimento, L. F. Yamaguchi, M. J. Kato and E. Nakano. 2012. Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**. 132: 222-227.
- Farahnak, A. and J. Barrett. 2001. **Comparative Glutathione S-Transferases (GSTs) Inhibition Assay in the Whole Extract of Fasciola hepatica and Sheep Liver Tissue by Hexachlorophene**.
- Fukuhara, K., S. Phompida, S. Insisiengmay, M. Kirinoki, Y. Chigusa, S. Nakamura, H. Matsuda and H. Ishikawa. 2011. Analysis of the effectiveness of control measures against Schistosoma mekongi using an intra- and inter-village model in Champasak Province, Lao PDR. **Parasitology International**. 60: 452-459.
- Gobert, G. N., D. J. Stenzel and D. P. McManus. 1998. Immunolocalisation of the glutathione S-transferases, GST-26 and GST-28, within adult Schistosoma japonicum. **International Journal for Parasitology**. 28: 1437-1443.
- Han, Y.-H., S.-J. Hong, H.-K. Cheong and Y. J. Chung. 2013. Crystal structures of 26kDa Clonorchis sinensis glutathione S-transferase reveal zinc binding and putative metal binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 438: 457-461.
- Henkle, K. J., K. M. Davern, M. D. Wright, A. J. Ramos and G. F. Mitchell. 1990. Comparison of the cloned genes of the 26- and 28-kilodalton glutathione S-transferases of Schistosoma japonicum and Schistosoma mansoni. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 40: 23-34.
- Hirose, Y., J. Matsumoto, M. Kirinoki, M. Shimada, Y. Chigusa, S. Nakamura, M. Sinuon, D. Socheat, V. Kitikoon and H. Matsuda. 2007. Schistosoma mekongi and Schistosoma japonicum: Differences in the distribution of eggs in the viscera of mice. **Parasitology International**. 56: 239-241.

- Hong, S.-J., J.-R. Yu and S.-Y. Kang. 2002. Ultrastructural localization of 28 kDa glutathione S-transferase in adult *Clonorchis sinensis*. **The Korean Journal of Parasitology**. 40: 173-176.
- Johnson, K. A., F. Angelucci, A. Bellelli, M. Hervé, J. Fontaine, D. Tsernoglou, A. Capron, F. Trottein and M. Brunori. 2003. Crystal Structure of the 28 kDa Glutathione S-Transferase from *Schistosoma haematobium*. **Biochemistry**. 42: 10084-10094.
- Kalita, J., R. Shukla, H. Shukla, K. Gadhawe, R. Giri and T. Tripathi. 2017. Comprehensive analysis of the catalytic and structural properties of a mu-class glutathione s-transferase from *Fasciola gigantica*. **Scientific Reports**. 7: 17547.
- Kim, T. Y., J.-Y. Lee, T. I. Kim, K. H. Moon, S.-Y. Kang and S.-J. Hong. 2007. Molecular cloning and enzymatic characterization of a class mu glutathione S-transferase of *Paragonimus westermani*. **Parasitology Research**. 101: 1225-1231.
- Kumar, S. and P. K. Trivedi. 2018. Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. **Frontiers in Plant Science**. 9.
- Liu, J. L., J. Fontaine, A. Capron and J. M. Grzych. 1996. Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology**. 113: 377-391.
- Liu, S. X., G. C. Song, Y. X. Xu, W. Yang and D. P. McManus. 1995. Anti-fecundity immunity induced in pigs vaccinated with recombinant *Schistosoma japonicum* 26kDa glutathione-S-transferase. **Parasite Immunology**. 17: 335-340.
- Matsumoto, J., M. Sinuon, D. Socheat and H. Matsuda. 2002. **The first reported cases of canine schistosomiasis Mekongi in Cambodia.**
- Mbanefo, E. C., T. Kumagai, Y. Kodama, T. Kurosaki, R. Furushima-Shimogawara, M. S. Cherif, S. Mizukami, M. Kikuchi, N. T. Huy, N. Ohta, H. Sasaki and K. Hirayama. 2015. Immunogenicity and anti-fecundity effect of nanoparticle coated glutathione S-transferase (SjGST) DNA vaccine against murine *Schistosoma japonicum* infection. **Parasitology International**. 64: 24-31.
- McTigue, M. A., D. R. Williams and J. A. Tainer. 1995. Crystal Structures of a Schistosomal Drug and Vaccine Target: Glutathione S-Transferase from *Schistosoma japonicum* and its Complex with the Leading Antischistosomal Drug Praziquantel. **Journal of Molecular Biology**. 246: 21-27.

- Moatamedi Pour, L., A. Farahnak, M. Molaei Rad, T. Golmohamadi and M. Eshraghian. 2014. Activity Assay of Glutathione S-Transferase (GSTs) Enzyme as a Diagnostic Biomarker for Liver Hydatid Cyst in Vitro. **Iranian Journal of Public Health**. 43: 994-999.
- Moraes, J. d., C. Nascimento, P. O. M. V. Lopes, E. Nakano, L. F. Yamaguchi, M. J. Kato and T. Kawano. 2011. Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**. 127: 357-364.
- Morrison, C. A., T. Colin, J. L. Sexton, F. Bowen, J. Wicker, T. Friedel and T. W. Spithill. 1996. Protection of cattle against Fasciola hepatica infection by vaccination with glutathione S-transferase. **Vaccine**. 14: 1603-1612.
- Ohmae, H., M. Sinuon, M. Kirinoki, J. Matsumoto, Y. Chigusa, D. Socheat and H. Matsuda. 2004. Schistosomiasis mekongi: from discovery to control. **Parasitology International**. 53: 135-142.
- Paumi, C. M., B. G. Ledford, P. K. Smitherman, A. J. Townsend and C. S. Morrow. 2001. Role of Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1) and Glutathione S-Transferase A1-1 in Alkylating Agent Resistance: KINETICS OF GLUTATHIONE CONJUGATE FORMATION AND EFFLUX GOVERN DIFFERENTIAL CELLULAR SENSITIVITY TO CHLORAMBUCIL VERSUS MELPHALAN TOXICITY. **Journal of Biological Chemistry**. 276: 7952-7956.
- Porchet, E., A. McNair, A. Caron, J. P. Kusnierz, K. Zemzoumi and A. Capron. 1994. Tissue expression of the Schistosoma mansoni 28 kDa glutathione S-transferase. **Parasitology**. 109: 565-572.
- Preyavichyapugdee, N. 2007. **Vaccine Potential of Recombinant Glutathione S-Transferase (rFg26GST) Protein Against Fasciola gigantica and its Cross Protection Against Schistosoma mansoni**. The Degree of Doctor of Philosophy Mahidol University, Nakhonpathom.
- Ren, S., F. Zhou, C. Xu and B. Li. 2015. Simple method for visual detection of glutathione S-transferase activity and inhibition using cysteamine-capped gold nanoparticles as colorimetric probes. **Gold Bulletin**. 48: 147-152.
- Riveau, G., A.-M. Schacht, J.-P. Dompnier, D. Deplanque, M. Seck, N. Waucquier, S. Senghor, D. Delcroix-Genete, E. Hermann, N. Idris-Khodja, C. Levy-Marchal, M.



- Capron and A. Capron. 2018. Safety and efficacy of the rSh28GST urinary schistosomiasis vaccine: A phase 3 randomized, controlled trial in Senegalese children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 12: e0006968-e0006968.
- Sexton, J. L., A. R. Milner, M. Panaccio, J. Waddington, G. Wijffels, D. Chandler, C. Thompson, L. Wilson, T. W. Spithill and G. F. Mitchell. 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. **The Journal of Immunology**. 145: 3905.
- Sheehan, D., G. Meade, V. M. Foley and C. A. Dowd. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical journal**. 360: 1-16.
- Shimada, M., N. Kato-Hayashi, Y. Chigusa, S. Nakamura, H. Ohmae, M. Sinuon, D. Socheat, V. Kitikoon and H. Matsuda. 2007. High susceptibility of *Neotricula aperta* gamma-strain from Krakor and Sdau in Cambodia to *Schistosoma mekongi* from Khong Island in Laos. **Parasitology International**. 56: 157-160.
- Shuxian, L., S. Guangchen, X. Yuxian, W. Yang and D. P. McManus. 1995. Immunization of mice with recombinant Sjc26GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum*. **Vaccine**. 13: 603-607.
- Sinuon, M., R. Tsuyuoka, D. Socheat, P. Odermatt, H. Ohmae, H. Matsuda, A. Montresor and K. Palmer. 2007. Control of *Schistosoma mekongi* in Cambodia: results of eight years of control activities in the two endemic provinces. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 101: 34-39.
- Steinmann, P., J. Keiser, R. Bos, M. Tanner and J. Utzinger. 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**. 6: 411-425.
- Sun, Y., Y. Wang, X. Huang, X. Gu, W. Lai, X. Peng and G. Yang. 2017. Characterization of glutathione S-transferase and its immunodiagnostic potential for detecting *Taenia multiceps*. **Veterinary Parasitology**. 242: 31-37.
- Sung, C. K. and M. H. Dresden. 1986. CysteinyI Proteinases of *Schistosoma mansoni* Eggs: Purification and Partial Characterization. **The Journal of Parasitology**. 72:

891-900.

- Tang, C.-l., J. Yang, L.-y. Cheng, L.-f. Cheng and Z.-m. Liu. 2017. Anti-CD25 monoclonal antibody enhances the protective efficacy of *Schistosoma japonicum* GST vaccine via inhibition of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **Parasitology Research**. 116: 2727-2732.
- Thiangtrongjit, T., P. Adisakwattana, Y. Limpanont, P. Dekumyoy, S. Nuamtanong, P. Chusongsang, Y. Chusongsang and O. Reamtong. 2018. Proteomic and immunomic analysis of *Schistosoma mekongi* egg proteins. **Experimental Parasitology**. 191: 88-96.
- Trottein, F., M. P. Kieny, C. Verwaerde, G. Torpier, R. J. Pierce, J.-M. Balloul, D. Schmitt, J.-P. Lecocq and A. Capron. 1990. Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 41: 35-44.
- Trottein, F., M.-C. Vaney, B. Bachet, R.-J. Pierce, N. Colloc'h, J.-P. Lecocq, A. Capron and J.-P. Mornon. 1992. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a protective cloned 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. **Journal of Molecular Biology**. 224: 515-518.
- Tudyka, T. and A. Skerra. 1997. Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal, enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of *Escherichia coli*. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**. 6: 2180-2187.
- Urbani, C., M. Sinoun, D. Socheat, K. Pholsena, H. Strandgaard, P. Odermatt and C. Hatz. 2002. Epidemiology and control of mekongi schistosomiasis. **Acta Tropica**. 82: 157-168.
- Veal, E. A., W. M. Toone, N. Jones and B. A. Morgan. 2002. Distinct Roles for Glutathione S-Transferases in the Oxidative Stress Response in *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Biological Chemistry**. 277: 35523-35531.
- Vichasri-Grams, S., V. Viyanant, E. S. Upatham, R. Grams and G. Korge. 1997. Cloning and sequence analysis of the 26 kDa glutathione S-transferase gene of *Schistosoma mekongi*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 28: 570-574.

