ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์และลักษณะทางพันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว, *Sarcocystis singaporensis* โดยวิธีทางอณูชีววิทยา

Study on method for Identification of *Sarcocystis singaporensis* by molecular biology method

วิชาญ วรรธนะไกวัล ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง
ทรงทัพ แก้วตา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *Sarcocystis singaporensis* ที่นำมาใช้ในการทดลองมีการปนเปื้อนจากปรสิตโปรโตซัวชนิดอื่นและเชื้อต่างๆจำนวนมากแม้ว่าจะผ่านการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มาแล้วก็ตาม แต่เชื้อเริ่มต้นของ *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์นั้นไม่ได้มาจากเชื้อเพียงหนึ่งซีสต์ (1 sarcocyst) ดังนั้นต้องเริ่มทำการศึกษาปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะซาร์โคซีสต์ 1 ซีสต์ก่อน ซึ่งสามารถทำได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ดีหลังจากได้ทำการถอดรหัสพันธุกรรมของ *S. singaporensis* ในระยะซาร์โคซีสต์พบว่ามีเชื้อปรสิตโปรโตซัวในกลุ่มค็อคซิเดียโปรโตซัวชนิดอื่นปนอยู่ในกล้ามเนื้อลำตัวหนูประมาณ 2-3 ชนิด ดังนั้นจึงต้องทำการโคลนนิ่งเพื่อถอดรหัสพันธุกรรมเชื้อแต่ละชนิดที่ปนกันอยู่ให้สามารถแยกจากกันได้ก่อนแล้วจึงนำรหัสพันธุกรรมที่ได้นำมาใช้ออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะต่อ *S. singaporensis* เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-35-56

คำนำ

Sarcocystis singaporensis Zamen & Colley (1976) เป็นปรสิตโปรโตซัวที่มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัย(หนูและงูเหลือม) พบแพร่ระบาดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งค้นพบโดยศาสตราจารย์ Zamen เป็นครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ การขยายพันธุ์แบบมีเพศของปรสิตชนิดนี้ในสัตว์อาศัยสุดท้าย เกิดขึ้นภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือมและสปอร์โรซีสต์ (sporocysts) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเจริญเติบโตจะปะปนออกมาพร้อมมูลงูสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก และสู่สัตว์อาศัยตัวกลางโดยทางน้ำและอาหาร คือ หนูในสกุลท้องขาว (*Rattus* spp.) และสกุลพุก (*Bandicota* spp.) ที่ซึ่งโปรโตซัวชนิดนี้จะขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศในเซลล์บุผิวหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญเช่น ปอด หัวใจ ตับ ไต เป็นต้น และสุดท้ายเจริญพัฒนาเป็นแบรดิซ้อยต์ (bradyzoites) ที่ซึ่งปรากฏในถุงฝังตามกล้ามเนื้อลำตัวหนู (sarcocysts)

ระยะสปอร์โรซีสต์เท่านั้น ที่มีศักยภาพสูงมากในการทำให้หนูป่วยตายได้ จึงมีการวิจัยและพัฒนาโปรโตซัวชนิดนี้ เป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนู (bio-rodenticide) ซึ่งเป็นที่ยอมรับของทั้งภาคเอกชนและเกษตรกร โดยมีงูเหลือม (*Python reticulates*) เป็นแหล่งผลิตขยายสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวชนิดนี้ได้ดีที่สุด แต่งูเหลือมยังสามารถผลิตสปอร์โรซีสต์ของโปโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นๆ ได้แก่ *S. zamani* และ *S. villvilosi* ซึ่งการจำแนกชนิดปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในปัจจุบันนั้น จำแนกโดยอาศัยลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์โรซีสต์ และลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะซาร์โคซีสต์ในกล้ามเนื้อของหนูที่ติดเชื้อ ซึ่งอาจจำแนกผิดพลาดได้ เพราะเกิดการปนเปื้อนของค็อคซิเดียโปรโตซัวหลายชนิดได้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคในหนูลดลงได้ ดังนั้นจึงควรที่จะมีการยืนยันชนิดที่แน่นอนและเชื่อถือได้ร่วมกับการจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S.singaporensis* นอกจากนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบสปอร์โรซีสต์ของ *S.singaporensis* ในสารแขวนลอยที่บรรจุในเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงได้ ดังนั้นการศึกษารหัสทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดของ *S.singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์โดยวิธีทางอณูชีววิทยา เพื่อที่จะพัฒนางานวิจัยการจำแนกปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้เป็นชุด kit เพื่อตรวจสอบ *S. singaporensis* ในเหยื่อโปรโตซัวที่ผลิตโดยภาคเอกชน ในอนาคต

