



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การแยกบริสุทธิ์ การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างระดับ
ปฐมภูมิและสายวิวัฒนาการของเอนไซม์ไลโซไซม์ใน
กลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน

Purification, characterization, complete amino acid
sequence and evolution of reptile lysozymes

โดย ผศ.ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ และคณะ

สิงหาคม 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแยกบริสุทธิ์ การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างระดับปฐมภูมิและสายวิวัฒนาการของเอนไซม์ไลโซไซม์ในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน

Purification, characterization, complete amino acid sequence and evolution of reptile lysozymes

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. ผศ.ดร. ศักดา ดาดวง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. ศ.ดร.มร. ชินณสุร สวัสดิวัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัยและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญรูป	ข-ค
สารบัญตาราง	ง
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	1
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	3
Executive Summary	5
บทนำ	9-14
วิธีการดำเนินการวิจัย	15
วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือ	15
วิธีการทดลอง	15-21
ผลการทดลอง	22-42
อภิปรายผลการทดลอง	43-52
บรรณานุกรม	53-57
ภาคผนวก	58-59

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 elution profile ของการทำบริสุทธิ์ SSTLs ด้วย CM-Toyopearl 650M	22
รูปที่ 2 elution profile ของการทำบริสุทธิ์ ASTL ด้วย CM-Toyopearl 650M	22
รูปที่ 3 elution profile ของการทำบริสุทธิ์ GSTL ด้วย CM-Toyopearl 650M	23
รูปที่ 4 elution profile ของการทำบริสุทธิ์ GSTL ด้วย Sephadex G-50	23
รูปที่ 5 ผลการทำ SDS-PAGE ของ SSTLs, ASTL และ GSTL เทียบกับ HEWL	25
รูปที่ 6 ผลการศึกษาและยืนยัน activity ของไลโซไซม์ทั้ง 4 ชนิดโดย refolding gel เทียบกับ HEWL	25
รูปที่ 7 การศึกษา native-PAGE ของ SSTLs, ASTL และ GSTL เทียบกับ HEWL	27
รูปที่ 8 แสดง pH optimum ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสผนังเซลล์แห้ง <i>M.luteus</i> ของ HEWL, SSTLs, ASTL และ GSTL ที่ ionic strength 0.1	28
รูปที่ 9 แสดง pH optimum ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสผนังเซลล์แห้ง <i>M.luteus</i> ของ HEWL, SSTLs, ASTL และ GSTL ที่ ionic strength 0.05	28
รูปที่ 10 การศึกษาแอกติวิตีของ HEWL, SSTLs และ GSTL ที่ 90 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	29
รูปที่ 11 การแยก carboxymethylated lysozyme ด้วย Sephadex G-50	30
รูปที่ 12 แผนที่โปรตีนของ SSTLs เทียบกับ HEWL ที่ได้จากการแยก tryptic peptide ด้วย C18 reversed phase column chromatography	31
รูปที่ 13 แผนที่โปรตีนของ SSTLs และ ASTL ที่ได้จากการแยก tryptic peptide ด้วย C18 reversed phase column chromatography	32
รูปที่ 14 การทำ rechromatogram ของ peak ที่ 10, 11 โดยใช้ C18 reversed phase column ซึ่ง solvent A เป็น 5 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 และ solvent B เป็น 60% CAN ใน solvent A	33
รูปที่ 15 การทำ rechromatogram ของ peak ที่ 13, 14 โดยใช้ C18 reversed phase column ซึ่ง solvent A เป็น 5 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 และ solvent B เป็น 60% CAN ใน solvent A	34
รูปที่ 16 chromatogram ของกรดอะมิโนที่ใช้เป็นมาตรฐานในการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบแบบ post column derivatized with OPA	35