- Vonghachack, Y., S. Sayasone, V. Khieu, R. Bergquist, G. J. van Dam, P. T. Hoekstra, P. L. A. M. Corstjens, B. Nickel, H. Marti, J. Utzinger, S. Muth and P. Odermatt. 2017. Comparison of novel and standard diagnostic tools for the detection of *Schistosoma mekongi* infection in Lao People's Democratic Republic and Cambodia. **Infectious diseases of poverty**. 6: 127-127.
- Wang, W., L. Wang and Y.-S. Liang. 2012. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**. 111: 1871-1877.
- Weerakoon, K., G. N. Gobert, P. Cai and D. P. McManus. 2015. **Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis**.
- WHO, W. H. O. 2002. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis**. report of a WHO expert committee.
- WHO, W. H. O. 2018. **Schistosomiasis**. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/schistosomiasis>, Accessed May 20, 2018.
- Wijffels, G. L., J. L. Sexton, L. Salvatore, J. M. Pettitt, D. C. Humphris, M. Panaccio and T. W. Spithill. 1992. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. **Experimental Parasitology**. 74: 87-99.
- Xu, S., F. Shi, W. Shen, J. Lin, Y. Wang, P. Ye, E. Tian, C. Qian, B. Lin, Y. Shi and Z. Zhang. 1995. Vaccination of sheep against *Schistosoma japonicum* with either glutathione S-transferase, keyhole limpet haemocyanin or the freeze/thaw schistosomula/BCG vaccine. **Veterinary Parasitology**. 58: 301-312.
- Xu, Y.-z. and M. H. Dresden. 1986. Leucine Aminopeptidase and Hatching of *Schistosoma mansoni* Eggs. **The Journal of Parasitology**. 72: 507-511.
- Xu, Y.-Z. and M. H. Dresden. 1990. The hatching of schistosome eggs. **Experimental Parasitology**. 70: 236-240.
- Yu, Q., H. Yang, Y. Feng, X. Yang and Y. Zhu. 2012. Magnetic affinity enzyme-linked immunoassay based on recombinant 26kDa glutathione-S-transferase for serological diagnosis of schistosomiasis japonica. **Acta Tropica**. 124: 199-202.
- Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**. 9: 40.
- Ziniel, P. D., B. Karumudi, A. H. Barnard, E. M. S. Fisher, G. R. J. Thatcher, L. M. Podust

and D. L. Williams. 2015. The *Schistosoma mansoni* Cytochrome P450 (CYP3050A1) Is Essential for Worm Survival and Egg Development. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 9: e0004279-e0004279.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อ

## อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

### 1. LB (Luria-Bertani) medium

ส่วนประกอบต่อลิตร

LB Broth (Hi-media) 25 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

การเตรียม: เติมน้ำกลั่น 1 ลิตรใน LB Broth จากนั้นปั่นให้ละลายและนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### 2. LB (Luria-Bertani) agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

LB Broth (Hi-media) 25 กรัม

Agar 15 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

การเตรียม: เติมน้ำกลั่น 1 ลิตรใน LB Broth และ Agar จากนั้นปั่นให้ละลายและนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ

สำหรับ LB agar ที่มีการเติม ampicillin โดยผสมสารละลาย ampicillin ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน LB agar ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นหรือประมาณอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

### 3. การเตรียม ampicillin stock solution

ชั่ง ampicillin 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส





## การเตรียมสารเคมี

### 1. การเตรียมสารละลาย 10X Phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4

ส่วนประกอบต่อลิตร

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 7.4 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในการเตรียมให้เป็น 1X PBS, pH 7.4 โดยผสม 10X PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

### 2. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิธี SDS-PAGE

- การเตรียมสารละลาย 10% SDS

ชั่งสาร SDS 10 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าจนสารละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

- การเตรียมสารละลาย 10% APS

การเตรียม: ชั่งสาร APS 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน แบ่งเก็บในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- การเตรียมสารละลาย 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

การเตรียม: ชั่งสาร Tris base 184.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 8.8 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

- การเตรียมสารละลาย 1 M Tris-HCl, pH 6.8

การเตรียม: ชั่งสาร Tris base 60.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 6.8 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

- การเตรียม polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 12.5% (separating gel)

ปริมาณที่ใช้สำหรับเตรียมเจล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบ ดังนี้

30% acrylamide gel	4	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	3	มิลลิลิตร
10% SDS	120	ไมโครลิตร
10% APS	120	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร
TEMED	12	มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม 30% acrylamide, 1.5 M Tris-HCl, 10% SDS และน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10% APS และ TEMED ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว และระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เท เจลใส่ช่องว่างระหว่างกระจกที่เตรียมไว้กับฐานลอค

- การเตรียม polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 4% (stacking gel)

มีส่วนประกอบ ดังนี้

30% acrylamide gel	800	ไมโครลิตร
1 M Tris-HCl, pH 6.8	750	ไมโครลิตร
10% SDS	60	ไมโครลิตร
10% APS	60	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	4.3	มิลลิลิตร
TEMED	6	มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม 30% acrylamide, 1 M Tris-HCl, 10% SDS และน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10% APS และ TEMED ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว และระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เท เจลใส่ช่องว่างระหว่างกระจกที่เตรียมไว้กับฐานลอคจนเต็ม แล้วใส่หวีลงด้านบนเพื่อทำเป็นช่อง ปลอ่ยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง

- การเตรียมสารละลาย loading dye 2X (bromphenol blue)

ปริมาตร 12 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบ ดังนี้

1 M Tris-HCl, pH 6.8	4.5	มิลลิลิตร
Glycerol	10	มิลลิลิตร
10% SDS	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20.5	มิลลิลิตร
DTT	1.55	กรัม
Bromophenol blue	0.01	กรัม

การเตรียม: ผสม Glycerol, 1 M Tris-HCl, 10% SDS และน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นชั่ง DTT และ Bromophenol blue เทใส่และผสมให้เข้ากัน แบ่งเก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- การเตรียมสารละลาย 10X Running buffer

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tris base	30.2	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบดังกล่าวในน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันจนสารละลายหมด

### 3. การเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อม SDS-PAGE ด้วยวิธี Coomassie Brilliant Blue R-250

- การเตรียมสารละลาย 0.1% coomassie brillaiant blue R-250

ส่วนประกอบต่อลิตร

Coomassie brillaiant R-250	1	กรัม
Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบดังกล่าวในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วใช้กระดาษกรองขนาด 0.2

ไมโครเมตร กรองก่อนนำไปใช้

- การเตรียมสารละลาย Destain solution

ส่วนประกอบต่อลิตร

	Destain solution I	Destain solution II
Methanol	300 มิลลิลิตร	50 มิลลิลิตร
Acetic acid	100 มิลลิลิตร	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600 มิลลิลิตร	850 มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบดังกล่าวในน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

#### 4. การเตรียมสารละลายสำหรับวิธี *In Situ Hybridization*

- การเตรียมสารละลาย 10X Tris-NaCl-EDTA (TNE)

ส่วนประกอบต่อลิตร

500 mM Tris-Cl	60.57	กรัม
100 mM NaCl	5.84	กรัม
10 mM EDTA	3.72	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 7.4 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในการเตรียมให้เป็น 1X TNE, pH 7.4 โดยผสม 10X TNE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- การเตรียมสารละลาย Proteinase K 10 mg/ml

มีส่วนประกอบ ดังนี้

Proteinase K	100	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม Proteinase K 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นสะอาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ในการเตรียม Proteinase K 20 µg/ml โดยผสม Proteinase K 10 ไมโครลิตร ใน 1X TNE 5 มิลลิลิตร ซึ่งควรมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

- การเตรียม 0.4% Formaldehyde solution

มีส่วนประกอบ ดังนี้

37% Formaldehyde solution	20	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	1.98	มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม 37% Formaldehyde solution ในน้ำกลั่นสะอาด เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปใช้ ซึ่งควรมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

- การเตรียม 50% Dextran Sulfate

มีส่วนประกอบ ดังนี้

Dextran Sulfate	50	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม Dextran Sulfate ในน้ำกลั่นสะอาด ปั่นให้สารละลายด้วยเครื่อง hot plate sterier จากนั้นแบ่งเก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- การเตรียม Salmon Sperm DNA (10 mg/ml)

มีส่วนประกอบ ดังนี้

Salmon Sperm DNA	500	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

การเตรียม: เติม Salmon Sperm DNA ลงในน้ำกลั่นสะอาดอย่างช้าๆ พร้อมปั่นให้ละลายด้วยเครื่อง hot plate sterier จากนั้นแบ่งเก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- การเตรียมสารละลาย 20X SSC (Sodium Chloride/ Sodium Citrate) buffer, pH 7.0

มีส่วนประกอบ ดังนี้

3 M NaCl	175.32	กรัม
0.3 M Na citrate	88.23	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 7.0 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในการเตรียมให้ เป็น 2X SSC, pH 7.0 โดยผสม 20X SSC ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ในการเตรียมให้ เป็น 1X SSC, pH 7.0 โดยผสม 20X SSC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ในการเตรียมให้ เป็น 0.5X SSC, pH 7.0 โดยผสม 20X SSC ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 975 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- การเตรียมสารละลาย 10X Buffer I

มีส่วนประกอบ ดังนี้

1 M Tris-HCl	121.14	กรัม
1.5 M NaCl	87.66	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น เขย่าจนสารละลายหมด แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในการเตรียมให้เป็น 1X Buffer I โดยผสม 10X BufferI ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- การเตรียมสารละลาย Buffer II (0.5% Blocking solution)

มีส่วนประกอบ ดังนี้

Blocking agent (Roche)	0.5	กรัม
1X Buffer I	100	มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม Blocking agent ใน 1X Buffer I จากนั้นปั่นให้สารละลายด้วยเครื่อง hot plate sterier จนสารละลายใส เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

- การเตรียมสารละลาย Buffer III, pH 9.5

100 mM Tris-HCl	12.114	กรัม
100 mM NaCl	5.844	กรัม
50 mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.16	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 9.5 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

- การเตรียมสารละลาย 10X TE buffer, pH 8.1

100 mM Tris-HCl	12.11	กรัม
10 mM EDTA	3.72	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 8.1 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

## 5. การเตรียม buffer สำหรับวิธี *In Situ* Hybridization

- การเตรียม Pre-hybridization buffer

มีส่วนประกอบ ดังนี้

50% Deionized formamide	5	มิลลิลิตร
20X SSC	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3	มิลลิลิตร

