

1.3 การศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติของนิวเคลียสโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์จากอวัยวะ (testicular cells) ของมนุษย์ หนู (rats) กบ (*Rana tigerina*) และหอยเป่าอื้อ (*Haliothis asinina*)

1.3.1 การแยกเบสิกนิวเคลียโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์จากอวัยวะของมนุษย์เปรียบเทียบกับของหนูโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ในเบื้องต้นเราได้ใช้ระบบ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ใน 0.9N acetic acid, 2.5M urea, pH 2.7 (Panyim & Chalkley, 1969) แยกเบสิกนิวเคลียโปรตีน แต่วิธีนี้ไม่สามารถแยกแถบ TH2B (testis-specific histones) จาก H3 ได้อย่างชัดเจนถึงแม้ว่าจะใช้ gel ขาวถึง 18-24 ซม. (รูปที่ 62) เราพบว่าการใช้ Triton X-100 ซึ่งเป็น non-ionic detergent ใส่ลงในระบบ acid urea gel ข้างต้นจะทำให้การแยกแถบโปรตีน TH2B จาก H3 และการแยกแถบ histones อื่น ๆ ทำได้ดีขึ้น เราจึงได้สกัดเบสิกนิวเคลียโปรตีนจากเซลล์ในอวัยวะของหนูด้วย 0.4N H_2SO_4 แล้วตกตะกอนด้วย 5 % PCA หลังจากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปแยกใน acid-urea-TritonX PAGE (AUT PAGE) โดยใช้เบสิกนิวเคลียโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ตับของหนูเปรียบเทียบกับ ผลปรากฏว่าลำดับของการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าใน AUT PAGE จากซ้ายไปขวาของเบสิกนิวเคลียโปรตีนจากเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะของหนู คือ $H1 > TH1 > H4 > H2B > TH2B > H3 > H2A$ (รูปที่ 63A) โดย TH1 และ TH2B เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในเซลล์อวัยวะแต่ไม่พบในเซลล์ตับ

การศึกษาวิเคราะห์เบสิกนิวเคลียโปรตีนจากเซลล์อวัยวะของมนุษย์ก็ให้ผลคล้ายคลึงกันกับที่ได้จากเซลล์อวัยวะของหนู แต่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยที่ TH1 ไม่ปรากฏในเซลล์อวัยวะของมนุษย์ นอกจากนั้นการแยก TH2B จาก H3 ที่ได้จากเซลล์ของมนุษย์ไม่ค่อยชัดเจนเหมือนในโปรตีนที่ได้จากเซลล์หนู เพื่อให้การแยก TH2B จาก H3 ชัดเจนยิ่งขึ้น เราได้ทดลองปรับระดับความเข้มข้นของ urea จาก 0 ถึง 6M ปรากฏว่า การแยกแถบเบสิกโปรตีนรวมทั้งแถบ TH2B, H3 และ H4 ที่ความเข้มข้น 1.5M urea ให้ผลดีที่สุด โดยลำดับของการเคลื่อนที่ของเบสิกนิวเคลียโปรตีนจากเซลล์อวัยวะมนุษย์ในสนามไฟฟ้าจากซ้ายไปขวาคือ 0.4 % TritonX-100, 1.5M urea, 0.9N acetic acid PAGE คือ $H1 > H4 > H2B > TH2B > H3 > H2A$ โดยไม่ปรากฏ TH1 (รูปที่ 63B) การพัฒนา acid-urea-Triton PAGE 2 ระบบ คือ 2.5M urea สำหรับแยก rat TH2B และ 1.5M สำหรับ human TH2B ทำให้เราสามารถแยก วิเคราะห์ และเปรียบเทียบเบสิกนิวเคลียโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์จากอวัยวะของมนุษย์และหนูได้โดยละเอียด

1.3.2 การวิเคราะห์เบสิกนิวเคลียโปรตีนในเซลล์อสุจิของหนูและมนุษย์เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ กบ และปลา โดยวิธี Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis (AUPAGE)

1.3.2.1 การวิเคราะห์ด้วย 15 % Acid Urea PAGE (AUPAGE)

รูปที่ 64A แสดงกลุ่มโปรตีน histones ของเม็ดเลือดแดงที่สกัดได้จากปลา (lane 2) โดยวิธี HCl-extraction มีความแตกต่างจาก histones ที่สกัดได้จากเม็ดเลือดแดงของกบ (lane 3) และจาก

เม็คเล็ดแดงไก่ (lane 4) ก็จะปรากฏเด่นเฉพาะแถบ H2B และ H2A เท่านั้น ในขณะที่ histones ที่ได้จากกบและไก่มีความคล้ายคลึงกันมาก ยกเว้น แถบ H2A ที่สามารถแยกได้อย่างชัดเจนในเม็คเล็ดกบแต่แยกได้ไม่ชัดเจนในเม็คเล็ดไก่ ซึ่งคาดว่าน่าจะอยู่ใกล้ชิดกันแถบ H2B ที่ปรากฏเป็นแถบหนามาก

ในกลุ่มเซลล์ที่แยกจากอวัยวะของหนู rat ซึ่งทำการสกัดเปรียบเทียบโดย 2 วิธี คือการใช้ HCl-extraction (lane 5) และการใช้ reducing agent DTT (lane 6) พบว่าลักษณะของแถบโปรตีน มีความคล้ายคลึงกันมาก โดยเฉพาะความเด่นชัดของแถบโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะคือแถบ TH2B ที่อยู่เหนือแถบ H2B ที่ปรากฏจางๆ ซึ่งตรงกับที่เคยเสนอไว้ในรายงานของ Tanphaichitr *et al*, 1982 แต่ยังคงมีความแตกต่างกันบ้างในแถบย่อยของ H1 ซึ่งอาจเป็น TH1 ที่เด่นกว่าใน lane 6 สำหรับเบสิกนิวเคลียโปรตีนของ spermatozoa จาก epididymis ของหนู rat ที่สกัดโดยใช้ Guanidine-HCl + DTT (lane 7) และการใช้ DTT อย่างเดียว (lane 8) พบว่าการใช้ reducing agent อย่างเดียวสามารถสกัดได้ทั้ง protamine (P) ที่มีแถบกว้างและเคลื่อนที่เร็ว และ transitional protein (TP) ที่มีการเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง histones และ protamines ในขณะที่โปรตีน histones ในเซลล์สุจิของหนูมีบริเวณน้อยมากจนเกือบไม่สามารถสังเกตเห็นได้เมื่อเทียบกับเบสิกนิวเคลียโปรตีนที่สกัดได้จาก ejaculated spermatozoa ของคน (lane 9,10) ซึ่งพบว่ายังคงมี histones เหลืออยู่ในปริมาณมากกว่าในหนูและสังเกตเห็นได้ชัดเจน โดยเฉพาะแถบ TH2B ซึ่งมีความเข้มมาก ส่วนแถบ TH1 ในคนจางมากเมื่อเปรียบเทียบกับของหนู แต่ในเซลล์สุจิของคนปรากฏแถบของ TP จางมากเมื่อเปรียบเทียบกับหนูถึงแม้ว่าจะสกัดด้วย reducing agent เช่นเดียวกับที่ทำในหนูก็ตาม ส่วนแถบของ protamine ไม่ปรากฏเมื่อใช้วิธีสกัดโดย 0.25 M NaCl extraction (lane 9) แต่จะปรากฏเด่นชัดมากเมื่อสกัดด้วย DTT ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในเซลล์สุจิของหนูมีโปรตีน protamines และ TP เ่นมาก ในขณะที่มี histones เหลืออยู่น้อย ในขณะที่เซลล์สุจิของมนุษย์มี histones เหลืออยู่มากกว่าโดยเฉพาะแถบ TH2B และมี protamine มากแต่มี TP โปรตีนน้อยกว่าในเซลล์สุจิของหนู นอกจากนั้นแล้วในเซลล์สุจิของมนุษย์ยังมี non histone proteins ที่ปรากฏเป็นแถบอยู่หลัง TH1 ซึ่งไม่ปรากฏในเซลล์สุจิของหนู

1.3.2.2 การวิเคราะห์ด้วย 12% Triton X-100 Acid Urea PAGE

การใช้ non-ionic detergent เช่น Triton X-100 ผสมอยู่ใน gel ในปริมาณ 0.375% ทำให้สามารถแยกแถบของ histones ออกจากกันได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เนื่องจากโปรตีนมีประจุบวกต่างกันและคุณสมบัติ hydrophobicity ต่างกันจากการมี neutral amino acid ซึ่งมี nonpolar side chain ที่ต่างกัน Triton ซึ่งเป็น nonionic detergent จึงเป็นตัวช่วยแยกโปรตีนอีกทางหนึ่งตามปริมาณความแตกต่างของ hydrophobicity ของเบสิกโปรตีน

ผลการทดลอง (รูปที่ 64B) พบว่า การเรียงตัวของแถบ histones ในเซลล์เม็คเล็ดแดง ของไก่และกบเป็นไปตามลำดับจากซ้ายขวาไปเลยดังนี้ H2A, H3, H2B, H1 และ H4 โดยแถบ H1 และ

H4 ของไก่สามารถแยกออกเป็น 2 แถบย่อยได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับแถบ H4 ของกบที่สามารถแยกเป็น 2 แถบย่อยแต่การเคลื่อนของโปรตีนช้ากว่าเมื่อเทียบกับแถบ H4 ของไก่ ในขณะที่โปรตีนสกัดได้จากปลา (lane 4) มีความแตกต่างจากกบและไก่ชัดเจน กล่าวคือ แถบ H2B ทั้ง 2 แถบย่อยเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าแถบ H2B ที่สกัดได้จากกบ (lane 3) และไก่ (lane 2) เราจึงให้ชื่อโปรตีนดังกล่าวว่า H2B.X

ในกลุ่ม Testicular cell ของหนู rat (lane 5) ประกอบด้วยแถบ histone 4 แถบหลักคือแถบ H2A, H3, TH2B, H2B และ H1 โดยแถบ TH2B จะมีการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับแถบ H3 แต่ปรากฏว่าจางมากในหนู เมื่อเทียบกับแถบ TH2B ใน spermatozoa ของคน (lane 7) ซึ่งนอกจากจะมีการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับ H3 แล้วยังเป็นแถบที่เด่นชัดมาก นอกจากนั้นแล้วยังมีแถบ H2B.X ที่มีการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับ H2B.X ของปลาด้วย

ใน gel ที่มีความเข้มข้น 12% ไม่สามารถแยกแถบของ protamine (P) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากการเคลื่อนที่ของ protamines ใน spermatozoa ของหนู (lane 6) และของคน (lane 7) จะเท่ากับการเคลื่อนที่ของยีส pyronin G ดังนั้นจึงต้องใช้เปอร์เซ็นต์ของ acrylamide gel ที่สูงขึ้นเพื่อแยก protamines

1.3.3 การวิเคราะห์ชนิดของเบสิกนิวเคลียสโปรตีนในเซลล์ต่อมอัณฑะ (Testicular cells) และเซลล์อสุจิของกบนา (*Rana tigerina*)

จากการศึกษาโดย TEM ที่กล่าวแล้ว (ข้อ 1.1.3, ข้อ 1.2.3) ปรากฏว่าการขดของใยโครมาตินในเซลล์อสุจิของกบนา (*Rana tigerina*) มีลักษณะเช่นเดียวกับในนิวเคลียสของ chick erythrocyte จึงเป็นไปได้ว่าเบสิกนิวเคลียสโปรตีนในเซลล์อสุจิของกบนาอาจจะไม่มี protamines อยู่เลย โดยการขดแน่นของใยโครมาตินอาจเกิดจากโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่ protamine โดยเส้นใย 30 nm ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนแปลงขนาดเลย ดังนั้นเราจึงได้ศึกษาแบบแผนของเบสิกนิวเคลียสโปรตีนในเซลล์ต่อมอัณฑะ (testicular cells) กับเซลล์อสุจิ (spermatozoa) ของกบนา เพื่อเปรียบเทียบกับเบสิกนิวเคลียสโปรตีนของ เซลล์เม็ดเลือดแดงของกบนาเองและของ chick erythrocytes

เราได้สกัดเบสิกนิวเคลียสโปรตีนจากเซลล์ในอัณฑะทั้งหมด (testicular cells) และจากเซลล์ spermatozoa ที่เก็บจาก cloaca ของกบนา ด้วย 0.25 N HCl แล้วนำชั้นเหลว (supernatant) ที่มีเบสิกนิวเคลียสโปรตีนละลายอยู่ไปตกตะกอนด้วย 20% TCA แล้วนำโปรตีนที่ตกตะกอนได้ไปล้างด้วย acidified acetone และ acetone ตามลำดับ จากนั้นจึงนำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 17% acid urca triton-x polyacrylamide gel โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ โปรตีนที่สกัดจาก chick erythrocyte นอกจากนั้นเรายังได้เปรียบเทียบเบสิกนิวเคลียสโปรตีนของเซลล์สืบพันธุ์ของกบ (testicular cell และ spermatozoa) กับเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของกบ โดยใช้เซลล์ตับและเซลล์เม็ดเลือดแดงของกบเป็นตัวแทนของเซลล์ร่างกาย

รูปที่ 65 แสดงผลการวิเคราะห์เบสิกนิวเคลียสโปรตีนด้วย 17% acid-urea-Triton X polyacrylamide gel จากโปรตีนที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงของไก่ (lane a) โปรตีนที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงของกบ (lane b) โปรตีนที่สกัดจากเซลล์ตับของกบ (lane c) โปรตีนที่สกัดจากเซลล์ในต่อมอินทรีของกบ (lane d) และโปรตีนที่สกัดจาก อสุจิของกบนา (lane e) และโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ต่อมอินทรีของเขียดแล้ว *Rana blythii* (lane f) ผลปรากฏว่า โปรตีนที่สกัดจากเซลล์ในอินทรีและอสุจิของกบนาสามารถแยกแถบโปรตีนตามการเคลื่อนที่ไปใน gel จากซ้ายขวาก็ยังชัด ออกได้เป็น 5 แถบ คล้ายกับโปรตีนที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงของไก่ และ กบตามลำดับ คือ H2A, H3, H2B, H4 และ H1 นอกจากนั้น พบว่าโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ในอินทรีและเซลล์อสุจิของกบนา รวมทั้งเม็ดเลือดแดงของไก่ มีแถบโปรตีนที่เคลื่อนที่ไปอยู่ในระดับต่ำกว่า H1 ปรากฏอยู่ อีก 2 แถบ ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่ปรากฏในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับของกบ ดังนั้นเซลล์สืบพันธุ์ของกบจึงมีโปรตีนจำเพาะ กล่าวคือ นอกจาก histones ที่เป็นโปรตีนที่มีอยู่ในก้อน nucleosome แล้ว เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกบยังมีโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า และเคลื่อนที่ลงไปสู่ขั้วลบเร็วกว่า H1 อีกสองชนิดที่อาจจะเป็นโปรตีนที่มีกำเนิดหรือคล้ายคลึงกับ H1 ที่อาจเรียกว่า H1 variants (H1V) โปรตีน H1V คล้ายคลึงกับโปรตีนในเม็ดเลือดแดงของไก่ที่เรียกว่า H5 ที่เป็น variant ของ H1 เช่นกัน โดยจะเห็นว่าแถบโปรตีนดังกล่าวของทั้งสองกลุ่ม จะเคลื่อนที่ไปบนเจลในระดับที่ใกล้เคียงกัน และที่น่าประหลาดใจคือในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกบนาไม่พบ Protamine อยู่เลย ซึ่ง protamine เป็นโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการขดของใยโครมาตินในเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่ ฉะนั้น H1 variants ซึ่งน่าจะเป็นตัวการสำคัญที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการขดของใยโครมาตินในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกบนา เนื่องจากโปรตีน histones ที่เหลือก็มีลักษณะและขนาดเช่นเดียวกับ histones ใน somatic cells ทั่วไป จึงไม่น่าจะเกี่ยวกับการขดแน่นของใยโครมาตินในเซลล์ spermatids และ spermatozoa ของกบ นอกจากนั้นแล้วจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า H5 เกี่ยวข้องโดยตรงกับการขดแน่นของใยโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ จึงอาจเป็นไปได้ว่าถึงแม้เซลล์สืบพันธุ์ของกบจะไม่มีโปรตีน protamines อยู่เลย ใยโครมาตินที่ยังคงสภาพเป็นแบบ nucleosomal organization ขนาด 30 นาโนเมตรก็สามารถเข้ามาขดพันกันจนแน่นทึบโดยอาศัย H1 variants เป็นโปรตีนที่ควบคุมการขดตัวแต่เพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับในกรณีของเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ที่ใช้ H5 เป็นโปรตีนที่กระตุ้นการขดตัวของใยโครมาติน

1.3.4 การวิเคราะห์เบสิกนิวเคลียสโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยเป่าชื่อ (*Haliotis asinina*) เปรียบเทียบกับเบสิกนิวเคลียสโปรตีนสกัดจากนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ กบ และปลา ด้วยวิธี 15% Acid-Urea PAGE

การสกัดโปรตีนด้วย Reducing agent ร่วมกับ HCl

เราสกัดโปรตีนโดยคัดต่อมอินทรีของหอยเป่าชื่อแช่ลงในสารละลาย 0.1M PBS และ 0.5 mM Phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF) โดยพยายามแยกส่วนของอินทรีออกจากเซลล์ตับ

(hepatopancreas) ให้บริสุทธิ์มากที่สุด จากนั้นนำไปปั่นล้างที่ 2200 g เป็นเวลา 10 นาที จนได้กลุ่มของ testicular cells ตกอยู่ที่ก้นหลอด ใส่สารละลายชนิดเดิมลงไปแล้วนำไปบดด้วย homogenizer ประมาณ 10 นาที นำไปปั่นอีกครั้งที่ 2,200 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนของนิวเคลียสออกจากไซโตพลาสซึม เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลาย reducing agent (0.1M Tris-HCl, 2mM EDTA, 10 mM DTT) ซึ่งเป็นสารสกัดเบสิกโปรตีน เข้าไปแทนที่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย HCl ให้ได้ความเข้มข้น 0.25N ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง ใช้เครื่อง sonicator บดทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสเป็นระยะ ๆ เสร็จแล้วนำส่วน supernatant ไปปั่นแยกส่วนของเบสิกนิวเคลียโปรตีนที่ 12,000g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลาย supernatant ไว้แล้วนำไปทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย 20% Trichloroacetic acid (TCA) โดยเขย่าเบา ๆ เพื่อให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง จนเห็นตะกอนสีขาวของโปรตีนเกิดขึ้น จากนั้นนำไปปั่นอีกครั้งที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง นำโปรตีนที่ได้ไปล้างด้วย acidified acetone แล้วล้างซ้ำด้วย pure acetone ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

การแยกวิเคราะห์เบสิกนิวเคลียโปรตีนที่ได้จาก testicular cells ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วย 15% Acid-Urea PAGE

นำผงโปรตีนที่สกัดได้มาละลายใน 100 µl sample buffer (ประกอบด้วย 1M HCl, 5% β-mercaptoethanol, 9M urea, 5% pyronin Y) จากนั้นนำไปหยอดใส่ช่อง 15% AUPAGE gel ในปริมาณ 1-2.5 µl ต่อ 1 ช่อง gel โดย slab polyacrylamide gel นี้จะถูกหล่ออยู่ใน reservoir buffer (0.9N acetic acid, pH 3) ต่อ gel electrophoresis แบบ constant voltage โดยใช้กระแสไฟ 120 volts โดยโปรตีนตัวอย่างจะวิ่งจากขั้วบวกมายังขั้วลบ ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นสี pyronin Y วิ่งลงมาถึงปลาย slab gel พอดี หลังจากนั้นนำแผ่น gel มาย้อมสี Coomassie blue (0.125% Coomassie brilliant blue R250, 50% methanol, 10% acetic acid) ประมาณ 30 นาที จะเห็นเบสิกนิวเคลียโปรตีนที่สกัดจาก testicular cells ของหอยเป่าชื่อแยกออกเป็นแถบโปรตีนขนาดต่าง ๆ กัน 6 แถบ ได้แก่ H1, H3, H2B, H2A, H4 และ Protamine-like protein ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 66

ผลการวิเคราะห์เบสิกนิวเคลียโปรตีน

จากรูปที่ 66A ซึ่งเปรียบเทียบเบสิกนิวเคลียโปรตีนจาก calf thymus histone (Sigma Co.) และเบสิกนิวเคลียโปรตีนที่สกัดจาก chick erythrocytes, frog erythrocytes และ fish erythrocytes ที่แยกโดย acid-urea gel พบว่ากลุ่มโปรตีน histones เคลื่อนที่ไปอยู่ใน gel ที่ระยะใกล้เคียงกันและสามารถแยกออกเป็นแถบต่าง ๆ ได้ โดย abalone histones มีลักษณะใกล้เคียงกับ chick erythrocyte histones มากที่สุด มีการแยกแถบโปรตีน histones ที่สังเกตเห็นได้จากขั้วบวกไปลบคือแถบ H1 มี 2 แถบย่อย แถบ H3 มี 2 แถบย่อย แถบ H2B และ H2A อยู่ค่อนข้างจะชิดกันและเคลื่อนที่เร็วกว่าแถบ H2B และ H2A ใน chick erythrocyte เล็กน้อย แถบ H4 ปรากฏเป็นแถบใหญ่และเด่นอยู่ 1 แถบ

แถบโปรตีน PL ปรากฏเป็นแถบที่เข้มที่สุดและมีโปรตีนมากที่สุดโดยเคลื่อนไปอยู่สุดขอบของ gel ด้านซ้าย ระหว่างแถบ H4 และแถบ PL มีแถบที่เป็น intermediate proteins อยู่ 4 แถบ

ใน acid-urea-Triton gel (17 % PAGE, 6 M urea, 0.375 % Triton X-100, 0.9 N acetic acid) (รูปที่ 66B) ปรากฏว่า สามารถแยกแถบเบสิกโปรตีนได้ชัดเจนเช่นกัน จากซ้ายไปขวา คือ แถบ H2A 1 แถบ แถบ H3 1 แถบ แถบ H2B มี 2 แถบย่อย แถบ H1 มี 2 แถบย่อย แถบ H4 มี 1 แถบ แถบ PL มีความกว้างและความเข้มมากที่สุดซึ่งอยู่ติดกับขอบล่างของ gel ที่อยู่ทางซ้าย ระหว่างแถบ PL และแถบ H4 ปรากฏว่ามี intermediate proteins อยู่ 3-4 แถบ ดังนั้นเซลล์สุจิของหอยเป่าฮือจึงมีเบสิกโปรตีนที่เป็นลักษณะเฉพาะคือ intermediate proteins (IP) ที่อาจจะเทียบได้กับ TP โปรตีนของหนูและมนุษย์กับ protamine-like protein (PL) ซึ่งมีประจุบวกน้อยกว่า protamine ของหนูและมนุษย์ โปรตีน PL อาจจะเป็นโปรตีนหลักที่ช่วยให้ไซโครมาตินขดแน่นเป็นก้อนบนเส้นใยขนาด 60 nm ในเซลล์สุจิของหอยเป่าฮือ (ข้อ 1.1.4)

รูปที่ 62 คุณลักษณะของเบสิกนิวเคลียโปรตีนจากเซลล์สืบพันธุ์ในต่อมอัณฑะของหนู (rat) และมนุษย์ซึ่งแยกด้วย 15 % polyacrylamide gels ที่ประกอบด้วย 2.5 M urea, 0.9 N acetic acid, pH 2.7 ดังที่ 130 volt นาน 18 ชั่วโมง a: rat liver total histones; b: rat testis total histones; c: human testis total histones

รูปที่ 63 A) การวิเคราะห์ histones จากเซลล์สืบพันธุ์ในต่อมอัณฑะของหนูโดย triton-acid-urea gel ที่ประกอบด้วย 15 % polyacrylamide, 0.4% triton-X 100, 0.9 N acetic acid, 2.5 M urea ดังที่ 130 volt นาน 18 ชั่วโมง โปรตีน histones ถูกสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันคือ 1: liver total histones; 2: testis total histones; 3: liver 5% PCA supernate; 4: testis 5% PCA supernate; 5: liver 80% EtOH-HCl pptc; 6: testis 80% EtOH-HCl pptc; 7: liver 80% EtOH-HCl supernate; 8: liver 95% EtOH-HCl pptc; 9: liver slightly lysine-riched histones obtained from hydroxylapatite chromatography

B) ผลของการปรับระดับความเข้มข้นของ urea ต่อการแยกโปรตีน histones จากเซลล์สืบพันธุ์ในต่อมอัณฑะของมนุษย์ใน triton-acid-urea gels โดยความเข้มข้นของ triton และ acetic acid อยู่ที่ระดับ 0.4% และ 0.9 N ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นของ urea เปลี่ยนจาก 0-6.0 M SP คือ Salmon protamine ที่ถูกเติมลงใน gel เพื่อใช้เป็นตำแหน่งที่อ้างอิง 30 นาที ก่อนหน้าปิดกระแสไฟฟ้า

รูปที่ 64 A) การแยก basic nuclear proteins จากกลุ่มเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดย 15 % acid-urea gel: lane 1-calf thymus; 2-fish erythrocytes; 3-frog erythrocytes; 4-chick erythrocytes; 5-rat testicular cells extracted by 0.25N HCl; 6- rat testicular cells extracted with 10 mM DTT; 7-rat sperm extracted with 1.6M Guanidine HCl + 10 mM DTT; 8-rat sperm extracted with 10 mM DTT; 9-human sperm extracted with 0.25M NaCl; 10-human sperm extracted with 10 mM DTT

B) การแยก basic nuclear proteins จากกลุ่มเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดย 17% acid-urea-Triton X-100 gel: lane 1-calf thymus; 2-chick erythrocytes; 3-frog erythrocytes; 4-fish erythrocytes; 5-rat testicular cells; 6-rat spermatozoa; 7-human spermatozoa

รูปที่ 65 17% Acid-urea-Triton X polyacrylamide gel electrophoresis ของเบสิกนิวเคลียโปรตีนจากเซลล์สืบพันธุ์จากอัณฑะของกบนา (*Rana tigerina*) และเบียดแฉว (*Rana blythii*)

a: chick erythrocytes; b: *Rana tigerina* erythrocytes; c: *Rana tigerina* liver;

d: *Rana tigerina* testicular cells; e: *Rana tigerina* spermatozoa; f: *Rana blythii* testicular cells

รูปที่ 66 A) 15% Acid-urea PAGE gel ที่วิเคราะห์เบสิกนิวเคลียโปรตีนที่สกัดจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในต่อมอัณฑะของหอยเป่าฮื้อ *Haliotis asinina*: lane 1-calf thymus histone H₁, lane 2-chick erythrocytes' basic nuclear proteins, lane 3-8 –basic nuclear proteins จาก testicular cells ของ *H.asinina*

B) 17% Triton X-100 Acid-urea PAGE gel ของเบสิกนิวเคลียโปรตีนที่สกัดจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในต่อมอัณฑะของหอยเป่าฮื้อ *Haliotis asinina*: lane 1-calf thymus H₁, lane 2-chick erythrocytes' basic nuclear proteins, lane 3-fish erythrocytes' basic nuclear proteins, lane 4&5-basic nuclear proteins จาก testicular cells ของ *H.asinina*

Figure 62

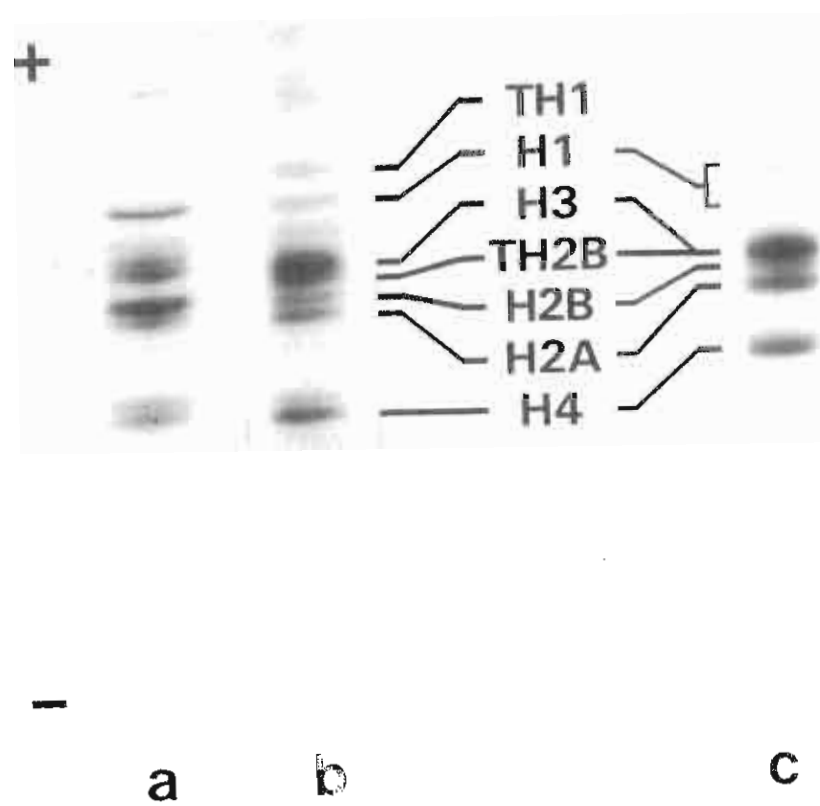


Figure 63

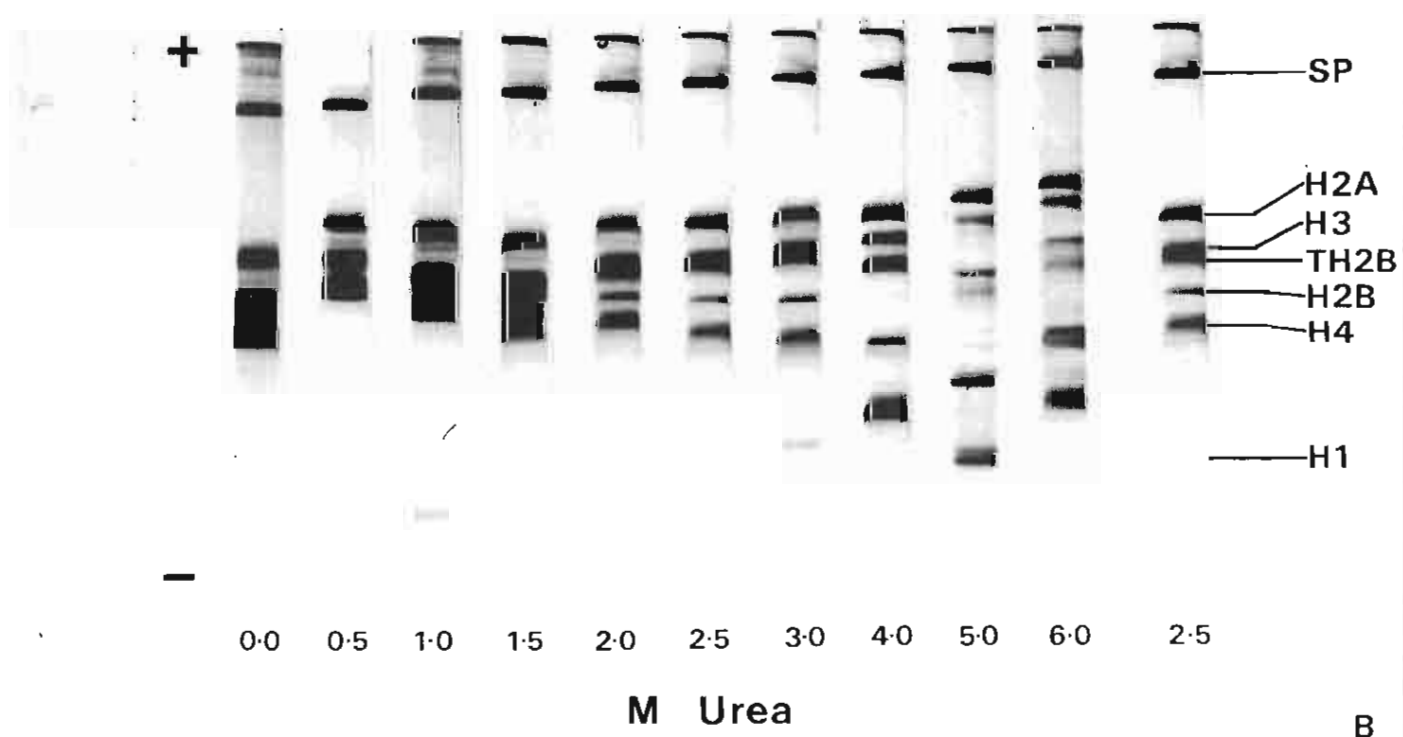
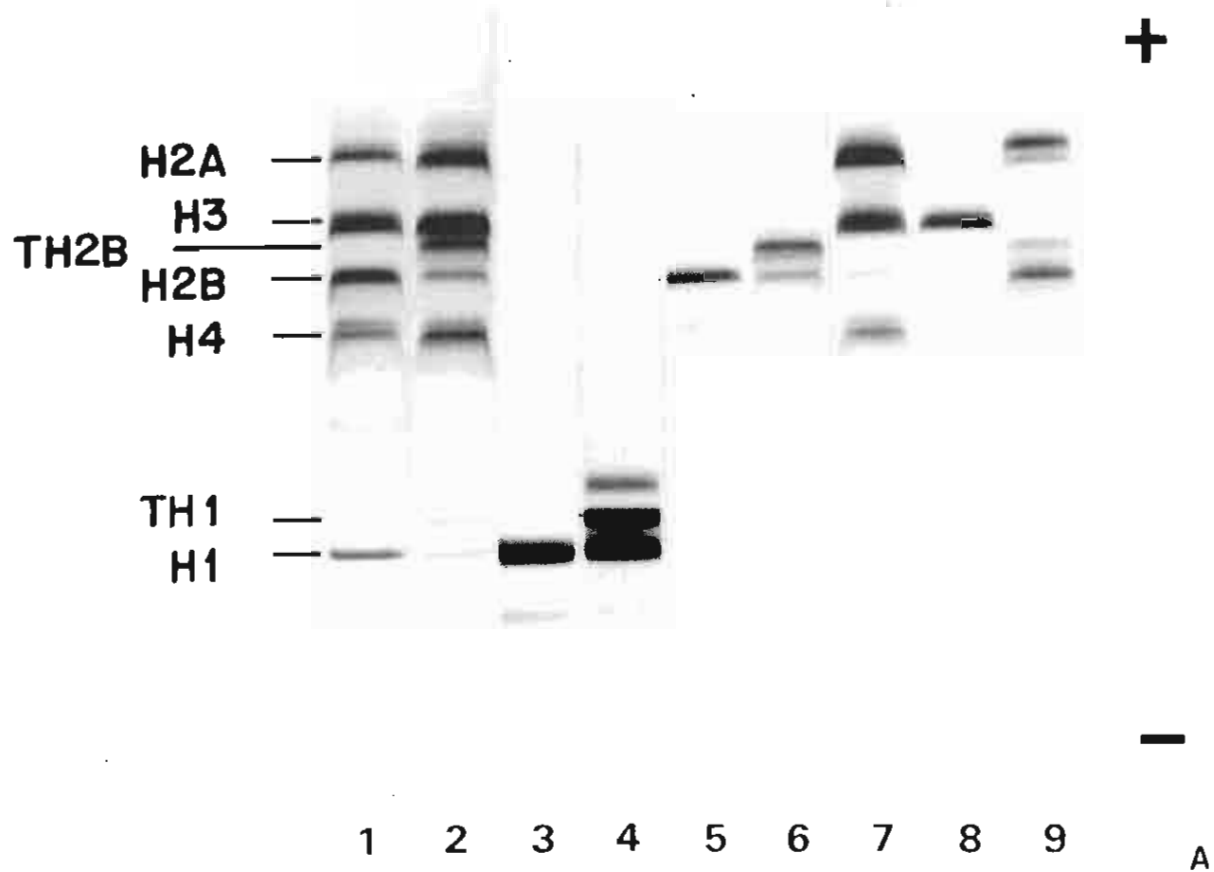