รูปที่ 17 chromatogram ตัวอย่างการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบใน peak 4 ของ SSSL A เทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐานที่ถูกชะออกจากคอลัมน์แบบ post column derivatized with OPA	35
รูปที่ 18 chromatogram ของกรดอะมิโนที่ใช้เป็นมาตรฐานในการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบแบบ post column derivatized with ninhydrin	36
รูปที่ 19 chromatogram ตัวอย่างของการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของ SSSL A เทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐานในรูปที่ 18 ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์แบบ post column derivatized with ninhydrin	37
รูปที่ 20 ลำดับกรดอะมิโนของ SSSL A และ SSSL B โดยเส้นทึบคือหาลำดับกรดอะมิโนแล้วส่วนเส้นประคือการหาลำดับกรดอะมิโนโดยการหาจากส่วนประกอบของกรดอะมิโน	39
รูปที่ 21 ลำดับกรดอะมิโนของ ASTL เปรียบเทียบกับ SSSL B	42
รูปที่ 22 โครงสร้าง 3 มิติ (Three dimensional structure) ของเอนไซม์ไลโซไซม์จาก HEWL	48
รูปที่ 23 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SSSL A, SSSL B และ ASTL กับไลโซไซม์ชนิดอื่นคือ HL, HEL, STL, GSTL	51
รูปที่ 24 Phylogenetic tree ของ C-type lysozyme	52

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตารางสรุปการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส	26
ตารางที่ 2 ตารางสรุปผลการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบใน SSTL A	38
ตารางที่ 3 ตารางสรุปผลการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของ peak เปปไทด์ ของ ASTL ที่ต่างจาก SSTLs	41

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้แยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานได้สี่ชนิด ได้แก่ SSTL A, SSTL B ซึ่งได้จากไข่ขาวของตะพาบน้ำ (soft shell turtle) ASTL ได้จากไข่ขาวของตะพาบน้ำ (Asiatic soft shell turtle) และ GSTL ได้จากไข่ขาวของเต่าตนุ (green sea turtle) ซึ่งเป็นเต่าทะเลชนิดหนึ่ง ด้วยเทคนิค cation exchanger column chromatography และ gel filtration chromatography เมื่อนำไลโซไซม์ทั้งสี่ชนิดมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า SSTL A, SSTL B และ ASTL มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือประมาณ 14.8 kDa ส่วน GSTL มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15.2 kDa ยืนยันผลของ lysozyme activity ทั้งสี่ชนิดที่แยกบริสุทธิ์ได้โดย refolding gel จากการทดสอบโปรตีนที่อยู่ในรูป native conformation โดย Native PAGE พบว่าไลโซไซม์ของสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิดมีของกรดอะมิโนที่มีประจุแตกต่างกันโดยพบว่า SSTL B วิ่งเข้าหาขั้วลบได้เร็วที่สุดในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานและวิ่งได้ใกล้เคียงกับ HEWL จากการศึกษาคูสมบัติทางเคมีพบว่าไลโซไซม์จากตะพาบน้ำ (SSTLs และ ASTL) สามารถทำงานได้ดีที่ pH 6.0 แต่ตรงกันข้ามกับไลโซไซม์จากไข่ขาวของเต่าทะเลที่สามารถทำงานได้ดีที่สอง pH คือ pH 6.0 และ pH 8.0 และจากการศึกษา Thermostability ที่อุณหภูมิ 90°C พบว่าไลโซไซม์ทั้งสี่ชนิดยังสามารถทำงานได้เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงโดย ASTL ยังมี activity สูงสุดประมาณ 60% จากการศึกษาคูสร้างระดับปฐมภูมิของเอนไซม์ไลโซไซม์สี่ชนิดพบว่า SSTL A SSTLB และ ASTL มีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ 131 ตัว ซึ่งต่างจาก GSTL โดยมีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ 130 ตัว และพบว่าทางปลาย N (N-terminal sequencing) ของ SSTLs และ ASTL มีการ insertion ด้วยกรดอะมิโน Gly ซึ่งเคยมีรายงานพบในนกบางชนิดเช่นไก่ฟ้า (pheasant lysozyme) และนอกจากนี้ยังพบ insertion ของ Gly ระหว่างตำแหน่งที่ 47 และ 48 นอกจากนี้พบว่า SSTL A และ SSTL B มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันมากโดยมีการ substitutions เพียงสามตำแหน่งคือ ตำแหน่ง Lys97 ใน SSTL A เปลี่ยนเป็น Arg ใน SSTL B, Gly122 ใน SSTL A เปลี่ยนเป็น Gln ใน SSTL B และ Asp126 ใน SSTL A เปลี่ยนเป็น Gly ใน SSTL B สำหรับการศึกษapeptide mapping ระหว่าง SSTL A, SSTL B และ ASTL พบว่า เกิด substitution ขึ้นใน ASTL อย่างน้อย 4 ตำแหน่งคือ Leu8 เปลี่ยนเป็น Ala, Ala41 เปลี่ยนเป็น Gly, Lys71 เปลี่ยนเป็น Asp และ Leu83 เปลี่ยนเป็น Met เมื่อเปรียบเทียบกับ SSTL B นอกจากนี้จากการศึกษาเปรียบเทียบกับ C-type lysozyme ชนิดอื่นๆพบว่า ในกลุ่มของ reptile lysozymes จะมีการ substitutions เกิดขึ้นที่บริเวณ binding subsite คือ site E และ site F เมื่อเทียบกับ HEWL คือ Phe34, Arg45, Thr47 และ Arg114 จะถูกแทนที่โดย His, Tyr, Arg และ Tyr ซึ่งการ