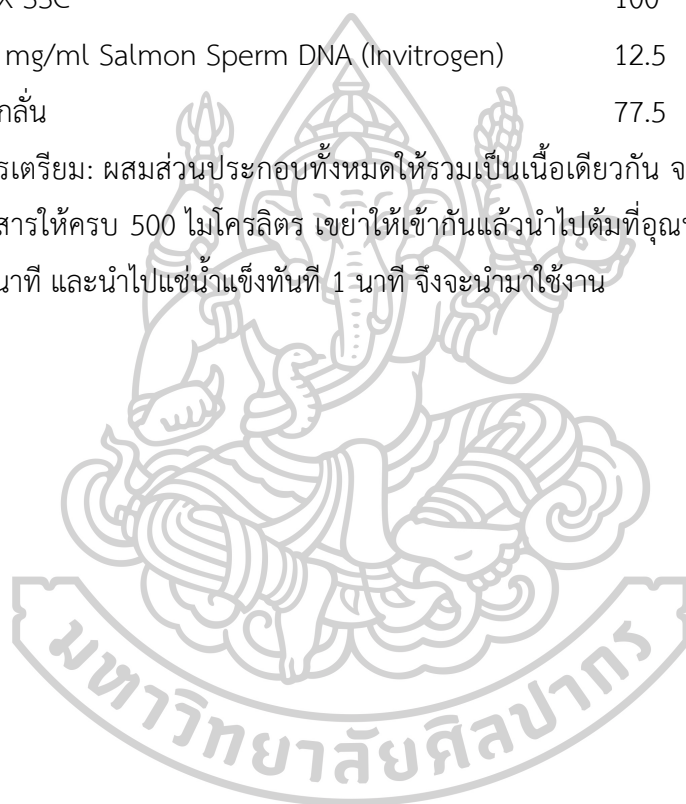
การเตรียม: ผสม Formamide และ 20X SSC ในน้ำกลั่นสะอาด เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปใช้ ซึ่งควรมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

- การเตรียมสารละลาย Hybridization buffer

มีส่วนประกอบ ดังนี้

50% Deionized formamide	250	ไมโครลิตร
50% Dextran Sulfate (w/v)	50	ไมโครลิตร
50X Denhardt's Solution (Sigma)	10	ไมโครลิตร
20X SSC	100	ไมโครลิตร
10 mg/ml Salmon Sperm DNA (Invitrogen)	12.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	77.5	ไมโครลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้รวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใช้น้ำกลั่นสะอาดปรับปริมาตรสารให้ครบ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และนำไปแช่น้ำแข็งทันที 1 นาที จึงจะนำมาใช้งาน







## การเปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SmekGST1 และ SmekGST2

### 1. การเปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SmekGST1 กับยีน GST ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์

SmekGST1	GTAGCGGTATTGGTGGGTATATAT	27
SmekGST26_Y07663.1	-----	0
SjGST26_MI4654.1	-----	0
SmGST26_M31106.1	-----	0
FgGST_AF112567.1	-----	0
Fh47GST26mu_M77681.1	-----	0
Fh51GST26mu_M77682.1	-----	0
Fh7GST26mu_M77680.1	-----	0
Fh1GST26mu_A00993.1	-----	0
HsGSTmu1_X08020.1	-----	0
MusGSTmu1_NM_010358.5	CTGCCTCCGCTTTAGGGCTCTGCTGCTCTGGTTACAGACCTAGGAAGGGGAGT.CCTAATTGGGATTG...CAGGGT.GG	80
SmekGST1	ACGATATTCGTGGACAAGTCTC-----	50
SmekGST26_Y07663.1	.....	23
SjGST26_MI4654.1	.....T.....	22
SmGST26_M31106.1	-----	0
FgGST_AF112567.1	-----	0
Fh47GST26mu_M77681.1	-----	0
Fh51GST26mu_M77682.1	-----	0
Fh7GST26mu_M77680.1	-----	0
Fh1GST26mu_A00993.1	-----	0
HsGSTmu1_X08020.1	G..GA..C..C-----	11
MusGSTmu1_NM_010358.5	GA.GG.CC..C..TTTTGTC..GCCACGTTTCTCTAGTAGTCTGTATAAAGTCACAACCTCCAACACACAGGTCAGTCC	160
SmekGST1	-----GAATAAGGTTACT-AGTCATGGCTCCGATACTCGGCTATTGGAAAATTAAGGCCTTGTA	110
SmekGST26_Y07663.1	.....T.....	84
SjGST26_MI4654.1	.....A.....G.....T.C..T.....A..T.....G	77
SmGST26_M31106.1	.....A.....A..T.AGT.....T.....G.C..A.....	43
FgGST_AF112567.1	.....C.AG.C.A.....A..C.....A.GA..G.CCA	42
Fh47GST26mu_M77681.1	.....GACGA..CAT.C.G..C.AG.C.A.....A..C.....A.GA..G.CCA	21
Fh51GST26mu_M77682.1	.....GACGA..CAT.C.G..C.AG.C.A.....A..C.....A.GA..G.CCA	56
Fh7GST26mu_M77680.1	.....GACGA..CAT.C.G..C.AG.C.A.....A..C.....A.GA..G.CCA	18
Fh1GST26mu_A00993.1	.....CC.....CAGCAC.....C.CAT.....G..G..C..G.C..CCGC..G..G.CC	0
HsGSTmu1_X08020.1	.....CC.....CAGCAC.....C.CAT.....G..G..C..G.C..CCGC..G..G.CC	66
MusGSTmu1_NM_010358.5	TGCTGAAGCCAGTTTGAGAAG.CC.CAGC..CAGCAC.....C..AT.....G..A..C.....CG.CCGC..A..GAC	240
SmekGST1	CAACCCACTAGACTCTTTTGAATATCTGGAGAAGATATGAAGAGCGTTGTACG-----AACGC--AA---	175
SmekGST26_Y07663.1	.....C.....A..A.....A..A.....T.....G...G...G---	149
SjGST26_MI4654.1	.....C.....A..A.....A..A.....T.....G...G...G---	142
SmGST26_M31106.1	.....A..C.....C..C.....A..ACT.....G..A..GC..T.....T.....G---	108
FgGST_AF112567.1	.....GT.C.....CT.GC.C.....C..G.AT.....G.....A.A.C.....GT..T..G---	107
Fh47GST26mu_M77681.1	.....GT.C.....CT.CC.C.....C..G..T..G..G..C.....A.A.C.....GT..T..G---	86
Fh51GST26mu_M77682.1	.....GT.C.....CT.GC.C.....C..G..T..G..G..C.....A.A.C.....GT..T..G---	121
Fh7GST26mu_M77680.1	.....GT.C.....CT.CC.C.....C..G..T..G..G..C.....A.A.C.....GT..T..G---	83
Fh1GST26mu_A00993.1	.....GTC.....T..GA.G..C.....A.AGA.A.....G..T..G---	38
HsGSTmu1_X08020.1	..CG...TCC.C..G..CC.....CACACTC.AGC.....G..AAAGAA...ACGATGGGG...TCCTG.TTA	146
MusGSTmu1_NM_010358.5	..C..G.TCC.CA.G..CC.....CACACTC.AGC.....T...AAGAGA...ACCATGGGTG...TCCCG.CTT	320



```

SmekGST1          TGAAGGTGATGCATGGCGAAACGAAAAATTTAAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGACGGTGTATG 255
SmekGST26_Y07663.1 ..... AA..... A..... G..... G..... T..... 229
SjGST26_M14654.1 ..... AA..... A..... G..... G..... T..... 222
SmGST26_M31106.1 ..... ATC..... C..... A..... C..... T..... A..... CC..... C..... A..... T..... T..... 188
FgGST_AF112567.1 ..... TA.G...GAA...TTGGG...T...C...CA...A...T...G...A...T...A...A...C...C...A.A.GT 187
Fh47GST26mu_M77681.1 ..... TA.G...GAA...ATG.GT...G...C...CA...A...T...G...A...T...A...A...C...C...A.A.GT 166
Fh51GST26mu_M77682.1 ..... TA.G...GAA...TTTGG...T...C...CA...A...T...G...A...T...A...A...C...C...A.A.GT 201
Fh7GST26mu_M77680.1 ..... TA.G...GAA...TTGGG...T...C...CA...A...T...G...A...T...A...A...C...C...A.A.GT 163
Fh1GST26mu_A00993.1 ..... T...A...AAAG...TTC.G.A.G...CG.G...C...A...A...CT.A.A...C...T.ACA.GT 118
HsGSTmu1_X08020.1 ..... CA.AAGCCAG...TG...T...G...G...C...GC...CC...C...G...C...TG...T...G.C.C 226
MusGSTmu1_NM_010358.5 ..... CA.AAGCCAG...TG...T...G...G...C...GC...CC...C...G...C...TG...C...T...ATCAC 400
***          ***          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

SmekGST1          TTAATTTGACACAATCCATGGCCATCATACTTACATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGAGGTTGCCAAAAGAGCGT 335
SmekGST26_Y07663.1 ..... CGGG..... 309
SjGST26_M14654.1 ..... A..... G..... T..... T..... T..... T..... T..... T..... T..... 302
SmGST26_M31106.1 ..... A..... T..... T..... T..... T..... A..... G..... C..... T..... A..... 268
FgGST_AF112567.1 ..... GC...C...T...G...GG...A...G...G...T...G...T...TGGG...C...T...TTCCACA...CG.G.A.A 267
Fh47GST26mu_M77681.1 ..... GC...C...T...G...GG...A...G...G...T...G...T...TGGG...C...T...TTCCACA...CG.G.A.A 246
Fh51GST26mu_M77682.1 ..... GC...C...T...G...GG...A...G...G...T...G...T...TGGG...C...T...TACCACA...CG.G.A.A 281
Fh7GST26mu_M77680.1 ..... GC...C...T...GG...A...G...G...T...G...T...TGGG...C...T...TTCCACA...CG.G.A.A 243
Fh1GST26mu_A00993.1 ..... G...C...A...T...AC...AG...AT...G...C...T...GGG...A...T...TTC.ACG...CG...A.A 198
HsGSTmu1_X08020.1 ..... AC...GA.C...C...GAG...AC...T...GT.C...T...CCG...C...G...T...G.AGACAGA.G...AAG 306
MusGSTmu1_NM_010358.5 ..... AC...GA.C...C...GAG...AT...C...G.C...C...T...CCGA...C...G...T...AGACAGAGG.G...A.G 480
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

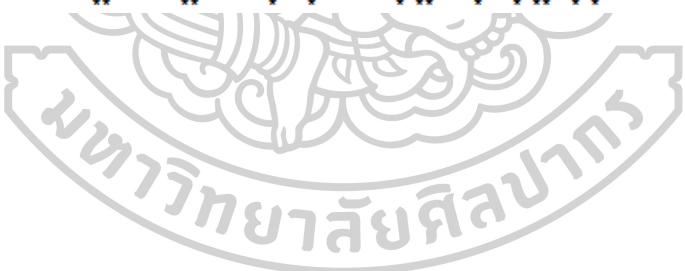
SmekGST1          GCAGAGATTACAATGCT-TGAAGGAGCAG-TTTCGGATATTAGATCTGGTGTTCGAAGAATTGCATATAAATAAGACTTT 413
SmekGST26_Y07663.1 ..... 387
SjGST26_M14654.1 ..... T..... G..... T..... AC..... G..... G..... 380
SmGST26_M31106.1 ..... G...A...T...G...G...G...T...T...GATG...T...C...C...G...A.A 346
FgGST_AF112567.1 ..... TCGAG...T...G...A...C...T...CAAT...C...C...GATG...T...GTTC.TG...TGT...C...CC.A.T... 345
Fh47GST26mu_M77681.1 ..... TCGA...T...G...A...C...T...CAAT...C...C...GATA...GT...GG.C.TG...TGC...C...CC.A.A... 324
Fh51GST26mu_M77682.1 ..... TCGA...T...G...A...C...T...CAAT...C...C...GATA...GT...GG.C.TG...TGT...C...CC.A.A... 359
Fh7GST26mu_M77680.1 ..... TCGA...T...T...A...C...T...CAAT...C...C...GATA...GT...GG.CTT.C.TGC...C...CC.A.A... 321
Fh1GST26mu_A00993.1 ..... TCGAG...T...G...A...C...T...CAGTA...C...C...TCAA...CC...CC...T.T...CGTATC.A.A... 276
HsGSTmu1_X08020.1 ..... ATTCG...GTGG.CAT.T...G...A...C...ACCAT...C...ACCATATGCAGC.GGGC.TG...CTGC...C...CC.A... 384
MusGSTmu1_NM_010358.5 ..... ATTCG...GCAG.CAT.G...G...A...C...G.CAT...C...CCC.CATGCAGC.CATC.TGC.CTGT...C...CCCT... 558
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

SmekGST1          GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAACAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTCGAAGATCGTTTATGCCATAAAACA-- 491
SmekGST26_Y07663.1 ..... 395
SjGST26_M14654.1 ..... G..... T..... 458
SmGST26_M31106.1 ..... C..... C..... A...T...GG.G...G...CTA.C...T... 424
FgGST_AF112567.1 ..... GAAG.G...GA...A...G...AG.A...G...CA...CAT...G...G...TC.A...T...CT.GG.G.T.GTC 421
Fh47GST26mu_M77681.1 ..... GAAG.T...G...AA...G...A...G...AG.A...G...CA...CAT...G...G...TC.A...T...CTTGG.G.T.GTC 400
Fh51GST26mu_M77682.1 ..... GAAG.G...GA...A...G...AG.A...G...AAC...CAT...G...G...TC.AA...T...CTTGG.G.T.GTC 435
Fh7GST26mu_M77680.1 ..... GAAT.G...GA...A...T...G...AGGA...G...GAC...C...T...G...G...TC.A...T...CT.GG.G.C.GTC 397
Fh1GST26mu_A00993.1 ..... CAG...G...AA.GA.AC...G...GG.CT.G...GAC...C...A...G...TC.A...T...CT.GGT...A.TC 352
HsGSTmu1_X08020.1 ..... G.AA...G...GCCAA.G.ACT.GG.GG.A...C...A...A...GC.C...CTCAAG.T.CTGGGG.G.GGC 460
MusGSTmu1_NM_010358.5 ..... G.AG.AG.GCCA...G...CT.G...G.CCA.C...G.AAA...GC.C...CTCT.AG.TCCTGGGC.GAGGC 634
**          **          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```