Figure 64

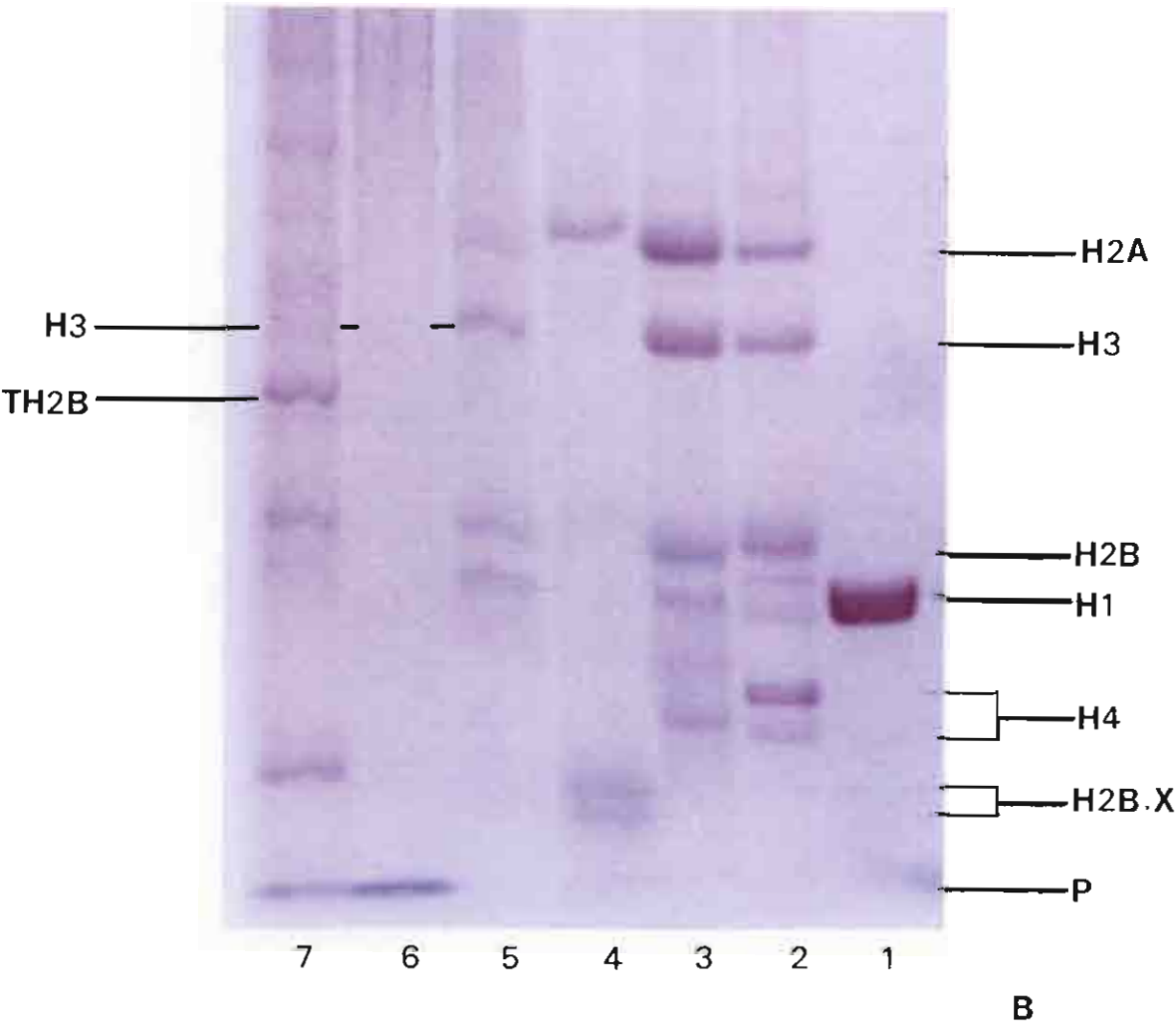
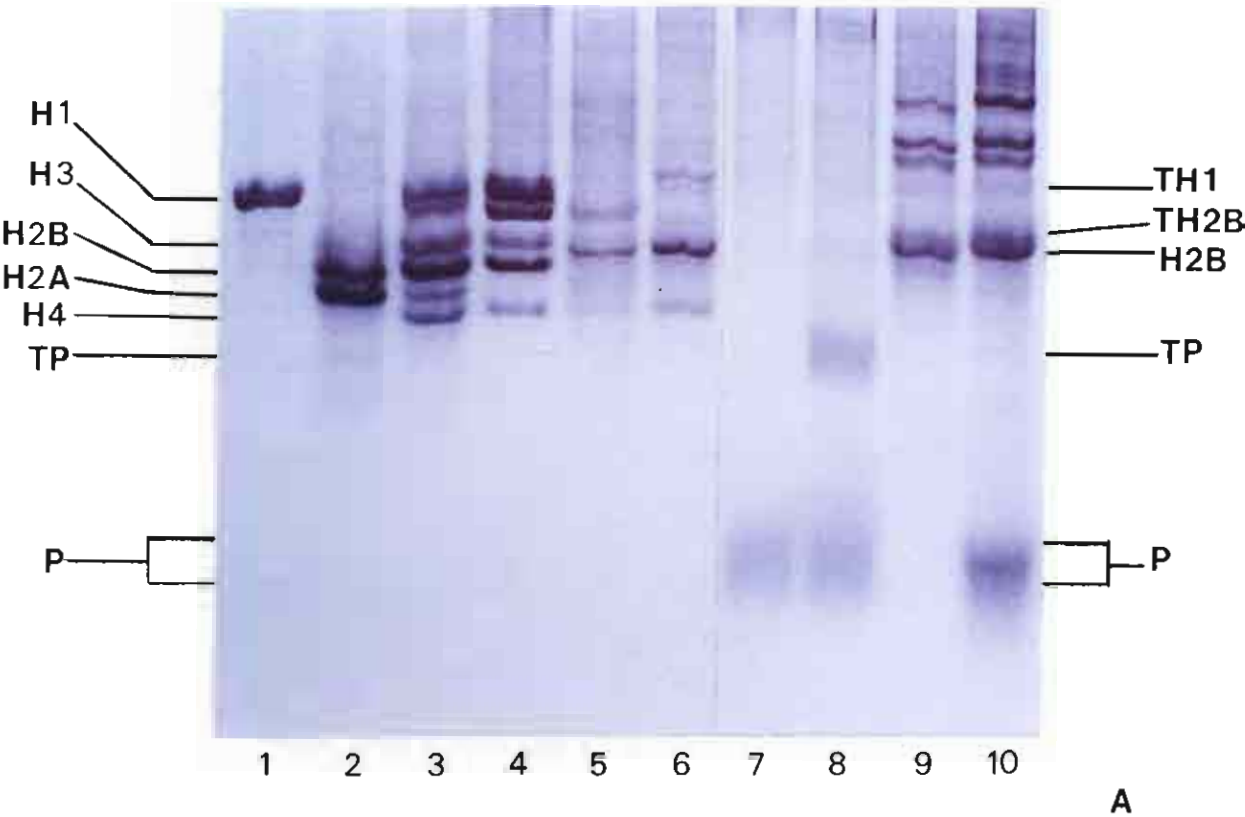
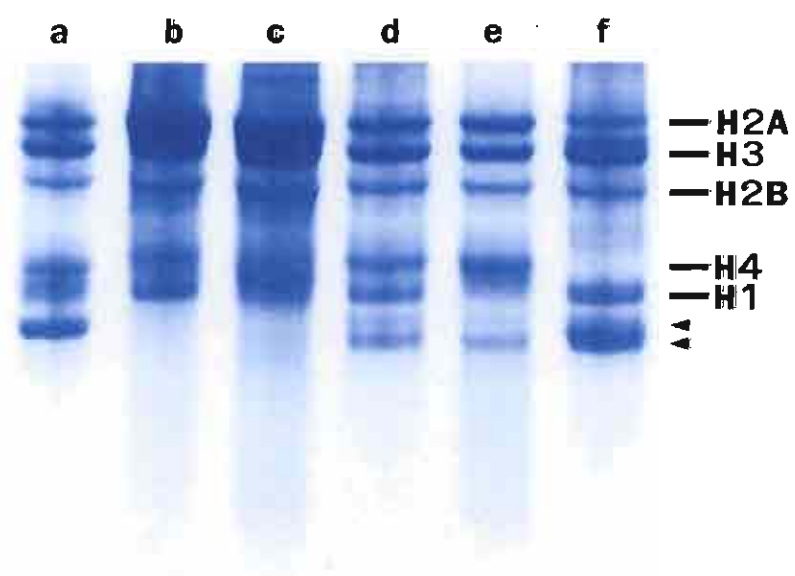
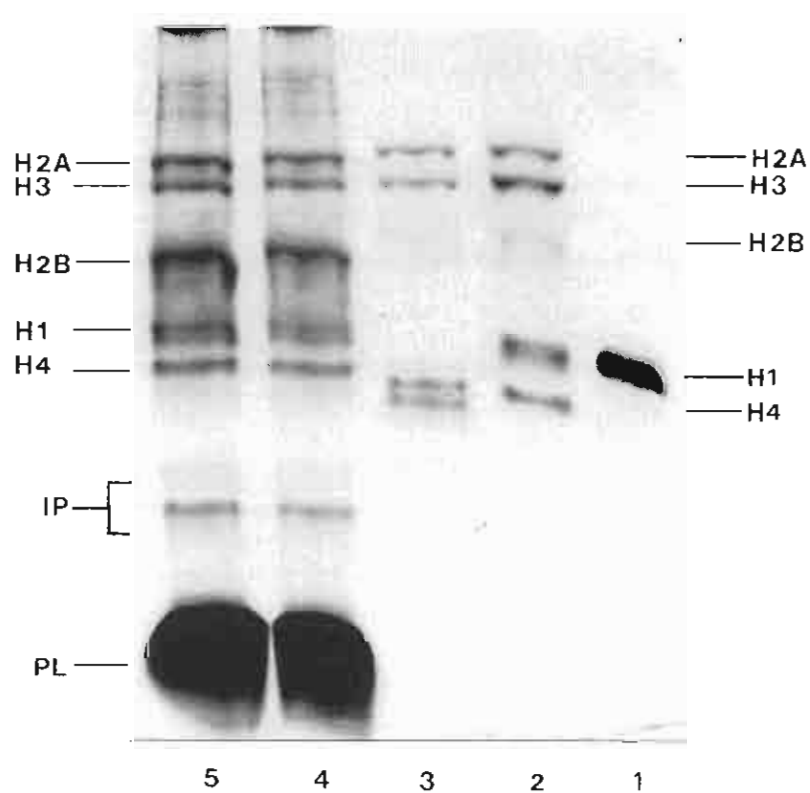
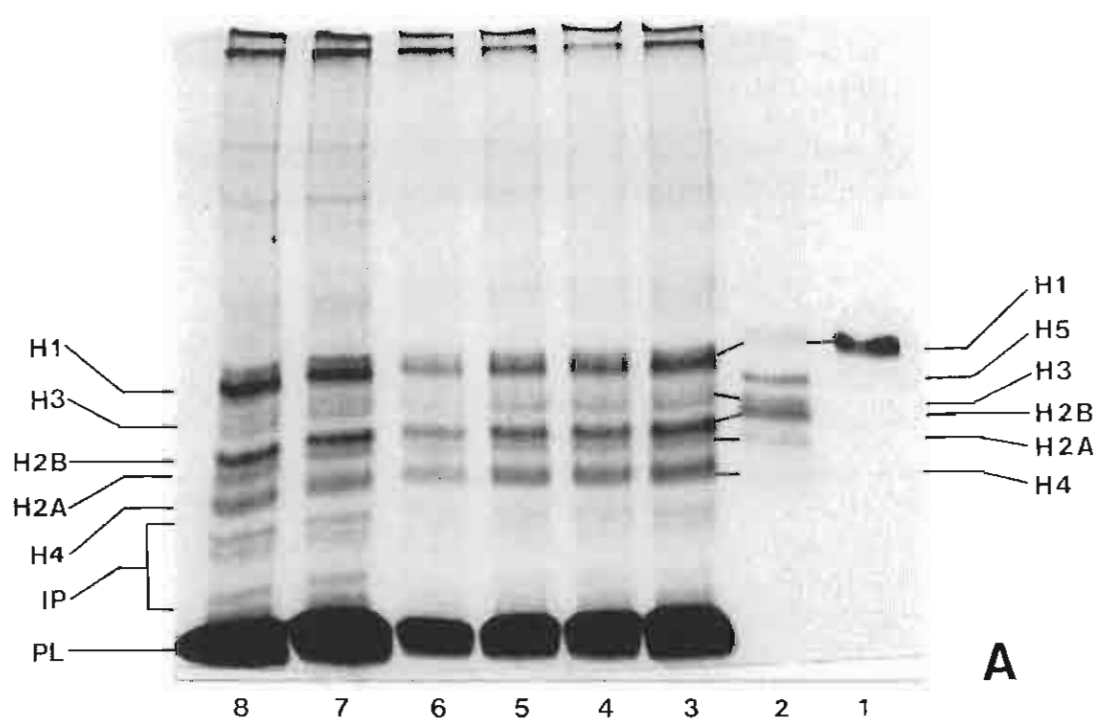


Figure 65





1.4 การวิเคราะห์ลำดับการเปลี่ยนแปลงและแทนที่ของเบสกลีโคซิลโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ชั้นต่าง ๆ

1.4.1 การศึกษาลำดับการเปลี่ยนแปลงเบสกลีโคซิลโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์จากต่อม อัณฑะของหนู

เราศึกษาการปรากฏตัวของโปรตีน TH1, TH2B และ TP ในเซลล์อัณฑะจากหนูที่อยู่ในช่วงอายุต่าง ๆ กันจาก 21, 40, 46, 51, 56 และ 61 วัน ส่วนหนึ่งของอัณฑะได้ถูกเตรียมเพื่อตรวจดูจุลกายวิภาคและปริมาณของเซลล์ชั้นต่าง ๆ โดยวิธีจุลทรรศน์ธรรมดาและส่วนที่เหลือได้ถูกนำมาสกัดเบสกลีโคซิลโปรตีนเพื่อนำไปแยกโดยระบบ 0.9N acetic acid-2.5M urea PAGE เพื่อวิเคราะห์โปรตีน TP (รูปที่ 67A) และโดยระบบ Triton X-100-0.9N acetic acid-2.5M urea เพื่อวิเคราะห์โปรตีน TH1 และ TH2 (รูปที่ 67B) ผลปรากฏว่า TH1 และ TH2B ปรากฏตัวแล้วในอัณฑะของหนูอายุ 21 วัน ซึ่งการตรวจจุลกายวิภาคพบว่าในช่วงอายุดังกล่าวมีเฉพาะเซลล์ spermatogonia และ primary spermatocytes ในหลอด seminiferous tubules ของอัณฑะเท่านั้น (รูปที่ 68A, B) โปรตีนทั้งสองชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงระดับปกติในหนูอายุ 45-61 วัน สำหรับ TH1 และที่อายุ 56-61 วันสำหรับ TH2B (รูปที่ 67B) โปรตีน TP ปรากฏตัวขึ้นครั้งแรกในปริมาณที่น้อยเมื่อหนูมีอายุได้ 40 วันในขณะที่เซลล์ spermatids ขึ้นต้นเริ่มปรากฏ (รูปที่ 68C, D) ปริมาณของโปรตีน TP ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงระดับปกติเมื่อหนูมีอายุได้ 61 วัน ดังนั้นจึงอาจสรุปจากข้อมูลดังกล่าวได้ว่า TH1 และ TH2B อาจถูกสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ชั้น spermatocytes โดย TH1 ถูกสังเคราะห์ก่อน TH2B ส่วนโปรตีน TP น่าจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ชั้น spermatids

รูปที่ 67 การวิเคราะห์ลำดับการเกิดโปรตีน histones ในต่อมอัณฑะของหนูในช่วงอายุต่างๆ ด้วย acid-urea PAGE (A) และ โดย triton-acid-urea PAGE (B). แถบต่างๆแสดงการแยกโปรตีน histones จาก 1: rat liver; 2: testis ของหนูอายุ 21 วัน; 3: testis 40 วัน; 4: testis 46 วัน; 5: testis 51 วัน; 6: testis 56 วัน; 7: testis 61 วัน; 8: testis 3 เดือน.

รูปที่ 68 A, B) ภาพจุลทรรศน์ธรรมดา (paraffin section) ของอัณฑะหนู อายุ 21 วัน ภายในหลอด seminiferous tubules ประกอบด้วยเซลล์ spermatogonia (Sg) และ primary spermatocytes (PSc) เท่านั้น

C, D) ภาพจุลทรรศน์ธรรมดา (semithin section) ของอัณฑะหนู อายุ 61 วัน ภายในหลอด seminiferous tubules ประกอบด้วยเซลล์ spermatogonia (Sg) และ primary spermatocytes (PSc), spermatids (St) ขั้นต่างๆ และ spermatozoa (Sz) จำนวนมาก.

Figure 67

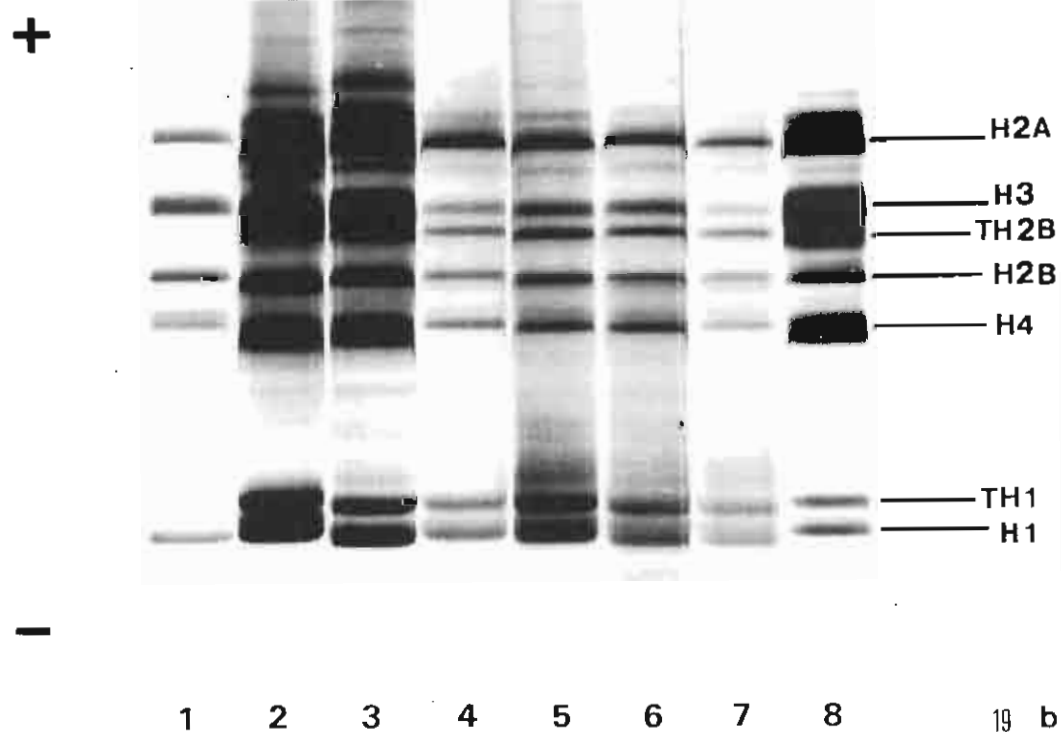
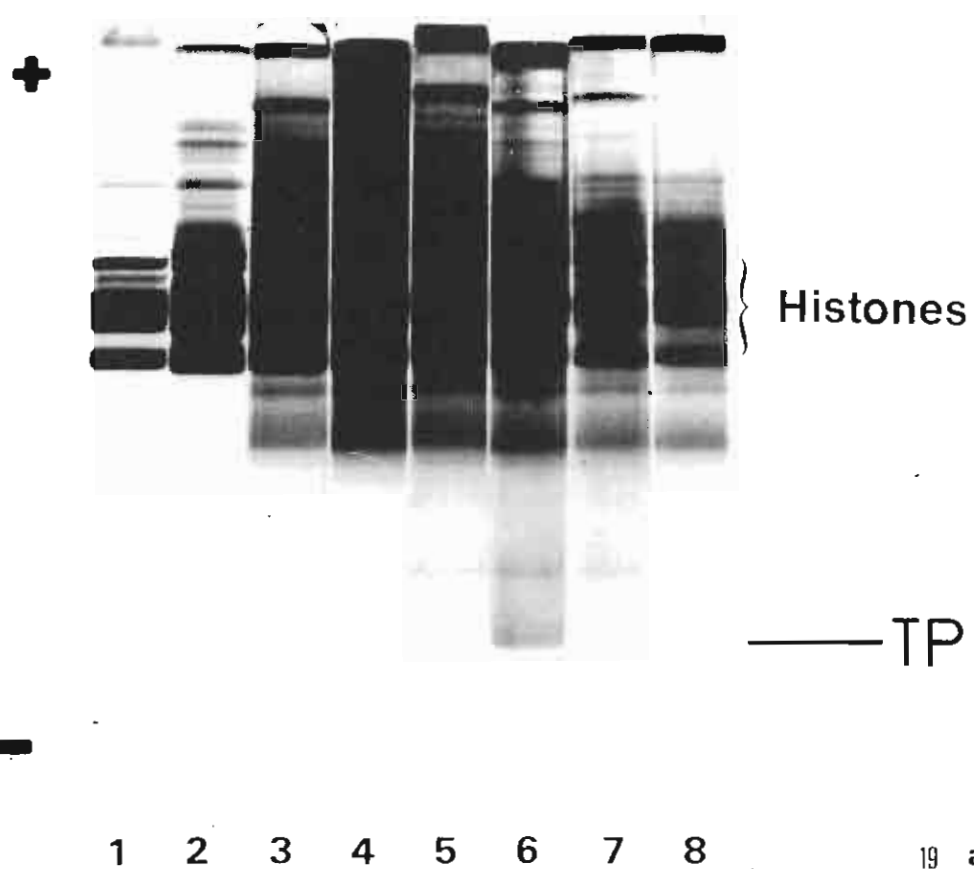
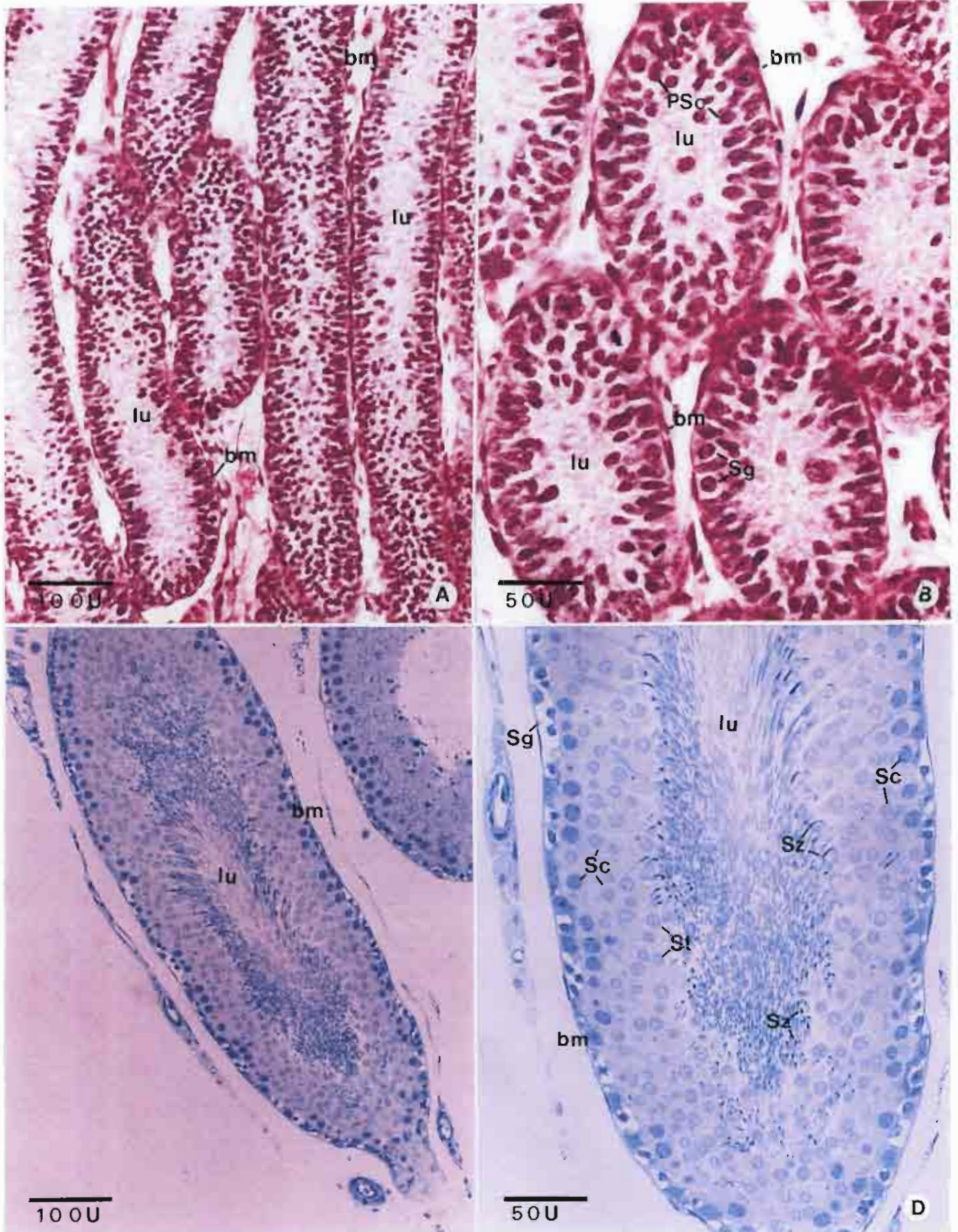


Figure 68



1.4.2 การแยกเบสิกนิวเคลียโปรตีนจากเซลล์สุจิของหนูและกบ และจากนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่และกบ เพื่อนำไปเตรียมแอนติบอดีต่อ histones และ protamines

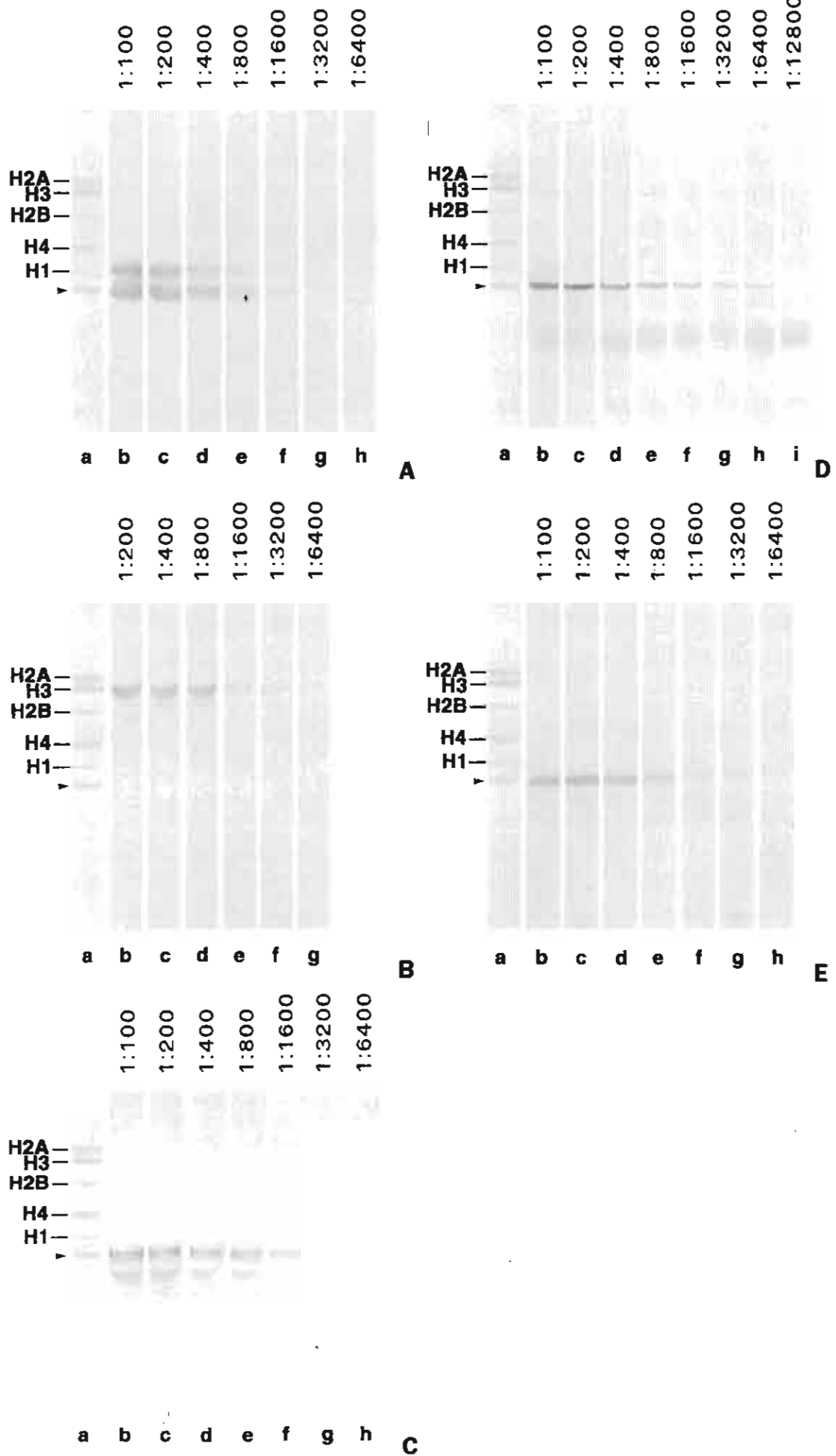
เนื่องจากเราต้องการเตรียมแอนติบอดีต่อโปรตีน histones และ protamines ชนิดต่าง ๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับการเปลี่ยนแปลงและแทนที่ของโปรตีนเหล่านี้ในเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่าง ๆ โดยวิธี immunolabelling เราจึงได้สกัด histones จากนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ (chick erythrocyte nuclei) และของกบ (frog erythrocyte nuclei) และ histones จากเซลล์สุจิของกบ เนื่องจากสามารถเก็บเซลล์ชนิดนี้ได้ปริมาณสูงเพื่อสกัด histones ให้ได้ในปริมาณที่มากพอ ซึ่งก็พบว่า histones ของไก่และสัตว์ประเภท mammals เช่นหนูไม่แตกต่างกัน และแสดง histones ทุกชนิดในปริมาณสูง ส่วน histones จากกบก็แตกต่างจากของไก่และ mammals น้อยมาก เนื่องจาก histone เป็นโปรตีนที่มีลักษณะอนุรักษ์ (conservative) เบสิกโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ต่าง ๆ ดังกล่าวได้นำไปแยกโดย 20% acid-urea PAGE หรือ 17 % acid-urea-Triton X PAGE โดยแยกออกเป็น fractions ต่าง ๆ ของ histones และ protamines เมื่อได้ปริมาณมากพอแล้วก็นำไปฉีดในหนู (mouse) และกระต่ายเพื่อผลิต polyclonal antibodies ต่อ fractions ต่าง ๆ ของ histones โดยการตัดแถบโปรตีน H3, H1 และ H1 variant จากแผ่น acid-urea-Triton X PAGE (AUT PAGE) แล้วนำไปผสมกับ Freund's adjuvant แล้วจึงนำไปฉีดเข้าชั้นผิวหนังของกระต่ายหรือหนู หลังจาก immunize ครั้งที่ 1 ประมาณ 6 สัปดาห์ จึงฉีดกระตุ้นอีก 2 ครั้ง ห่างกัน 6 สัปดาห์ หลังจากกระตุ้นครั้งที่ 2 ประมาณ 14 วัน จึงเก็บเลือดจาก marginal ear vein ของกระต่ายหรือจาก tail vein ของหนู แล้วนำมาทดสอบความจำเพาะของ antibodies ด้วยวิธี Immunoblotting โดยนำเบสิกโปรตีนที่สกัดได้มาแยกด้วยวิธี electrophoresis ใน 17% AUT PAGE จากนั้น จึงส่งผ่านโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane โดยใช้ Western blotting แบบเปียก โดยใช้ 0.9 N acetic acid เป็น transfer buffer และใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 400 mA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose membrane มาข้อมด้วยสี Ponceaus S เพื่อตรวจสอบความสำเร็จของการส่งผ่านโปรตีนก่อนที่จะตัดแถบโปรตีนมาข้อม antibodies โดยนำแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่ใน 10 mM TBS pH 7.4, 10 นาที แล้วจึงนำไปแช่ใน blocking solution คือ 5% non-fat milk ใน 10 mM TBS pH 7.4, 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่ต่อใน antibodies ที่ต้องการทดสอบที่ dilution 1:50-1:10000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแผ่น nitrocellulose membrane ด้วย blocking solution 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่ใน secondary antibodies (goat anti rabbit IgG-HRP หรือ rabbit anti mouse IgG-HRP) ที่ dilution 1: 20000 เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย 0.1% tween 20 (V/V) ใน 10 mM TBS pH7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้น นำแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่ใน substrates ของ HRP คือ 3,3' diaminobenzidine + H_2O_2 เพื่อทำให้เกิดสี ผลปรากฏว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อโปรตีน H1, H1V และ H3 ตามที่คาดไว้ และเมื่อได้แอนติบอดีแล้วก็ได้นำแอนติบอดีมาเป็น probes เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและแทนที่ของเบสิกนิวเคลียโปรตีนชนิด

ต่าง ๆ ในเซลล์สืบพันธุ์ของต่อมอัณฑะของหนูและกบโดยวิธี immunofluorescence, immunoperoxidase ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา และ immunogold ในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

พบว่าสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ histones แลต่าง ๆ ได้แก่ แอนติบอดีต่อ frog H1, H3 และ H1V ซึ่งมีความจำเพาะสูงและแอนติบอดีดังกล่าวก็สามารถจับกับโปรตีน H1 และ H3 ของสัตว์ทุกชนิดได้ดีเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นแล้วเรายังสามารถผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน H1V (H1 variants) จากเซลล์สุจิของกบ และ H5 จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ จากการทดสอบด้วย immunoblotting ด้วยแอนติบอดีต่อ H1V และ H5 ปรากฏว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูง ซึ่งน่าจะเป็นโปรตีนที่ใกล้เคียงกันมาก (รูปที่ 69)

รูปที่ 69 ภาพแสดงความจำเพาะของแอนติบอดีที่ทดสอบด้วยวิธี Western blotting โดยใช้แผ่น nitrocellulose เป็นตัวรับโปรตีนที่สกัดจากเซลล์สืบพันธุ์ของกบนาที่แยกโดย 17% AUT polyacrylamide gel และย้อมด้วย rabbit anti frog H1 (A), rabbit anti frog H3 (B), rabbit anti frog HIV (C), และ rabbit anti chick H5 (E) ที่ความเข้มข้น 1: 20000 ผลปรากฏว่า แอนติบอดีมีความจำเพาะต่อ H1 (A), H3 (B), HIV (C), และ H5 (E) ภาพ D แสดงความจำเพาะของ rabbit anti chick H5 antiserum ที่ย้อมแผ่น nitrocellulose ซึ่งรับโปรตีนที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงของไก่ที่แยกด้วย 17% AUT polyacrylamide gel ผลปรากฏว่า แอนติบอดีมีผลจำเพาะต่อ H5 ในเม็ดเลือดแดงของไก่

Figure 69



1.4.3 การย้อมหาตำแหน่งของ histones ในเซลล์สืบพันธุ์ของหนูโดยใช้โพลีโคลนัล แอนติบอดีต่อ histones H3

เราได้ผลิตแอนติบอดีต่อ histone H3 ของกบและพบว่ามันมีปฏิกิริยาข้ามชนิด (cross reactivity) ต่อ histone ของสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งของของหนู rat ด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก histone H3 เป็นโปรตีนอนุรักษ์ (conserved) ที่สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์ เราทำการทดสอบการกระจายตัวของ histone H3 ในเซลล์สืบพันธุ์ของต่อมอัณฑะหนู rat ด้วยวิธี immunoperoxidase ผลปรากฏว่าพบการเกาะของแอนติบอดีบนเซลล์ร่างกายในอัณฑะหนู ได้แก่ Leydig และ Sertoli cells (Ser) รวมทั้ง fibroblasts (F) ที่อยู่รอบ seminiferous tubules (รูปที่ 70a, d) ในส่วนของเซลล์สืบพันธุ์สามารถพบ histone H3 ได้ตั้งแต่เซลล์เริ่มต้นของกระบวนการสร้างอสุจิ คือ spermatogonia (Sg), Pachytene spermatocytes (PSc) และ spermatids ระยะที่ 1-13 ส่วน spermatids ระยะปลายไม่พบการย้อมติดของแอนติบอดี (รูปที่ 70a-d)

1.4.4 การย้อมหาตำแหน่งของ protamines ในเซลล์สืบพันธุ์ของหนูโดยใช้ mouse monoclonal anti-human protamines

วิธี immunoperoxidase

เราได้รับโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ human protamines จาก Dr. Rod Balhorn, แห่ง Lawrence Livermore National Laboratory, California, USA. ซึ่งเป็นที่ปรึกษาชาวต่างประเทศของโครงการ ดังนั้นในขั้นแรกเราได้ทำการย้อมหาตำแหน่งของโปรตีนชนิดนี้ในเซลล์สืบพันธุ์ของต่อมอัณฑะหนูด้วยวิธี immunoperoxidase ปรากฏว่าในหนูมีปฏิกิริยาข้ามชนิด (cross reaction) ระหว่าง protamines ของหนูและคนได้ดี จึงทำให้มีการติดของ anti human protamines ที่เด่นมาก โดยเฉพาะในเซลล์ spermatids ขั้นปลาย โดยเฉพาะ จากชั้นที่ 12 ซึ่งมักจะวางตัวอยู่ชั้นในสุดของ seminiferous epithelium และบางเซลล์ที่ติดสี ก็ปรากฏเป็นกลุ่มฝังตัวอยู่ใน Sertoli cells โดยเริ่มจากส่วนปลายและส่วนล่างของหัวอสุจิ และปรากฏเด่นชัดมากขึ้นเรื่อย ๆ จนครอบคลุมหัวอสุจิทั้งหมดในกลุ่มเซลล์ spermatids ชั้นที่ 12-19 ทั้งนี้ไม่มีการติดสารเรืองแสงในชั้น round spermatids และชั้นเซลล์ spermatocytes เลย (รูปที่ 70e-h)

วิธี immunogold

เพื่อติดตามการสังเคราะห์โปรตีน protamines ซึ่งเข้าแทนที่โปรตีน histones ในเซลล์ spermatids ขั้นต่าง ๆ เราได้ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ human protamines ย้อมหาตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์ spermatids ขั้นต่าง ๆ ที่ระดับการเจือจาง 1:5 แล้วติดฉลากด้วย protein-A gold ซึ่งมีขนาด 20 nm ที่ระดับการเจือจาง 1:20 เป็นเครื่องหมายชี้บ่งการกระจายของโปรตีน โดยใช้จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM สังเกตใน thin section ของต่อมอัณฑะที่ฝังในพลาสติกแบบ LR White ผลปรากฏว่าเริ่มมี gold particles กระจายอยู่ในเซลล์ spermatids ชั้น 11 และ 12 ซึ่งเป็นชั้นที่ไฮโดรมาตินมีความหนา 50 nm และมีลักษณะเหยียดตรงขนานกัน โดยส่วนที่อยู่ทางด้านหน้าของ

นิวเคลียสเริ่มมีการเข้ามาเรียงตัวชิดกันเป็นแท่งหนา เมื่อตรวจดูที่กำลังขยายสูงพบว่า gold particles มักจะทับอยู่บนแท่งโครมาตินที่กำลังเรียงตัวเป็นแท่งหนาขนาด 60-70 nm (รูปที่ 71A, B) นอกจากเซลล์ spermatids ขั้นที่ 11 และ 12 แล้วยังพบ gold particles ในเซลล์ spermatids ขั้นที่ 15 ถึง 19 ที่กำลังกลายเป็น spermatozoa ซึ่งมีการขดของใยโครมาตินเป็นแท่งขนาด 100 nm โดย gold particles มักจะมีจำนวนมากกว่าในส่วนหัวของเซลล์ spermatids และ spermatozoa ด้านที่ติดกับ acrosomes (รูปที่ 71C, D)

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า (1) แอนติบอดีต่อ human protamines มีปฏิกิริยาข้ามชนิดได้ดีกับโปรตีน protamines ในหนู ซึ่งแสดงการอนุรักษ์ของโปรตีนชนิดนี้ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (2) มีการสร้างและการกระจายของ protamines ในนิวเคลียสของเซลล์ spermatids ของหนู โดยเริ่มมีในขั้นที่ 11 ซึ่งเป็นขั้นของเซลล์ที่เริ่มมีใยโครมาตินขนาด 50 nm ที่ปรากฏเป็นเส้นหนาเหยียดตรงและวางตัวเรียงกันตามยาว (ดูข้อ 1.1.2) (3) การแทนที่ histones โดย protamines ทำให้เกิดการขดตัวแน่นที่ด้านหัวก่อนแล้วบริเวณการขดตัวขยายวงกว้างออกไปจากด้านหัวถึงด้านหาง โดยแท่งโครมาตินมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ จากใยขนาด 50 nm ที่เหยียดตรงซึ่งรวมตัวกันแล้วกลายเป็นแท่งขนาดใหญ่ 70-100 nm

รูปที่ 70 A-D) ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาของอวัยวะหนู rat ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ histone H3 ด้วยวิธี immunoperoxidase สามารถสังเกตเห็นการเกาะของแอนติบอดีได้ในเซลล์ร่างกาย (somatic cells) ทั่วไป ซึ่งได้แก่ fibroblast (F ในภาพ a) Sertoli cell (Ser ในภาพ d) Leydig cells (มิได้แสดง) สำหรับเซลล์ในขบวนการสร้างเซลล์สุจิ พบการเกาะของแอนติบอดีต่อ histone H3 ได้ตั้งแต่ในเซลล์ระยะแรกสุด คือ spermatogonia (Sg ในภาพ a, c) pachytene spermatocytes (PSc ในภาพ b, c, d) และ spermatid ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงขั้นที่ 12 (St₁₂) หลังจากนั้นที่ 12 แล้วปริมาณการเกาะของแอนติบอดีต่อ histone H3 จะลดน้อยลงมากจนไม่สามารถสังเกตเห็นความเข้มของสีได้

E-H) ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาของอวัยวะหนูที่ย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ protamine ด้วยวิธี immunoperoxidase เริ่มสังเกตเห็นการเกาะของแอนติบอดีได้ใน spermatids ขั้นที่ 12 (ภาพ e) โดยความเข้มของการย้อมจะยังไม่มากนัก อีกทั้งขนาดของหัว spermatid ยังคงโตอยู่ แต่เมื่อเซลล์สืบพันธุ์พัฒนาขึ้นเรื่อย ๆ ความเข้มของการย้อม (ภาพ f, g, h) ด้วยแอนติบอดีจะมากขึ้น ด้วย พร้อมกับขนาดของหัวเซลล์จะเล็ก และมีรูปร่างเรียวยาวลงเรื่อย ๆ จนถึงขั้นที่ 19 และเซลล์สุจิ เซลล์ในช่วงต้นของ spermatogenesis รวมทั้งเซลล์ร่างกายที่พบว่ามี การย้อมติดด้วยแอนติบอดีต่อ histone H3 ได้ดีแต่กลับไม่ติดแอนติบอดีต่อ protamine ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ protamine.