substitutions นี้ อาจจะมีผลกระทบต่อ catalysis mechanism ของเอนไซม์ และการ substitutions ในตำแหน่งที่ 8 และตำแหน่งที่ 83 ใน ASTL จะพบเป็นครั้งแรกในกลุ่มของ C-type lysozyme

รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่มีการพบ C-type lysozymes สองชนิดในไขขาวของสัตว์เลื้อยคลาน และมีการศึกษาทั้งทางด้านโครงสร้างและหน้าที่ของไลโซไซม์เปรียบเทียบกับเป็นกลุ่ม ซึ่งพบว่า โครงสร้างระดับปฐมภูมิของเอนไซม์ไลโซไซม์ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานจะแตกต่างจากไลโซไซม์ในกลุ่มของสัตว์ปีก และการเกิด amino acid substitutions ในระหว่างกลุ่มของ reptile lysozyme พบว่าส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณผิวของโมเลกุลซึ่งอาจจะมีผลต่อ binding affinity ของเอนไซม์และเซลล์แบคทีเรีย และนอกจากนี้กลไกการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มของ reptile กับ สัตว์ตระกูลต่าง ๆ จะมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ : ตะพาน้ำ; ไลโซไซม์ชนิด C; การแยกบริสุทธิ์; ไลโซไซม์จากสัตว์เลื้อยคลาน; ไลโซไซม์จากตะพาน้ำ

Abstract

Cation exchange column chromatography and gel filtration chromatography were used to purify four types of reptile lysozymes : SSTL A and SSTL B, from the egg white of soft shelled turtle, ASTL from the egg white of Asiatic soft shell turtle and the fourth lysozyme, GSTL, from the egg white of green sea turtle. The molecular masses of purified lysozymes were estimated to be 14.8, 14.8, 14.8 and 15.2 kDa for SSTL A, SSTL B, ASTL and GSTL respectively by SDS-PAGE. Zymograms of the four lysozymes on native-PAGE mobility showed differences in charge between the reptile lysozymes. SSTL A, SSTL B and ASTL had sharp pH optima of around pH 6.0, which contrast with that of GSTL, which showed dual pH optima at around pH 6.0 and pH 8.0. These lysozymes were stable at 90°C for 2 h, but completely lost activity after 3 h incubation. The amino acid sequences of three reptile lysozymes (SSTL A, SSTL B and ASTL) were analyzed by peptide mapping method. The lysozymes were reduced and carboxymethylated to fragment them with trypsin. Then amino acid composition and amino acid sequence of each peptide was performed. SSTLs and ASTL was proved to consist of 131 amino acid residues whereas GSTL (JC7918) had 130 amino acid residues. SSTLs and ASTL have an extra Gly residue at N-terminus which was found in pheasant lysozyme. Further, all four reptile lysozymes have an insertion of a Gly residue between 47 and 48 residues when compared with HEWL, as found in human lysozyme. The three reptile lysozymes were shown to be very similar to one another on the basis of amino acid sequence. The established amino acid sequence of SSTL A had the highest similarity to SSTL B with three amino acid substitutions at positions 97 (Lys to Arg), 122(Gly to Gln) and 126 (Asp to Gly). From the peptide mapping analysis, ASTL had four amino acid substitutions at position 8, 41, 71 and 83 from SSTL B. The amino acid sequence of reptile lysozymes that might contribute to substrate binding were found at subsites E and F (Phe34His, Arg45Tyr, Thr47Arg and Arg114 Tyr) when comparing to HEWL. The amino acid substitution at position 8 and 83 in ASTL were newly detected in C-type lysozyme.