```

SmekGST1      --TATTTAAATGCTGATCGTGTAAACCCATCCTGACTTCACTGTGTATGACGCTCTTGAT-GTTGTTTTATACATGGACCG 568
SmekGST26_Y07663.1  -----C----- 472
SjGST26_M14654.1  -----A----- 535
SmGST26_M31106.1  -----G..C..A..T.....T.....T.....A..C..T..C.....G.....TC 501
FgGST_AF112567.1  AG...G..CA...TCCTCA..T..G...GTG...T...G..T..C..A..AT..G..C..TG..A..CGT..TT...CA..C 500
Fh47GST26mu_M77681.1 AT...G..CA...TCCTCA..C..G...GTG...C..T..C..AA..A..G...TCGA..CGT..TT...CA..C 479
Fh51GST26mu_M77682.1 AC...G..CA...TC..CA..T..G...GTG...T...G..T..C..A..AT..G..C..TG..A..CGT..TT...CA..C 514
Fh7GST26mu_M77680.1 AA...G..TA...TCCTCA..T..G...GTG...T...G..C..A..AT..G..C..TG..A..CGT..TT...CA..C 476
Fh1GST26mu_A00993.1 CT..C..G..GA...ACCTCG...G...CGTC..T...G...C..G...G...CGA..CG...TT...G..C 431
HsGSTmu1_X08020.1 CA..GG...TGCA..AA..CAAGA..C...TTT..GTA..T...TC..CG..C...T..TC...CCTCCACCG...TT...AG...C 540
MusGSTmu1_NM_010358.5 CA..GG...TGCA..G..CAAG...C...T...GTG...T...C..TGCT...AT...CCAG..ACC...GTT..AG...C 714
          *  **  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

SmekGST1      AAGGTGCTTGATGCGTTTCCAAAACTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAAAATATACCACAAATCAATGAGTACTTGA 648
SmekGST26_Y07663.1  ----- 552
SjGST26_M14654.1  ..T...C.....C.....T.....GC...C.....TG..A... 615
SmGST26_M31106.1  ..C...T...A..C..A.....T.....C...C...GT.....G..T...GA..C...A... 581
FgGST_AF112567.1  ..C...TC..A..C..AC..C...T..GAAGGAA...C..G..GT.....G..C..T...A...G..CA...A..G 580
Fh47GST26mu_M77681.1 ..C..T..TC..A...AA...G...T..GAAGGAA...C..G..GT.....GC..C..T...A...G..CA...A..G 559
Fh51GST26mu_M77682.1 ..C...TC...G..AC..C..C...T..GAAGGAA...C..G..GT.....G..C..T...A...G..CA...A..G 594
Fh7GST26mu_M77680.1 ..C...TC...C..AC..C..C...T..GAAGGAA...C..G..GT.....G..C..T...A...A..A... 556
Fh1GST26mu_A00993.1 ..C..C..TC...CAC..C..T...CT..GCAACAA...C..TG..GT.....GC..C..G...GAGC...GCC...A..G 511
HsGSTmu1_X08020.1  ..C...C...C...C...T...GAAGGAC..C..CTCC...CT...GGGCT..GGAGA..G...TC..CC...A... 620
MusGSTmu1_NM_010358.5 ..C...C...C...C...C..GAGGGAC..CCTGGCC..CT..C...GGGCC..CAAGA..G...TC..CC...A... 794
          *  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

SmekGST1      GATCTAGTAAGTATAT-----AGAAATGCC-----CTCTGCAGGGCTGGCA 688
SmekGST26_Y07663.1  ----- 592
SjGST26_M14654.1  A...C..C.....C.....T..... 655
SmGST26_M31106.1  AT...C..G...C.....A.....A..T...G... 621
FgGST_AF112567.1  A...AGAG...TC...CA..G...T...A..CTCG...AC 620
Fh47GST26mu_M77681.1 A...A..AACG..TC...CA...T...A..C..A...GC 599
Fh51GST26mu_M77682.1 A...AGAG...TC...CA..G...T...A..CTCG...AT 634
Fh7GST26mu_M77680.1 AG...CGAGCG..TC...CA...T...CT...CTCG...AC 596
Fh1GST26mu_A00993.1 AG...C..A..CGA..T...A..G...C...AA..C...T... 551
HsGSTmu1_X08020.1  AG...C...CCGC..TCC..CCCAAGACCTGTGTTCTCA..AG...TGCTGGGGCAACAAGTAGGG..CT...A..A...AG 700
MusGSTmu1_NM_010358.5  AGAG...CCGC..C...CGCAACACCTATATTTTCA..AG...CCACTGGAGTAACAAGTAGGC..CT...TACA..G... 874
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