รูปที่ 71 ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอวัยวะหนูที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ protamine เราต้องการเปรียบเทียบการย้อมของ protamine กับระดับการขดตัวของเส้นใยโครมาตินในอวัยวะหนูในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ผลการทดลอง พบการเกาะของ gold particles จากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ protamine ใน spermatid ขั้นที่ 11 (ภาพ a และลูกศรดำในภาพ b) และสามารถพบ gold particles ได้อย่างหนาแน่นบนเส้นใยของโครมาตินที่มีการขดตัวที่บ (ระยะที่ 7 ของการขดตัวของโครมาติน) ใน spermatid ขั้นที่ 18-19 (ภาพ c และหัวลูกศรในภาพ d)

Figure 70

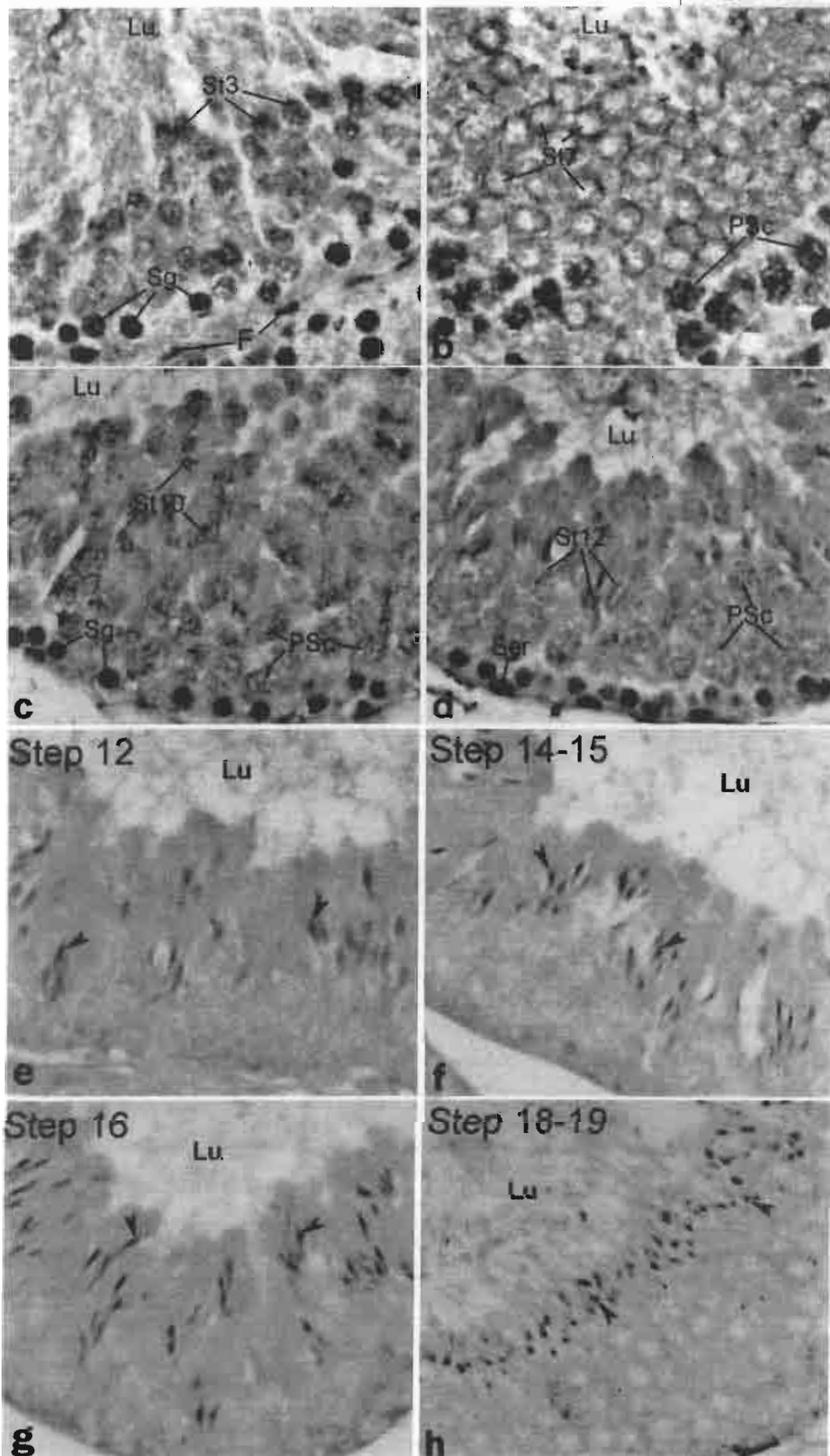
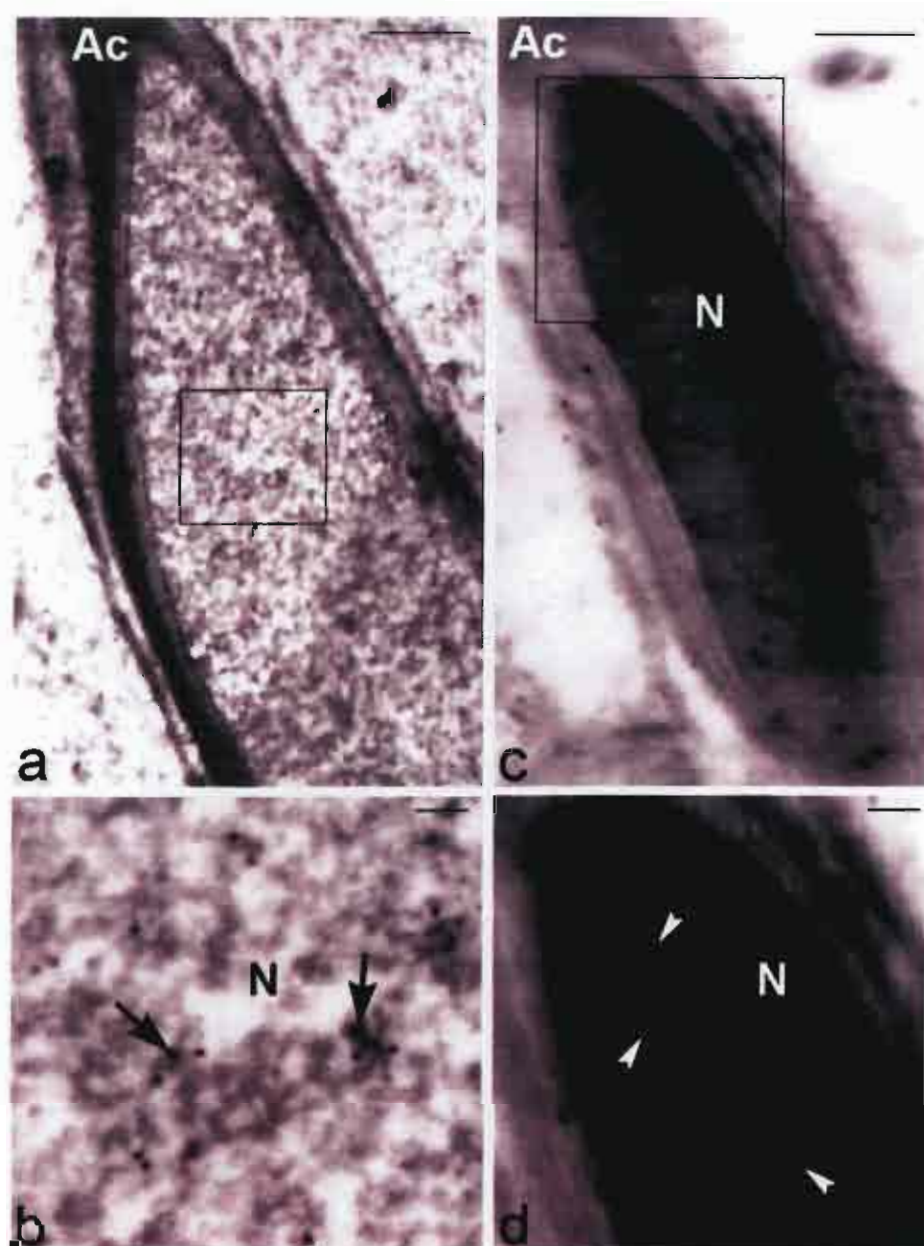


Figure 71



B

1.4.5 การแสดงตำแหน่งการกระจายและลำดับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนฮิสโตน histones-H3 และ H1 variants ในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกบ

Immunofluorescence

เมื่อเราได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน H3 และ H1 variant แล้ว เราได้นำแอนติบอดีมาเชื่อมเนื้อเยื่ออวัยวะของกบนาที่ฝังอยู่ในพลาสติก LR White โดยตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในพลาสติกด้วย ultramicrotome ให้มีความหนาประมาณ 1 ไมครอน แล้วนำแผ่นเนื้อเยื่อมาแช่ใน 0.1% glycine และ 4% BSA ใน 0.1 M PBS pH 7.4 อย่างละ 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเนื้อเยื่อมาแช่ต่อใน primary antibodies (rabbit anti frog H3 หรือ rabbit anti frog H1 variant) ที่ dilution 1:10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย 0.1 % Tween 20 ใน 0.1 M PBS pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นจึงนำแผ่นเนื้อเยื่อมาแช่ต่อใน secondary antibody (goat anti rabbit IgG FITC conjugated) ที่ dilution 1:100 เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วย 0.1 % Tween 20 ใน 0.1 M PBS pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที mount แผ่นเนื้อเยื่อบนแผ่นแก้วด้วยสาร anti fade แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องเรืองแสงแบบ epifluorescence ผลปรากฏว่า ในเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย rabbit anti frog H3 จะสังเกตเห็นการเรืองแสงในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ทุกระยะรวมถึง spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocyte, spermatids, spermatozoa และ somatic cells ได้แก่ Sertoli cell, interstitial cell, red blood cell และ follicular cell (รูปที่ 72, 73) ส่วนเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย rabbit anti frog H1 variant จะสังเกตเห็นการเรืองแสงในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ metaphase spermatocyte, spermatid 1 ถึง spermatid 4 และจะสังเกตเห็นการเรืองแสงเข้มมากในระยะ spermatozoa (รูปที่ 74, 75, 76A-C) แต่ไม่พบการเรืองแสงในระยะ spermatogonia , primary spermatocyte, secondary spermatocyte หรือใน somatic cells ได้แก่ Sertoli cell, interstitial cell เลย แต่พบการเรืองแสงในนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงของกบ (รูปที่ 76D)

Immunogold

นอกจากการศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาแล้ว เรายังได้ศึกษาการกระจายของโปรตีน H3 และ H1 variant ในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM อีกด้วย โดยการนำเนื้อเยื่ออวัยวะของกบนาที่ฝังอยู่ในพลาสติก LR white มาตัดด้วย ultramicrotome ให้มีความหนาประมาณ 60-90 nm แล้วนำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ไปล้างด้วย 0.1% glycine ใน 0.05M PBS pH 7.4 และ block ด้วย 4% BSA ใน 0.05M PBS pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 4°C หลังจากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อมาเชื่อมด้วย primary antibodies (rabbit anti frog H3 หรือ rabbit anti frog H1 variant) ที่ dilution 1:10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย 0.05% Tween 20 ใน 0.05M PBS pH 7.4 จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อมาเชื่อมด้วย protein A gold ที่ dilution 1:200 เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วย 0.05% Tween 20 (V/V) ใน 0.05M PBS pH 7.4 และ counter stain ด้วย uranyl acetate และ lead citrate ล้างออกด้วยน้ำกลั่นตากให้แห้ง และนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM ผลปรากฏว่า เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย

วิธี immunogold ให้ผลสอดคล้องกับเนื้อเยื่อที่ย้อมโดยวิธี immunofluorescence ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น คือ เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย rabbit anti frog H3 จะพบ gold particle กระจายอยู่ทั่วไปในก้อน heterochromatin ภายในนิวเคลียสของเซลล์ทุกระยะ คือ spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocyte, spermatids และ spermatozoa รวมทั้ง somatic cells ได้แก่ Sertoli cell, interstitial cell, red blood cell และ follicular cell ด้วย (รูปที่ 77, 78) ส่วนเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย rabbit anti frog H1 variant จะสังเกตเห็น gold particle เฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ spermatid 1 ถึง spermatid 4 และจะสังเกตเห็น gold particle กระจายตัวอยู่อย่างหนาแน่นในระยะ spermatozoa และ metaphase spermatocyte (รูปที่ 80, 81, 82A, B) แต่ไม่พบการกระจายของ gold particle หรือพบจำนวนน้อยมาก ในระยะ spermatogonia, primary spermatocyte, secondary spermatocyte รวมทั้งใน somatic cells ได้แก่ Sertoli cell, interstitial cell, follicular cell (รูปที่ 79) นอกจากนี้ยังพบการกระจายของ gold particle ในนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงของกบด้วย (รูปที่ 82C, D) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า H3 ซึ่งประกอบเป็นส่วนแกน (core) ของก้อน nucleosomes มีอยู่ในเซลล์สืบพันธุ์ของกบทุกระยะ และนับเป็นหลักฐานที่ช่วยสนับสนุนว่าโครมาตินในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะของกบมีการเรียงตัวแบบ nucleosomal organization ในขณะที่ H1 variant มีเฉพาะในเซลล์ spermatids โดยเริ่มจาก St₁ และมีมากที่สุดที่เซลล์สุจิที่มีโครมาตินอัดกันแน่นทึบ และมี HIV-like protein ซึ่งอาจเป็นโปรตีนชนิดเดียวกับ H5 ในนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกบและไก่ด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า HIV น่าจะเป็นโปรตีนที่ก่อให้เกิดการอัดแน่นของโครมาตินในเซลล์สุจิของกบซึ่งเป็นแบบเดียวกันกับการหดตัวหรือ heterochromatinization ของโครมาตินในเซลล์ร่างกายที่พัฒนาเต็มที่แล้ว เช่นเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่

รูปที่ 72 ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาของต่อมอัณฑะกบ (LR white section) ที่ย้อมโดยวิธี immunofluorescence ด้วยแอนติบอดีต่อ frog histone H3 แสดงตำแหน่งของ H3 ในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะในภาพ B, C, D (primary spermatocytes- LSc, ZSc, PSc, DSc; spermatids-St₁ และ Spermatozoa-Sz) ภาพ A-negative control

รูปที่ 73 ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาของต่อมอัณฑะกบ (LR white section) ที่ย้อมโดยวิธี immunofluorescence ด้วยแอนติบอดีต่อ frog histone H3 แสดงตำแหน่งของ H3 (จากการเรืองแสง) ในนิวเคลียสของเซลล์ spermatids (St₁, St₂) และใน spermatozoa ซึ่งนิวเคลียสเรืองแสงเข้มมาก (รูป A, B) H3 มีปริมาณสูงในนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกบ (ภาพ C) และในนิวเคลียสของ Leydig cells (Le) (ภาพ E) ในภาพ D แสดง H3 มีตำแหน่งจำเพาะอยู่บนก้อน heterochromatin ในเซลล์ leptotene primary spermatocyte (LSc)

รูปที่ 74 ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาของอัณฑะกบ (LR white section) ที่ย้อมโดยวิธี immunofluorescence ด้วยแอนติบอดีต่อ frog histone H1V แสดงตำแหน่งของ H1 variant จากการเรืองแสงในนิวเคลียสของเซลล์ สืบ spermatids (St₁, St₂) และใน spermatozoa (Sz) และ metaphase cells (MSc) A, B-negative control

รูปที่ 75 ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาของอัณฑะกบ (LR white section) ที่ย้อมโดยวิธี immunofluorescence ด้วยแอนติบอดีต่อ frog histone H1V แสดงตำแหน่งของ H1 variant จากการเรืองแสงในนิวเคลียสของเซลล์ spermatids ทุกชั้น (St₁, St₂, St₃, St₄) และเข้มเป็นพิเศษภายในนิวเคลียสของเซลล์ spermatozoa (Sz) (ภาพ A, B, C, D) ส่วนในนิวเคลียสของเซลล์ spermatocytes (รูป D) คัดสีจางมาก

รูปที่ 76 A, B, C) ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาของอัณฑะกบ (LR white section) ที่ย้อมโดยวิธี immunofluorescence ด้วยแอนติบอดีต่อ H1V แสดงตำแหน่งของ H1 variant จากการเรืองแสงในนิวเคลียสของเซลล์ spermatids ชั้นที่ 3 และ 4 (St₃, St₄) เซลล์ spermatozoa (Sz) และใน metaphase cells (MSc)

D) แสดงตำแหน่ง H1V ที่มีปริมาณสูงในนิวเคลียสเซลล์เม็ดเลือดแดงของกบ (Nu)

รูปที่ 77 ภาพ TEM ของเซลล์ในต่อมอัณฑะของกบที่ย้อมด้วยวิธี immunogold ด้วย antibody ต่อ H3 แสดงตำแหน่งของ H3 จากการเกาะของเม็ดทองคำ (หัวลูกศร) ซึ่งส่วนใหญ่กระจายอยู่บน heterochromatin ของ leptotene spermatocyte (ภาพ A) zygotene spermatocyte (ภาพ B, C) และบน

โครโมโซมของ metaphase spermatocyte (ภาพ D, E) บริเวณ euchromatin มีเม็ด gold อยู่ น้อยมาก Sy: synaptonemal complex; Nu: nucleus; No: nucleolus; Mi: mitochondria; Ch: metaphase chromosome

รูปที่ 78 ภาพ TEM ของเซลล์ในต่อมอัณฑะของกบที่ย้อมด้วยวิธี immunogold ด้วย antibody ต่อ H3 แสดงตำแหน่งของ H3 จากการเกาะของเม็ดทองคำ (หัวลูกศร) บนเส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์ spermatids ขั้นที่ 1 (St₁-รูป A) ขั้นที่ 2 (St₂-รูป B) ขั้นที่ 3 (St₃-รูป C) กับในนิวเคลียสของเซลล์ spermatozoa ทั้งที่ตัดตามขวาง (ภาพ D) และตัดตามยาว (E, F)

รูปที่ 79 ภาพ TEM ของเซลล์ในต่อมอัณฑะของกบที่ย้อมโดยวิธี immunogold ด้วย antibody ต่อ HIV แสดงตำแหน่งของ H1 variant โปรตีน พบว่ามีเม็ด gold น้อยมากในนิวเคลียสของ Sertoli cell (ภาพ A), follicular cell (ภาพ B), leptotene (ภาพ C, D) และ zygotene spermatocytes (ภาพ E, F) Nu: nucleus; no: nucleolus; Sy: synaptonemal complex; NE: nuclear envelope; Mi: mitochondria

รูปที่ 80 ภาพ TEM ของเซลล์ในต่อมอัณฑะของกบที่ย้อมโดยวิธี immunogold ด้วย antibody ต่อ HIV แสดงตำแหน่งของ H1 variant โปรตีน พบว่าเริ่มมีเม็ด gold (หัวลูกศร) เกาะอยู่บนใยโครมาติน ในนิวเคลียสของเซลล์ spermatid ขั้นที่ 1 (St₁-ภาพ A, B) ขั้นที่ 2 (St₂-ภาพ C, D) และมีปริมาณมากขึ้นใน spermatid ขั้นที่ 3 (St₃-ภาพ E, F) โดยที่เม็ด gold (หัวลูกศร) เกาะอยู่บนใยโครมาตินขนาด 30 nm และช่องว่างระหว่างใยโครมาติน (ภาพ F)

รูปที่ 81 ภาพ TEM ของเซลล์ในต่อมอัณฑะของกบที่ย้อมโดยวิธี immunogold ด้วย antibody ต่อ HIV แสดงตำแหน่งของ H1 variant โปรตีน พบว่าปริมาณของเม็ด gold (หัวลูกศร) มีมากขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์ spermatid ขั้นที่ 4 (St₄-ภาพ A, B) และโดยเฉพาะในเซลล์ spermatozoa ทั้งที่ตัดตามยาว (Sz-ภาพ C, D, E) และตัดตามขวาง (Sz-ภาพ F)

รูปที่ 82 ภาพ TEM ของเซลล์ในต่อมอัณฑะของกบที่ย้อมโดยวิธี immunogold ด้วย antibody ต่อ HIV แสดงตำแหน่งของ H1 variant โปรตีนพบว่า นอกจากใน spermatids และ spermatozoa แล้ว ยังพบเม็ด gold (หัวลูกศร) จำนวนมาก บนใยโครมาตินในเซลล์ขั้น metaphase primary spermatocyte (ภาพ A, B) และโครมาตินในนิวเคลียสของ frog erythrocytes (ภาพ C, D)