This is the first report for the discovery two type lysozymes in egg white of reptile group. Further, the primary structures of reptile lysozymes are different from the

other c-type lysozymes. In addition, amino acid substitutions in between reptile lysozyme group which were found mainly on the surface molecule of protein might contribute to the binding affinity of an enzyme and bacterial cell substrate. Furthermore, the study of catalysis mechanism with different kind of substrated is in progress to elucidate the structural basis of the diversity in their biological activity.

Keywords—Asiatic soft shelled turtle lysozyme; C-type lysozyme; Purification; Reptile lysozyme; Soft shelled turtle lysozyme

Executive summary

Lysozyme (N-acetylmuramide glyconohydrolase, (EC 3.2.1.17) is one of the best characterized hydrolases. It cleaves β -1,4 linkages of GlcNAc homopolymer and (GlcNAc-MurNAc)_n heteropolymer, which causes lysis of the bacteria containing these polymers in the cell wall. Lysozymes are considered to be self-defense enzymes, which are produced in serum, mucus and many organs of vertebrates. Lysozymes have been classified into three distinct forms of lysozyme by their amino acid sequences and tertiary structures, namely, C-type, T4-type, and G-type. Among this group, despite the apparent lack of primary sequence correspondence, the three-dimensional structures of HEWL (hen egg white lysozyme), T4L(T4 phage lysozyme), and GEWL(goose egg white lysozyme) have been shown to share the common tertiary structure elements.

Lysozyme has served as a model system in protein chemistry as it was the first enzyme to be sequenced, which contains all 20 of the common amino acids. HEWL was the first enzyme to have its three-dimensional structure determined by X-ray crystallography. A deep cleft containing the active site divides the molecule into two domains; one of them is almost entirely β -sheet structure, whereas the other, comprising the N- and C-terminal segments, is more helical in nature. The two domains are linked by an α -helix (residues 89-99). HEWL has four disulfide bridges formed by the cysteine residues pairs (6-127), (30-115), (76-94), and (64-80). The two proposed catalytic residues, Glu35 and Asp52, are located at opposite sides of the active site. In 1966, the structure of an enzyme-substrate complex between lysozyme and a hexamer of (GlcNAc)₆ was deduced from the results of X-ray analysis, where six sugar rings bind in the cleft of lysozyme and the subsites are called A-F.

The catalytic mechanism of this enzyme group was proposed to follow the general acid catalysis involving the two acidic residues, the general acid-base glutamic acid and the nucleophile aspartic acid residue. Lysozymes have a highly conserved proton donor, which is a Glu residue (Glu35, Glu11, and Glu73 in C-type, T4-type, and G-type lysozymes, respectively). On the other hand, the other carboxylate of the Asp residue, that stabilizes the oxocarbenium ion of the reaction intermediate, shows variability especially in G-type lysozyme. This information adds a further question about

the role of Asp residue in other lysozymes as well.

Much information has been obtained on the structural properties and enzymatic mechanism of the C-type lysozyme. The C-type lysozyme is composed of 129-130 amino acids and has six substrate binding sites. The substrate bound to the subsites is cleaved at subsite D and E by the conventional acid catalytic reaction of Glu35 and Asp52. The amino acid sequences of C-type lysozyme have been determined from many birds, mammals, fish, and insects. However there are only three reports concerning lysozymes in reptile. These reports described the purification and properties of egg white lysozyme of *Trionyx gangeticus*, the crystal structure of tortoise egg-white lysozyme, and the complete amino acid sequence and activity of soft-shelled turtle lysozyme.