SmekGST1      AG-----CTACGTTTGG-----TG-----GTGGCG-----708
SmekGST26_Y07663.1  ----- 612
SjGST26_M14654.1  -----C----- 675
SmGST26_M31106.1  T.....C.....A... 641
FgGST_AF112567.1  T.....T..T..C...A... 640
Fh47GST26mu_M77681.1 T.....T..T..C...C...A... 619
Fh51GST26mu_M77682.1 T.....T..T..C...A... 654
Fh7GST26mu_M77680.1 TT.....C..T...A... 616
Fh1GST26mu_A00993.1 T.....CCA..C...C..A... 571
HsGSTmu1_X08020.1  GTGGGAGTGAGGA...GC..C..TAC..CA..CCTGC...CCCAGGCT...CA..CGCAGCTGGACTCTGCATCCCAGCACC..TGC 776
MusGSTmu1_NM_010358.5  CTCCTACTAGGAGGACCTGT..C...AC..G...GATCC...CAGGCC...GTGGGGACAGCACCTGGCCTTCTGCCTGTGG 952
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```



```

SmekGST1                                     ----- ACCATCC 715
SmekGST26_Y07663.1                          ----- 619
SjGST26_MI4654.1                             ----- 682
SmGST26_M31106.1                             ----- TAC 648
FgGST_AF112567.1                             ----- GC.G. 647
Fh47GST26mu_M77681.1                         ----- GC.G. 626
Fh51GST26mu_M77682.1                         ----- GC.G. 661
Fh7GST26mu_H77680.1                         ----- GC.G. 623
Fh1GST26mu_A00993.1                         ----- TGCC 578
HsGSTmu1_X08020.1                             ----- 856
MusGSTmu1_NM_010358.5                       CTCCTCGTTCCCTTCTCCTGTTTATTCCATCTTTACTCCCAAGACTTCATTGTCCTCTTCACTCCCCCTAA...CTG
CTCCTGGTTC-TCTCTCTCCCGCTCCCTCTGCA-----GCTTGGTCAGCCC--CATCTCCCTC--...C..T 1,016
*

SmekGST1                                     TCCGAAATAAATTATTAA-----TTGTTGTT--TTGTA-- 747
SmekGST26_Y07663.1                          ----- 651
SjGST26_MI4654.1                             ----- A-----AG-----GA-----A.A----- 714
SmGST26_M31106.1                             ----- A-----G-----AC.G-----AA--A--C----- 677
FgGST_AF112567.1                             A...GCT.G----- 657
Fh47GST26mu_M77681.1                         G...TCG.G.GCG.CG.TATTGATCAAGTCA-GTGCCTGATGAGGC-----ATTCC...CAA--C.T.A-- 690
Fh51GST26mu_M77682.1                         A...GCT.G.G.G.CG.CATTGTCCGCGTCA-ATCCCGATGAGG-----ATTCC.C.CAA--C.T.A-- 723
Fh7GST26mu_H77680.1                         A...TGCT.G.G.G.CG.TCTTGTTCACGTCA-ATCCAGATGAGG-----ATTCC...CAA--C.T.A-- 685
Fh1GST26mu_A00993.1                         G...GCC.TGAA.AG..GTGAAC TAAGTCAATGCTGGCTGATGTG-----AAGTT...ACAAC--CGT.G-- 642
HsGSTmu1_X08020.1                             ...C.TGC.GGCC...TGAAGCCTCAG-CTACCCACTATCCTCTGTGAACATCCCCCTCCA.CA..ACCCTTCCCT.C.C 935
MusGSTmu1_NM_010358.5                       ...C.GTC..G.CCAC.CAGCCTTCATTCCTCCAGTTCTTTTCCAC--ATGGCCCTTCT-.CA...GC--TCCTC.-- 1,088
**

SmekGST1                                     ----- AACATTATTTATCACC-----TATGAT 769
SmekGST26_Y07663.1                          ----- 673
SjGST26_MI4654.1                             ----- .....T-----CA... 736
SmGST26_M31106.1                             ----- ..T.AC..AA.AAG..-----G.T... 699
FgGST_AF112567.1                             ----- ..TGC....GT..GTTGATACGCAAT-----TT.TC... 724
Fh47GST26mu_M77681.1                         ----- ..TGC.C..GT.GTTTACACTAAAT-----TT.G.AC. 757
Fh51GST26mu_M77682.1                         ----- ..TGC.C..GC.TGTTAAAACGCAAT-----TT.G... 719
Fh7GST26mu_H77680.1                         ----- TTT.....CT..GTTTATAAGCAAT-----TT..C... 676
Fh1GST26mu_A00993.1                         TAAAGCC.G.C.G.CC.TC..TTCCTGCTTAGTGGTTGTGTCTGCTTTAAAGCC-----TGCTGGCCCTCGCC.G..G 1,010
HsGSTmu1_X08020.1                             ---ACCC...C.C.CAGCC.GTTTCTCGAAGCTGAG--GTCTGTCTGAACTCAGCTTCTTAGAATTAACCCG...G. 1,162

SmekGST1                                     ----- T-----GTGCTA-- 776
SmekGST26_Y07663.1                          ----- 680
SjGST26_MI4654.1                             ----- .....AAA... 743
SmGST26_M31106.1                             ATG-----T.A... 709
FgGST_AF112567.1                             ----- ..... 657
Fh47GST26mu_M77681.1                         ----- .....T.C..G-- 731
Fh51GST26mu_M77682.1                         ----- .....T.CA... 764
Fh7GST26mu_H77680.1                         ----- .....T.C..G-- 726
Fh1GST26mu_A00993.1                         ----- .....T.CA... 683
HsGSTmu1_X08020.1                             ----- AGCTCAGCCCCGAGCTGTCCCC-GTGTTCATGAAGGAGCAGCAT.GACTGGTTTACAGGCCCTGC.C..GCA 1,082
MusGSTmu1_NM_010358.5                       CAACACTATCTTAGTGCT-AGCCCTCCCTAGAGTTACCCGAGGTCAATAC.---TGAGTGCCAG--CCTGT.C..G-- 1,234

SmekGST1                                     ----- AATAAA--AAT--GTCG----- 789
SmekGST26_Y07663.1                          ----- .....ATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 684
SjGST26_MI4654.1                             ----- .....T-----AC 758
SmGST26_M31106.1                             ----- .....A.AA 722
FgGST_AF112567.1                             ----- ..... 657
Fh47GST26mu_M77681.1                         ----- ..G.A--TA...TGA.T.CTTCTG----- 754
Fh51GST26mu_M77682.1                         ----- G....A--TA..A--TGA.T.TCTCTG----- 788
Fh7GST26mu_H77680.1                         ----- T.G.A--TA...TGACTACTTTGAC----- 751
Fh1GST26mu_A00993.1                         ----- C.G...TA...TATGC.T.ATACAAAAAAAAA 714
HsGSTmu1_X08020.1                             GCATGGTCCCTGCCTTAGCCCTACCTGATGGA..G...GCCTC..CCACA-----AAAAAAAAA 1,141
MusGSTmu1_NM_010358.5                       GTGGAGTAGCCTCCCGAGTCTGTCTCGTCTAC.....GTCGTG..ACACAC.T.CCATGAAAAAAAAAAAAAAAAA 1,314

```



2. การเปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SmekGST2 กับยีน GST ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์

```

SmekGST2                TTCAAGCAATGGC--TT GTGGG--CATGTT 26
SjGST_AF044411.1        .....                ..... 23
ShGST28mu_XM_012942408.1 .....                ..... 18
ShGST28_M87799.1        TCTGTCTGACTGTATG...A..G...AT...CA.C 34
SjGST28_M26914.1        .....                ..... 3
SbGST28_M87800.1        .....                ..... 23
SmGST28_S71584.1        .....                ..... 39
FyGSTsigma_JX157879.1   AAAATAGCGCACAC    GAATCATTGAG CG..AGG...A-CA-AACA...TAC 52
CsGST_DQ179264.1        CGTATCG GCATTAGCCGGGGTCATTC AG..TG...CG..AG-AAC..CA..A.ACAC 55
OvGST_AY057838.1        AACG A-ACT    GCGTTGTT...T..C..AG..G..AA..A.ATAC 40
MusGSTsigma_AK020246.1  GACTGTACAGACAGGAAC TGAGACACGGGACACGGCAGGAAAGGC..T.TGC..A.AAT.GTACCATGCCTA.CTAC 80

SmekGST2                AAG-----GTTAT-CTATTTCAACGGACGTGG-ACGTGCTGAACCAATCCGCATGATTCT-CGTGGCA 86
SjGST_AF044411.1        .....                ..... 83
ShGST28mu_XM_012942408.1 .....                ..... 78
ShGST28_M87799.1        .....                ..... 94
SjGST28_M26914.1        .....                ..... 63
SbGST28_M87800.1        .....                ..... 83
SmGST28_S71584.1        .....                ..... 99
FyGSTsigma_JX157879.1   ..G.GG...TC.ATTC...G..A..A...T..C.TC.G...ACTTGT 112
CsGST_DQ179264.1        T.AAACACAGACACTGTGC.C..T...TC...C..A...GG.G..TA.G...G.A.C.G.A.C-T 133
OvGST_AY057838.1        C..A...TTTC...A.C..C.G..GTG..A.C...G.G..G.A..C- 80
MusGSTsigma_AK020246.1  C.GCTT...T..TATGA.G...A.A.C..ATT..T..TAC..AT...CTTAT 140
* * * * *

SmekGST2                GCGGAAATAGAATACGAAGATGAAAGGATT-GAATTCCAAGATTGGCCTAAAATCAAACCAACCATACCTGGAGGAAGA 164
SjGST_AF044411.1        .....                ..... 161
ShGST28mu_XM_012942408.1 .....                ..... 156
ShGST28_M87799.1        T..TG.GA.C.T.....G..A...AGT.....G.....T..T..G..C...C... 172
SjGST28_M26914.1        .....                ..... 141
SbGST28_M87800.1        T..TG.GA.C.....G..A...AGT.....G.....T..T..G..C...C... 161
SmGST28_S71584.1        T..TG..C.....G..A...AGT.....A.....T..T..A..C...C... 177
FyGSTsigma_JX157879.1   ..C..TG.CA..T..G..CT.TCAAT.CACA.TG-G.TC.G...CC.....C..C..C..C..TC.G 190
CsGST_DQ179264.1        AAC.ATG.TTCG.TT..G...TGC...TC..TAAGG.CC.A..T..G..CG...ACGAGT.T..G..T..T.A 211
OvGST_AY057838.1        C..TG.GCCT.TT..C...C.A..CCCAGCA-G.T.C..G.A..CGA..T.TGAGG.T...C...G 158
MusGSTsigma_AK020246.1  TT..AC..A.G..T..G..C..C..A..A...CAAGCT..C.....G...TC.T..ATTT..C.A. 218
* * * * *

SmekGST2                TTGCCATCGTGAAATCACAGACAAAAGGGGAGATGTGAAAA-CGATG-----TCAGAAAGTTGGCTATTGCACGA 236
SjGST_AF044411.1        .....                ..... 233
ShGST28mu_XM_012942408.1 .....                ..... 228
ShGST28_M87799.1        TGCA.....C..T.TCAT..GC.C...T-G...GT..G.....G 244
SjGST28_M26914.1        .....                ..... 213
SbGST28_M87800.1        TGCA.....C..T.TCAT..GC.C...T-G...T..G.....G 233
SmGST28_S71584.1        TGCA.....G...T..TG.TCAT..GC.C...T-G...T..G.....G 249
FyGSTsigma_JX157879.1   G.T..C.GT..G.TG.G..C.G-CCA...C.G..CTTA.C..TTATCA..TCGA..G...T... 262
CsGST_DQ179264.1        A..GC.TC.CC..G.A.G..G...ATC.CAA..G...A.ACTTATA..G..CA...G..C..C... 286
OvGST_AY057838.1        A..TG.GC.CC..G.GCTC...CCC.AT.C.CCG..T..AC..A.AGCTATGTG..G..CA...A.A...G 236
MusGSTsigma_AK020246.1  A.C..TG.TT..G.GG.GGA..G-----CT.AC..T..C.CC...G..CC.C..A.A..A.. 275
* * * * *
    
```



```

SmekGST2          TTTATAGCGAGAAAACATAACATGATGGGCGAAACAGACGAGGAGTATTATATCGTAGAGAAGATGATTGGCCAAGTCGA 316
SjGST_AF044411.1  .....C.....C.....T.....T.....A..... 313
ShGST28mu_XM_012942408.1 .A..G...AG..G...C.T.....A.G...A...A...AT..T...T...T..G.CT.. 308
ShGST28_M87799.1  .A..G...AG..G...C.T.....A.G...A...A...AT..T...T...T..G.CT.. 324
SjGST28_M26914.1  .....C.....C.....T.....T.....A..... 293
SbGST28_M87800.1  .A..G...AG..G...C.T.....A...A...AT..T...T...T..G..T... 313
SmGST28_S71584.1  .A..G...AG...C.T.....T.....A.....A.C...GT..T..A...T...T..G.CT.. 329
FyGSTsigma_JX157879.1 .GC.T..C...C..TTC..A.....T...G.....CC.GA.T..ACGT..C...TG.GTGT.. 342
CsGST_DQ179264.1  G.GC.C..A.A.C.CT.C.GT.....TT.T..A...A...C.AGA.T..ACGA...G..GTGT.C 366
OvGST_AY057838.1  A.GT.G..A...G.TT.G..T.....ATTGC...A...GT..C..C.A.A.T..ACGA...TG..TGT.. 316
MusGSTsigma_AK020246.1 .A.T.G.A.C.A...CACAG.TT..GCT..GA.G...CGTT...C.A.G.CAA.CT..TGCAG..G.G.A.ACGC.G.. 355
          * * * * *