Figure 72

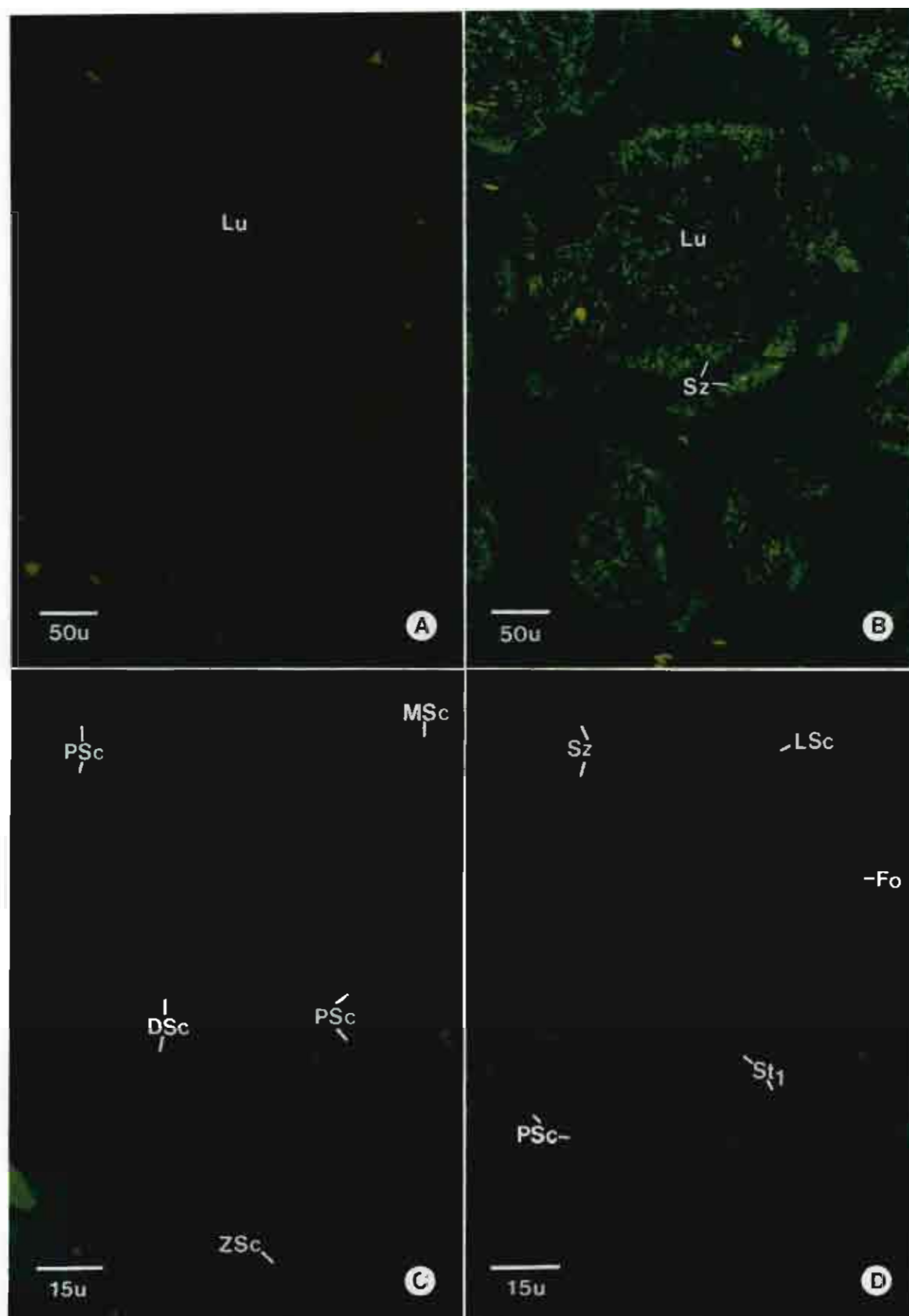


Figure 73

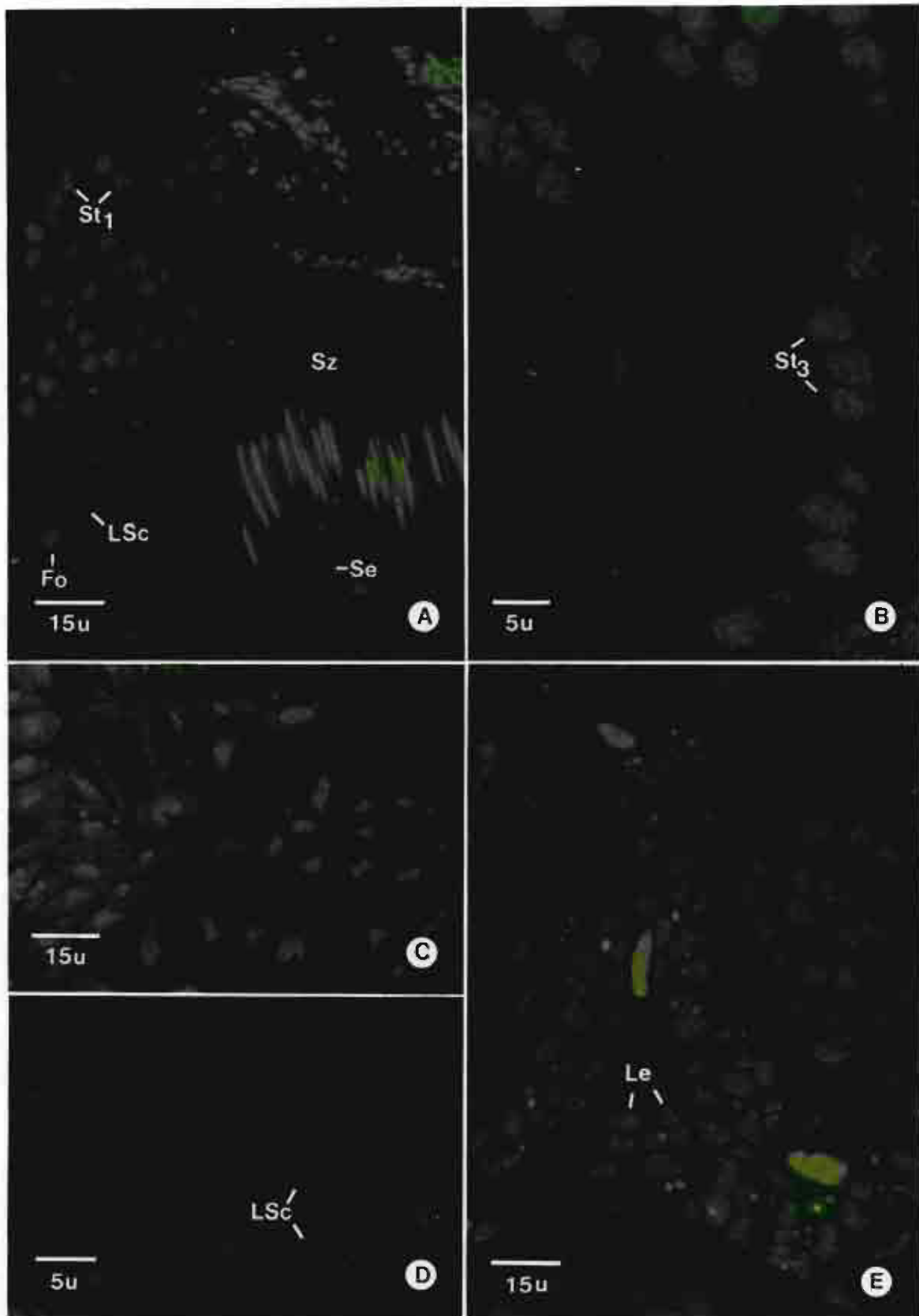


Figure 74

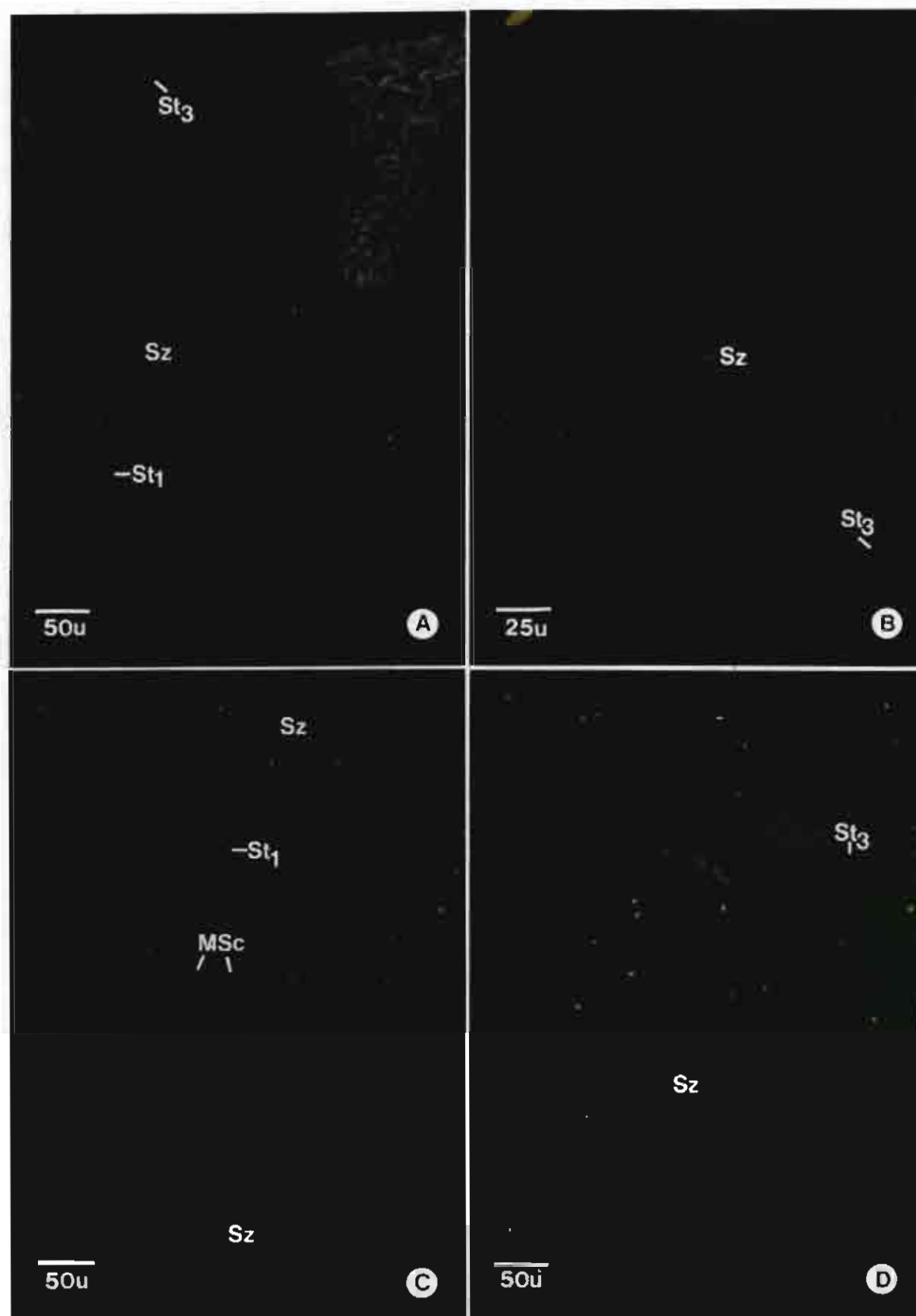


Figure 75

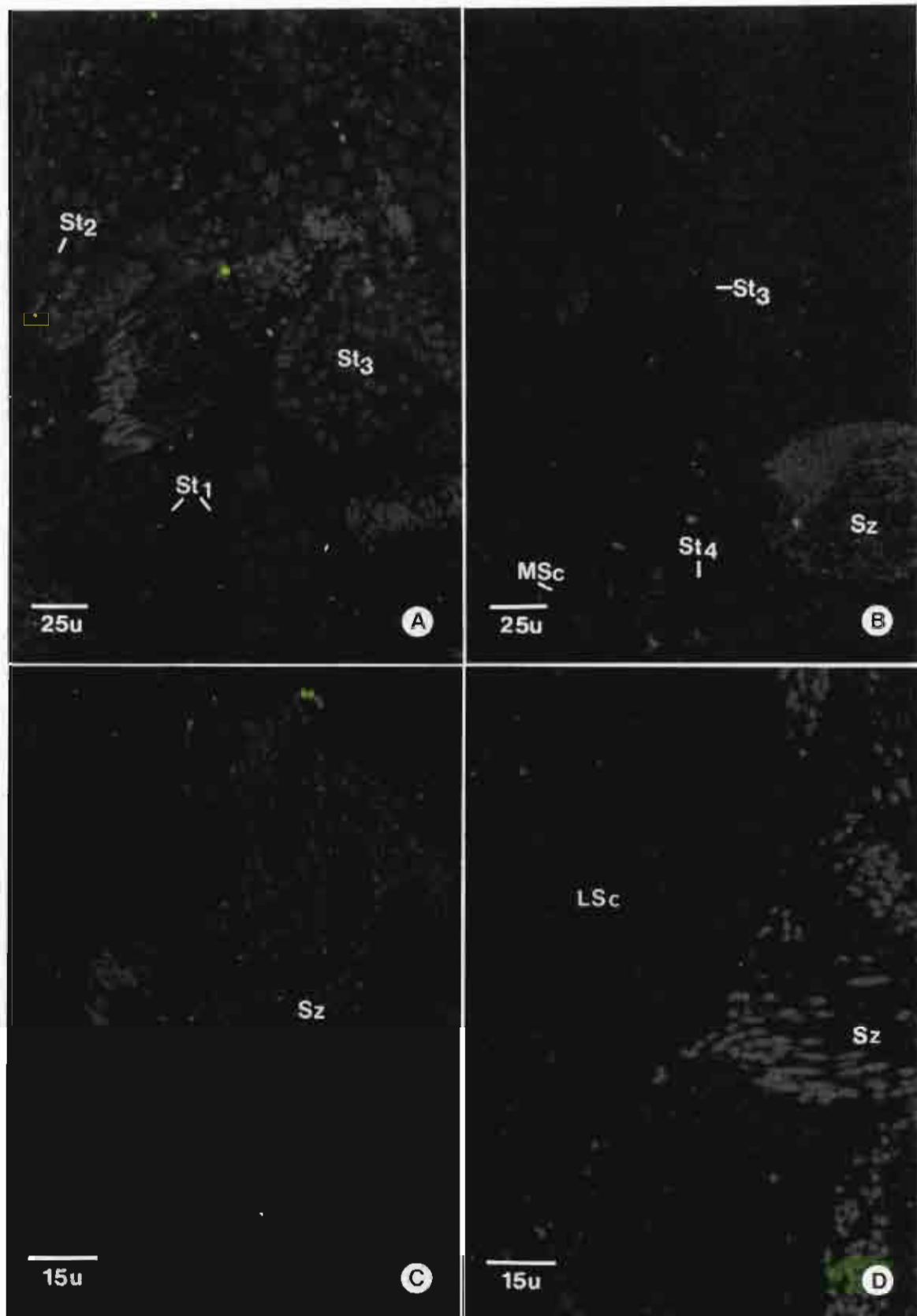


Figure 76

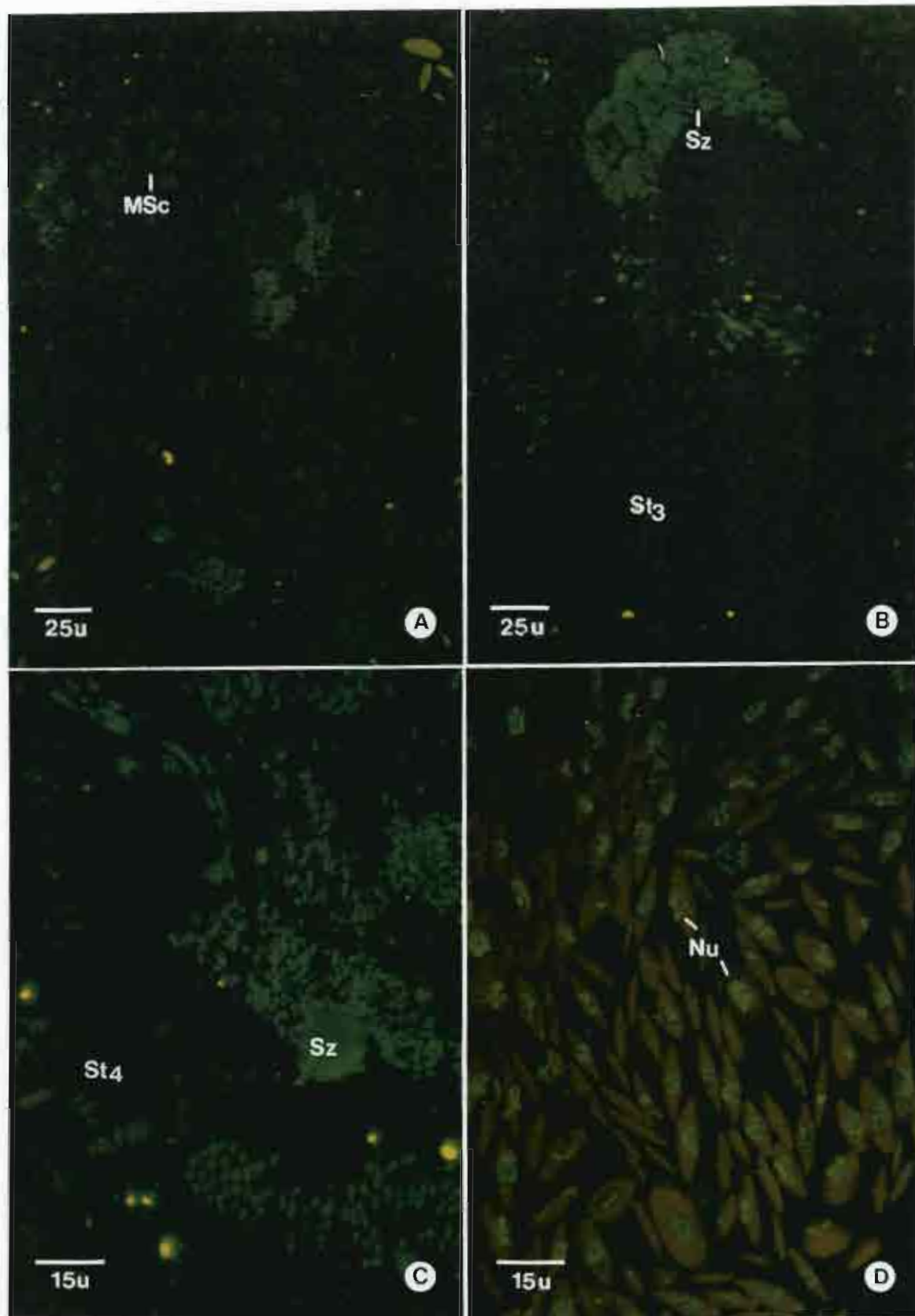


Figure 77

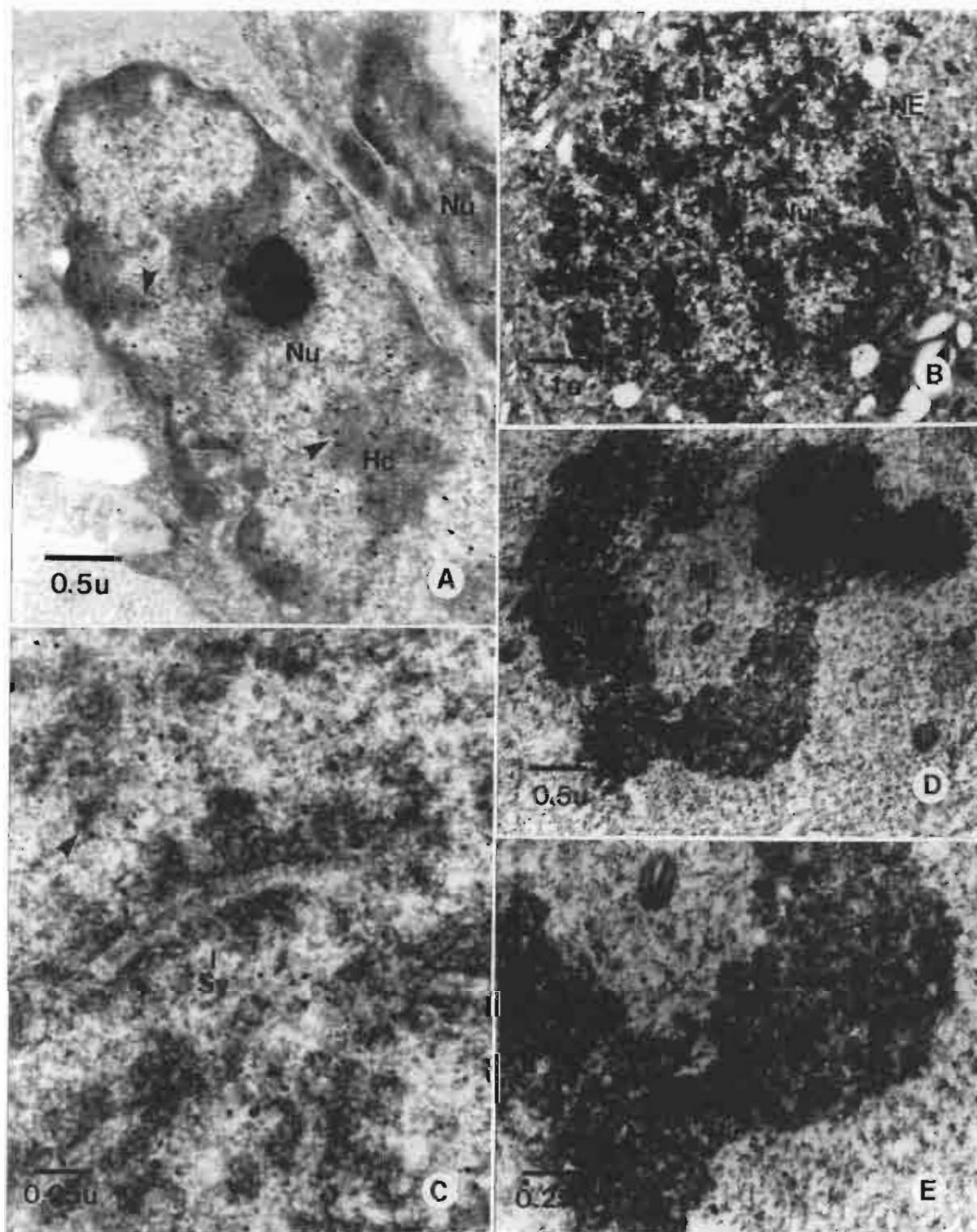


Figure 78

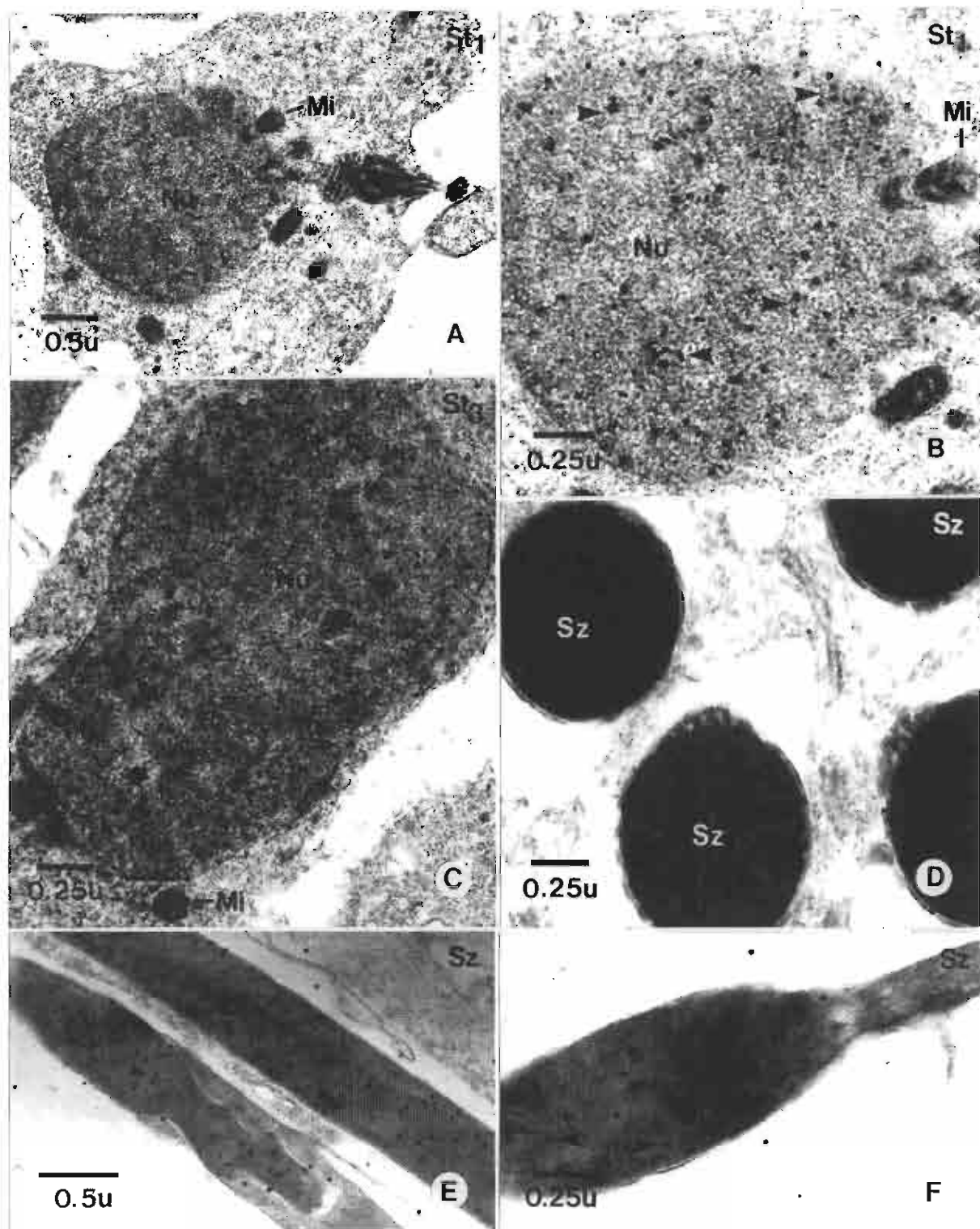


Figure 79

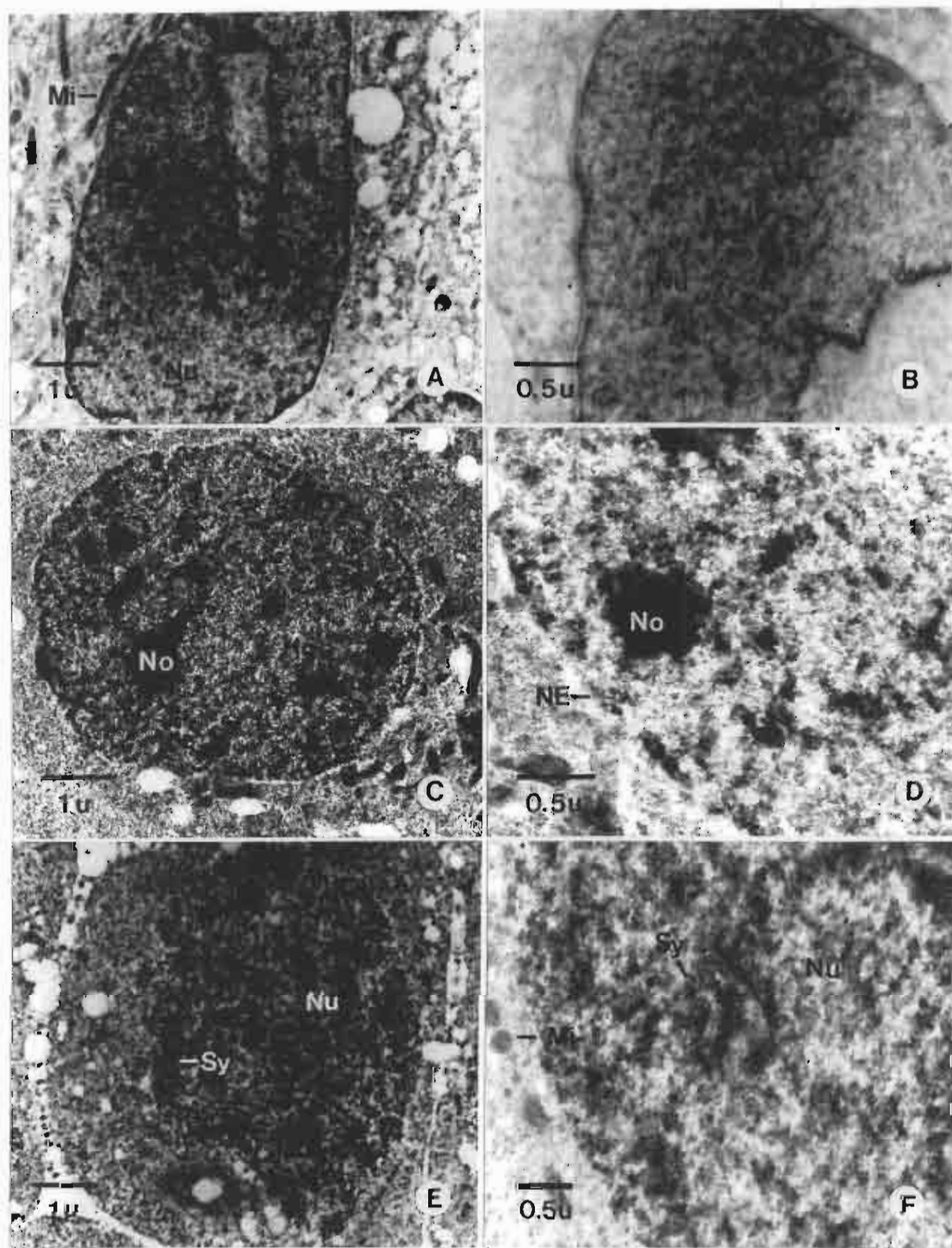


Figure 80

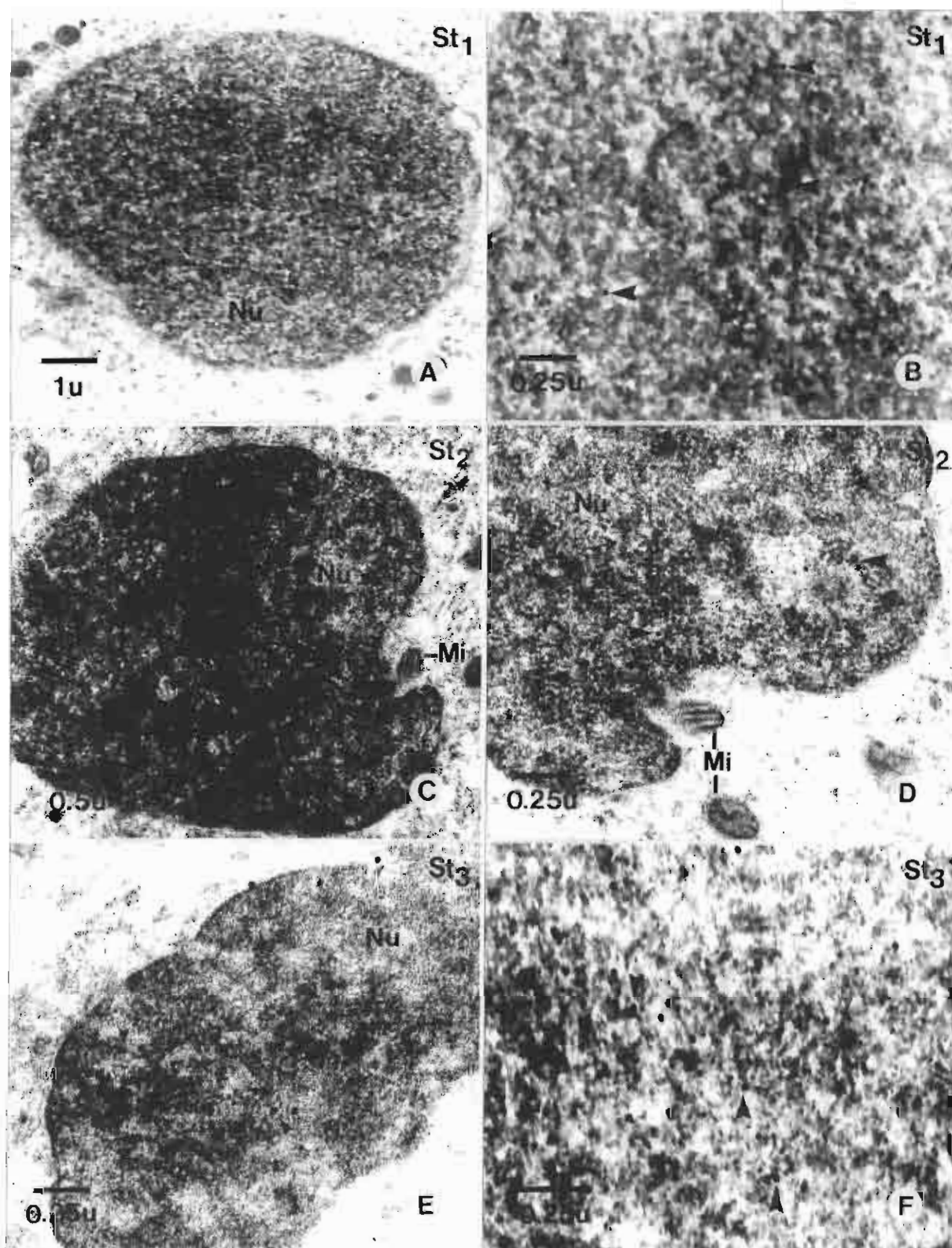


Figure 81

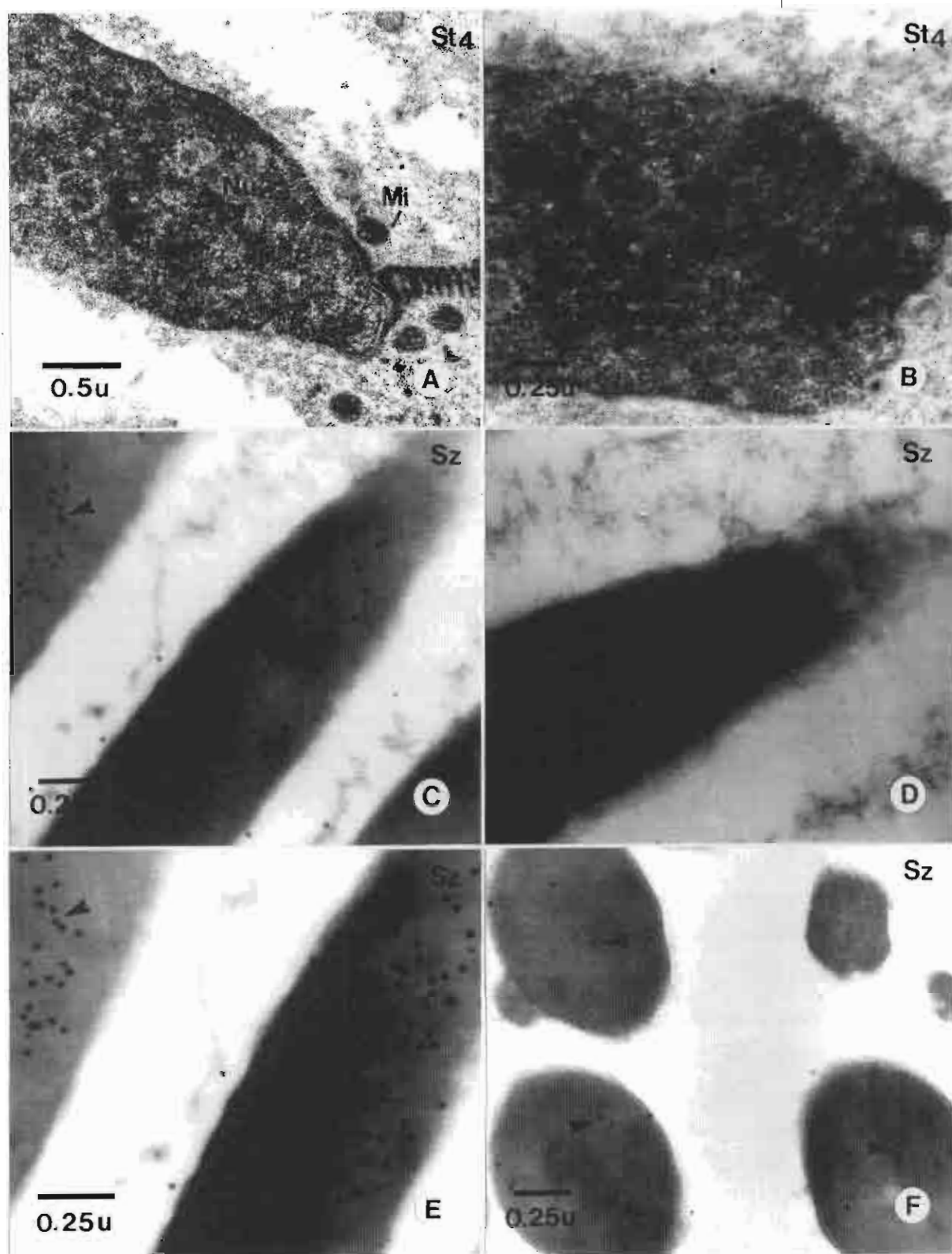
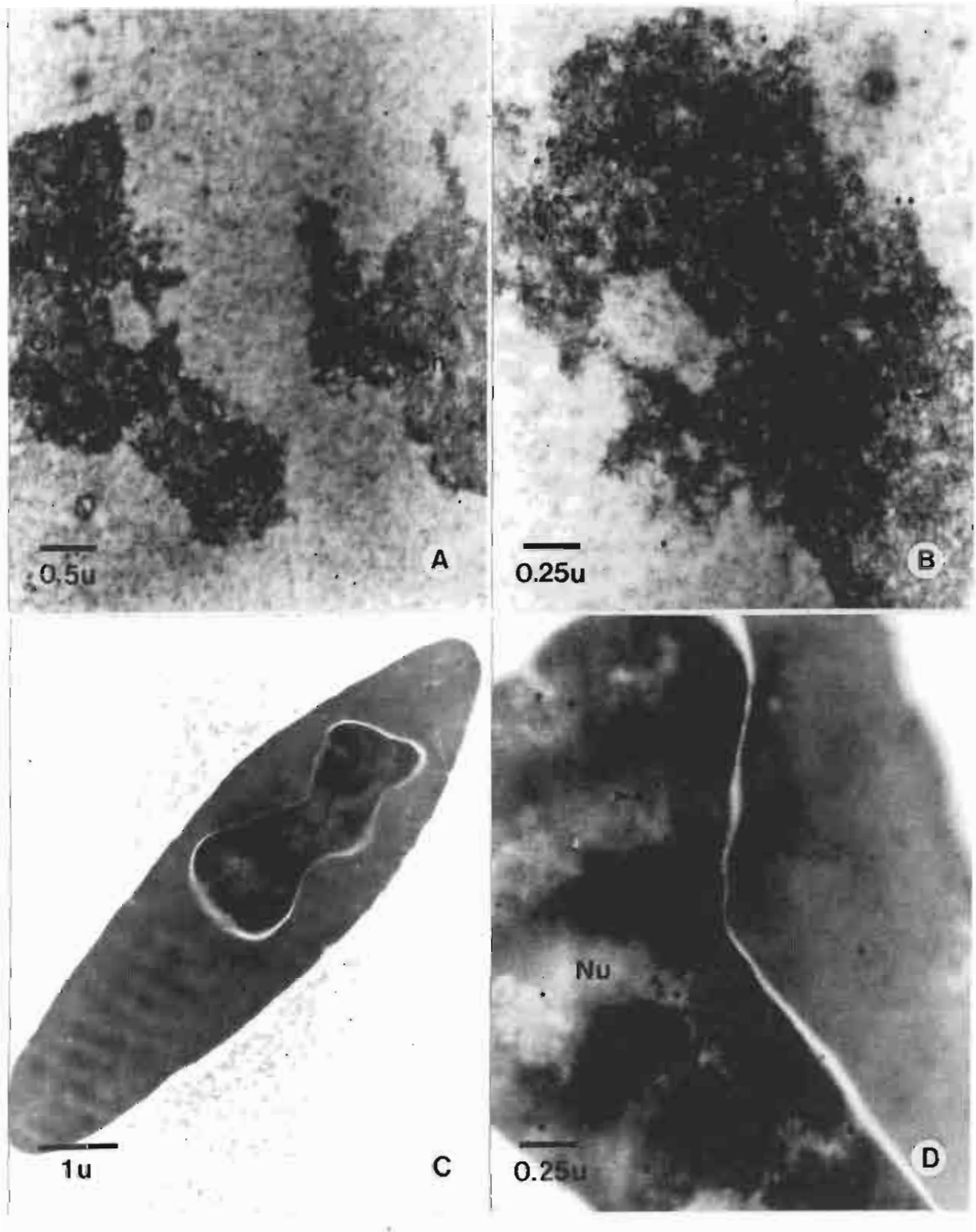


Figure 82



1.4.6 การย้อมหาตำแหน่งการกระจายและลำดับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนฮิสโตน (histones) และโปรตีนคล้ายกับโปรตามีน (protamine-like protein-PL) ในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยเป่าฮือ

การผลิตแอนติบอดี

เราได้ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน histone H1 และ H4 กับแอนติบอดีต่อ PL-protein ของหอยเป่าฮือ โดยการตัดเอาแถบ H1, H4 และ PL จากแผ่น 15% acid-urea PAGE ที่ใช้แยกเบสิกโปรตีนของหอยเป่าฮือตามข้อ 1.3.4 แล้วนำไปบดและผสมกับ Freund's adjuvant แล้วจึงนำไปฉีดหนู mouse หลังจากฉีดแอนติเจนได้ 14 วันหนูจะถูกกระตุ้นอีกครั้งโดยการฉีดโปรตีนส่วนๆที่ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำหนูมาเจาะเลือดแล้วเก็บเลือดไปตรวจดูความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี immunoblotting โดยนำเบสิกนิวเคลียโปรตีนที่สกัดได้จากต่อมอัณฑะของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ไปแยกออกจากกันด้วย 15% acid-urea PAGE จากนั้นนำโปรตีนที่แยกได้ไปทำการส่งข้าม (blotting) จาก gel ไปสู่กระดาษ nitrocellulose ด้วยวิธี electrotransfer แบบระบบเปียกโดยใช้ 0.9N acetic acid เป็น transfer buffer และใช้กระแสไฟฟ้ที่ 400 mA เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษ nitrocellulose มาย้อมด้วยสี Ponceaus S (รูปที่ 83A) เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของการส่งข้ามโปรตีนก่อนที่จะตัดแต่ละแถบเพื่อนำไปทำ immunoblotting ต่อไป ผลปรากฏว่าแอนติบอดีต่อ H4 ที่ได้มีความจำเพาะต่อแถบ H4 แต่แอนติบอดีต่อแถบ H1 และ PL โปรตีนนอกจากจะทำปฏิกิริยากับแถบ H1 หรือ PL เองแล้ว ยังสามารถทำปฏิกิริยาข้ามชนิดซึ่งกันและกัน และทำปฏิกิริยากับ histone H5 ที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงของไก่ได้อีกด้วย (รูปที่ 83B) จึงทำให้เราคิดว่า PL โปรตีนและ H5 อาจจะเป็น variants ของ H1

การตรวจตำแหน่งของโปรตีน H4, H1 และ PL โปรตีนด้วยวิธี immunofluorescence

หลังจากที่ได้ตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดแล้ว เราได้นำแอนติบอดีไปย้อมแผ่นเนื้อเยื่อต่อมอัณฑะของหอยเป่าฮือที่ฝังใน paraffin และในพลาสติก LR white เพื่อตรวจดูตำแหน่งการกระจายของโปรตีน histones, H4, H1 และ PL ด้วยวิธี immunofluorescence ผลปรากฏว่าการกระจายของโปรตีน H1 และ H4 มีลักษณะคล้ายคลึงกันทั้งใน paraffin sections และ LR white section โดยใน paraffin sections จะสังเกตเห็นการเรืองแสงเป็นแนวที่เข้มกว่า LR white แต่การแยกเซลล์สืบพันธุ์ไม่ชัดเจนเท่า โดย anti H1 และ anti H4 จะย้อมติดตามแนวของเซลล์สืบพันธุ์ขึ้นต้น คือ แนวของเซลล์ spermatocytes ที่อยู่ชิดกับแผ่น trabecula ส่วนแนวของเซลล์ spermatids จะมีความเข้มของสารเรืองแสงลดน้อยลงจนเกือบไม่ปรากฏเลยในแนวของเซลล์ spermatozoa (รูปที่ 84A-D) ในขณะที่ anti PL ย้อมแนวของเซลล์ spermatocytes รอบ ๆ แผ่น trabecula ไม่ติด แต่แนวของเซลล์ secondary spermatocyte เริ่มเรืองแสงและ spermatids มีการเรืองแสงเข้มขึ้นจนกระทั่งเข้มที่สุดในแนวของเซลล์ spermatozoa (รูปที่ 85) ใน LR white sections สามารถแยกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์ได้ชัดเจนขึ้นและพบว่าจุดที่ติด anti H1 และ anti H4 คือนิวเคลียสของเซลล์ primary

spermatocytes, secondary spermatocytes และ spermatids ซึ่งมีการเรืองแสงเฉพาะตามขอบของนิวเคลียส โดยที่ตรงกลางเซลล์ไม่เรืองแสงเลย ส่วนใน spermatozoa การเรืองแสงลดลงมาก (รูปที่ 84C, D) แนวที่ติด anti PL มีการเรืองแสงเข้มมากโดยเริ่มจากเซลล์ secondary spermatocytes ซึ่งมีขนาดใหญ่และเรียงตัวเป็นแถวกันระหว่าง primary spermatocytes ที่เรียงตัวอยู่เป็นชั้น ๆ ติดกับแผ่น trabecula กับ spermatids ที่ลอยอยู่เป็นอิสระ ส่วน spermatids ทั้ง 4 ชั้น กับ spermatozoa ก็ติดสีเรืองแสงเข้มเช่นกัน (รูปที่ 85C, D) ในขณะที่ negative control section ที่ใช้ normal serum หรือ phosphate buffer saline แทน primary antibody ไม่มีเซลล์ที่เรืองแสงเลย (รูปที่ 85A)

ดังนั้นเราจึงสรุปว่า H1 คงมีอยู่ในเซลล์สืบพันธุ์ทุกชั้นในขณะที่ H4 มีเฉพาะในเซลล์สืบพันธุ์ชั้น primary และ secondary spermatocytes ในขณะที่ PL เริ่มปรากฏขึ้นใน secondary spermatocytes และมีปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ ใน spermatids ชั้นต่าง ๆ และ spermatozoa โดยเซลล์ spermatids ชั้นปลายและเซลล์ spermatozoa จะมี H1 และ H4 เหลืออยู่ในปริมาณน้อยมากโดยปรากฏอยู่เพียงตามขอบของนิวเคลียสเท่านั้น โปรตีน PL อาจจะเป็น variants ของ H1 ที่ช่วยในการขดตัวขั้นสุดท้ายของโครมาตินในหัวเซลล์อสุจิ เนื่องจากจะสังเกตเห็นว่าโปรตีน PL มีประจุบวกมากกว่า HIV ที่พบในกบมาก

การตรวจดูตำแหน่งของ H4, H1 และ PL โปรตีนด้วยวิธี immunogold

เมื่อย้อมด้วย anti PL พบว่ามี gold particles จำนวนมากเกาะอยู่กับใยโครมาตินของเซลล์ spermatids ชั้นที่ 1 โดยเฉพาะในส่วนที่เป็นก้อน heterochromatin (รูปที่ 86C, D) ส่วนในบริเวณไซโทพลาสซึมที่เป็น euchromatin เกือบไม่มี gold particles อยู่เลย ใน St_2 (รูปที่ 86E, F), St_3 (รูปที่ 87A, B) และ St_4 ก็มี gold particles เกาะอยู่จำนวนมากในส่วนของ heterochromatin โดยเฉพาะใน St_4 พบว่า gold particles จะซ้อนอยู่บนเส้นใย หรือก้อนโครมาตินขนาด 60 nm ซึ่งเป็นระดับสุดท้ายที่มีขนาดใหญ่ที่สุดก่อนที่ใยโครมาตินจะประกบกันแน่นจนหีบแสงอิเล็กตรอน (รูปที่ 87C, D, E) ส่วนในนิวเคลียสของเซลล์ spermatozoa มี gold particles กระจายอยู่อย่างหนาแน่นบนโครมาตินที่ขดแน่น ในขณะที่ไม่สามารถเห็นขอบเขตของก้อนโครมาตินต่อไป (รูปที่ 87F) ในเซลล์ spermatocytes ยกเว้นเซลล์ secondary spermatocytes (SSc) มี gold particles กระจายอยู่น้อยมาก ซึ่งอาจจะถือได้ว่าเป็น background staining ส่วนใน SSc พบว่ามี gold particles จำนวนพอประมาณเกาะอยู่บนเส้นใยโครมาตินที่สานกันเป็นลักษณะตาข่าย (รูปที่ 87A, B) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า PL เป็นโปรตีนจำเพาะที่พบมากในเซลล์ spermatids ทุกชั้นและอาจเป็นตัวกลางที่ทำให้มีการขดของใยโครมาตินซึ่งเปลี่ยนขนาดจาก 30 และ 40 nm กลายเป็น 60 nm ในเซลล์ชั้น St_4 ซึ่งจะรวมตัวแน่นเข้าจนกลายเป็นโครมาตินที่หีบแสงอิเล็กตรอนในเซลล์อสุจิ

รูปที่ 83 A) แถบของเบสิกนิวเคลียร์โปรตีนจาก 15% acid urea gel ที่สกัดจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในต่อมอัณฑะของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* (lane Ab) เปรียบเทียบกับแถบเบสิกโปรตีนมาตรฐานคือ H1 ของ calf thymus histone H1 (lane CT) และแถบเบสิกโปรตีนที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงไก่ (lane Ch) CT-calf thymus histone H1, Ch-chick erythrocytes' basic nuclear proteins, Ab-basic nuclear proteins จาก testicular cells ของ abalone

B) แถบของกระดาษ nitrocellulose ที่รับเบสิกนิวเคลียร์โปรตีนจาก 15% acid urea gel แล้วย้อมด้วย anti H1 (lane Ab-anti H1) และ anti PL (lane Ab-anti PL) พบว่าแถบที่เกาะกับแอนติบอดีคือ H1 และ PL แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีทั้งสองชนิดเกิดปฏิกิริยาข้ามชนิดซึ่งกันและกันได้ ในขณะที่ย้อมด้วย anti H1 ยังเกาะกับแถบโปรตีน H1 ของ calf thymus histone H1 (lane CT-anti H1) และ H5 ของเบสิกโปรตีนที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงไก่ (lane Ch-anti H1) อย่างจำเพาะอีกด้วย

รูปที่ 84 A) Negative control LR white sections ของต่อมอัณฑะของหอยเป่าชื่อแสดงแผ่น trabecula (tr) และแถวของเซลล์ spermatocytes (Sc), spermatids (St) และ spermatozoa (Sz) ซึ่งไม่มี autofluorescence

B) LR white sections ของอัณฑะที่ย้อมด้วย Anti H1 แสดงการเรืองแสงเข้มในนิวเคลียสของเซลล์ชั้น primary spermatocytes (Sc) และ secondary spermatocytes (SSc) และการเรืองแสงพอประมาณใน spermatids (St) และเรืองแสงน้อยใน spermatozoa (Sz)