The molecular evolution of the C-, G- and T4 type lysozymes has been discussed. One possibility is that the three type of lysozymes diverged from a common precursor whose three dimensional structure was most like that of the G-type lysozyme. Another possibility is that a C-type-like common precursor diverged, giving rise to a G-type lysozyme that again diverged, giving rise to a T4-type lysozyme. However, there are also several ideas on the evolution of the different lysozymes. Thus, more amino acid sequence information on lysozyme from other species is required to clarify hypotheses for the evolution of lysozymes.

In contrast to other C-type lysozymes, there is limited information on primary structure and catalytic mechanism of reptile lysozyme. One approach to overcome these problems is to accumulate information on reptile lysozymes from various origins for their characteristics would very useful in terms of evolution studies. Further, the relation of the amino acid substitutions and the catalysis mechanism in comparison with other C-type lysozymes should be studied.

The Objectives of this project are

- To purify lysozyme from egg white of reptiles, such as soft shelled turtle and green sea turtle. Other species, such as crocodile, may be studied if time permits.
- To analyze the primary structures of reptile lysozyme by peptide mapping.
- To study the molecular evolution of reptile lysozymes.

-To establish the methods for studying protein structure and function, in particular amino acid analysis by HPLC with post column OPA derivatization and amino acid sequencing by a DABITC/PITC double coupling manual micro sequencing method.

In this study, the we have purification and analysis the complete amino acid sequence of lysozymes from reptiles egg white, namely soft shelled turtle (*Trionyx sinensis Chinese*), Asiatic soft shelled turtle (*Amyda cartilaginea*) and green sea turtle (*Chelonia mydas*) by peptide mapping method. After that, the evolution of reptile lysozymes was studied.

For the purification of reptile lysozymes, cation exchanger column chromatography and gel filtration chromatography were used to purify four types of reptile lysozymes: SSTL A and SSTL B, from the egg white of soft shelled turtle, ASTL from the egg white of Asiatic soft shell turtle and the fourth lysozyme, GSTL, from the egg white of green sea turtle. The molecular masses of purified lysozymes were estimated to be 14.8, 14.8, 14.8 and 15.2 kDa for SSTL A, SSTL B, ASTL and GSTL respectively by SDS-PAGE. Zymograms of the four lysozymes on native-PAGE mobility showed differences in charge between the reptile lysozymes. For the chemical characterization, SSTL A, SSTL B and ASTL showed sharp pH optima of around pH 6.0, which contrast with that of GSTL, which demonstrated dual pH optima at around pH 6.0 and pH 8.0. The reptile lysozymes are thermostable enzyme because these lysozymes were stable at 90^o C for 2 h, but completely lost activity after 3 h incubation. Further, the primary structures of three reptile lysozymes (SSTL A, SSTL B and ASTL) were analyzed by peptide mapping method. The lysozymes were reduced and carboxymethylated to fragment them with trypsin. The tryptic peptide solution of each lysozyme was purified by RP-HPLC. Then amino acid composition and amino acid sequence of each peptide was performed. SSTLs and ASTL was proved to consist of 131 amino acid residues whereas GSTL (JC7918) had 130 amino acid residues. SSTLs and ASTL have an extra Gly residue at N-terminus which was found in pheasant lysozyme. Further, all four reptile lysozymes have an insertion of a Gly residue between 47 and 48 residues when compared with HEWL, as found in human lysozyme. The three reptile lysozymes were shown to be very similar to one another on the basis of amino acid sequence. The

established amino acid sequence of SSTL A had the highest similarity to SSTL B with three amino acid substitutions at positions 97 (Lys to Arg), 122(Gly to Gln) and 126 (Asp to Gly). From the peptide mapping analysis, ASTL had four amino acid substitutions at position 8, 41, 71 and 83 from SSTL B. The amino acid substitution at position 8 and 83 in ASTL were newly detected in C-type lysozyme. The amino acid sequence of reptile lysozymes that might contribute to substrate binding were found at subsites E and F (Phe34His, Arg45Tyr, Thr47Arg and Arg114 Tyr) when comparing to HEWL. The disulfide bond location and catalytic amino acids (Glu35 and Asp52) are completely conserved.