ในการทดลองนี้ใช้วิธีทางอณูชีววิทยาในการจำแนกชนิดและใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว *S.singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์ จากตัวอย่างในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรและภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงงูเหลือมและงูเหลือม กรงเลี้ยงเดี่ยวสำหรับหนูท้องขาว อาหารหนูและน้ำ
2. ชุด kit สกัดดีเอ็นเอ , ชุด kit PCR , ชุด kit Pure gel , ชุด kit remove dye
3. อุปกรณ์ run gel electrophoresis , ชุดถ่ายรูป gel electrophoresis
4. สารเคมีเตรียม TAE/TBE buffer, Agarose gel, Ethidium bromide (gel star)
5. หม้อนึ่ง Autoclave
6. เครื่อง spindown , microcentrifuge , autopipette

7. กระดาษทิชชูแบบอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

วิธีการ

ทำการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นการสนับสนุนผลที่ได้จากสัณฐานวิทยาและยืนยันชนิดของเชื้อ รวมถึงการถอดรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธีทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค sequencing มีรายละเอียดดังนี้

1.สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาเป็นแนวทาง

2.สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของยีนต่างๆที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank (data base ของ NCBI) ของ *S. singaporensis* และกลุ่มอื่นที่ใกล้เคียงกันเพื่อนาใช้เปรียบเทียบอ้างอิง

3.ออกแบบ primer โดยใช้ลำดับเบสของ *S. singaporensis* ที่มีในฐานข้อมูล Genbank Accession number AF 434050-59, AF 237617 เพื่อนำมาใช้ในการโคลนนิ่งและถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเทคนิค Sequencing

4.เก็บตัวอย่างโปรโตซัว *S. singaporensis* จากกล้ามเนื้อลำตัวหนูโดยดูผ่านกล้องสเตอริโอสโคป

5.สกัดดีเอ็นเอของโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยเทคนิค Phenol extraction/Alcohol precipitation DNA แล้วเก็บ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ อุณหภูมิ -20 หรือ -70°C

6.ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยวิธีโคลนนิ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนของ ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ จำนวน 2 คู่ มีลำดับเบส ดังนี้

SSU primer

1LF_edit 5'- AGC CAT GCA TGT CTA AGT ATA AG

1 hr 5'- TAT CCC CAT CAC GAT GCA TAC

LSU primer

KL 1F 5'- TAC CCG CTG AAC TTA AGC ATA T

KL 3R 5'- CCA CCA AGA TCT GCA CTA GA

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ul ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของโปรโตซัว *S. singaporensis* 5 ul ผสมกับ 5x PCR buffer , 10mM dNTPs , เอนไซม์ Hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพร์เมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 50 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ
(Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ(°c)	เวลา(นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (Initial Denaturing)	98	30 วินาที
2. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Denaturing)	98	30 วินาที
3. ไพร์เมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)	55/64	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Extension)	72	45 วินาที

5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ รอบสุดท้าย (Final Extension) 72 5 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 40 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 °c นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดมาผสมกับ loading dye ปริมาณ 10 ul จากนั้นทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5% อะกาโรสใน 0.5xTAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 135 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมดีเอ็นด้วย เอธิเดียมโบรไมด์หรือสีย้อม Syber green dye ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอและ ทำให้บริสุทธิ์แล้วทำการ Ligation , Transformation , Sequencing ตามลำดับ

7.วิเคราะห์ผลลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากโปรโตซัว *S. singaporensis* แต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA 5 วิเคราะห์ค่า Bootstrap และนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในห้องปฏิบัติการกับค็อคซิเดียนโปรโตซัวและโปรโตซัวชนิดอื่นๆที่มีในฐานข้อมูล Genbank ด้วย Maximum likely hood แล้วจัดทำ Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่ภายในห้องปฏิบัติการที่ได้มาจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย

เวลาและสถานที่

เก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2556 ภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกสายพันธุ์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์ จากตัวอย่างในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งผลการทดลองที่ผ่านมาในปี 2556 นั้น พบว่าสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่นำมาใช้ในการทดลองมีการปนเปื้อนจากปรสิตโปรโตซัวชนิดอื่นและเชื้อต่างๆจำนวนมากแม้ว่าจะผ่านการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มาแล้วก็ตาม แต่เชื้อเริ่มต้นของ *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์นั้นไม่ได้มาจากเชื้อเพียงหนึ่งซีสต์ (1 sarcocyst) ดังนั้นต้องเริ่มทำการศึกษาปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะซาร์โคซีสต์ 1 ซีสต์ก่อน ซึ่งสามารถทำได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ดีหลังจากได้ทำการถอดรหัสพันธุกรรมของ *S. singaporensis* ในระยะซาร์โคซีสต์พบว่ามีเชื้อปรสิตโปรโตซัวในกลุ่มค็อคซิเดียโปรโตซัวชนิดอื่นปนอยู่ในกล้ามเนื้อลำตัวหนูประมาณ 2-3 ชนิด ดังนั้นจึงต้องทำการโคลนนิ่งเพื่อถอดรหัสพันธุกรรมเชื้อแต่ละชนิดที่ปนกันอยู่ให้สามารถแยกจากกันได้ก่อนแล้วจึงนำรหัสพันธุกรรมที่ได้นำมาใช้ออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะต่อ *S. singaporensis* เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมต่อไปพร้อมกับพัฒนาวิธีการทำให้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* มีความบริสุทธิ์มากขึ้นสามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูและสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทางด้าน อณูชีววิทยาได้

การทดลองงานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด ยังต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไปอีก

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ที่ช่วยสอนเทคนิคและวิธีการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ทั้งในระยะสปอร์โรซีสต์และระยะซาร์โคซีสต์และ รศ.ดร. นสพ.วรวิทย์ วัชชวัลคุ ที่คอยให้คำปรึกษาในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. หน้า 25-40 ในรายงาน ผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด, ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปราการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ,2545 . จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี , ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 115 หน้า

Beaver, P.C. and J.R. Maleckar. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976. *Sarcocystis villivillosi* and *Sarcocystis zamani* : Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. The International Journal for Parasitology. 67: 241-256.

Gardiner, C.H., R. Fayer and J.P. Dubey. 1985. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. Agriculture Handbook. 651.

Gjerde, B. and J. Schulze. 2013. Muscular sarcocystosis in two arctic foxes (*Vulpes lagopus*) due to *Sarcocystis arctica* n. sp.: sarcocyst morphology, molecular characteristics and phylogeny. Parasitology Research. 43: 579-591.

Hafner, U. and F.R. Matuschka. 1984. Life cycle studies on *Sarcocystis dirumpens* with to host specificity. Zeitschrift Parsitenkunde. 70: 715 – 720.

Jaekel, T., H. burgstaller and W. Frank. 1996. *Sarcocystis singaporensis*, studies on host specificity, pathologenicity and potential use as a biocontrol agent of rats. The Journal for Parasitology. 82: 280 – 287.

Kolarova, L. and P. Sulc. 1978. *Sarcocystis cernae* Levine, 1977 excystation, life cycle and comparison with other heteroxenous coccidians from rodents and birds. Folia Parasitology. 23: 201 – 207.

Lekakul, B. and J.A. Mcneely. 1977. Mammals of Thailand. Association for the conservation of wildlife, Bangkok.

Lindsay, D.S., B.L. Blagburn and K.G. Braund. 1995. *Sarcocystis* spp. and Sarcocystosis. Microbiological Methods & Bacteriological Analytical Manual 5: 249-254.

Moyer, C. L. 2001. Molecular phylogeny: applications and implications for marine microbiology. Methods Microbiology. 30: 375-394.

Mugridge, N.B., D.A Morrison, A.M. Johnson and J.P. Dubey. 1999. Phylogenetic relationships of the genus Frenkelia: a review of its history and new knowledge gained from camparison of large subunit. The International Journal for Parasitology. 29: 957-72.

Munday, B.L. and R.W. Mason. 1980. *Sarcocystis* and related organisms in Australian wildlife: III. *Sarcocystis murinotechis* life cycle in Rats (*Rattus, Pseudomys and Mastocomys*) and Tiger snake (*Notechis ater*). The Journal of Wildlife Disease. 16: 83 – 86.

Prakas, P. and D. Butkauskas. 2012. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. Ekologija. 58: 45-58.

Slapeta, J.R., D. Mordry, J. Votypka, M. Jirku, B. Koudela and J. Lukes. Multiple origin of the dihomoxenous life cycle in sarcosporidia. The International Parasitology. 31: 413-417.

Slapeta, J.R., I. Kyselova , A.O. Richardson , D. Modry and J. Lukes , 2002 . Phylogeny and sequence variability of the *Sarcocystis singaporensis* Zaman and Colly,(1975)1976 ssr DNA . The International Journal for Parasitology. 88: 810-815.

Tenter, A.M. and A.M. Johnson. 1997. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. Advances in Parasitology. 39: 69-139.