C, D) LR white sections ของอัณฑะที่ย้อมด้วย Anti H4 แสดงการเรืองแสงเข้มใน primary spermatocytes และ secondary spermatocytes (Sc, SSc) ที่เกาะอยู่รอบๆแผ่น trabecula (tr) นิวเคลียสของเซลล์ spermatids (St) และ spermatozoa (Sz) มีการเรืองแสงเฉพาะที่ ขอบของนิวเคลียส ส่วนตรงกลางมืดทึบ

รูปที่ 85 A) Negative control LR white sections ของต่อมอัณฑะของหอยเป่าชื่อแสดงแผ่น trabecula (tr) และบริเวณของเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่างๆ (Sz-spermatozoa) ซึ่งไม่มี autofluorescence อยู่เลย

B, C, D) แสดงการติดสีเรืองแสงของเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่างๆ จากการย้อมด้วย anti PL โดยเฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์ secondary spermatocytes (SSc), spermatids (St) และ spermatozoa (Sz) ในขณะที่เซลล์ primary spermatocytes ที่อยู่ติดกับแผ่น trabeculae ไม่ติดสีเลย

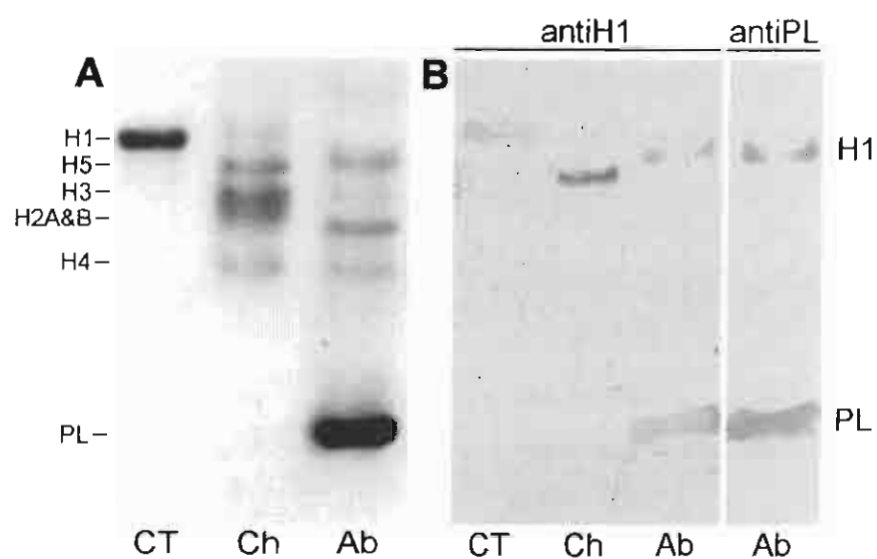
รูปที่ 86 ภาพ TEM ของเซลล์ในต่อมอัณฑะหอยเป่าชื่อที่ย้อมด้วยวิธี immunogold ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน PL แสดงตำแหน่งของโปรตีน PL จากการเกาะของเม็ดทองคำ (ลูกศร) ซึ่งเริ่มปรากฏ

จำนวนพอประมาณในนิวเคลียสของเซลล์ secondary spermatocyte โดยเฉพาะบนใยโครมาติน (ภาพ A, B) ปริมาณเม็ดทองคำมีมากขึ้นเรื่อยๆ ในนิวเคลียสของเซลล์ spermatid ขั้นที่ 1 (St₁-ภาพ C, D) และขั้นที่ 2 โดยเฉพาะบนใยโครมาตินที่ขดแน่นเป็นก้อน heterochromatin (St₂-ภาพ E, F)

รูปที่ 87 ภาพ TEM ของเซลล์ในต่อมอัณฑะหอยเป่าฮือที่ย้อมด้วยวิธี immunogold ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน PL แสดงตำแหน่งของโปรตีน PL จากการเกาะของเม็ดทองคำ (ลูกศร) พบว่ามีเม็ดทองคำเกาะอยู่บนใยโครมาตินขนาด 40 nm ที่อัดแน่นในนิวเคลียสของเซลล์ spermatids ขั้นที่ 3 (St₃-ภาพ A, B) และบนใยโครมาตินขนาด 60 nm ในเซลล์ spermatids ขั้นที่ 4 (St₄-ภาพ C, D, E). ปริมาณเม็ดทองคำมีมากที่สุด ในนิวเคลียสของเซลล์ spermatozoa ที่โครมาตินขดแน่นเต็มที่ (S₃-ภาพ C, F)

รูปที่ 88 ภาพวาดสรุปลักษณะการจัดระดับและการขดของใยโครมาตินในเซลล์ spermatids ขั้นสุดท้ายและเซลล์สุจิของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (มนุษย์, หนู) สัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ (กบ *Rana tigrina*) สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังประเภท gastropods (หอยทากยักษ์-*Achatina fulica* และหอยเป่าฮือ-*Haliotis asinina*) และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ (*Fasciola gigantica*) ซึ่งมีการเรียงตัวและการขดของใยโครมาติน 4 แบบที่อาจมีความสัมพันธ์กับรูปร่างของเซลล์สุจิ

Figure 83



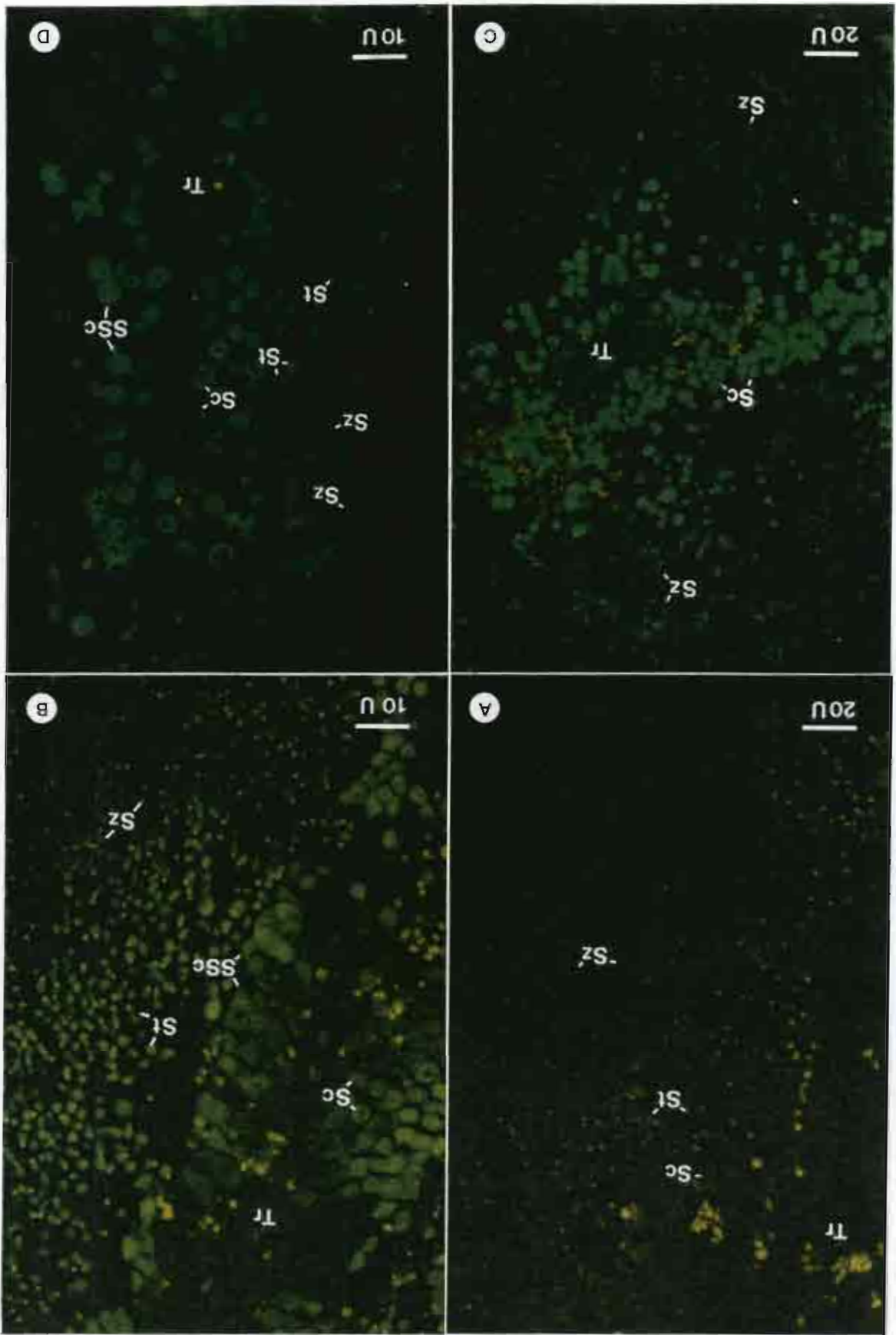


Figure 84

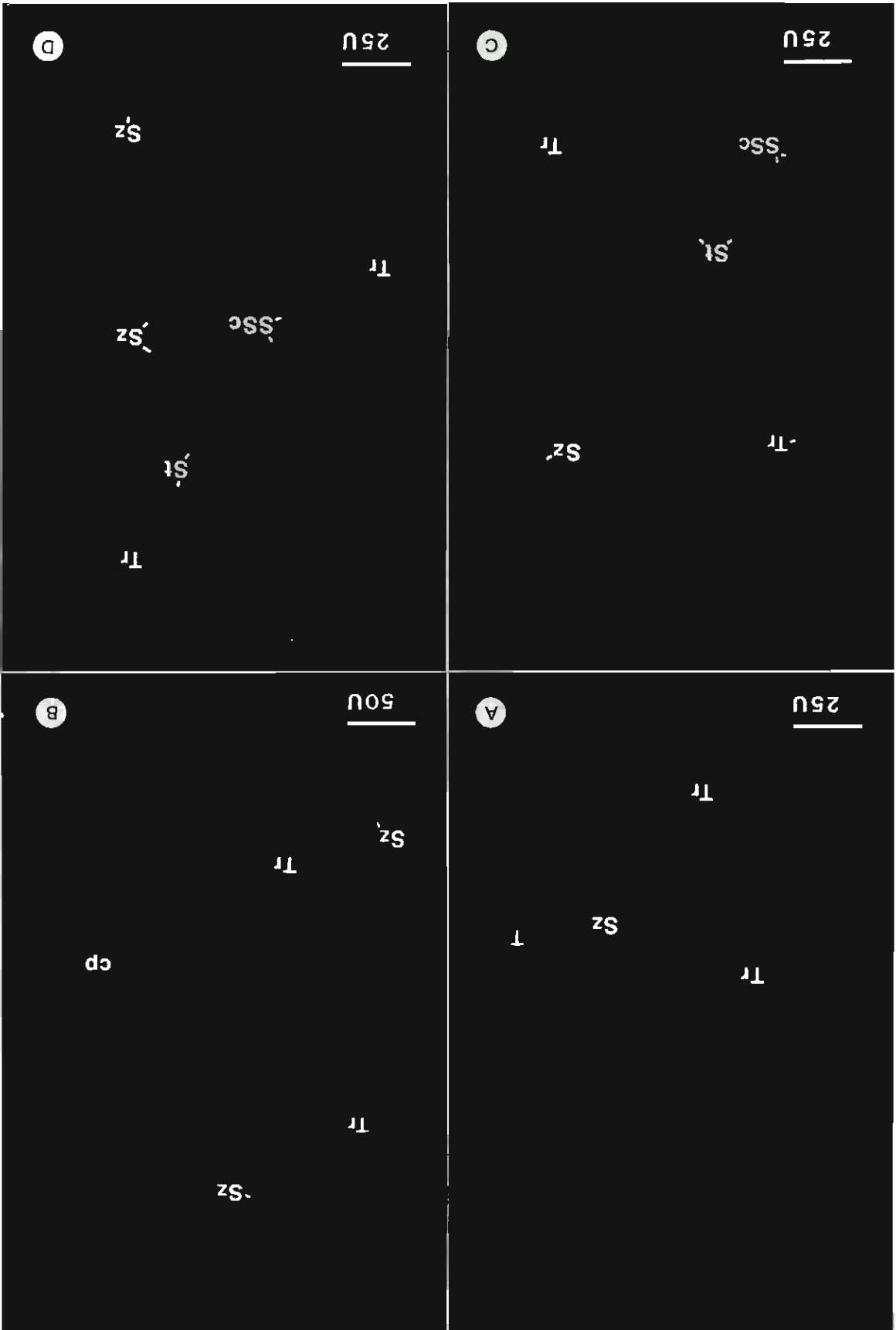


Figure 85

Figure 86

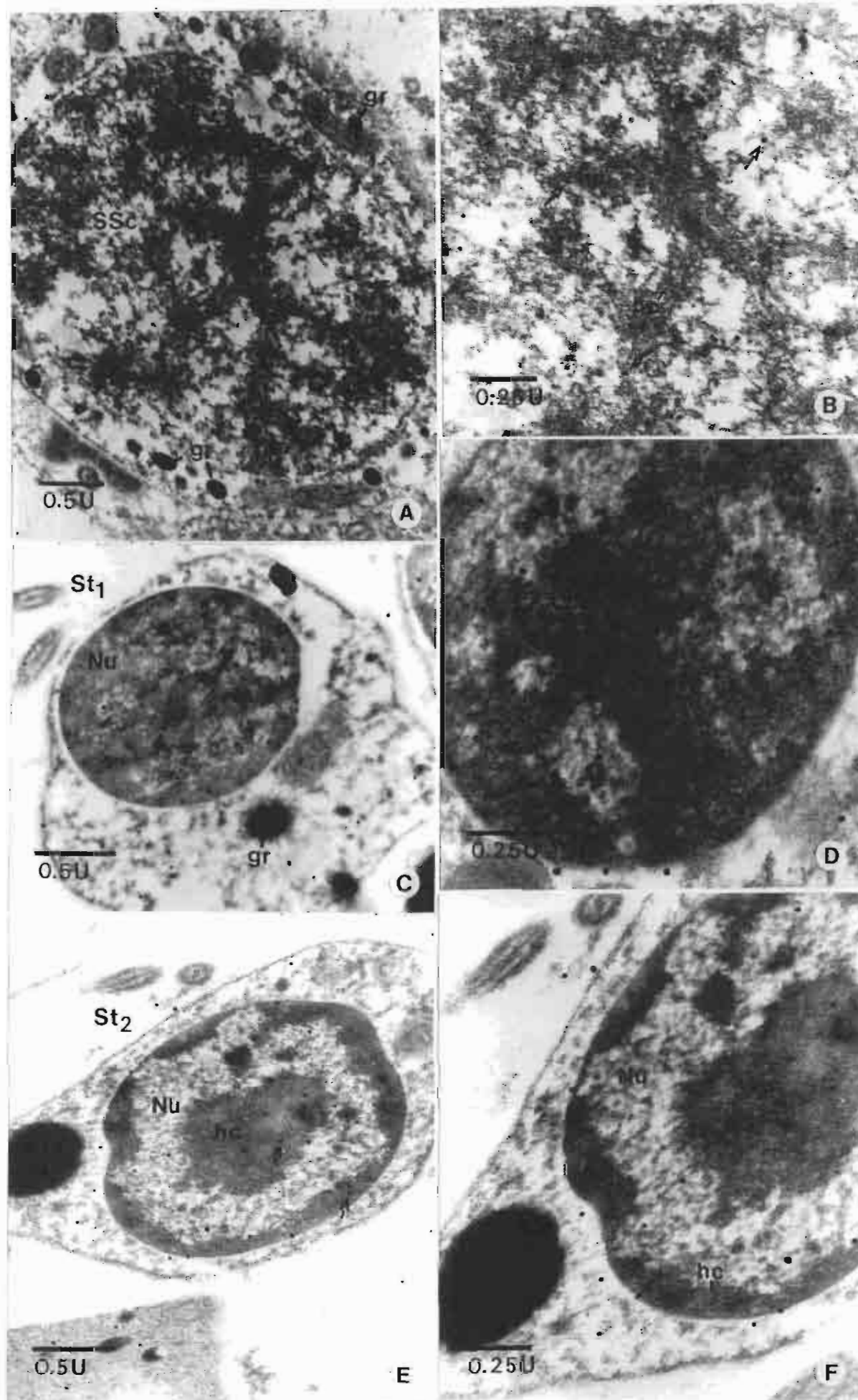
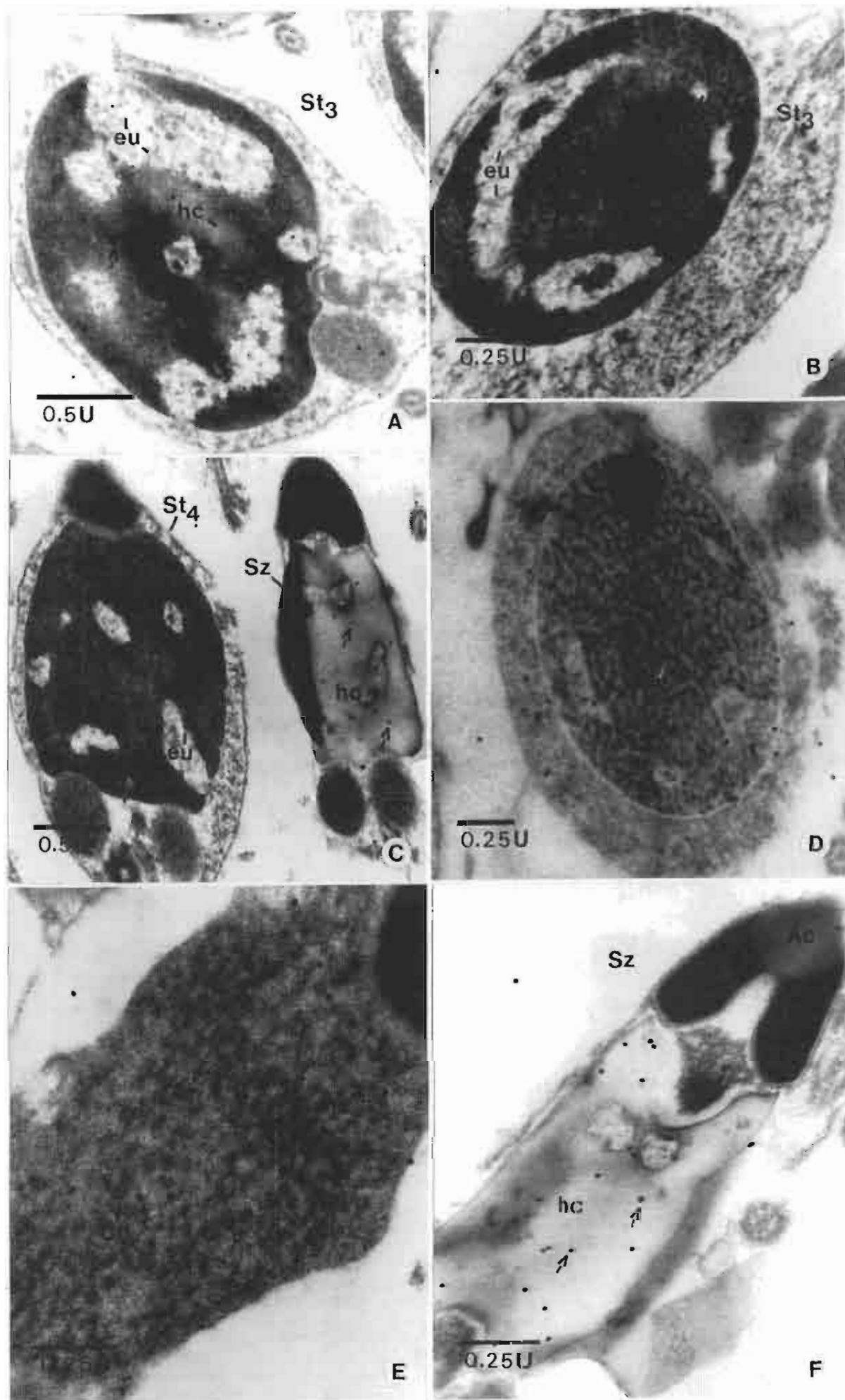
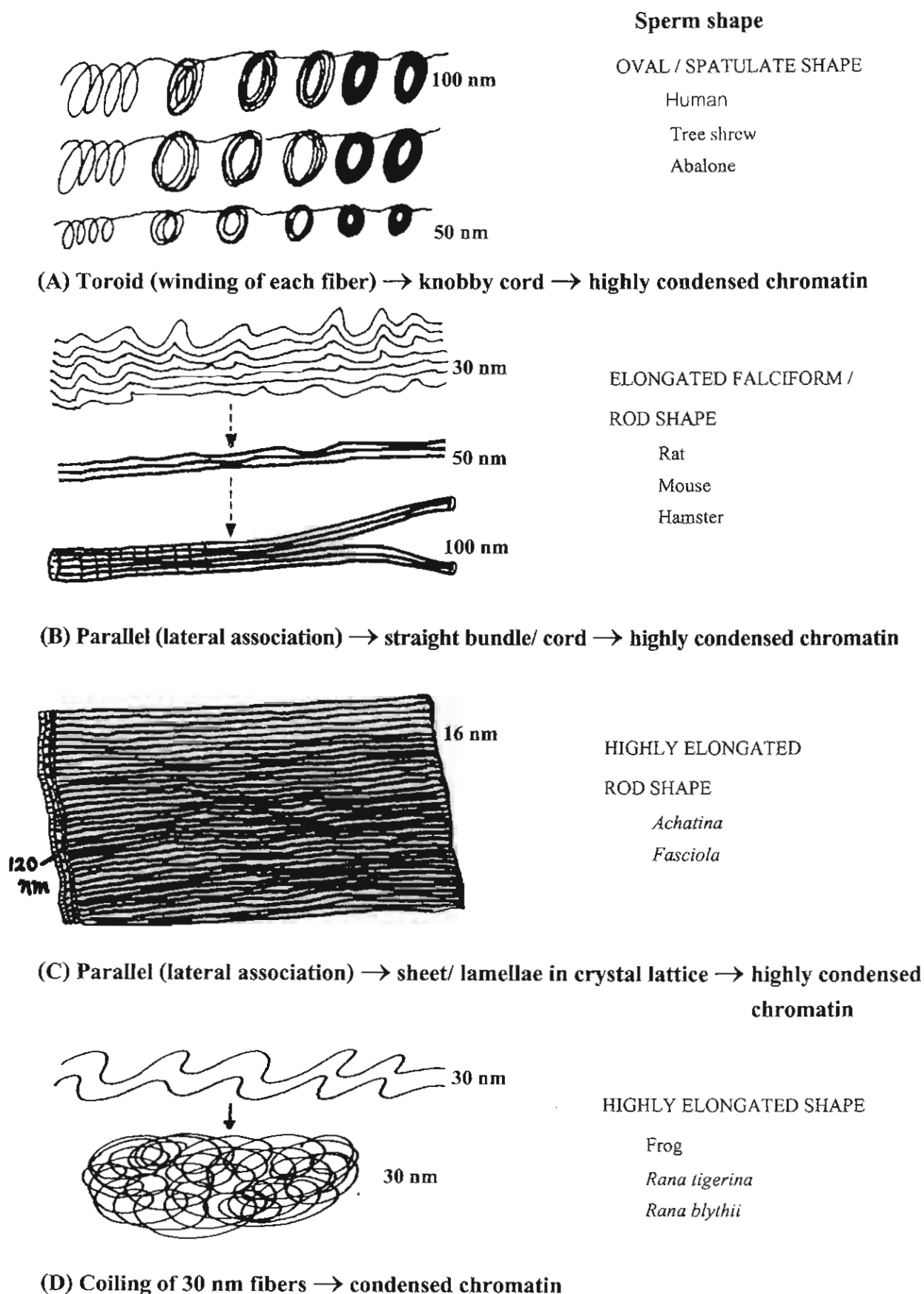


Figure 87



Chromatin Conformation and Condensation



สรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบการจัดระดับและการขดของใยโครมาตินในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (มนุษย์, หนู-*Rattus rattus*, กบ-*Rana tigerina*) และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (หอยเป่าฮือ-*Haliothis asinina*, หอยทากยักษ์-*Achatina fulica*, พยาธิ *Fasciola gigantica*) เราได้ข้อสรุปดังนี้

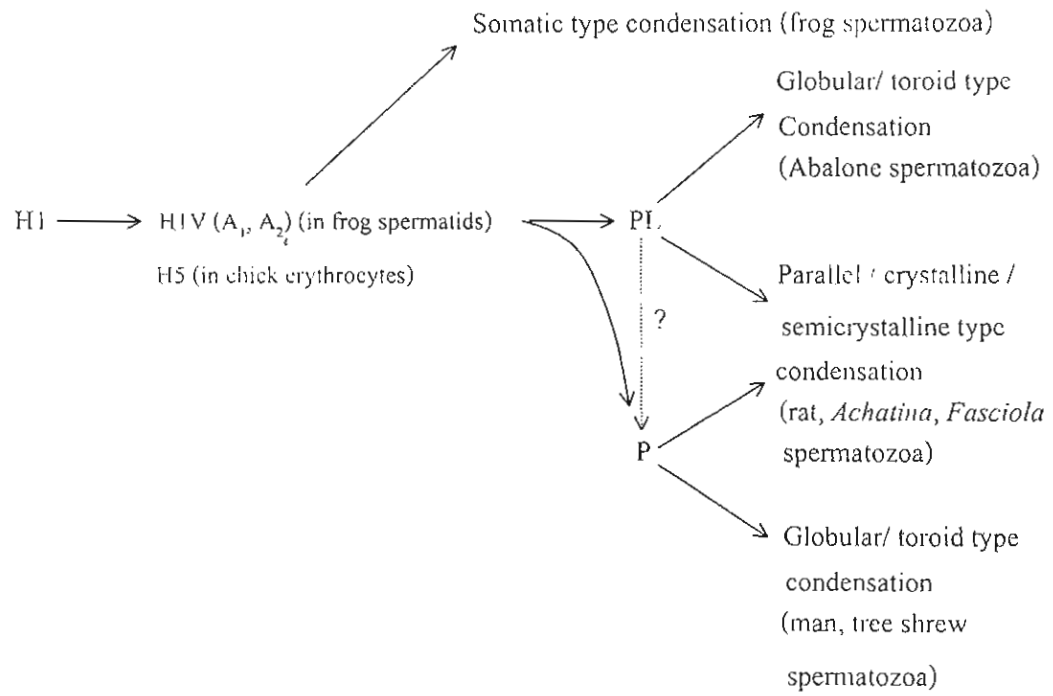
1) ในช่วง spermatogenesis การจัดระดับของใยโครมาตินในเซลล์ต้นตอ (spermatogonia) ซึ่งมีเซลล์ 1-3 ชั้น และช่วง primary spermatocytes ซึ่งมีเซลล์ 6 ชั้น (leptotene-LSc, zygotene-ZSc, pachytene-PSc, diplotene-DSc, diakinesis-DiSc และ metaphase-MSc) กับ secondary spermatocytes 1 ชั้น เป็นแบบ nucleosomal organization โดยใยโครมาตินที่มี nucleosomes ขนาด 10 nm ขดตัวเป็นใยขนาด 30 nm ซึ่งเป็นเส้นใยโครมาตินหลักของเซลล์ในช่วง spermatogenesis การขดตัวของใยระดับ 30 nm เข้าเป็นก้อน heterochromatin ขนาดต่าง ๆ กัน เริ่มจากชั้น LSc จนกระทั่งกลายเป็นแท่งโครโมโซมในชั้น MSc ซึ่งล้วนแต่เป็นการขดแน่นของใยขนาด 30 nm เข้าด้วยกัน โดยมีแกน condensation axis (Ax) เป็นแกนกลางที่กระตุ้นการขดของใยโครมาตินซึ่งเริ่มปรากฏขึ้นใน LSc ในที่สุดแกนนี้คงกลายเป็น scaffold protein (axis) สำหรับโครโมโซมแต่ละท่อน พบว่ามีแกนการขดตัวในเซลล์ระยะ LSc และ ZSc ของสัตว์ทุกชนิด นอกจากนั้นยังพบ synaptonemal complex (Sy) ซึ่งเป็นจุดไขว้ระหว่างโครมาตินของโครโมโซมแต่ละคู่ในชั้น ZSc ของสัตว์ทุกชนิดด้วย การขดของใยขนาด 30 nm เข้าด้วยกัน นอกจากจะเริ่มที่ Ax แล้วต้องใช้โปรตีนที่มำเนิดจาก H1 หรือ H1 variants คล้ายกับที่พบในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ของกบระยะ spermatids หรือโปรตีน H5 ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่และกบ

2) ใยโครมาตินขนาด 30 nm เริ่มคลายตัวออกอีกครั้งในระยะ secondary spermatocytes และ spermatids ขั้นต้น (Golgi และ Cap phases) โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และหอยชั้นสูง เช่น หอยทากยักษ์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ามี transcriptional activity เกิดขึ้นอีกครั้งที่จำเป็นในการสร้าง proacrosomal vesicles หรือ granules ซึ่งจะประกอบเป็น acrosome ต่อไป ในขณะที่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขั้นต่ำ เช่น หอยเป่าฮือ และพยาธิ *Fasciola gigantica* ใยขนาด 30 nm ไม่คลายออกอีกครั้งในเซลล์ spermatids เนื่องจากไม่จำเป็นต้องมี transcriptional activity เพราะ proacrosomal vesicles ถูกสร้างขึ้นในระยะ spermatocytes แล้ว เพียงแต่นำก้อน proacrosomal เหล่านี้มาประกอบกันเข้าในชั้นเซลล์ spermatids ขั้นต้น เซลล์ spermatids ของสัตว์เหล่านี้จึงแยกจากกันและพัฒนาอย่างอิสระต่อไปโดยไม่ต้องอาศัย Sertoli cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาารูปร่างของเซลล์อสุจิในสัตว์ชั้นสูง

3) ในสัตว์เกือบทุกชนิดที่ศึกษา ยกเว้นกบ มีการสับเปลี่ยนแทนที่นิวเคลียสโปรตีน คือ histones ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างของใยโครมาตินที่มีลักษณะอนุรักษ์ด้วยโปรตีนที่มีประจุบวก

มากขึ้น เช่น transitional proteins (TP) (หนู, มนุษย์) และ protamines (หนู, มนุษย์) หรือ intermediate proteins และ protamine-like (PL) proteins (ในหอยเป่าฮือและหอยทากยักษ์) ส่วนในเซลล์สืบพันธุ์ของกบมีการเพิ่มโปรตีนที่เป็น H1 variant มากขึ้นโดยไม่มีการแทนที่ histones ซึ่งยังคงมีปริมาณเท่าเดิม

4) TP proteins, protamines, และ PL proteins ทำให้ใยโครมาตินเปลี่ยนโครงสร้าง (conformation) ได้ 3 รูปแบบ กล่าวคือแบบที่หนึ่ง เช่น ในมนุษย์ และหอยเป่าฮือ ใยโครมาตินแต่ละเส้นที่โปรตีน histones ถูกแทนที่แล้วโดย protamines หรือ PL proteins จะขดพันตามจุดต่าง ๆ ในตัวมันเองจนกลายเป็นก้อนกลมลักษณะคล้าย doughnut หรือ toroid ขนาดต่างๆ กันที่ 50 และ 100 nm เรียงต่อกัน ซึ่งพบในเซลล์ spermatids ชั้นกลางของมนุษย์ หรือก้อนขนาด 40-60 nm ในเซลล์ spermatids ของหอยเป่าฮือ ในเซลล์ spermatid ชั้นสุดท้าย ก้อน toroid เหล่านี้จะประกบติดกันเข้าจนกลายเป็นสายโครมาติน (nucleoprotamine) ขนาดใหญ่ที่มีลักษณะหยักไปมาและมีปุ่มตลอดความยาว (ดูภาพสรุป 88A) ที่เข้ามาชิดและกระชับแน่นจนกลายเป็นโครมาตินทึบในเซลล์อสุจิ ในแบบที่ 2 เช่นในหนู เมื่อ histones ถูกแทนที่โดย TP proteins และ protamines แล้วใย nucleoprotamine จะเหยียดตรงและขนานกัน ใยที่วางตัวขนานกันเหล่านี้จะค่อย ๆ หลอมกันเข้าจนกลายเป็นเส้นโครมาตินที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ (50 nm $\rightarrow$ 70 nm $\rightarrow$ 100 nm) จนกลายเป็นแท่งโครมาตินที่เชื่อมกันสนิทในเซลล์อสุจิ (ดูภาพสรุป 88B) ในแบบที่ 3 เช่นในหอยทากยักษ์และพยาธิ *Fasciola gigantica* ใยที่เหยียดตรงมีขนาดลดลงเหลือประมาณ 15-20 nm แต่ยังคงวางตัวขนานกันและหลอมรวมกันเข้าเป็นแผ่น (lamellae) ขนาด 110-120 nm ที่อัดกันแน่นในเซลล์อสุจิจนทำให้ใย protein-DNA ขนาดเล็กนี้เหยียดตรงและเรียงตัวแน่นอยู่ในชั้นจันมีลักษณะคล้ายผลึก (crystal lattice) (ดูภาพสรุป 88C) ส่วนแบบที่ 4 คือการขดของใยโครมาตินในเซลล์อสุจิของกบซึ่งมีใยขนาด 30 nm ที่เป็นแบบ nucleosomal organization อยู่ในเซลล์สืบพันธุ์ทุกชั้นจนกระทั่งถึงชั้นเซลล์อสุจิโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดและ histone ไม่ถูกแทนที่ ใยโครมาตินเหล่านี้จะถูกเรียงเข้าหากันและขดพันกันแน่นด้วยโปรตีน H1 variant (H1V) ซึ่งทำให้โครมาตินแน่นทึบได้เท่ากับโปรตีน protamines หรือ PL แต่อาจจะมีพันธะยี้ดระหว่างใยอ่อนกว่ามาก (ดูภาพสรุป 88D) ลักษณะเช่นนี้คล้ายกับการขดตัวของใยโครมาตินที่สร้างเป็นแท่งโครโมโซมขณะที่เซลล์แบ่งตัวหรือการขดของใยโครมาตินที่กลายเป็นโครมาตินแน่นทึบ (heterochromatin) ในนิวเคลียสของเซลล์ร่างกายที่ปรับสภาพเต็มที่แล้ว เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดงของกบ และไก่ ซึ่งใช้ H5 ที่เป็น H1 variant อีกชนิดหนึ่งในการกระชับใยโครมาตินเข้าด้วยกัน จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิด (cross reaction) ระหว่างโปรตีน histones และ protamine-like proteins พบว่า H1, H1V, H5 และ PL proteins มีปฏิกิริยาข้ามชนิดระหว่างกันสูงมากและไม่มียปฏิกิริยาข้ามชนิดกับ histones อื่นเลย ดังนั้นโปรตีนเหล่านี้จึงอาจจะเป็นกลุ่มเดียวกันที่มีกำเนิดมาจากยีนอันเดียวกันตามภาพสรุปการวิวัฒนาการของเบสิกนิวเคลียโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขดตัวของใยโครมาติน



โครงการที่ 2 การศึกษาแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพเป็นวัคซีนตัวเลือกและกระบวนการสังเคราะห์แอนติเจนที่ระดับเซลล์ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพยาธิ (Characterization of *Fasciola gigantica* antigens with vaccine potentials, and their syntheses at cellular level in various tissues of the parasites)

2.1 การวิเคราะห์แอนติเจนของพยาธิและการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี

2.1.1 การวิเคราะห์แอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย

การเตรียมแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย

เราได้เตรียมแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัยเพื่อทำการวิเคราะห์แอนติเจน 3 ประเภท คือ (1) แอนติเจนที่ปล่อยออกมาจากตัวพยาธิขณะเมื่อแช่ในน้ำเลี้ยง (medium) ซึ่งเป็นทั้ง excretory และ secretory products ที่รวมเรียกว่า ES antigens ซึ่งน่าจะคล้ายกับแอนติเจนที่พยาธิปล่อยออกมาสู่เลือดของโฮสต์ (2) แอนติเจนจากชั้นผิวและเยื่อหุ้มชั้นผิว (surface & tegumental antigens หรือ TA antigens) และ (3) แอนติเจนจากทั้งตัวของพยาธิ (Whole body extract หรือ WB antigen)

การเตรียม ES antigens

เก็บตัวเต็มวัยของ *F. gigantica* จากตับและถุงน้ำดีของโค หรือกระบือที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ นำตัวพยาธิที่เก็บได้มาล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย Hanks' balanced salt solution ซึ่งมียาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน และสเตรปโตมัยซิน ในอัตรา 100 units/ml และ 100 mg/ml ตามลำดับ เพื่อขจัดเลือดและสิ่งแปลกปลอมจากโฮสต์และทำลายจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมากับตัวพยาธิ จากนั้นจึงนำพยาธิใส่ในจานเลี้ยงที่ปลอดเชื้อใส่น้ำเลี้ยง Minimum Essential Medium (MEM) ซึ่งมียาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน และสเตรปโตมัยซินผสมอยู่เลี้ยงพยาธิที่อุณหภูมิห้องในน้ำเลี้ยงประมาณ 20 มล. และคอยสังเกตเมื่อน้ำเลี้ยงเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลืองอ่อน แสดงว่าพยาธิได้ขับ metabolic products ซึ่งอาจจะได้แก่เอนไซม์และสารบางอย่าง (ES antigens) ออกมาในน้ำเลี้ยง จากนั้นจึงเปลี่ยนน้ำเลี้ยงใหม่และเก็บน้ำเลี้ยงที่มี ES antigens มารวมกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C โดยทั่วไปพบว่าพยาธิสามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำเลี้ยงได้นานถึง 48 ชั่วโมง

การเตรียม ES antigens ที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงพยาธิทำได้โดยนำน้ำเลี้ยงมาทำให้แห้งเป็นผงโดยการ lyophilize จากนั้นนำผง ES antigens ที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นก่อนที่จะนำไป dialyse ใน 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4-6°C นาน 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายภายในถุง dialysis ใส นำ ES antigen ที่เตรียมได้ไปปั่นที่ 8000 rpm 4°C นาน 20 นาที ก่อนที่จะนำสารละลายส่วนบนไปวัดหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's method