```

```

SmekGST2          TGATGTTGAAAGTAAATACCATAGACTCTCATGAAGCCA-CCAGAAGAAAGAGACAGAATCGCCAAGG-AGATATTGAA 394
SjGST_AF044411.1  A.....G.C.....A.....A.....G.A...T..... 391
ShGST28mu_XM_012942408.1 A..C.A..CA.G...TT.C..A..T.G.....GA...G.A.C.G.AG..AAT..A...C... 386
ShGST28_M87799.1  A..C.A..CA.G...TT.C..A..T.G.....GA...G.A.C.G.AG..AAT..A...C... 402
SjGST28_M26914.1  A.....G.....A.....A.....G.A...T..... 371
SbGST28_M87800.1  A..C.A..CA.G...T.C..A..T.G.....GA...G.A.C.G.AG..AA..A...C... 391
SmGST28_S71584.1  A..A..A..CA.G...T.C..A..T.G.....A.....G.A..G.AG..AA..A...C... 407
FyGSTsigma_JX157879.1 A..CC..T.TC.GG..ATGT.C.CC.T.T..CG..CA..C..A..GT..G.AG..TGCC.AAAT..A.TTC.AA.. 421
CsGST_DQ179264.1  C..T.G..T.AGG.G.TTGT.C..TGCT.TT.CGCA.G..GA...CC...AGA.AGA.G.ACTTG..A..AGC.A..GG 444
OvGST_AY057838.1  A..C..GTTC.AAG.G.T..GC.GGTT..C..TCT..G.G.G..T.CG.AG..ACA.G..CTTG.AAG.AGC.A..G.. 394
MusGSTsigma_AK020246.1 ...CT...CA.GTC.CT.T.CCC.TGGG..GAG.AAG.T.A...TCT..A...GC.G..GTT..T..AT.GC.C.C 430
          ** * * * * *

```

```

SmekGST2          TGGTAAAGTCCCATTCCTTCAA-----GCAATTTGTGAAACCCATAAAGAGTCTACAGGT-----AATC 466
SjGST_AF044411.1  C.....C.....T..... 463
ShGST28mu_XM_012942408.1 C..C...A..AG...CG.T...ATT..C..C...T.T..G...C..C...C...G... 458
ShGST28_M87799.1  C..C...A..AG...CG.T...ATT..C..C...T.T..G...C..C...C...G... 474
SjGST28_M26914.1  C.....C.....T..... 443
SbGST28_M87800.1  C..C...G..AG...CG.T...ATT..C..C...T.T..G...C..C...C...G... 463
SmGST28_S71584.1  C..C...AG...CA.T...ATG..C..C...T.T..G...G..G...A...G... 479
FyGSTsigma_JX157879.1 AATA.CG..A..G.CAT.GT.GA...TT.G...CA..T.AT.G...C.GT..AG..GA..A.. 493
CsGST_DQ179264.1  ...AG.G..G..G.AA..A..GG...CTT...CA..T.A..CTCT..A...GGT.C...GT 516
OvGST_AY057838.1  AACCTCT..A..A.AA..A..GA.C...CTT...CAC.GT.A..G.GC...G.T.C...GT 466
MusGSTsigma_AK020246.1 ACA.C...CA..TCGC...GA..GATTTGGACACAT.C..AG..G..AAG.GT...T..T...CAATTATGT..C.. 502
          * * * * *

```

```

SmekGST2          TGA-----CTGCCGAA-----ATAAGATCAC---TCTAGCT---GATGTGGTTCTGATTG---CTGCCATTGATC 523
SjGST_AF044411.1  .....T...G.....G.....G.....A.....T..... 520
ShGST28mu_XM_012942408.1 ..G...TT..GG...AG.G...C...CT.A.....T.....C.. 515
ShGST28_M87799.1  ..G...TT..GG...AG.G...C...CT.A.....T.....C.. 531
SjGST28_M26914.1  .....T...G.....G.....A.....T.....C.. 500
SbGST28_M87800.1  ..G...TT..GG...AG.G...C...CT.A.....T.....C.. 520
SmGST28_S71584.1  ..G...TT..GG...C..AG.A.....T.A..C.....T..... 536
FyGSTsigma_JX157879.1 ATG...TG..T..G...CCG.....T.G.GC...T..T.CT.AT.CA...CA.GT.GAC... 550
CsGST_DQ179264.1  ..CG...TC..T..T...C..AG.A...T.GA...CA.ATGC..T..G...AT...G..AA 573
OvGST_AY057838.1  ..CG...T..T..T...GC..AG.T...C..G.GC...CC.CTG...C.G...ATG.T.G... 523
MusGSTsigma_AK020246.1 ..GGCAGACTT..A.T..G.TATCTGC.GC.C...ACT.T.G.T.TTAA.GCCT.GCT..T.G.ATAT..A...CCAAT 582
          * * * * *

```



```

SmekGST2      A---TATAACTGATT-TGGATAAGGA-----ATTTTIGACTGGC---AAGTATCC---TGAGATTCACAA 578
SjGST_AF044411.1  -----A----- 575
ShGST28mu_XM_012942408.1  ---G.G-----C-----A-----C.A-----C.T 570
ShGST28_M87799.1  ---G.G-----C-----A-----C.A-----C.T 586
SjGST28_M26914.1  -----A----- 555
ShGST28_M87800.1  ---G.G-----C-----A-----C.A-----C.T 575
SmGST28_S71584.1  ---G.G-----C-----A.G-----C.A-----C.T 591
FgGSTsigma_JX157879.1  ---G.C.TG---GA-CA.TGCC.C---CC.CGAACAA---TC---AA.AC.G...G 605
CzGST_DQ179264.1  ---G...G...GAGC...CCCTC...GC...AAACG...A...T...GACAT.ATTGGC 628
OvGST_AY057838.1  ---CG---GGAC.AAGC...CCT...C...AA.AG...A.C...CA.AC...TGG 578
MusGSTsigma_AK020246.1  GGTGTC...T..G..ACAAA.TCC.A.CTATCCCTGCC...C..C...ATACTA...AGG..ACAGACA.A.C...T.G 661
* * * * *

SmekGST2      AC-ATCGAAAACATTTATGGCCAC-TTCACCT-AAACTGGC---GAA---ATACCTATCA-GAGAGACATGCAA 643
SjGST_AF044411.1  -----T-----C-----A----- 640
ShGST28mu_XM_012942408.1  ---A.G.A.C.C.C.A..G---G-G-T-----T-----C.GGC 635
ShGST28_M87799.1  ---A.G.A.C.C.C.A..G---G-G-T-----T-----C.GGC 651
SjGST28_M26914.1  -----T-----C-----A----- 620
ShGST28_M87800.1  ---A.G.A.C.C.C.A..G---G-G-T-----T-----C.GGC 640
SmGST28_S71584.1  ---G.A.A.C.C.G.A..G---G-CGTT-----T-----G.A.C.G.C 656
FgGSTsigma_JX157879.1  .TT---.AC..TC...GC.CAA.GA.A.TG.AGC.GG..AT..G...C.GAA..A.AC.TGCAAA 670
CzGST_DQ179264.1  C.TCGAG.CGG.G-G.G...CAAGGT-CCTG..G...T...G...C..G.CAA..ACAC...CA.A 693
OvGST_AY057838.1  GT--GG..CG..GCCG.G...AAGGA-GGAG..A..G..T...AG..T...A..AAG-TCAC.T.C.AC 643
MusGSTsigma_AK020246.1  .TGA...AGG.C.CA.C..CA.ATGAGAA.T..ATT.G...TAGA.G.TCCAC...C...CCA.T..GAC..T.. 741
* * * * *

SmekGST2      CGGCAT---TTTAA-----CACTGCCAGC----- 664
SjGST_AF044411.1  -----AA-GAATATAAAGAGGATGTGCTGGAAAT-TGCCCATAT-T 699
ShGST28mu_XM_012942408.1  .TC.C---C..C.G----- 646
ShGST28_M87799.1  .TC.C---C..G-----A...T..A.AG.AATGCT---GGGTGTGACG-AGAT-TGAAGATAC-T 704
SjGST28_M26914.1  -----AA-GAATATAAAGAGGATGTGCTGGAAAT-TGCCCATAT-T 679
ShGST28_M87800.1  .TC.C---C..G-----A...T..A.AG.AATGCT---GGGTGTGACG-AGAT-TGAAGATAT-T 693
SmGST28_S71584.1  .TC.C---C..-----A...AT..A.AG.AAAGCT---CGGTGAACG-AGAT-TTAAGATAT-T 709
FgGSTsigma_JX157879.1  .TC.G---C..-----ATA-GSCG---GGTATC 694
CzGST_DQ179264.1  ---G---CC.G-----TG-AGCA-GAC---TGTGGCGAC 722
OvGST_AY057838.1  .AC.T---C.G.TTTTTTCATGGGAAG.CATT.AGT.AAACCTTGAATCATGTGCTATCATT-GCTCCATTGG 715
MusGSTsigma_AK020246.1  .TTTG.AGTAC.C.GC-----T...TGTGTATAGCAACTCAAGGGTGTGTGCAGTTTTGCTTTATCTGCA 807
* * * * *

SmekGST2      GGTAAATAAACCATTAGTGTGATCTACTTATGATTGT-----GTCTTTACATCTTTG-----TTTTT 664
SjGST_AF044411.1  -----GTCTTTACATCTTTG-----TTTTT 756
ShGST28mu_XM_012942408.1  ----- 646
ShGST28_M87799.1  GATAGTAGTGCACCTGGTGCAGCCTTTTACTAAGAC-----GTCAATTGTTTTATGGTAT-----TTTTT 764
SjGST28_M26914.1  GGTAAATAAACCATTAGTGTGATCTACTTATGATTGT-----GTCTTTACATCTTTG-----TTTTT 736
ShGST28_M87800.1  GATAGTAGTGCACCTGGTGCACCTTTTACTAAGAC-----GTCAATTGTTTTATGGTAT-----TTTTT 753
SmGST28_S71584.1  GATAGTAAAGGACTAGTGTCACTTTTACAAGGAT-----GT-ATTTGTTTTATGGGTT-----TTTTT 769
FgGSTsigma_JX157879.1  ---TGAA---AGTGTG-----GTTATCGC-CGAC----- 717
CzGST_DQ179264.1  ---GATTAACATTCCATGTTTTTACG-ACTAA-----GTTTTTGTCCAGT-----TCCAC 770
OvGST_AY057838.1  TCAGTTTACCTTTGGGTGTTTTTCTCCACTGATCCCTGATAAAGCTTTTTGACTTTGACCTTTGCAAACTGTCTAC 795
MusGSTsigma_AK020246.1  GGCACCTTAGTTTCCAATCTTTATTTTTTCAAA-----ACTTTACACTTTATA-----TTGC 860

SmekGST2      ----- 664
SjGST_AF044411.1  TCTAAAACGTCTTT-----CAAAATAAACGTTAATTTGTGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAA 811
ShGST28mu_XM_012942408.1  ----- 646
ShGST28_M87799.1  TTCGCAATCGTTAT-----TAAAAATAAACTTAGTTTTCTGTT----- 802
SjGST28_M26914.1  TCTAAAACGTCTTT-----CAAAATAAACGTTAATTTGTGCTT----- 774
ShGST28_M87800.1  TTCGCAATCGTTAT-----TAAAAATAAACTTAGTTTTCTGTT----- 791
SmGST28_S71584.1  TTCGCAATCGTTAT-----TAAAAATAAACTTAGTTTTCTGTT----- 812
FgGSTsigma_JX157879.1  -----TTTG----- 722
CzGST_DQ179264.1  GTCAAA-----TAAAGTA-----GTTCCGT-TAGAAAA 798
OvGST_AY057838.1  ATTGAACATGTGTTCAGTCGGAAGACACACGGTATAAAATAT-TCATATTCGCCATAAAAAAAAAAAAAAAAA 868
MusGSTsigma_AK020246.1  AGGGAAATAGTT-----CACAAATATGTAG---TTGTGCATAC----- 897

SmekGST2      ----- 664
SjGST_AF044411.1  ----- 811
ShGST28mu_XM_012942408.1  ----- 646
ShGST28_M87799.1  ----- 802
SjGST28_M26914.1  ----- 774
ShGST28_M87800.1  ----- 791
SmGST28_S71584.1  ----- 812
FgGSTsigma_JX157879.1  ----- 722
CzGST_DQ179264.1  ----- 798
OvGST_AY057838.1  AAAAAAAAAA 879
MusGSTsigma_AK020246.1  ----- 897