การเตรียม surface-tegumental (TA) antigens

หลังจากเก็บ ES antigens แล้วนำพยาธิที่ยังมีชีวิตอยู่มารวมกันเพื่อสกัด TA แอนติเจน โดยแช่พยาธิในสารละลาย 1% Triton X-100 ใน Tris buffer pH 8 นาน 30 นาที ซึ่งเป็นช่วงที่ชั้นผิวของพยาธิจะหลุดลอกออกจากตัวพยาธิโดยไม่ทำให้ชั้น basement membrane และชั้นกล้ามเนื้อหลุดออกมาด้วย จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้มารวมกันและทำให้แห้งเป็นผงโดยการ lyophilize แล้วจึงนำผง TA แอนติเจนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น ขั้นตอนต่อจากนี้ทำเช่นเดียวกับการเตรียม ES antigens

การเตรียม whole body antigens (WBA)

นำพยาธิสดทั้งตัวที่ล้างแล้วมาใส่ใน 0.01M PBS pH 7.2 และบดด้วย tissue grinder จนละเอียด จากนั้นจึงนำมาทำให้ละลายอีกครั้งโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) แล้วจึงนำไปปั่นที่ 20,000 g 4°C นาน 20 นาที ก่อนที่จะนำสารละลายไปวัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธีข้างต้น

การวิเคราะห์ชนิดและคุณลักษณะของแอนติเจนของพยาธิตัวเต็มวัยโดยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting

เราได้ทำการวิเคราะห์แอนติเจนทั้งสามชนิดที่เตรียมแล้ว ได้แก่ ES antigens, surface และ tegument antigens (TA) และ แอนติเจนจากพยาธิทั้งตัว (whole body antigens-WB) โดยนำแอนติเจนแต่ละชนิดมาแยกใน 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แล้วตรวจด้วยวิธี immunoblotting

จากการวิเคราะห์แผ่น SDS-PAGE ของแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ที่ย้อมด้วยสี Coomassie blue และ silver stain (รูปที่ 89A, C; ตารางที่ 9) พบว่า lane ที่มี whole body antigens (WB) เป็น lane ที่มีแถบโปรตีนมากที่สุด ที่สังเกตได้ประมาณ 23 แถบ ที่ MW 110, 97, 95, 86, 66, 64, 58, 54, 50, 49, 47, 38, 35, 33, 28.5, 27, 26, 24, 22, 20, 19, 14.5 และ 11 kD ใน lane ของ tegument (TA) antigens มีจำนวนแถบคล้ายกับ WB แต่มีแถบที่เข้มเป็นพิเศษประมาณ 11 แถบ คือที่ MW 97, 86, 66, 64, 58, 54, 47, 38, 35, 28.5 และ 14.5 kD ส่วนใน lane ของ excretory-secretory (ES) antigens มีแถบที่เข้มที่สุดอยู่เพียงสองแถบที่ MW 26 และ 27 kD (ซึ่งค่อนข้างจางใน lane TA) แถบที่เข้มพอประมาณที่ 28.5 kD และมีแถบจาง ๆ อยู่ที่ MW ค่อนข้างสูงที่ 66, 64, 58 kD และที่ MW ต่ำที่ 14.5, 11 (ซึ่งค่อนข้างเข้มใน lane TA) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ES antigens ในแถบ 26-27 kD ไม่ถูกสกัดออกมาด้วย Triton X-100 และน่าจะมาจากส่วนลึกของร่างกายพยาธิ ส่วนแถบที่ปรากฏที่ MW 66, 64, 58, 28.5, 14.5 และ 11 อาจจะเป็นแอนติเจนที่มาจากส่วนภายนอกเช่น ผิวซึ่งเห็นเด่นชัดมากเมื่อสกัดด้วย Triton X-100

เราได้เคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่น SDS-PAGE ลงไปบนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี electroblotting แล้วย้อมด้วยซีรัมของโคตัวอ่อน (fetal calf serum - FCS) ที่ปลอดพยาธิซึ่งใช้เป็น control และซีรัมของโคที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ตรวจพบในพยาธิในอุจจาระ (cattle-infected serum - CIS) (รูป

ที่ 89B, C; ตารางที่ 9) ตามวิธี immunoblotting ผลปรากฏว่าในแผ่นที่ใช้ control serum ไม่มีแถบโปรตีนที่แสดง antigenicity อยู่เลย ส่วนในแผ่น immunoblot โดยซีรัมของโรคติดเชื้อพยาธิ ปรากฏว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกันโดยใน lane WB มีแถบที่เป็นแอนติเจนอยู่ประมาณ 18 แถบ คือที่ MW 97, 86, 66, 64, 58, 54, 50, 47, 38, 35, 33, 28.5, 27, 26, 20, 19, 14.5 และ 11 kD โดยแถบที่เข้มมากที่สุดคือ MW 97, 58, 54 และ ส่วนที่เข้มพอประมาณคือแถบที่ MW 66, 50, 47, 33, 28.5 และ 26 kD ที่เหลือปรากฏเพียงบาง ๆ

เมื่อตรวจใน lane TA ปรากฏว่ามีแถบที่เป็นแอนติเจนอยู่ประมาณ 15 แถบคือที่ MW 97, 86, 66, 64, 58, 54, 47, 38, 35, 33, 28.5, 27, 19, 14.5 และ 11 kD โดยมีแถบที่เข้มและเห็นได้ชัดเจนคือแถบ 66, 58, 54, 47, 28.5, 14.5 และ 11 ส่วนใน lane ES มีแถบแอนติเจนอยู่ประมาณ 6-10 แถบ โดยแถบที่มีความเข้มมากที่สุดและปรากฏอยู่สม่ำเสมอ 2 แถบคือที่ MW 26-27 kD ส่วนแถบที่เข้มพอประมาณคือแถบ 28.5, 14.5 และ 11 kD ส่วนแถบที่ปรากฏกลาง ๆ คือแถบ 66, 64, 58, 54 และ 47 kD

2.1.2 การวิเคราะห์แอนติเจนของพยาธิระยะ metacercariae

เนื่องจากคุณสมบัติของเมตาเซอร์คาเรียเป็นสารประเภท mucoprotein และ glycoprotein ขนาดใหญ่ ซึ่งอาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์แถบแอนติเจนของเมตาเซอร์คาเรียได้ เพราะฉะนั้นเพื่อที่จะลดแถบของสารที่มาจากผนังเซลล์ดังกล่าว เราจึงได้ทำการย่อยผนังเซลล์ออก โดยการนำเมตาเซอร์คาเรียไปแช่ใน 1% pepsin และ 0.4% HCl ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 45 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำเมตาเซอร์คาเรียที่ย่อยผนังเซลล์ออกแล้วมาบดให้ละเอียด ใน lysis buffer (10mM Tris-HCl pH 7.2, 150mM NaCl, 0.5% Triton-X 100, 1mM EDTA, 10 mM PMSF) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไป sonicate ด้วย Microson Ultrasonic Cell Disrupter (ด้วย 50% output power) ที่ 4 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 นาที นำ crude extract ที่ได้ไปปั่นที่ 12000 rpm นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำแอนติเจนที่ละลายอยู่ในส่วน soluble ไปวัดปริมาณโปรตีนแล้วเก็บที่ -70°C ไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์ชนิดและคุณลักษณะของแอนติเจนจากเมตาเซอร์คาเรียด้วยวิธี SDS-PAGE และ Immuno-blotting (รูปที่ 89C, D และตารางที่ 9)

เราได้ทำการวิเคราะห์แอนติเจนของเมตาเซอร์คาเรีย โดยการนำแอนติเจนที่เตรียมไว้มาแยกใน 12.5% SDS-PAGE แล้วตรวจด้วยวิธี silver stain และ immunoblotting

การวิเคราะห์แผ่น SDS-PAGE ของโปรตีนจากเมตาเซอร์คาเรียที่ย้อมด้วย Silver stain พบว่าแอนติเจนของเมตาเซอร์คาเรียมีแถบโปรตีนที่สังเกตได้ประมาณ 24 แถบที่ MW 200, 150, 97, 86, 66, 58, 54, 52, 50, 49, 47, 43, 38, 37, 35, 33, 28.5, 27, 26, 24, 20, 19, 18 และ 14.5 kD โดยแถบที่มีความเข้มเป็นพิสัยคือ 200, 150, 35, และ 18 kD แถบที่เข้มพอประมาณคือ 86, 50, 49 ส่วนแถบที่เหลือปรากฏกลางๆ เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนเหล่านี้กับแถบโปรตีนในส่วน WB TA และ ES จากพยาธิตัวเต็มวัย

แล้ว พบว่าแถบโปรตีนที่มีเฉพาะในเมตาเซอรคาร์เรียคือที่ 200, 150, 52, 43, 37 และ 18 kD ซึ่งน่าจะเป็นโปรตีนที่มีการผลิตเฉพาะในระยะเมตาเซอรคาร์เรีย

หลังจากนั้นได้ทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่น SDS-PAGE ลงไปบนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี immunoblotting แล้วย้อมด้วยซีรัมของโคที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับตามวิธี immunoblotting ผลปรากฏว่าแอนติเจนของเมตาเซอรคาร์เรียมีแถบแอนติเจนอยู่ประมาณ 16 แถบ ที่ MW 200, 150, 86, 66, 58, 54, 52, 50, 49, 43, 38, 37, 35, 33, 26, 18 และ 14.5 kD โดยแถบที่มีความเข้มมากที่สุดคือแถบที่ MW 38 kD รองลงมาคือ 52, 49, 43, 37, 35 และ 33 kD ส่วนแถบแอนติเจนที่เหลือมีความเข้มค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบแถบแอนติเจนเหล่านี้กับแอนติเจนของพยาธิตัวเต็มวัยพบว่าแถบแอนติเจนที่พบในเมตาเซอรคาร์เรียแต่ไม่พบในตัวเต็มวัยคือ 200, 150, 52, 49, 43, 37 และ 18 kD ส่วนแอนติเจนที่มีปริมาณมากเป็นพิเศษเมื่อเทียบกับพยาธิตัวเต็มวัยคือที่ 38 kD

จากการศึกษาเปรียบเทียบแผ่น immunoblot ดังกล่าวแล้ว มีข้อสรุปดังนี้คือ

(1) แอนติเจนจากตัวพยาธิทั้งตัวในระยะเมตาเซอรคาร์เรียและระยะตัวเต็มวัยที่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในโคที่ติดเชื้อพยาธิมีจำนวนไม่น้อยกว่า 24 แถบ โดยมีแถบที่เป็นแอนติเจนหลักมี 18 แถบ คือ MW 97, 66, 58, 54, 52, 50, 49, 47, 43, 38, 37, 35, 33, 28.5, 27-26, 14.5, 11 kD

(2) แอนติเจนจากการสกัดผิวพยาธิตัวเต็มวัยด้วยสาร Triton X-100 ที่เด่นคือ MW 66, 58, 54, 47, 28.5, 14.5 และ 11 kD โดยที่แอนติเจนเหล่านี้จะมีกำเนิดมาจากชั้นผิวเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเมื่อตรวจดูพยาธิที่สกัดแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนปรากฏว่าสาร Triton X-100 สกัดชั้นผิวออกเกือบหมดและสกัดลึกลงไปถึงชั้น basal lamina ที่รองรับชั้นผิวเท่านั้นซึ่งไม่น่าจะมีโปรตีนได้ชั้นผิวที่ถูกสกัดออกมาด้วย

(3) แอนติเจนจากชั้นผิวที่ 68, 58, 54, 28.5, 14.5 kD มีการแสดงออกทั้งในระยะตัวเต็มวัยและตัวอ่อนเมตาเซอรคาร์เรียและในระยะตัวอ่อนที่กำลังพัฒนา โดยเฉพาะแอนติเจนที่ 66 และ 28.5 kD

(4) ES แอนติเจนมีแถบที่เป็นแอนติเจนหลักคือที่ MW 26 และ 27 kD ซึ่งน่าจะมาจากส่วนลึกของพยาธิ เช่น ลำไส้ และแอนติเจนที่มีปริมาณน้อยคือที่ MW 66, 64, 58, 54, 47, 28.5 และ 14.5 kD ซึ่งน่าจะเป็นแอนติเจนที่ถูกปล่อยออกมาสู่น้ำเลี้ยงจากชั้นผิว

(5) แอนติเจนในระยะเมตาเซอรคาร์เรียที่ไม่ปรากฏในระยะตัวเต็มวัยคือที่ 200, 150, 52, 49, 43, 37 และ 18 kD แอนติเจนในระยะเมตาเซอรคาร์เรียที่มีปริมาณมากและเด่นเป็นพิเศษ เมื่อเทียบกับระยะตัวเต็มวัยคือที่ 38 kD

Table 9 Molecular weight and staining intensity of proteins derived from adult and metacercarial stages of *Fasciola gigantica* as separated in 12.5% SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membrane and immunostained with infected cattle sera (CIS). WB = whole body antigens, TA = tegument antigens, ES = excretory-secretory antigens, ME = metacercarial antigens *** = high intensity, ** - moderate intensity, * = low intensity, 1 – shown by Coomassie Blue and Silver stains, 2 – shown by immunoblotting with CIS (cattle-infected serum)

MW (kD)	Bands of natural proteins ¹				Bands of immunogenic proteins ²			
	WB	TA	ES	ME	WB	TA	ES	ME
200				***				*
150				***				*
110	**							
97	**	**		*	***	**		
95	**							
86	*	*		**	*	*		*
66	***	***	*	*	**	***	*	*
64	**	**			*	**		
58	***	***	*	*	***	***	*	*
54	***	***	*	*	***	***	*	*
52				*				**
50	**			**	**			*
49	*			**				**
47	**	**	*	*	**	***	*	
43				*				**
38	**	**		*	*	*		***
37				*				**
35	**	**		***	*	*		**
33	***	*		*	**	*		**
28.5	**	**	*	*	**	**	**	*
27	*		***	*	*	*	***	
26	**		***	*	**		***	*
24	**			*				
22	**							
20	**			*	*			
19	*	*		*	*	*		
18				***				*
14.5	**	**	*	*	**	**	*	*
11	*		*		*	**	*	

2.1.3 การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody-MoAb) ต่อแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิ

เราได้ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อแอนติเจนหลายชนิดของพยาธิ (สรุปในตารางที่ 10) โดยใช้วิธี hybridoma เทคนิค ด้วยการ immunize หนู BALB/c ด้วย TA และ ES antigens แล้วนำเซลล์ lymphocytes จากม้ามของหนูมาหลอมรวมกับ myeloma cells (P3-K63-Ag8.653) แล้วทำการตรวจเบื้องต้นเพื่อหา clones ที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ด้วยวิธี ELISA screening MoAb ที่ได้จาก hybridoma clones เหล่านี้ได้ถูกทดสอบความจำเพาะต่อไปด้วยวิธี immunoblotting โดยทำการ blot TA หรือ ES กับ MoAb ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ MoAb clones ต่าง ๆ ต่อ TA และ ES แอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลชนิดต่าง ๆ (97, 66, 58, 54, 28.5, 27-26 kD) และการวิเคราะห์ isotype ของ MoAb ได้สรุปไว้ในตารางที่ 10 และรูปที่ 90 (A, B, C, D) นอกจากการใช้โปรตีนธรรมชาติที่เตรียมจาก TA และ ES เป็นแอนติเจนที่ฉีดในหนู BALB/c เพื่อผลิต MoAb แล้วเรายังได้ใช้ recombinant proteins คือ rFABP และ rGST ฉีดหนู BALB/c เพื่อผลิต MoAb ต่อ recombinant proteins ดังกล่าวด้วย ผลปรากฏว่าได้ MoAb ที่ทำปฏิกิริยากับ native FABP 2 แถบ (2 isotypes) และ native GST 1 แถบ (1 isotype) (สรุปในตารางที่ 10 และรูปที่ 92 และ 93) เราได้ทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามชนิด (cross reaction) ของ MoAb ดังกล่าวกับแอนติเจนที่ได้จากพยาธิชนิดอื่นคือ Schistosomes (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*), *Eurythema pancreaticum* และ *Paramphistomum* spp. โดยใช้วิธี immunoblotting และ ELISA ผลปรากฏว่า MoAb ต่อแอนติเจนชั้นผิว (TA) ที่ 66, 58, 54, 28.5 มีความจำเพาะต่อ *Fasciola* spp. มากโดยเกือบจะไม่มี cross reaction เลย (รูปที่ 91B; 94A) ส่วน MAB ต่อ rFABP และ rGST มี cross reaction กับแอนติเจนจาก Schistosomes แต่ไม่มีปฏิกิริยากับแอนติเจนจากพยาธิชนิดอื่นเลย (รูปที่ 92C) ส่วน MoAb ต่อ ES แอนติเจนที่ MW 27, 26 kD ซึ่งเป็นเอนไซม์ cysteine protease มี cross reaction กับแอนติเจนของพยาธิชนิดอื่นค่อนข้างสูง (รูปที่ 94B) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า MoAb ที่นำจะนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจสอบที่มีความจำเพาะสูงน่าจะเป็นกลุ่ม MoAb ต่อแอนติเจนจากชั้นผิว และต่อ FABP กับ GST ซึ่งมีความจำเพาะพอประมาณซึ่งน่าจะดีกว่า MoAb ต่อ ES แอนติเจนที่ 26-27 kD นอกจากการใช้แอนติเจนเดี่ยว ๆ แล้วน่าจะทดลองใช้แอนติเจนรวม เช่น ที่ 66, 28.5, rFABP และ rGST โดยเฉพาะการใช้วิธี immunoblot หรือ DOT Elisa เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะในเลือดของสัตว์ติดเชื้อหรือในทางกลับกันใช้ MoAb ต่อแอนติเจนดังกล่าวเพื่อตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะในเลือดของสัตว์ที่ติดเชื้อ ทั้งนี้เพื่อจะได้เป็นการควบคุมความแม่นยำภายใน (internal control) ของการตรวจสอบอีกด้วย ซึ่งก็จะได้ทำการทดลองต่อไป

Table 10 Monoclonal antibodies (MoAb) produced by immunizing BALB/c mice with excretory-secretory (ES) antigens, tegument antigens (TA), purified paramyosin (PM), recombinant FABP (rFABP), and recombinant glutathione-S-transferase (rGST). Left-hand column = clones of monoclonal antibodies; middle column = band of antigens with molecular weights in kD that reacted with specific MoAb; right-hand column = isotype of MoAb.

MoAbs	Specific antigen (MW in kD)	Isotypes of MoAbs
PM-2G8	97	IgM
TA-1C12	66	IgM
TA-2C3	66	IgM
TA-1H7	66	IgM
ES-2D10	58	IgM
ES-5D10	54	IgM
TA-6E9-1E	28.5	IgG1
ES-2D9/1	26	IgM
ES-4F5	27	IgE
RGST-3A3	28	IgG1
RFABP-6F3-2	14.5	IgG2A

- รูปที่ 89 A, C) การแยกเพื่อวิเคราะห์โปรตีนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิตัวเต็มวัย (A) และระยะเมตาเซอร์คาเรีย (C) ด้วย 12.5% SDS PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie blue (A) และ silver stain (C): STD – standard molecular weights; WB – whole body antigens; TA – tegument antigens; ES – excretory-secretory antigens; ME – metacercarial antigens
- B, D) ภาพ immunoblots ของแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย (B) และของระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ย้ายข้ามจาก SDS-PAGE ลงบนแผ่น nitrocellulose และย้อมด้วยเซรัมจากวัวติดเชื้อ (cattle-infected serum – CIS) และ fetal calf serum (FCS)
- รูปที่ 90 A-D) ภาพ immunoblot ของแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย (WB - whole body antigens; TA - tegument antigens; ES – excretory-secretory antigens) ที่ย้อมด้วย monoclonal antibodies (MoAb) จาก clones ต่าง ๆ ซึ่งแสดงปฏิกิริยาจำเพาะต่อ TA แอนติเจนที่ MW 66 kD (A) 58, 54 kD (B), 28.5 kD (C) และ ES แอนติเจนที่ 26, 27 kD (D)
- รูปที่ 91 A) ภาพ immunoblot ปฏิกิริยาของ MoAb จาก clone 6E9-1E ที่จำเพาะต่อ TA แอนติเจนที่ 28.5 kD แสดงแอนติเจนชนิดนี้ซึ่งมีอยู่ในปริมาณต่าง ๆ กันในส่วนต่าง ๆ ของพยาธิตัวเต็มวัย (WB, TA, ES) ในพยาธิอายุ 5 สัปดาห์ (JP) และพยาธิระยะ newly excysted juvenile (NEJ)
- B) ภาพ immunoblot แสดงปฏิกิริยาข้ามชนิด (cross reaction) ของ MoAb 6E9-1E จำเพาะต่อ TA แอนติเจนที่ MW 28.5 kD ของ *Fasciola gigantica* (Fg) กับ WB แอนติเจนจากพยาธิชนิดอื่น คือ Sm – *Schistosoma mansoni*; Eu – *Eurythema pancreaticum*; Pa – *Paramphistomum* spp.; CF – culture fluid; MoAb – 6E9-1E
- รูปที่ 92 A, B) ภาพ immunoblot ของแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิตัวเต็มวัย (WB, TA, ES) ที่ย้อมด้วย culture fluid (CF) normal mouse serum (NMS) cattle-infected serum (CIS) polyclonal antibody ต่อ FABP (PoAb) และ MoAb ต่อ FABP (clone 6F3-2) (B) SD – standard molecular weights
- C) ภาพ immunoblot แสดงปฏิกิริยาข้ามชนิด (cross reactions) ของ MoAb ต่อ rFABP (6F3-2) กับ WB แอนติเจนจาก *Fasciola gigantica* (FG) *Schistosoma mansoni* (SM) *Eurythema pancreaticum* (EP) และ *Paramphistomum* spp (PA)
- รูปที่ 93 A, B) ภาพ immunoblot ของแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิตัวเต็มวัย (WB, TA, ES) ที่ย้อมด้วย culture fluid (CF), normal mouse serum (NMS), cattle-infected serum (CIS), polyclonal antibody ต่อ recombinant GST (PoAb) และ MoAb ต่อ rGST (3A3)
- C) ภาพ immunoblot แสดงปฏิกิริยาข้ามชนิด (cross reaction) ของ MoAb ต่อ rGST (3A3) กับแอนติเจนจาก *Fasciola gigantica* (Fg), *Schistosoma japonicum* (Sj), *Schistosoma mansoni* (Sm), *Eurythema pancreaticum* (Ep) และ *Paramphistomum* spp (Pa)

รูปที่ 94 ภาพแสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามชนิดโดยวิธี ELISA ของ MoAb (clone TA 1C12) ต่อ TA แอนติเจนที่ MW 66 kD (ภาพ A) และ MoAb (clone 2D9-1) ต่อ ES แอนติเจนที่ MW 27 kD ต่อแอนติเจนจาก ES และ ST (surface-tegument antigen =TA) ของ *Fasciola gigantica*, และ WB antigens จาก Rumen fluke (*Paramphistomum* spp - RF); *Schistosoma spindale* (S-sp); *Schistosoma mansoni* (S-man) และ *Schistosoma mekongi* (S-mek)

Figure 89

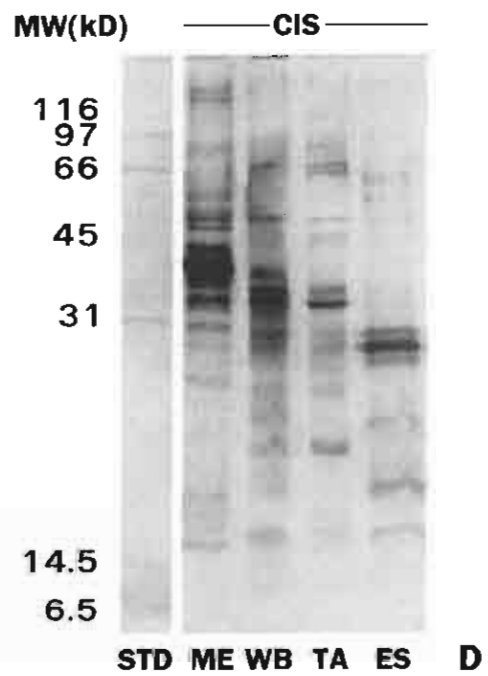
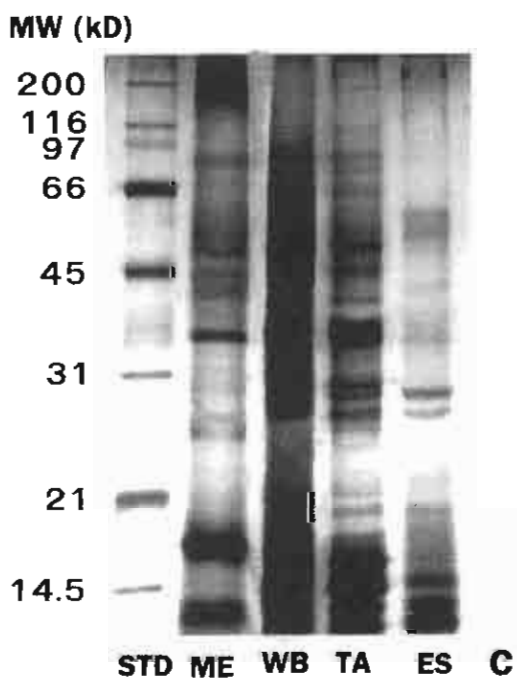
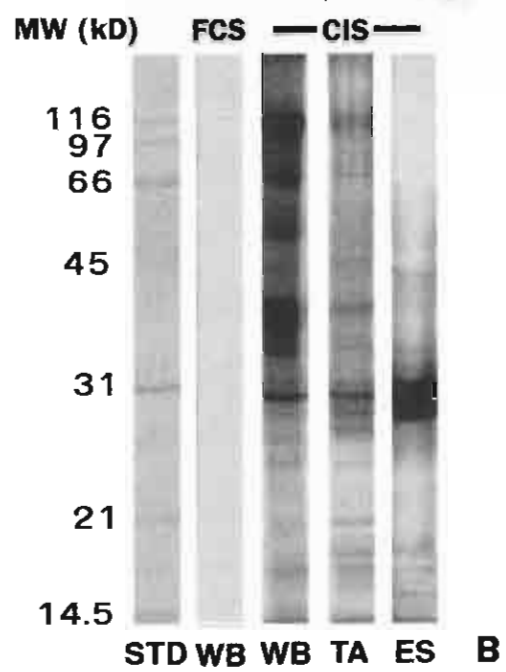
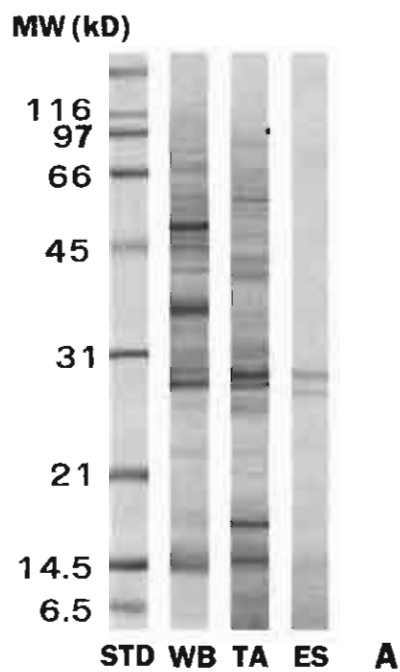


Figure 90

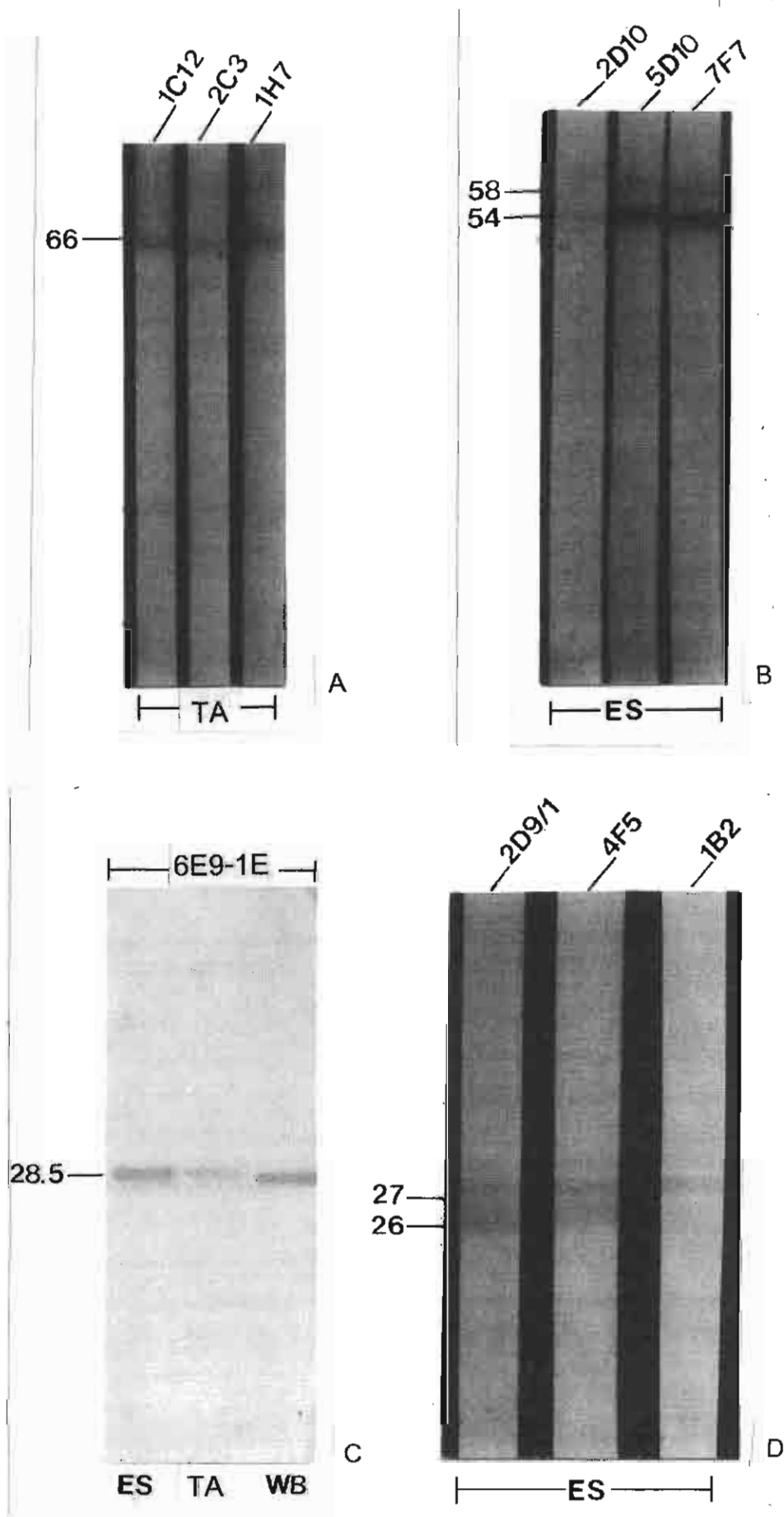


Figure 91

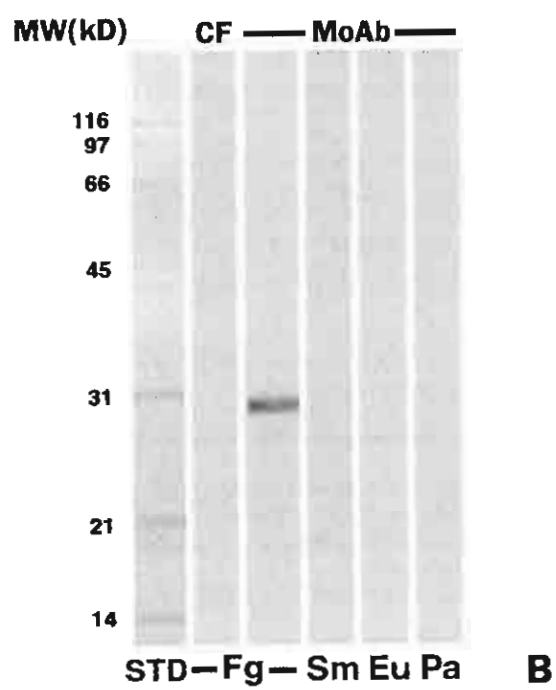
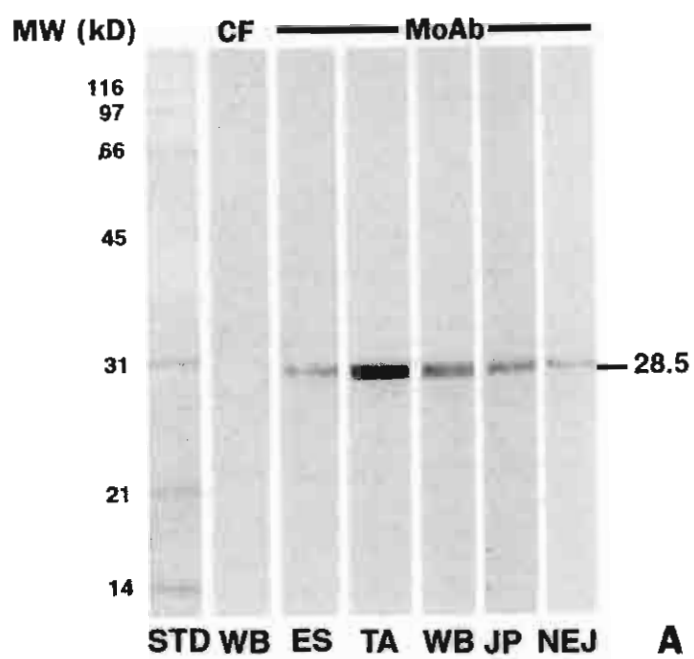


Figure 92

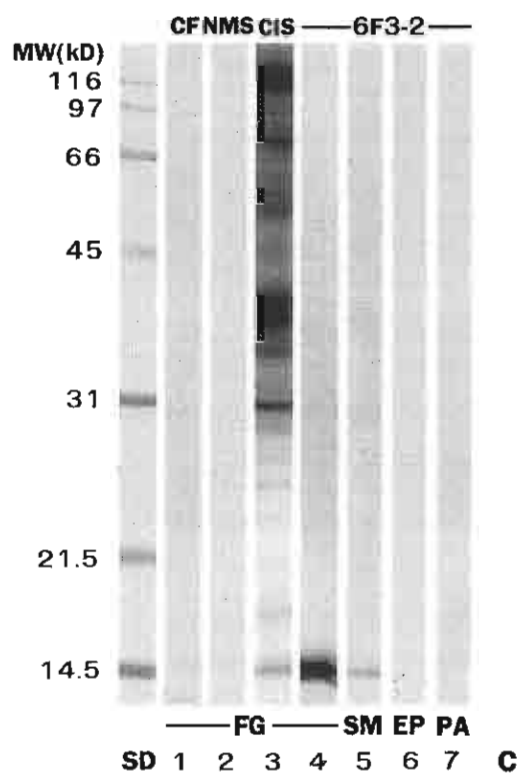
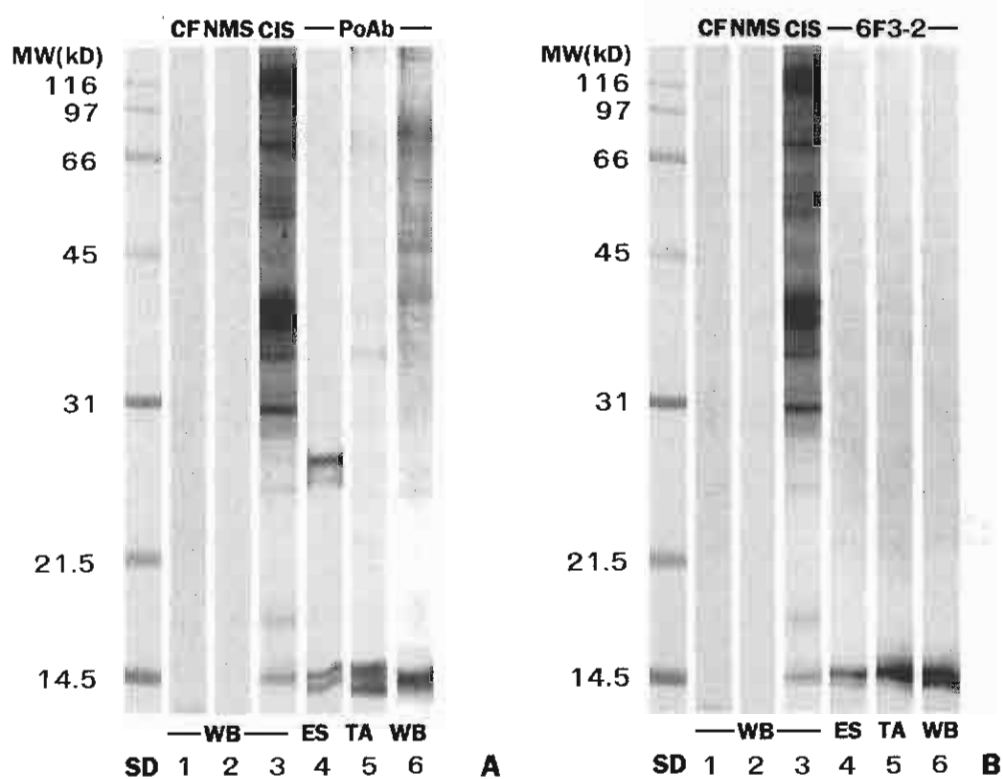


Figure 93

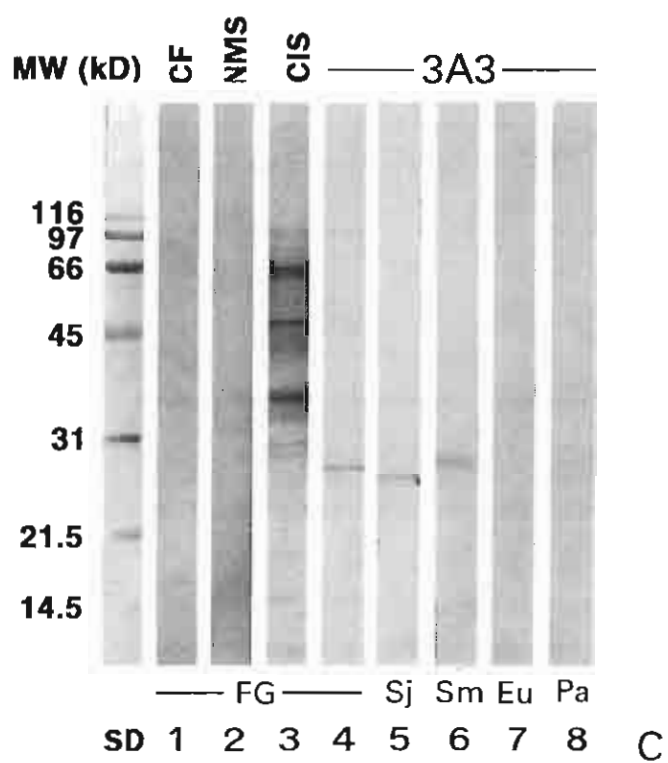
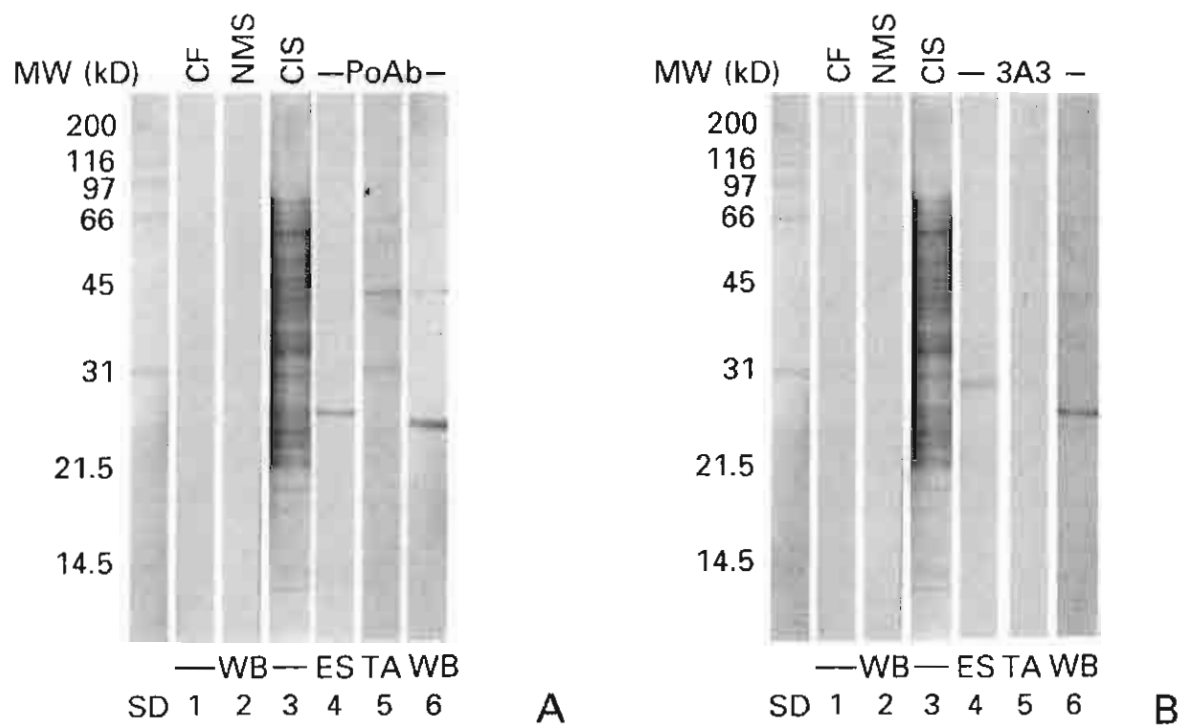
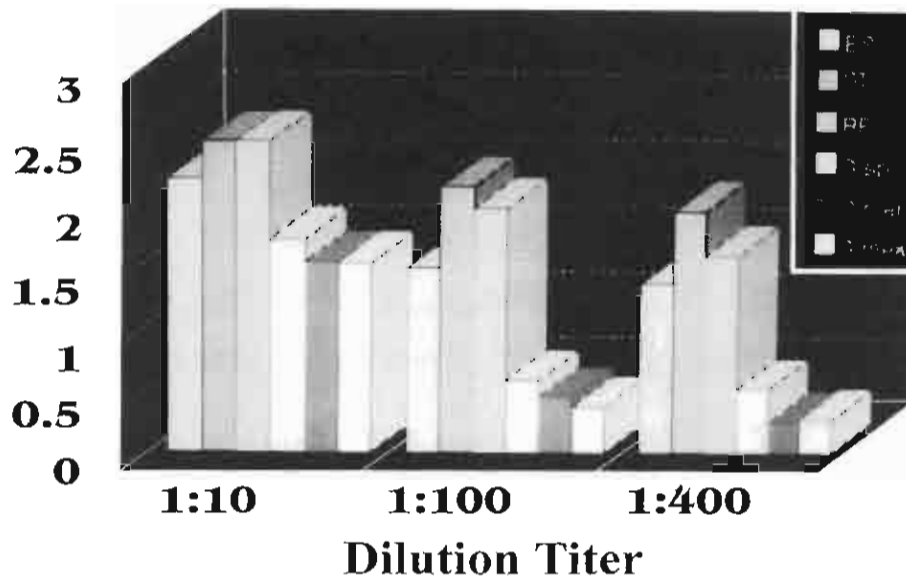


Figure 94

MoAb/ST 1C12

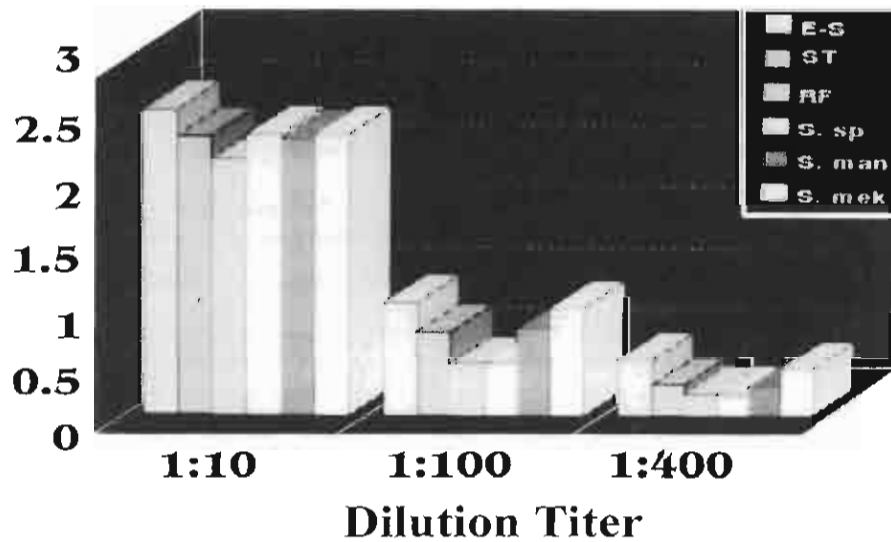
Optional Density



A

MoAb/ES 2D9/1

Optional Density



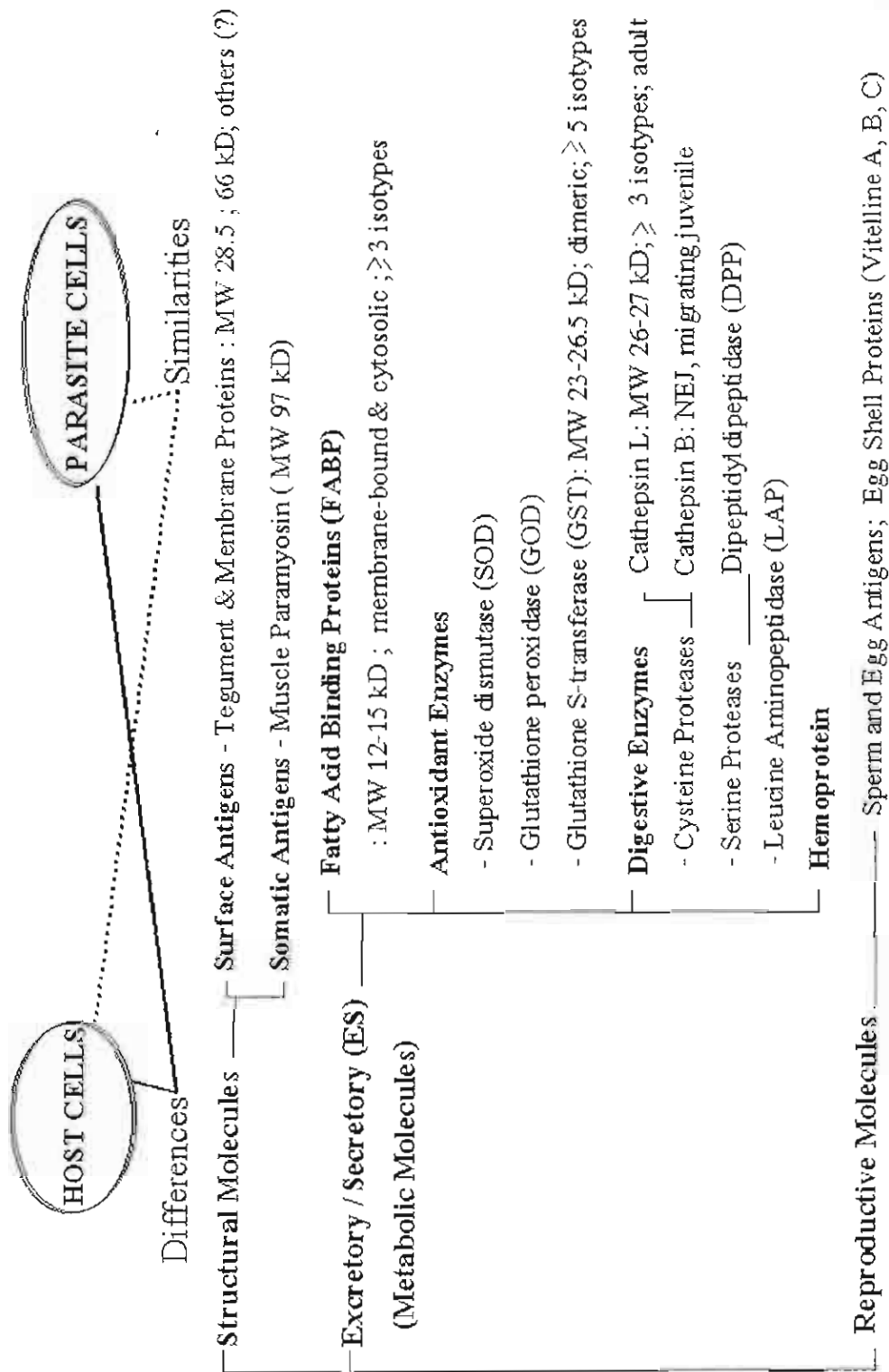
B

2.2 การวิเคราะห์ตำแหน่งและการกระจายของแอนติเจนในเนื้อเยื่อพยาธิ

จากการวิเคราะห์ในข้อ 2.1 และการสืบค้นข้อมูลจากรายงานการวิจัยอื่น ๆ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับพยาธิ *Fasciola hepatica* ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Fasciola gigantica* มากที่สุดพบว่าแอนติเจนที่เป็นแอนติเจนหลัก ซึ่งน่าจะใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจสอบและพัฒนาเป็นวัคซีนได้มีอยู่ 3 กลุ่ม (สรุปในตารางที่ 11) คือ (1) กลุ่มโปรตีนโครงสร้างได้แก่ paramyosin ของชั้นกล้ามเนื้อที่มี MW 97 kD ซึ่งเป็นแอนติเจนที่เด่นมากชนิดหนึ่งในกลุ่ม whole body antigens (WB) กับโปรตีนของชั้นผิวและเยื่อหุ้มลำตัว MW 66, 58, 54 และ 28.5 kD และ (2) โปรตีนที่เป็นตัวนำ (carrier) หรือเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเมตาบอลิซึม โดยเฉพาะกลุ่ม fatty acid binding proteins (FABP), กลุ่ม antioxidant enzymes เช่น GST และเอนไซม์ proteases จากลำไส้ที่พยาธิระยะ newly excysted juvenile และ ระยะตัวอ่อนปล่อยออกมาย่อยสลายเนื้อเยื่อของโฮสต์เพื่อใช้ในการไผ่ผ่านเข้าไปในเนื้อตับ และเอนไซม์ที่พยาธิตัวเต็มวัยปล่อยออกมาย่อยสลายสารอาหารคือ Cysteine protease (cathepsin L และ B) ที่ MW 27 และ 26 kD 3) โปรตีนจากเซลล์ของระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะโปรตีนจากเปลือกไข่ เช่น vitelline B ดังนั้นเราจึงได้ทำการผลิตทั้งโพลีโคลนัลและโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อแอนติเจนหลักเหล่านี้ แล้วนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาเป็น probes ข้อมหาดำเนินการกระจายและการสร้างแอนติเจนเหล่านี้ที่ระดับเซลล์ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพยาธิโดยวิธี immunoperoxidase และ immunofluorescence เพื่อตรวจดูที่ระดับจุลทรรศน์ธรรมดา ซึ่งมีขั้นตอนสั้น ๆ ดังนี้ นำพยาธิตัวเต็มวัย ตัวอ่อนกำลังพัฒนา (developing juvenile - DJ) ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (ME) และ/หรือ ระยะ newly excysted juvenile (NEJ) ไปแช่ในสาร fixative 2% paraformaldehyde แล้วใส่ใน microwave oven 90 วินาที ตัด cross sections ของพยาธิที่ระดับต่าง ๆ ใน cryostat แล้วนำ sections ที่มีความหนาประมาณ 5-10 μm มาข้อมหาดำเนินการกระจายของแอนติเจนชนิดต่าง ๆ โดยการใช้วิธี immunoperoxidase หรือวิธี immunofluorescence Sections ของพยาธิที่ตัดมาจากตัวเต็มวัยมาจาก 5 ระดับ คือระดับ oral sucker, uterus, ovary, testis และระดับหางซึ่งมี vitellaria Sections เหล่านี้รวมทั้งจากตัวอ่อนกำลังพัฒนาและจากระยะเมตาเซอร์คาเรียถูกนำมาข้อมตามลำดับด้วยโมโนโคลนัล (MoAb) หรือ โพลีโคลนัล (PoAb) แอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดต่าง ๆ (สรุปในตารางที่ 12) ตามด้วย biotinylated rabbit anti-mouse IgG, streptavidin-horse radish peroxidase (HRP) แล้วแช่ในสารละลาย 3, 3' diaminobenzidine และ H_2O_2 เพื่อให้เกิดตะกอนสีในบริเวณที่มีแอนติเจนกระจายอยู่แล้วตรวจดูด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา หรือข้อมด้วย rabbit anti-mouse IgG-FITC แล้วตรวจดูด้วยกล้อง fluorescence ส่วนในกลุ่ม negative control 2 กลุ่มใช้ normal mouse serum หรือ phosphate buffer แทนที่ primary antibody และ positive control ใช้ serum ของวัวที่ติดเชื้อพยาธิตามธรรมชาติ (CIS) เป็นตัวข้อม

Table 11 Strategic target molecules in *fasciola* susceptible to

immunological intervention



2.2.1 การตรวจแหล่งสร้างและการกระจายของแอนติเจนในเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยโดยใช้ซีรัมจากวัวที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ (Cattle immune serum – CIS)

จากการตรวจหาแหล่งสร้างและแหล่งสะสมของแอนติเจนภายในเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยโดยใช้ CIS ด้วยวิธี immunofluorescence และ immunoperoxidase พบว่าเนื้อเยื่อที่มีปริมาณแอนติเจนสูงคือ (1) ชั้นผิว (tegument) โดยเฉพาะที่ขอบนอกและในกิ่งไซโตพลาสซึมของเซลล์ชั้นผิว (tegumental cells) ที่เชื่อมกับชั้นผิว และในไซโตพลาสซึมรอบ ๆ นิวเคลียสของเซลล์ชั้นผิว (รูปที่ 95A, B) (2) ชั้นบุผิวทางเดินอาหารส่วนต้นที่มีลักษณะแบบเดียวกับชั้นผิว (tegumental-type epithelium) ตั้งแต่ระดับ oral sucker, pharynx จนถึง จุดเชื่อมกับลำไส้ (caecal bifurcation) และชั้นบุผิวที่คลุมท่อสืบพันธุ์ (genital canal) (รูปที่ 96A, B; 96D) (3) เซลล์บุผิวลำไส้ (caecal epithelium) โดยเฉพาะที่ขอบบนของไซโตพลาสซึมของเซลล์บุผิวและภายในช่องของลำไส้ (รูปที่ 95C, D) (4) เนื้อเยื่อสืบพันธุ์โดยเฉพาะในเซลล์ของรังไข่ "ไข่" oocytes ระยะต่าง ๆ ในเปลือกของไข่ที่พัฒนาเต็มที่แล้ว (รูปที่ 96C) จากผิวของ uterine epithelium (รูปที่ 96D) และเซลล์ของ Mehlis' gland ส่วนในต่อมอันทะมีแอนติเจนปริมาณน้อยของเซลล์สืบพันธุ์ชั้นปลาย ได้แก่ เซลล์อสุจิ (5) กลุ่มเซลล์พาราเนไคมา (parenchyma cells) ที่อัดอยู่ระหว่างอวัยวะต่างๆ ซึ่งมีแอนติเจนอยู่พอประมาณ (รูปที่ 96D)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในสภาพการติดเชื้อตามธรรมชาติพยาธิปลัทยแอนติเจนจากเนื้อเยื่ออย่างน้อยจาก 5 แหล่ง ทั้งที่เป็นโมเลกุลโครงสร้างและโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของพยาธิเข้าสู่เนื้อของโฮสต์ ซึ่งสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะแอนติบอดีในตัวของโฮสต์ได้ (ตารางที่ 12)

Table 12 Immunofluorescence and immunoperoxidase stainings indicating the distribution of specific antigens in various tissues of adults *P. gigantica* by using various antibodies as probes: infected sera (CIS-infected cow serum, MIS-infected mouse serum); polyclonal antibodies (PoAb) against Cathepsin L (Cat L), Fatty acid binding protein (FABP), Glutathione-S- transferase (GST); monoclonal antibodies (MoAb) against *P. Gigantica* antigens at 26, 28.5, 66 and 97 kD (paranyosin), recombinant FABP (rFABP), and recombinant GST (rGST); negative control used FCS-fetal calf serum and NIS-non-immune rabbit serum.

Antibodies	Tegument	Teg cells	Subteg muscle	Ventral sucker	Oral sucker	Pharynx	Ceacal bifurcation	Caecum	Bladder	Testis	Prostate gland	Seminal vesicle	Genital pore	Uterus & Eggs	Mehlis' gland	Parental chymal cells
FCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIS-r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MIS	+++	+	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	++	++	+	+
CIS	+++	++	-	+	++	++	++	+++	++	++	+	+	++	++	+	+
PoAb																
CatL-Fg	++	-	-	+	+	+	++	+++	-	-	-	-	-	++	+	-
CatL-Fh	++	-	-	+	+	+	++	+++	-	-	-	-	-	++	+	-
FABP-Fg	++ (outer)	+	-	+	+	+	+	++	+	+	+	+	-	+	+	+++
FABP-Fh	++ (outer)	+	-	+	+	+	+	++	+	+	+	+	-	+	+	+++
GST-Fg	++ (& spine)	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+++	++	+
MoAb-Fg																
rFABP (6F3-2)	+	+	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	-	+	+	+++
rGST (3A3)	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+++
26-27 kD (4F5)	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+	-
28.5 kD (2D9-2)	+++	+++	-	++	++	++	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-
66 kD (1C12)	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
97 kD (2G8-3)	+	+	+++ (mu)	+++ (mu)	+++ (mu)	+++ (mu)	++ (mu)	++ (mu)	++ (mu)	+	+	+	+	+	+	+

รูปที่ 95 Sections ที่ย้อมด้วย cattle-infected serum (CIS) แสดงการเรืองแสงที่ A) เยื่อ cacum (Ca) และ tegument (Te) B) tegument (Te) และ tegument cells (Tc) C,D) caecum ขยายใหญ่แสดงการเรืองแสงที่ขอบบนของเซลล์ผิวหนัง mu – muscle, Sp – spine, Bl – bladder, Pc parenchyma, Cep – caecal epithelium

รูปที่ 96 Sections ที่ย้อมด้วย CIS แสดงการเรืองแสงที่ A) เยื่อ oral sucker (Os) และชั้นผิวหนัง (Te) B) เยื่อ (Ep) ของ pharynx (Ph) C) เซลล์ใน ovary (Ov) D) เยื่อของท่อ uterus (Ut) ซึ่งมีไข่ (Eg), ชั้นผิวหนัง (Te), เซลล์ผิวหนัง (Tc) และ parenchyma (Pc) ก็เรืองแสงด้วย

Figure 95

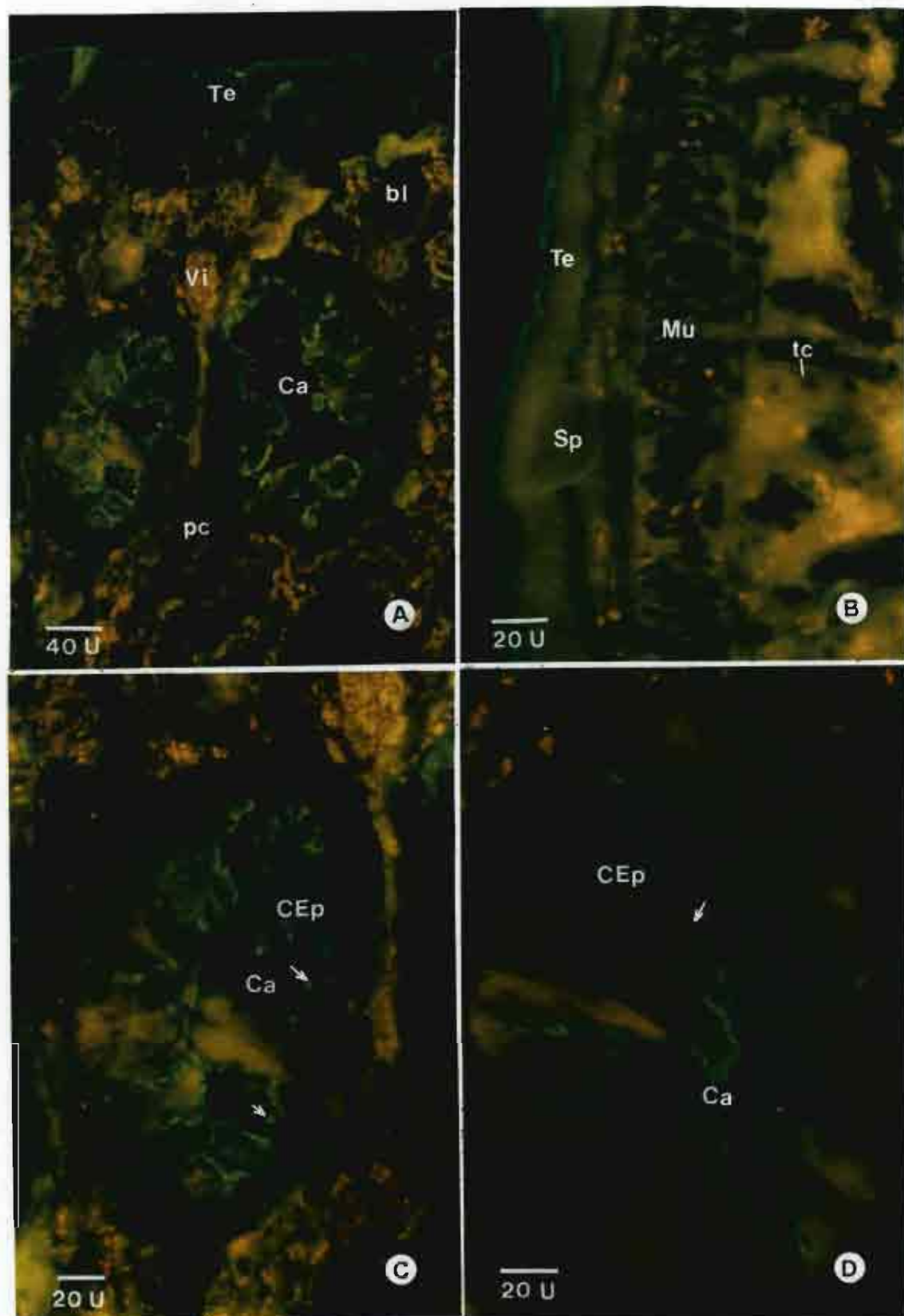
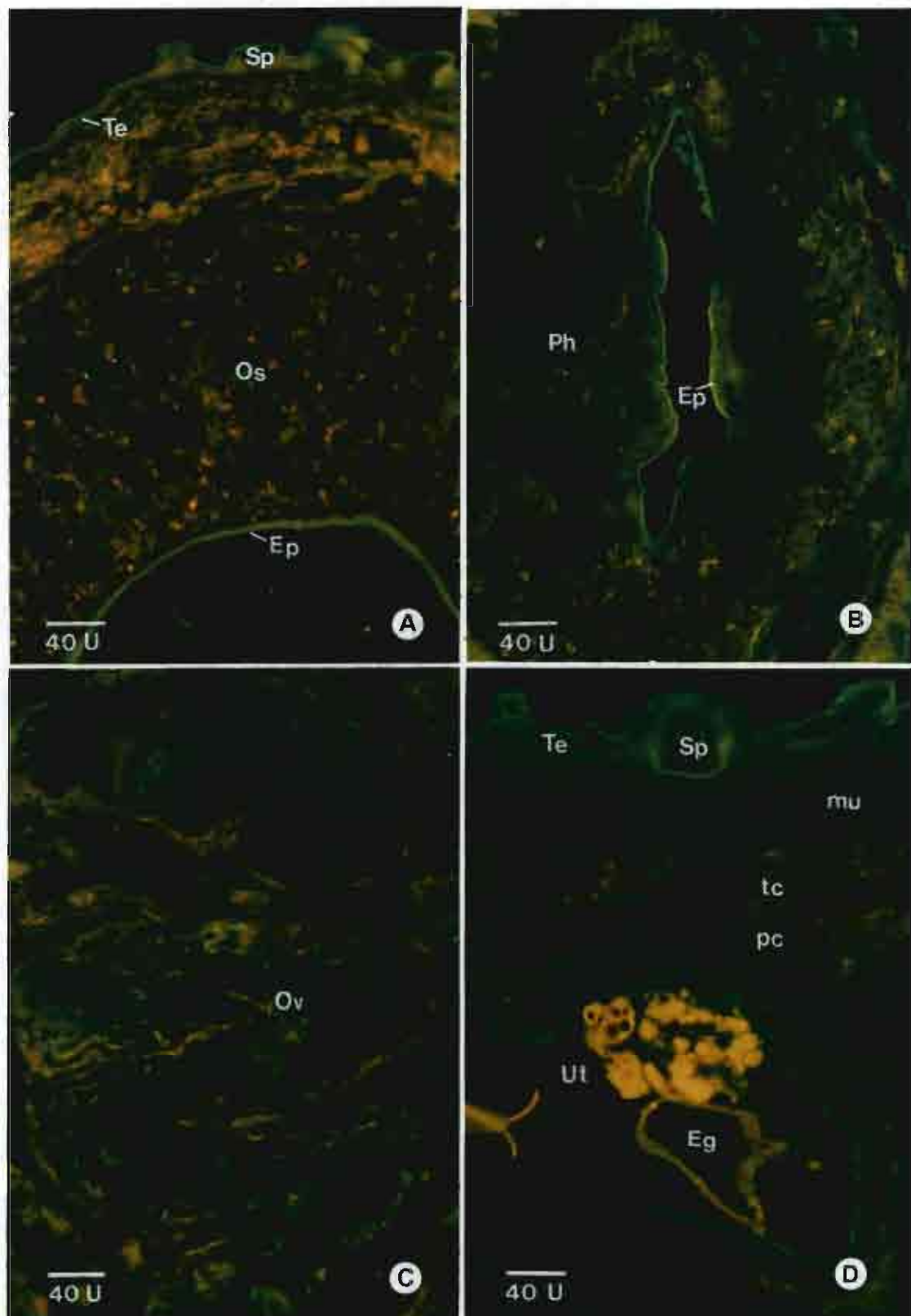


Figure 96



2. 2.2 ตำแหน่งและการกระจายของ paramyosin

พยาธิตัวเต็มวัย

ผลปรากฏว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี immunoperoxidase ในกลุ่มทดลองที่ใช้ MoAb ต่อ paramyosin (clone 2G8) ที่ dilution 1:50 มีตะกอนสีเข้มติดอยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อวงแหวน (circular muscle) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อชั้นนอกที่รองรับชั้นผิว (tegument) และเซลล์กล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อชั้นใน (รูปที่ 97C, D, E) ใน sections ที่ย้อมด้วย MoAb ที่เจือจางกว่า (1:100) สีภายในเซลล์กล้ามเนื้อค่อนข้างจะจางกว่าสีที่อยู่ตามขอบของเซลล์ (รูปที่ 97C) ซึ่งแสดงว่าอาจมีพาราไมโอซินอยู่ใกล้หรือติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ในปริมาณมากกว่าที่ส่วนกลางของเซลล์ ความเข้มของสีในกล้ามเนื้อแต่ละส่วนก็มีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปสีจะเข้มในชั้นกล้ามเนื้อที่รองรับ tegument และเซลล์กล้ามเนื้อตามขอบบนของ oral sucker (รูปที่ 97B, C) แต่สีจะจางกว่าในเซลล์กล้ามเนื้อส่วนในของ oral sucker โดยเฉพาะที่อยู่ลึกเข้าไปจากชั้นผิวที่เคลือบ oral sucker (รูปที่ 97B) และเซลล์กล้ามเนื้อที่พาดผ่านลำตัวของพยาธิก็ติดสีจางกว่าชั้น circular และ longitudinal muscles เช่นกัน (รูปที่ 97B)

ในชั้นผิว (tegument) ไม่มีโครงสร้างใดติดสีเลยยกเว้นแถบบาง ๆ ใต้ชั้นเยื่อหุ้มผิว (surface membrane) ซึ่งแถบนี้อาจจะตรงกับชั้น surface lamina บาง ๆ ที่สังเกตได้ในจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM ซึ่งเป็นชั้นรองรับ surface membrane (รูปที่ 97C, E)

ในลำไส้ (caecum) ก็ไม่มีโครงสร้างใดติดสีเลยยกเว้นแถบบาง ๆ ใต้ชั้น apical membrane ของเยื่อบุผิวลำไส้ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับ surface lamina ใต้ชั้นบุผิว และชั้น basement membrane ก็ติดสีจาง ๆ ด้วย

จากการย้อม sections ที่ระดับต่าง ๆ ทำให้สรุปได้ว่าไม่มีการติดสีเลยใน vitellaria, ovary (รูปที่ 97D,E) และ testis แต่จะมีสีติดอยู่บ้างที่ผนังของ uterus ซึ่งอาจจะมีพาราไมโอซินอยู่ในเซลล์ชั้นบุผิวของท่อ uterus

การย้อมด้วยวิธี immunofluorescence โดยใช้ MoAb ตามด้วย antimouse IgG-FITC แล้วตรวจดูในกล้อง fluorescence ก็ให้ผลคล้ายคลึงกับวิธี immunoperoxidase และได้เน้นให้เห็น fluorescence เข้มมากที่เซลล์กล้ามเนื้อได้ผิวทั้งสองชั้นและ เซลล์กล้ามเนื้อพาดกลางลำตัวซึ่งมีขนาดใหญ่ (รูปที่ 98A, C) ส่วนเซลล์กล้ามเนื้อขนาดเล็กที่เรียงตัวเป็นแนวรองรับอวัยวะภายใน เช่น caecum, uterus, testis และ seminal vesicle แสดง fluorescence ค่อนข้างต่ำ (รูปที่ 98B, 99A-D) ในขณะที่ส่วนเซลล์บุผิว caecum และชั้นผิวไม่ติดสีเลย ในขณะที่ vitellaria แสดง non-specific fluorescence สีส้ม (รูปที่ 99D)

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่ามีเซลล์กล้ามเนื้อที่มี paramyosin มีอยู่ 2 แบบ คือ เซลล์ขนาดใหญ่และยาวที่อยู่ในชั้นกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชั้น ที่เป็น longitudinal และ circular muscles ที่รองรับชั้นผิวและเซลล์กล้ามเนื้อที่พาดผ่านลำตัวพยาธิ ส่วนเซลล์กล้ามเนื้อขนาดกลางรองรับเยื่อบุผิวลำไส้ และเซลล์กล้ามเนื้อที่อยู่

รอบ ๆ ท่อของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ testis, seminal vesicles และ uterus เป็นเซลล์กล้ามเนื้อบาง ๆ ชั้นเดียวที่ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างเรียวยาว ขนาดเล็กและสั้นเรียงตัวเป็นริ้วขนานกัน (รูปที่ 99A-D)

เมตาเซอร์คาเรีย

ผลปรากฏว่าทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ข้อมด้วยวิธี immunoperoxidase มีสีน้ำตาลติดเข้มมากที่ถุงหุ้ม metacercaria ชั้นนอก (outer cyst wall) ซึ่งมีลักษณะหุ้มคล้ายฟองน้ำ การติดสีที่ชั้นนี้จึงน่าจะเป็นแบบ non specific เนื่องจากในกลุ่มควบคุมก็มีการติดสีของชั้นนี้ค่อนข้างเข้มเกือบเท่ากับในกลุ่มทดลอง (รูปที่ 100A) สาเหตุอาจจะเนื่องจากมีสาร mucoprotein เป็นส่วนประกอบหลักของ cyst wall ชั้นนอกซึ่งเป็นสารที่มีประจุลบสูง จึงอาจดึงดูดและเกาะกับ secondary antibody แบบ non specific absorption ได้ดี

ส่วนผนังของ cyst ชั้นใน (inner cyst wall) ซึ่งบางกว่าและมีสามชั้นย่อยกล่าวคือชั้นกลางประกอบด้วย connective tissues และ fibromuscular tissue ที่ถูกเคลือบทั้งสองด้านด้วยเยื่อหุ้มบาง ๆ มีเฉพาะส่วน fibromuscular tissue เท่านั้นที่ติดสีน้ำตาลซึ่งแสดงว่าในชั้นนี้ของ inner cyst wall อาจมี myoid cells ที่มีพาราไมโอซินกระจายอยู่ (รูปที่ 100B, C)

ส่วนในตัว metacercaria เองนั้น มีแนวสีน้ำตาลเข้มปรากฏชัดอยู่ได้ชั้นผิว แนวดังกล่าวอาจเป็นชั้นเซลล์กล้ามเนื้อที่กำลังพัฒนาและยังไม่เรียงตัวเป็น circular และ longitudinal muscle อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับในไส้เดือนฝอย นอกจากนั้นแล้วมีเซลล์บางกลุ่มในส่วนกลางของตัวเมตาเซอร์คาเรียก็ติดสีเข้ม ในขณะที่เซลล์ส่วนมากไม่ติดสี เซลล์กลุ่มนี้อาจจะเป็นเซลล์ myoblast ที่กำลังพัฒนาไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อพาดกลางลำตัวของเมตาเซอร์คาเรีย (รูปที่ 100B, C)

การข้อมด้วยกรรมวิธี immunofluorescence ก็ให้ผลคล้ายคลึงกันกล่าวคือ outer cyst wall แสดง fluorescence ที่ nonspecific ในขณะที่ specific fluorescence ปรากฏ เป็นแถบเข้มแคบ ๆ ในชั้น inner cyst wall และในชั้นกล้ามเนื้อใต้ผิวของตัวเมตาเซอร์คาเรีย ทั้งที่อยู่ใน cyst และที่หลุดออกมาจาก cyst แล้ว

รูปที่ 97 Paraffin sections ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย immunoperoxidase แสดงการกระจายของพาราไมโอซิน

(A) กลุ่มควบคุมซึ่ง primary antibody (MoAb-paramyosin) ถูกแทนที่ด้วย normal serum

(B-E) กลุ่มทดลองที่ย้อมด้วย MoAb ต่อพาราไมโอซิน (clone 2G8) ซึ่งประกอบด้วย sections จากกระดับ oral sucker (B, C) และจากกระดับ uterus (D, E) แสดงการติดสีเข้มในชั้นกล้ามเนื้อได้ผิวหนัง (Cmu, Lmu) และกล้ามเนื้อพาดกลางลำตัว (Vmu) ไข่ (Eg) และท่ออสุจิ (Va) ไม่ติดสี 1 แก้ว (Te) กล้ามเนื้อเฉพาะแถบแคบ ๆ (ลูกศร) ที่อยู่ใต้ชั้นเยื่อหุ้ม

รูปที่ 98 A-C) Frozen sections ของพยาธิตัวเต็มวัยย้อมด้วยวิธี immunofluorescence primary antibody คือ MoAb-paramyosin และ secondary antibody คือ rabbit antimouse IgG-FITC แสดง fluorescence เข้มในชั้นกล้ามเนื้อได้ชั้นผิว (Cmu, Lmu) กล้ามเนื้อพาดกลางลำตัว (Vmu) และกล้ามเนื้อบาง ๆ รอบ ๆ caecum (Emu) เซลล์ Vitellaria (Vi) แสดง non-specific fluorescence ต้ม ca = caecum, te = tegument

รูปที่ 99 A-D Frozen sections ส่วนหน้าของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ paramyosin จาก clone 2G8 แสดงเซลล์กล้ามเนื้อรอบ ๆ caecum (Ca), testis (Ti) seminal vesicle (se) และ uterus (Ut) ซึ่งมีลักษณะและขนาดเรียงตัวขนานกัน (ลูกศร)