```

3. การเปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SmekGST1 และ SmekGST2 กับยีน GST ของพยาธิใบไม้ *Schistosoma* spp.

```

SmGST26_H31106.1      -----AATGGCACCTA 11
SjGST26_H14654.1      -----AGGTAACCTT-GGTC...T.C... 26
SmekGST1              GTAGCGCGTATTGGTGGGTATATATACGATATTCTGGACAAGTCTCGAATAAGGTTACTTT-AGTC...T.G. 78
SmekGST26_Y07663.1      -----ACGATATTCTGGACAAGTCTCGAATAAGGTTACTTT-AGTC...T.G. 52
ShGST28mu_XM_012942408.1 -----ATGACTGGTGATC.CA...TC. 19
SbGST28_H87800.1      -----ATACGATGACTGGTGATC.CA...TC. 24
SmekGST2              TTCACGCAATGGCTTGTGGGC...T... 27
SjGST28_H26914.1      -----TG. 4
SjGST28_U58012.1      -----AGATGGCTTGTGGGC...T... 21
*

SmGST26_H31106.1      AGTTCGGTTATTGGAAAGTCAAAGCCCTTGTACAACCAACTCG-ACCTCTTTTGGAAACCTTGAAGAACTTATGAGGA 90
SjGST26_H14654.1      TAC.A.....A.T..G.....G.....C.....T.T.....AA.....A... 105
SmekGST1              TAC...C.....A.T..G.....C.....A.....T.T.....G.....GAA.....A... 157
SmekGST26_Y07663.1      TAC...C.....A.T..G.....C.....A.....T.T.....G.....GAA.....A... 131
ShGST28mu_XM_012942408.1 ..G.TATC...TT..C.GACGC...A.GA.CTG..T.G.TC..G.TGA.AC...TGG..G...GT.TG.AC...A... 98
SbGST28_H87800.1      ..G.TATA...TT..C.GACGC...A.GA.CTG..T.G.TC..G.TGA.AC...TGG..G...GT.TG.AC...A... 103
SmekGST2              ..G.TATC...TC..C.GACGT..A.G.CTG...G.TC..C.TGAT.C.C.TGG..G.G..G.AT.GAA..C.A... 106
SjGST28_H26914.1      ..C.TATC...TC..C.GACGT..A.G.CTG...G.TC..C.TGAT.C..TGG..G.G..G.T.GAA.TC...A... 83
SjGST28_U58012.1      ..C.TATC...TC..C.GACGT..A.G.CTG...G.TC..C.TGAT.C..TGG..G.G..G.T.GAA.TC...A... 100
* * * * *

SmGST26_H31106.1      ACGTGGGTATGATCGCAATGAAATCGATGCTGGAGCAACGATAAAATTTAAATAGGCTGGAGT---TCCCAAACTT 166
SjGST26_H14654.1      G.A.TT...G...G...GGT...AAA...C.A..A.A..G...G...G...TT...T.C... 181
SmekGST1              G...TT...C.A...GGT...A...C.A...A...G...G...T...T.C... 233
SmekGST26_Y07663.1      G...TT...C.A...GGT...A...C.A...A...G...G...T...T.C... 207
ShGST28mu_XM_012942408.1 -----GA.A.T.AGTT..C.A.AT...CCG.AATC...CC...C...TT...G.C.GACGA.TG.CTGCAG. 169
SbGST28_H87800.1      -----GA.A.T.AGTT..C.A.AT...CCG.AATC...CC...C...TT...G.C.GACGA.TG.CTGCAG. 174
SmekGST2              -----AA.G.T...T..C.A.AT...CCT.AATC...CC...CC.TA...GAAGA.TG.CC...G. 177
SjGST28_H26914.1      -----AA.G.T...T..C.A.AT...CCT.AATC...CC...CC.TA...GAAGA.TG.CT...G. 154
SjGST28_U58012.1      -----AA.G.T...T..C.A.AT...CCT.AATC...CC...CC.TA...GAAGA.TG.CT...G. 171
* * * * *

SmGST26_H31106.1      CCTTATTA---TATTGATGGTGATTTAAATFAA---CACAACTATGGCTATCATACGTTATATAGCTGACAAACACA 239
SjGST26_H14654.1      -----G.....G.....C.....C.....C.....G..... 254
SmekGST1              -----C.....G.....G.....C.....C.....C.....G..... 306
SmekGST26_Y07663.1      -----C.....G.....G.....C.....C.....C.....G..... 280
ShGST28mu_XM_012942408.1 GAAA..C.CCGA..A.C...GC.CG.G...GG.TGGT..G.GAG.T...TGC...G...G.GA.G..G..TC 249
SbGST28_H87800.1      GAAA..C.CCGA..A.C...GC.CG.G...GG.TGGT..G.GAG.T...TGC...G...G.GA.G..G..TC 254
SmekGST2              GAAA..C.CAGAC.AAAGG..G..G...ACG.TGT..G..AG.T...TGC...A.T...GAGA...T. 257
SjGST28_H26914.1      GAAA..C.CAGAC.AAAGG..G..G...ACG.TGT..G.GAG.T...TGC...A.T...GCGA...T. 234
SjGST28_U58012.1      GAAA..C.CAGAC.AAAGG..G..G...ACG.TGT..G.GAG.T...TGC...A.T...GCGA...T. 251
* * * * *

SmGST26_H31106.1      ACATGTGGGGCTTGTCCAAAGAAGCTGCGGAA-ATTTGATGCTTGAAGGAGCGGT-----TTG-GATATTAG 309
SjGST26_H14654.1      -----T.G.....G.....A.G...A..... 324
SmekGST1              -----A.G...C.....G.....A.G...A.A.....A.....C..... 376
SmekGST26_Y07663.1      -----A.G..CGGG...G...A.G...A.A.....A.....C..... 350
ShGST28mu_XM_012942408.1 ..T..A...A.G-----C...A.A..GT...ATA...GAGTT.A.GGT.CAGGC..AA..C.AGA 319
SbGST28_H87800.1      ..T..A...A.A-----C...C.A..GT...ATA...GAGTT.A.GGT.CAGG..AA..C.AGA 324
SmekGST2              -----A...C.A-----C...C.A..GT...ATATC...A..GAAGAT.A.GGCCAAG.C.AT...G.GA 327
SjGST28_H26914.1      -----A...C.A-----T.C...C.AT..GT...ATATCA..A..GAAGAT.A.GGCCAAG.C.AA...G.GA 304
SjGST28_U58012.1      -----A...C.A-----T.C...C.AT..GT...ATATCA..A..GAAGAT.A.GGCCAAG.C.AA...G.GA 321
* * * * *
    
```





```

SmGST26 M31106.1      GATGGG TGTTTAAGAATCGCATACAAT ----- AAGGAATATGAAACCCTCAAAGTGTATTTCT-CAACAAACTTC 380
SjGST26 M14654.1      ATAC .....CG.....T.....T.G.....A.C.T.....T.....T.G.....G.A. 395
SmekGST1              ATCT .....C.....T.....T.....T.....A.C.T.....T.....T.....G.A. 447
SmekGST26 Y07663.1    ATCT .....C.....T.....T.....T.....A.C.T.....T.....T.....G.A. 421
ShGST28mu_XM_012942408.1 ACAT.AA.A.AC.A.C.TTG.GA.GCCAGAAGA.GA..ACA..GATAATC..AGA..AC.GAA.GG..G.A. 399
SbGST28 H87800.1      ACAT.AA.A.CAC..A.C.TTG..GA.GCCAGAAGA.GA..ACA..GATAA.C..AGA..AC.GAA.GG..G.G. 404
SmekGST2              A.GTAA.ACCA.....C.T.....GA.GCCACCAGA.GAA.GAGAC.G.AT.G.C...GA..A.GAATGGT..G... 407
SjGST28 M26914.1      A.GT.AA.ACCA.....C.T.....A.GCCACCAGA.GAA..AGA.....AT..C...GA..A.GAA.GGT..G... 384
SjGST28_U58012.1      A.GT.AA.ACCA.....C.T.....GA.GCCACCAGA.GAA..AGA.....AT..C...GA..A.GAA.GGT..G... 401
          * * * * *
SmGST26 M31106.1      CTGGGAGGCTGAAAT-GTTCGAAGATCGTTTGTTC-----TAACAA--AACTTATTTGAAACGGTAATTGTGTAACCTCATCC 453
SjGST26 M14654.1      ...AA.T.....G.....A.G.....C.T.....A.....A.T...G.CA.....C..... 468
SmekGST1              ...AA.T.....G.....A.G.....CC.T.....A.....A.T...G.C.....C..... 527
SmekGST26 Y07663.1    ...AA.T.....G.....A.G.....CC.T.....A.....A.T...G.C.....C..... 501
ShGST28mu_XM_012942408.1 ..A.TTCCTT..CG.T..TA.CT.CGA..TC.GAAAGCGTCC..GGC..GC.GGC..T.T..GG..AAA..G...TAG. 478
SbGST28 H87800.1      ..A.TTCCTT..CG.T..TA.CT.CGA..TC.GAAAGCGTCC..GGC..GC.GGC..T.T..GG..AAA..G...TAG. 483
SmekGST2              .CATTCCTT..TC..GCAA..T.TGA.A.CC.AAAAGAGTCT..GGT..TC.GAC..C...A..AAGA.C...TAG. 486
SjGST28 M26914.1      .CATTCCTT..CC..GCAA..T.TGA.A.C..AAAAGAGTCT..GGT..TC.GAC..T...AG..AAG..C...TGG. 463
SjGST28_U58012.1      .CATTCCTT..CC..GCAA..T.TGA.A.C..AAAAGAGTCT..GGT..TC.GAC..T...AG..AAG..C...TGG. 480
          * ** * * * *
SmGST26 M31106.1      TGACTTTATGTTATACGATGCCCTTGATGTGGTTTTATACATGGACTCACAGTGCCTGAACG--AGT-TTCCAAAATTA 529
SjGST26 M14654.1      .....C.....G..T..C..T.....T.....C..AT.....C..G.T...C...C... 544
SmekGST1              .....C.....G..T..C..T.....T.....CG.A.....G.T...C...C... 603
SmekGST26 Y07663.1    .....C.....G..T..C..T.....T.....CG.A.....G.T...C...C... 577
ShGST28mu_XM_012942408.1 C.....AG.TC.GATT.C..T.A.....CCAT..GACTG.TC...TAA.G.A.TTC.A.CT.GCA..A.C.TG.G..CC 558
SbGST28 H87800.1      C.....AG.TC.GATT.C..T.A.....CCAT..GACTG.TC...TAA.G.A.TTC.A.CT.GCA..A.C.TG.G..CC 563
SmekGST2              ...TG.GG.TC.GATT.C..A.....CATA.AACTG.TT...TAAGG.A.TT...CT.GCA..A.C.TG.G..C 566
SjGST28 M26914.1      ...TG.AG.TC.GATT.C..T.A.....CATA.AACTG.TT...TAAGG.A.TT...A.CT.GCA..A.C.TG.G..C 543
SjGST28_U58012.1      ...TG.AG.TC.GATT.C..T.A.....CATA.AACTG.TT...TAAGG.A.TT...A.CT.GCA..A.C.TG.G..C 560
          ** * * * *
SmGST26 M31106.1      GTTCTTTCAA AAAA-GTGATTGAA-GATTTACCACAAATCAAGAACTACTTAAATTCATGACAGGTACATAAAATGGCCT 607
SjGST26 M14654.1      ....G...T...AC.....C.A.C.....TG.T.G...G..A.C...A...T...GC..... 622
SmekGST1              ....G...T...AC.....A.A.....TG.G...G.GA...T.A...T...G..... 681
SmekGST26 Y07663.1    ....G...T...AC.....A.A.....TG.G...G.GA...T.A...T...G..... 655
ShGST28mu_XM_012942408.1 A.AAACA.AG.G.AA.C..C.AGCCAG..C...GAG.T.GGC..A.T...AGA..GCTGC...CTC... 633
SbGST28 H87800.1      A.AAACA.AG.G.AA.C..AGCCAG..C...GAG.T.GGC..A.T...AGA..GCTGC...CTC... 638
SmekGST2              ACAAAACA..G...CA.T...GCCAC..C...TA.C.GGC..A.....AGAG..AC.TGC...C..A. 641
SjGST28 M26914.1      ACAAAACA..GT...CA.C...GCCAC..C...A.C.GGC..A.....AGAG..AC.TGC...C..A. 618
SjGST28_U58012.1      ACAAAACA..GT...CA.C...GCCAC..C...A.C.GGC..A.....AGAG..AC.TGC...C..A. 635
          * ** * * *
SmGST26 M31106.1      CTGCAAGGTTGGGAT-----GCCACGTTTGG-----TGGTGGAGATACCTCCAAAATAGATTAA 663
SjGST26 M14654.1      T...G...C...C.A.....T.....T.....C.CCA.....G..A...T 678
SmekGST1              ...G...C...C.A.....T.....T.....C.CCA.....G..A...T 737
SmekGST26 Y07663.1    ...G...C...C.A.....T.....T.....C.CCA.....G..A...T 711
ShGST28mu_XM_012942408.1 TC.T.G.....T.C.AGAAATGCTGGGTGT.A.G.A...AAG-----A.AT..ATAG..G.G.A.TGGTG.GACC.TT 638
SbGST28 H87800.1      TC.T.GAAC..TC.ACAGAATGCTGGGTGT.A.G.A...AAG-----A.AT..ATAG..G.G.A.TGGTG.GACC.TT 711
SmekGST2              T..T..CAC..CC.GC.....T.....T.....C.CCA.....G..A...T 656
SjGST28 M26914.1      T..T..CAC..CC.GCAAGATATAAAGAG.ATGT.C.G.AAATTCGCCA.AT..TA..AC..ATT.GTG.GATC..C 697
SjGST28_U58012.1      T..T..CAC..CC.GCAAGATATAAAGAG.ATGT.C.G.AAATTCGCCA.AT..TA..AC..ATT.GTG.GATC..C 714
          *
SmGST26 M31106.1      CAGTAA--ATCTGGTAAATAACATAAAAAGCCTGTTATATGTTACTAAATAAAAA-AATA----- 721
SjGST26 M14654.1      G.A.G.TTGT.T.A.....C.TT..TT.TCA.T.ACA...AA.....T...TG.CGAC----- 739
SmekGST1              T.A.TGTTGT.T.....C.TT..TT.TCA..A.G...G.G.....TG.CG----- 798
SmekGST26 Y07663.1    T.A.TGTTGT.T.....C.TT..TT.TCA..A.G...G.G.....TG.CGATAAAAAAAAAAAAAAAA 796
ShGST28mu_XM_012942408.1 TTAC..AGACGTCAT.TGT.TTATGGT.TTTT.T.CGC.ATCG.TA.T.A.T...CT..GTTTCTGTTT----- 638
SbGST28 H87800.1      TTAC..AGACGTCAT.TGT.TTATGGT.TTTT.T.CGC.ATCG.TA.T.A.T...CT..GTTTCTGTTT----- 783
SmekGST2              TTA.G.TTGTGCTT.T.CATCTT.GT---TTT.TC..A.AC.GCTT.C..A.T...CG.T.ATTGTGCTT----- 766
SjGST28 M26914.1      TTA.G.TTGTGCTT.T.CATCTT.GT---TTT.TC..A.AC.GCTT.C..A.T...CG.T.ATTGTGCTT----- 766
SjGST28_U58012.1      TTA.G.TTGTGCTT.T.CATCTT.GT---TTT.TC..A.AC.GCTT.C..A.T...CG.T.ATTGTGCTTAAAAAAAA 791

SmGST26 M31106.1      ----- 721
SjGST26 M14654.1      ----- 739
SmekGST1              ----- 798
SmekGST26 Y07663.1      AAA----- 799
ShGST28mu_XM_012942408.1 ----- 638
SbGST28 H87800.1      ----- 783
SmekGST2              ----- 656
SjGST28 M26914.1      ----- 766
SjGST28_U58012.1      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 813

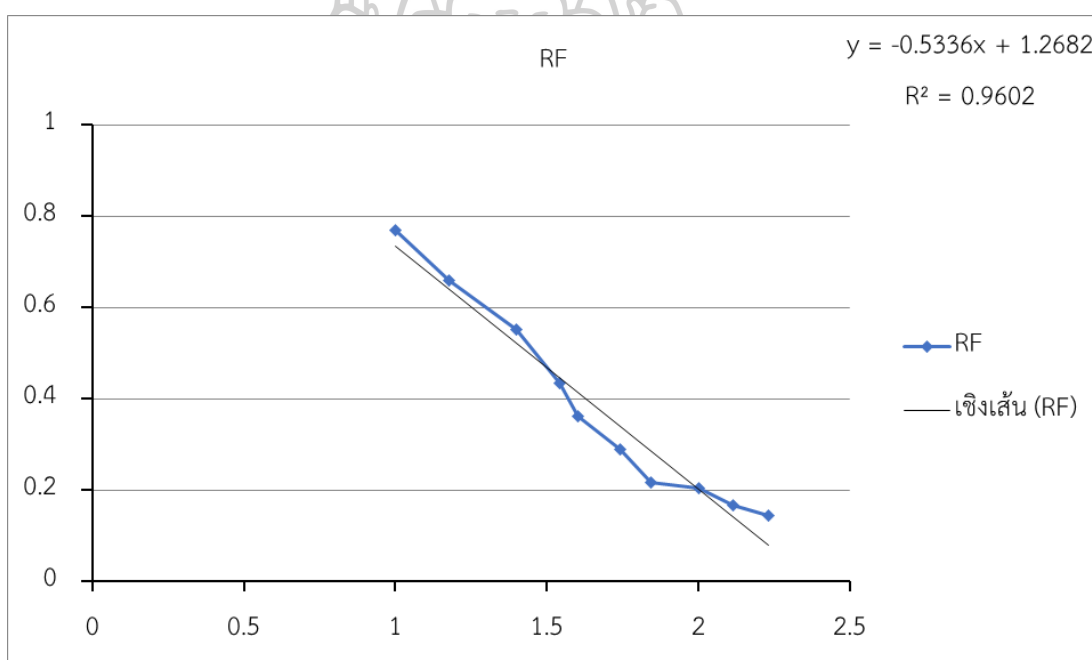
```



### การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนจากเจล SDS-PAGE สามารถคำนวณจากค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ (Relative electrophoretic mobility, Rf) ของแถบโปรตีนที่ต้องการคำนวณ โดยนำมาเปรียบเทียบกับค่าระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) ของค่าน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน ซึ่งจากกราฟเส้นตรงที่ได้จากการ plot ระหว่างค่าระยะทางสัมพัทธ์บนแกน X กับค่า  $\log_{10}$  ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ในระดับของน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานบนแกน Y โดยค่า Rf ของสารที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ในเตสารลายของน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานที่ใช้ คำนวณได้จาก

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ไป}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงระยะทางที่ bromphenol blue เคลื่อนที่ไป}}$$



ภาพที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) กับค่า  $\log_{10}$  ของน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานใน 12.5% SDS-PAGE gel

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว วรรณวิษา เป็นสมุท
วัน เดือน ปี เกิด	6 มิถุนายน 2536
สถานที่เกิด	สมุทรสาคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2559 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (สัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2560 ศึกษาต่อระดับปริญญาโทบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตวศาสตร์) มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	39/1 หมู่ที่ 1 ตำบล เจ็ดริ้ว อำเภอ บ้านแพ้ว จังหวัด สมุทรสาคร 73110
ผลงานตีพิมพ์	วรรณวิษา เป็นสมุท, มะนาว แสงเพ็ญ, ญาณิน ลิ้มปานนท์, จริญญาโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล, ประเสริฐ โสภณ และนรินทร์ ปรียวิชัยภักดี. 2562. การโคลนยีนและทำนายตำแหน่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ Glutathione S-Transferase จากพยาธิใบไม้เลือด Schistosoma mekongi. S548-S557. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 48 ร่วมกับการประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 9 และการประชุมวิชาการ "ศิลปากรวิจัย" ครั้งที่ 11 เรื่อง "นวัตกรรมและการสร้างสรรค์เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน" 13-14 มิถุนายน 2562. ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบพระชนมพรรษา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์. นครปฐม.