รูปที่ 100 Sections ของตัวอ่อน metacercaria ที่ย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ paramyosin จาก clone 2G8 โดยวิธี immunoperoxidase

A) กลุ่มควบคุมแสดงชั้นนอกของ cyst wall (Cw₁) ติดสีจาง ๆ ส่วนชั้นในของ cyst wall (Cw₂) และในตัวอ่อน (Me) ไม่ติดสีเลย

B, C) กลุ่มทดลองแสดงการติดสีเข้มในชั้นกลางของ cyst wall ชั้นที่ 4 (Cw₄-ลูกศร) ในชั้นแถบ ๆ ได้ชั้นผิว (Mu) และในส่วนกลางของลำตัว (Vmu)

Figure 97

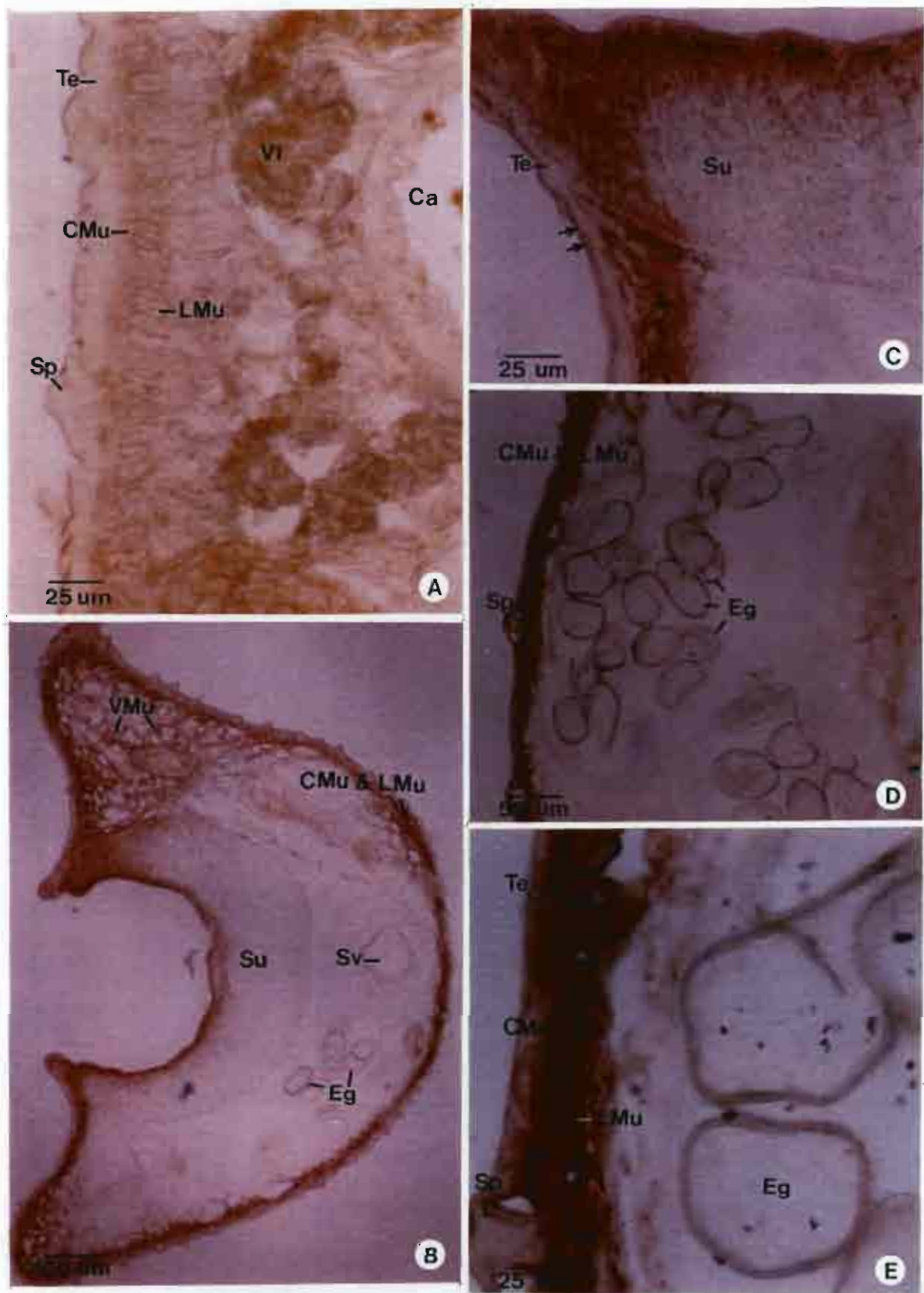


Figure 98

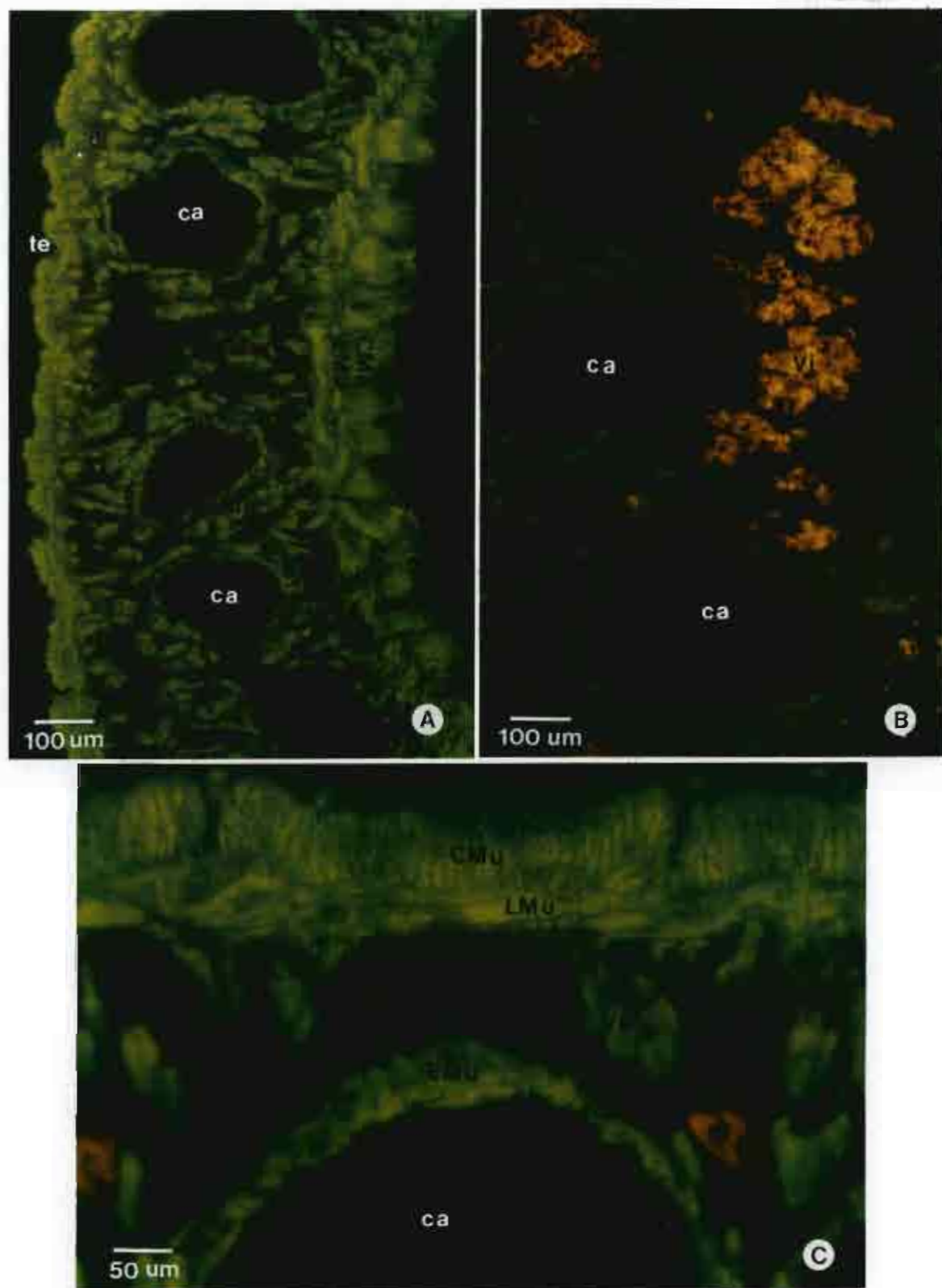


Figure 99

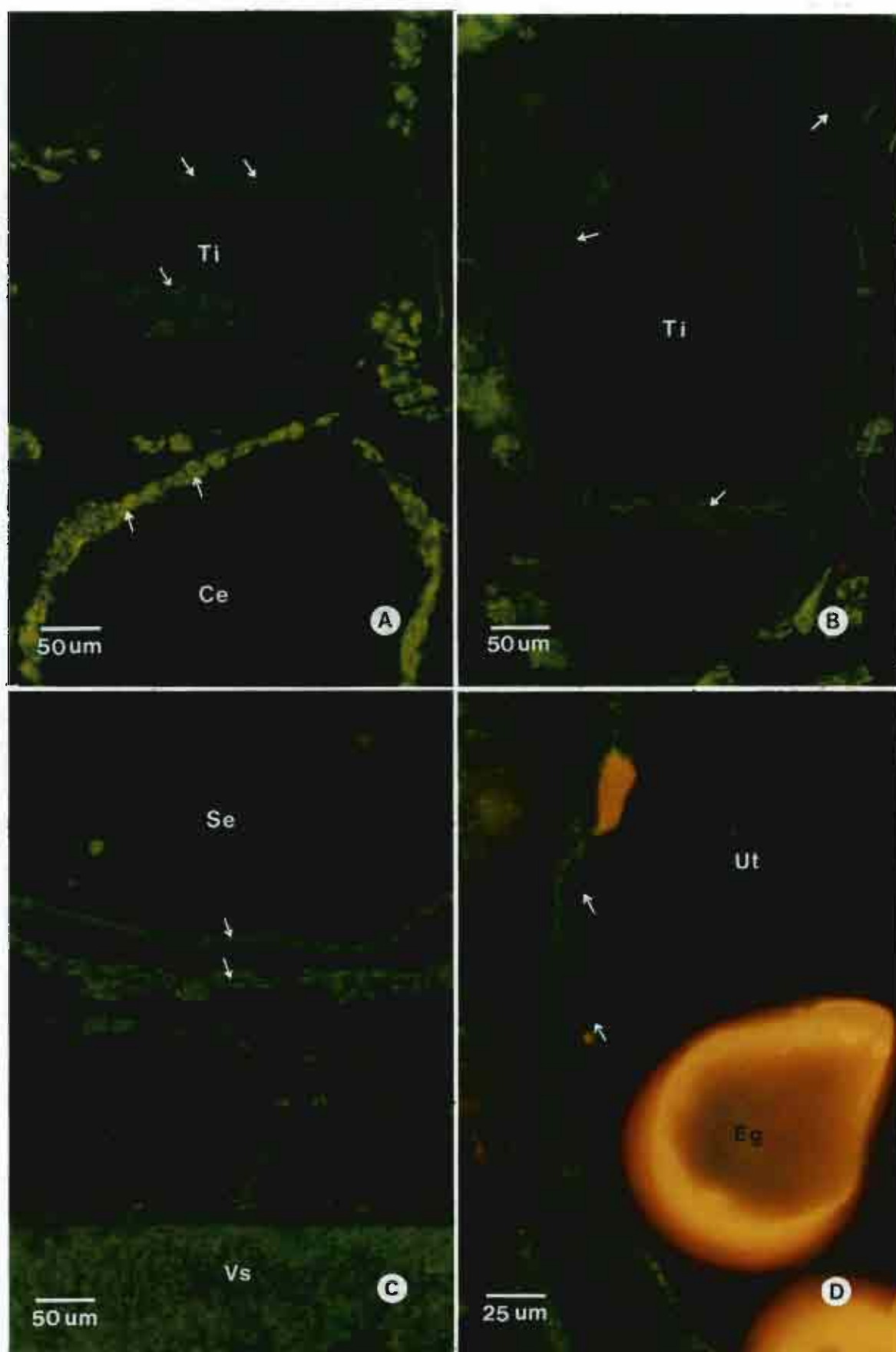
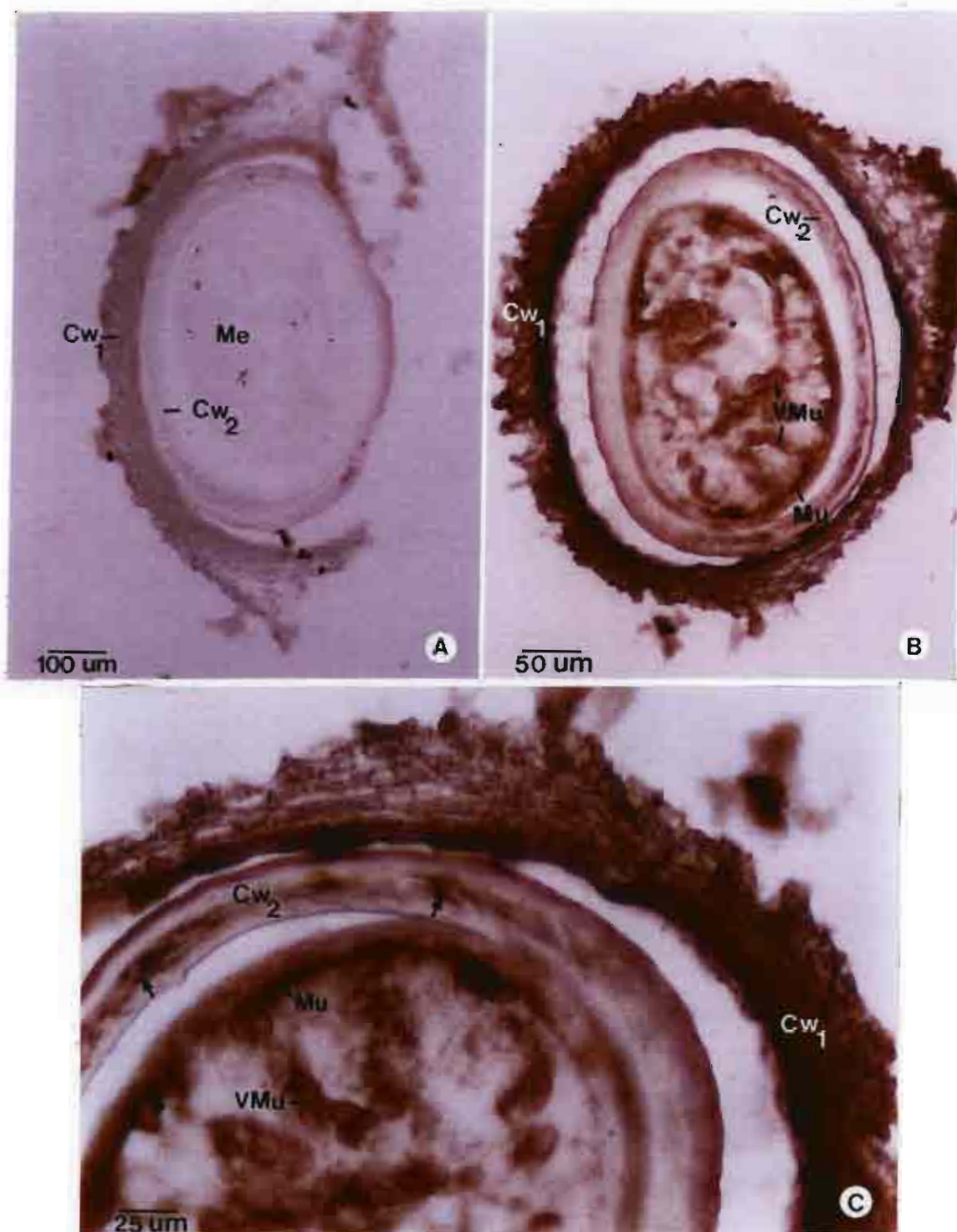


Figure 100



2.2.3 ตำแหน่งและการกระจายของแอนติเจนในชั้นผิวที่ MW 66 kD

พยาธิตัวเต็มวัย

เราได้ใช้ MoAb จากเซลล์ hybridoma 3 clones คือ TA 1C12, TA 2C3 และ TA 1H7 ซึ่งทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติเจนที่แถบ MW 66 kD (ดูตารางที่ 10) ย้อมหาตำแหน่งและการกระจายของแอนติเจนชนิดนี้โดยวิธี immunoperoxidase และ immunofluorescence ปรากฏว่าในพยาธิตัวเต็มวัยมีการติดสีน้ำตาลและสีเรืองแสงจากการใช้วิธีทั้ง 2 แบบ ที่เยื่อหุ้มชั้นผิว และแถบของไซโตพลาสซึมของชั้นผิวที่อยู่ใต้เยื่อหุ้ม ส่วนในความหนาของชั้นผิวจะมีเม็ดสีกระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 101B-D) นอกจากนี้ยังมีสีติดที่กิ่งของเซลล์ผิว (Tegument cell) ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ และตัวเซลล์ผิวเองก็ติดสีด้วย (รูปที่ 102A, B) ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่ติดสีเลย (รูปที่ 101A)

เมตาเซอร์คาเรีย

ส่วนในตั้มเมตาเซอร์คาเรียนั้นมีสีติดจาก ๆ ทั้งทั้งความหนาของชั้นผิว และในตัวเซลล์กับชั้นผนังของ cyst ชั้นที่ห่อ (รูปที่ 103A, B) ส่วนในเซลล์ชนิดอื่นภายในตั้มเมตาเซอร์คาเรีย ไม่ติดสีเลย

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่าโปรตีน 66 kD น่าจะเป็นแอนติเจนที่กระจายอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นผิว (surface membrane) และส่วนบนของไซโตพลาสซึมของชั้นผิว (Tegument cytoplasm) โดยเฉพาะชั้นย่อย 1 และ 2 ที่มีการสะสมของเกรนูล G_1 และ G_2 (ดูรายละเอียดในข้อ 3.2 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของชั้นผิวโดย TEM) และในตัวเซลล์ของชั้นผิว (Tegument cells) เอง นอกจากนั้นแล้วแอนติเจนชนิดนี้ยังพบในชั้นผิวของตั้มเมตาเซอร์คาเรีย แต่จะมีปริมาณน้อยกว่าในตั้มเต็มวัยมาก เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้คงจะเพิ่งเริ่มถูกแสดงออกในตั้มอ่อนเมตาเซอร์คาเรีย

2.2.4 ตำแหน่งและการกระจายของแอนติเจนในชั้นผิวที่ MW 28.5 kD

พยาธิตัวเต็มวัย

เราได้ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี TA-6E9-1E ที่ได้ จาก เซลล์ลูกผสม (hybridoma) ต่อ TA แอนติเจน ที่มี molecular weight (MW) 28.5 kD ย้อมหาตำแหน่งและการกระจายของแอนติเจน ในชั้นผิวของพยาธิตัวเต็มวัยชนิดนี้โดยวิธี immunofluorescence และ immunoperoxidase ใน sections ของพยาธิตัวเต็มวัยปรากฏว่ามีการกระจายของแอนติเจนชนิดนี้ในชั้นผิวโดยเฉพาะที่ขอบนอกของชั้นผิว ในกิ่งของเซลล์ผิวและในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิว (tegumental cell) ซึ่งมีการติดสีหรือสารเรืองแสงที่เข้มมาก รวมทั้งในเยื่อผิวของท่อย่อยอาหารส่วนต้นได้แก่ oral sucker, ventral sucker, pharynx และ caecal bifurcation และท่อสืบพันธุ์ genital canal (รูปที่ 104A-D; 105A-D) ซึ่งมีลักษณะการกระจายคล้ายคลึงกับแอนติเจนที่ MW 66 kD ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าโมเลกุลทั้ง 2 ชนิดอาจเป็นส่วนประกอบของเยื่อชั้นผิวที่สร้างและสะสมอยู่ในเกรนูลแบบ G_1 และ G_2 ที่สะสมอยู่ใต้ชั้นผิว

พยาธิตัวอ่อนอายุ 7 สัปดาห์

เมื่อตรวจดูตำแหน่งการกระจายของแอนติเจน 28.5 kD ในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวอ่อนอายุ 7 สัปดาห์ พบว่า มีการติดสีหรือการเรืองแสงในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิว (tegumental cell) ที่เรียงตัวอยู่ได้ชั้นกลั่นเนื้อและในแขนงของเซลล์ผิวที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กลั่นเนื้อที่ถูกส่งออกไปเชื่อมรวมกันเป็นชั้นผิวของพยาธิ ที่ชั้นผิวมีการติดสีเข้มที่บริเวณเยื่อหุ้มและขอบนอกของไซโตพลาสซึมชั้นผิวเช่นเดียวกับที่พบในชั้นผิวของตัวโตเต็มวัย(รูปที่ 105E)

เมตาเซอร์คาเรีย

เมื่อศึกษาการกระจายของแอนติเจนชนิดนี้ในระยะเมตาเซอร์คาเรียโดยใช้วิธี immunofluorescence ผลปรากฏว่าที่บริเวณชั้นผิว (tegument) และไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิว (tegumental cell) มีการติดสีเรืองแสงเข้มมาก โดยในเซลล์ชั้นผิวจะเห็นเป็นแกรนูลขนาดเล็กๆกระจายอยู่รอบๆนิวเคลียสของเซลล์ซึ่งไม่ติดสีเลย (รูปที่ 105F) นอกจากนั้นเซลล์เยื่อหุ้มผิวของ oral sucker และ ventral sucker ก็จะมีติดสีเรืองแสงด้วยเช่นกัน (รูปที่ 105F)

ผลจากการทดลองทำให้เราสรุปว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดี clone TA-6E9-1E มีทั้งปริมาณการเกาะและความจำเพาะต่อแอนติเจน MW 28.5 kD ในชั้นผิวของพยาธิชนิดนี้มาก ซึ่งชี้บ่งว่าแอนติเจนชนิดนี้มีปริมาณมากในชั้นผิว อีกทั้งมีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนชนิดนี้ในเซลล์ตั้งแต่ระยะเมตาเซอร์คาเรีย โดยแอนติเจนมีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ จากระยะเมตาเซอร์คาเรียถึงระยะตัวอ่อนพยาธิอายุ 7 สัปดาห์ และมีปริมาณสูงสุดในระยะตัวเต็มวัย ดังนั้นแอนติเจนของชั้นผิวที่ MW 28.5 kD จึงน่าจะเป็นแอนติเจนเด่นอีกตัวหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อแบบ immunodiagnosis และการพัฒนาวัคซีนซึ่งมีเป้าหมายที่การทำลายชั้นผิวของพยาธิ

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่าโปรตีนทั้งสองชนิด (66, 28.5 kD) น่าจะเป็นแอนติเจนที่กระจายอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นผิว (surface membrane) และส่วนบนของไซโตพลาสซึมของชั้นผิว (Tegument cytoplasm) โดยเฉพาะชั้นย่อย 1 และ 2 ที่มีการสะสมของแกรนูล G_1 และ G_2 และในตัวของเซลล์ของชั้นผิว (Tegument cells) เอง นอกจากนั้นแล้วแอนติเจนทั้งสองชนิดนี้ยังพบในชั้นผิวของตัวเมตาเซอร์คาเรีย ถึงแม้จะมีปริมาณน้อยกว่าในตัวเต็มวัยมาก เนื่องจากโปรตีนทั้งสองชนิดนี้คงจะเพิ่งเริ่มถูกแสดงออกในตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรีย

รูปที่ 101 A) กลุ่มควบคุม (negative control) ของ paraffin section พยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย normal mouse serum แทน primary antibody (MoAb clone 1C12)

B-D) Paraffin section ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีจาก clone 1C12 โดยวิธี immunoperoxidase ที่ทำปฏิกิริยากับ TA แอนติเจนที่ MW 66 kD แสดงการกระจายของเม็ดสีที่ตำแหน่งของแอนติเจนที่เยื่อหุ้มผิวและส่วนขอบนอกของไซโตพลาสซึมของชั้นผิว (Te) และในกึ่งของเซลล์ผิวที่แทรกอยู่ระหว่างชั้นกล้ามเนื้อ (Mu) ส่วนในหนาม (Sp) ไม่พบเม็ดสี Ca = caecum, Vi = vitellaria

รูปที่ 102 A, B) ภาพ paraffin section ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย MoAb จาก clone 1C12 โดยวิธี immunoperoxidase แสดงตำแหน่ง TA แอนติเจนที่ MW 66 kD ที่ชั้นผิว (Te) เซลล์ของชั้นผิว (Tc) กึ่งของเซลล์ที่แทรกอยู่ระหว่างชั้นกล้ามเนื้อ (ลูกศร) ที่ทอดออกไปจากเซลล์ชั้นผิวและแทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อเพื่อออกไปเชื่อมกับชั้นผิว Ca = caecum

รูปที่ 103 A, B) ภาพ immunofluorescence ของส่วนตัดของระยะ newly excysted juveniles ที่ย้อมด้วย culture fluid (A) และ MoAb ต่อ TA แอนติเจนที่ 66 kD (B) แสดงการเรืองแสงอยู่ในชั้นผิว (Te)

รูปที่ 104 A-D) ภาพ paraffin sections ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย MoAb จาก clone 6E9-1E ที่จำเพาะต่อ TA แอนติเจนที่ MW 28.5 kD แสดงการกระจายของแอนติเจนชนิดนี้ในชั้นผิว (Te) ตัวเซลล์ (Tc) และกึ่งของเซลล์ชั้นผิว (ลูกศร) ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ (Mu) St = stromal (parenchymal) cell, Ca = caecum, Vi = vitellaria

รูปที่ 105 A-D) ภาพ immunofluorescence ของ section จากพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย MoAb 6E9-1E ที่จำเพาะต่อ TA แอนติเจนที่ 28.5 kD (A, B) แสดงตำแหน่งของแอนติเจนชนิดนี้ในชั้นผิว (Tc) โดยเฉพาะที่ขอบนอก ในตัวเซลล์ (tc) และในกึ่งของเซลล์ชั้นผิว (ลูกศร) ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ (mu) C) แสดงตำแหน่งแอนติเจนในเยื่อ (Ep) ของ pharynx และ D) แสดงตำแหน่งแอนติเจนในเยื่อ (Ep) ของ genital canal (gc) ที่มีไข่พยาธิ (Eg) อยู่

E) ภาพ immunofluorescence ของ section จากพยาธิอายุ 5 สัปดาห์แสดงการเรืองแสงที่ชั้นผิว (Te) และเซลล์ชั้นผิว (Tc)

F) ภาพ immunofluorescence ของ section จากระยะ newly excysted juvenile แสดงการเรืองแสงที่ชั้นผิว (Te) และในเซลล์ชั้นผิว (Tc); Os – oral sucker

Figure 101

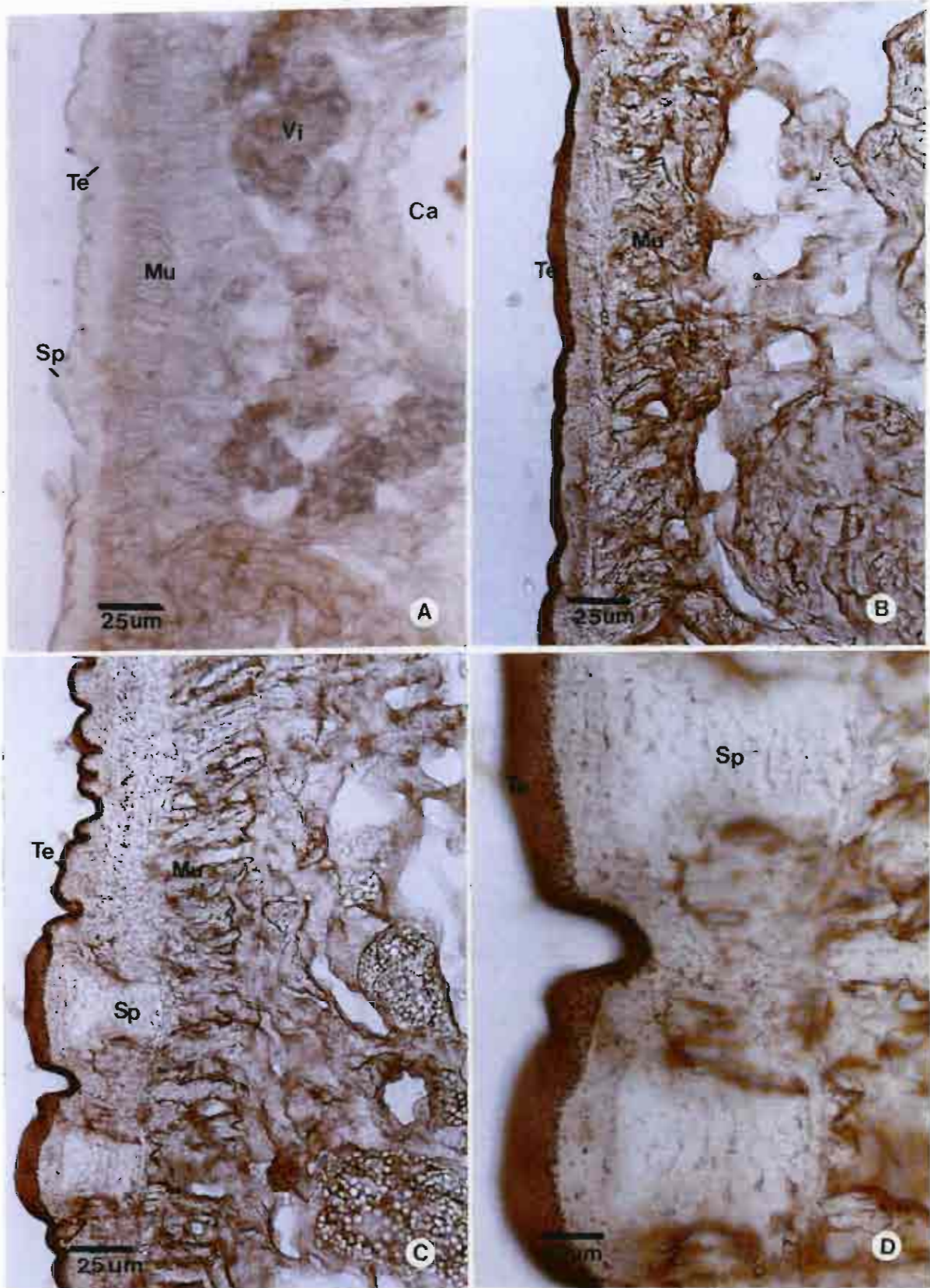


Figure 102

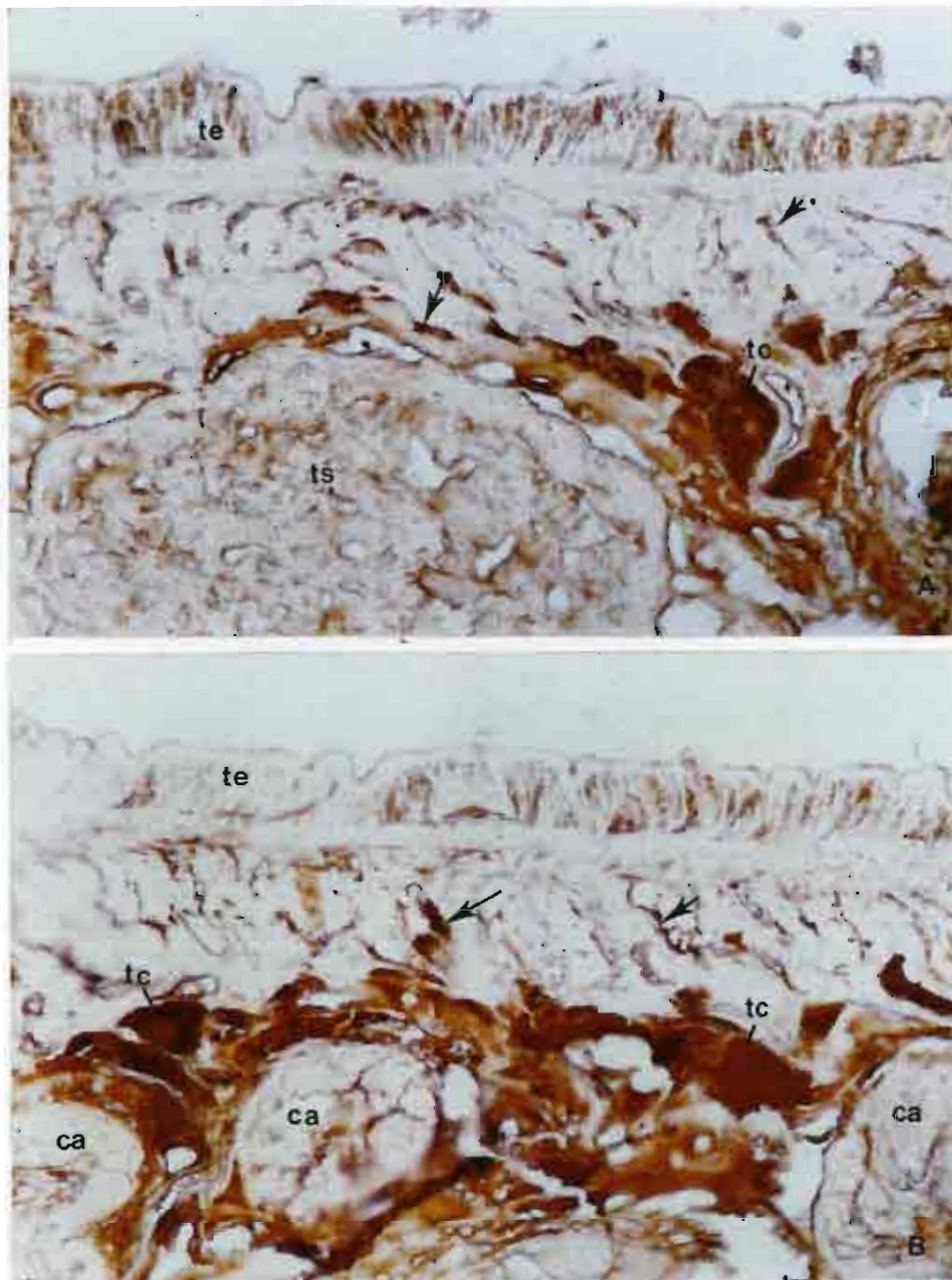


Figure 103

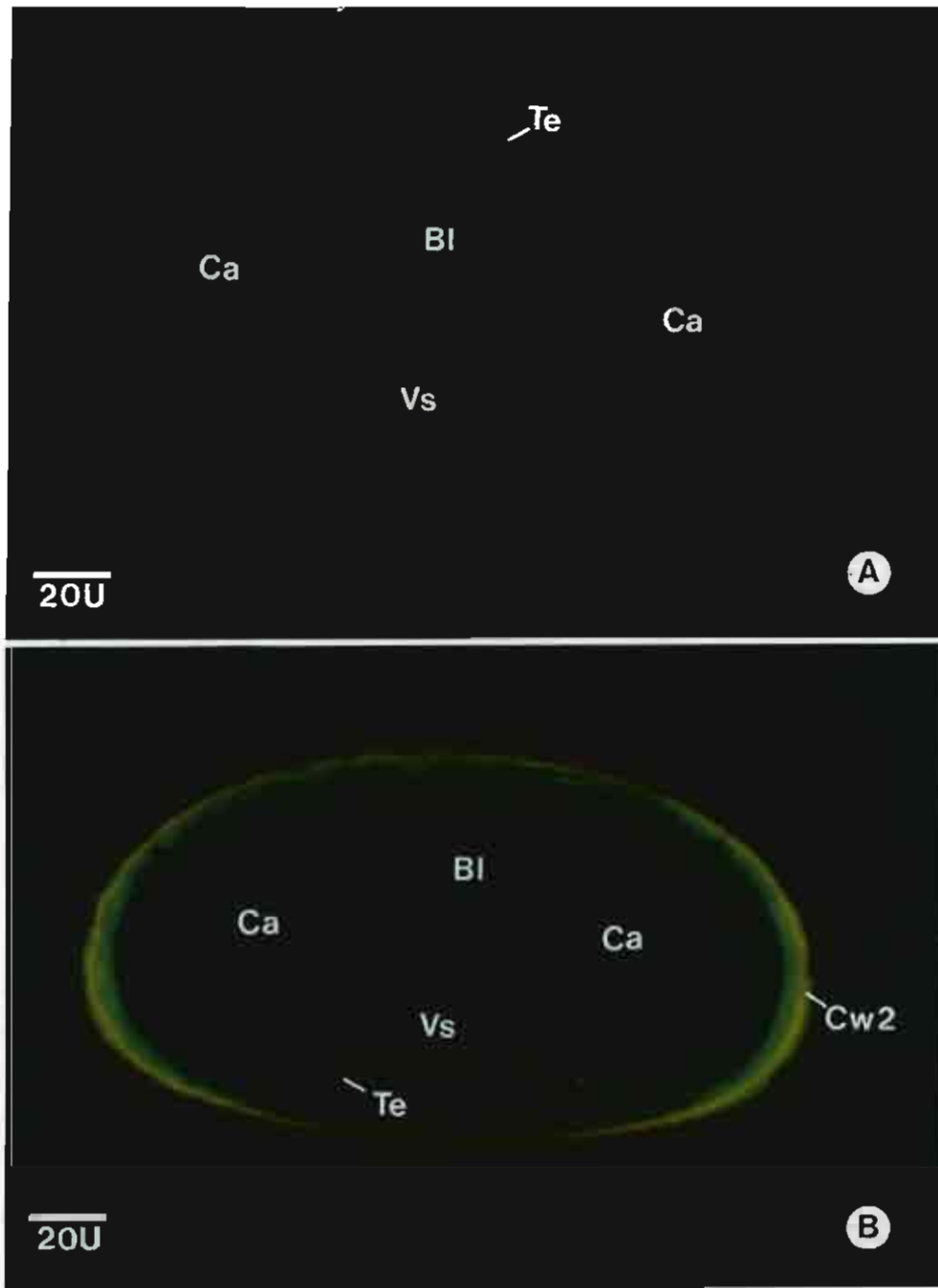


Figure 104