This is the first report for the discovery two type lysozymes in egg white of reptile group. Further, the primary structures of reptile lysozymes are different from the other C-type lysozymes. In addition, amino acid substitutions in between reptile lysozyme group which were found mainly on the surface molecule of protein might contribute to the binding affinity of an enzyme and bacterial cell substrate. Furthermore, the study of catalysis mechanism with different kind of substrate is in progress to elucidate the structural basis of the diversity in their biological activity.

บทนำ

ไลโซไซม์ (lysozyme ; N-acetylmuramide glyconohydrolase, (EC 3.2.1.17)) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม hydrolases เอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ β -1,4-ไกลโคซิดิก ระหว่าง N-อะซิติลกลูโคซามีนและ N-อะซิติลมูลูรามิคแอซิด ซึ่งโพลิเมอร์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกได้จึงถือได้ว่าไลโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตใช้ป้องกันตนเองจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถพบไลโซไซม์ได้ในซีรัม เยื่อเมือก และอวัยวะต่าง ๆ ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง จากการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งไลโซไซม์ออกเป็น 3 ชนิด ตามจำนวนและลำดับกรดอะมิโน ดังนี้คือ C-type (Canfield, 1963; Jolles et al., 1963; Blake et al., 1965), T4-type (Inoue et al., 1970; Matthews and Remington, 1981) และ G-type (Grutter et al., 1979; Simpson et al., 1980; Weaver et al., 1985) ซึ่งแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างปฐมภูมิที่ต่างกัน ส่วนโครงสร้าง 3 มิติของไลโซไซม์ทั้งสามชนิด HEWL (hen egg white lysozyme), T4L (T4 phage lysozyme) และ GEWL (goose egg white lysozyme) นั้น ได้มีการศึกษาพบว่ามีโครงสร้างตติยภูมิในส่วนที่เป็น core structure เหมือนกัน (Grutter et al., 1983; Matthews et al., 1981; Anderson et al., 1981) สำหรับกลไกการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์นั้น จะมีกรดอะมิโนเกี่ยวข้องอยู่ 2 ชนิด คือ กรดกลูตามิก (Glu) และกรดแอสพาทิก (Asp) (Weaver et al., 1985) ซึ่งกรดกลูตามิก จะทำหน้าที่เป็นตัวให้โปรตอน (Glu35, Glu11 และ Glu73 ใน C-type, T4-type และ G-type ตามลำดับ) (Blake et al., 1965; Matthews et al., 1981; Simpson et al., 1980; Matthews et al., 1981; Anderson et al., 1981) ในขณะที่ Asp จะทำหน้าที่ stabilize สารมัธยันต์ carbonium ion ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ส่วนใน G-type lysozyme พบว่ามีกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการไฮโดรไลซิสเพียงชนิดเดียวคือ Glu73 (Weaver et al., 1995) ข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้มีคำถามว่า กรดแอสพาทิก (Asp) มีบทบาทอย่างไรใน lysozyme ชนิดอื่นๆ ด้วยเช่นกัน

C-type lysozyme เป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ทั้งทางด้านโครงสร้างและกลไกการทำงาน ซึ่งพบว่าโครงสร้างปฐมภูมินั้นประกอบด้วยกรดอะมิโน 129-130 ลำดับ และมี 6 substrate binding subsites เมื่อเอนไซม์จับกับสับสเตรทแล้ว สับสเตรทจะถูกตัดตรงตำแหน่งระหว่าง subsite D และ E ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการทำงานของ Glu35 กับ Asp52 นอกจากนี้ไลโซไซม์ยังมี transglycosylation activity อีกด้วย แต่กลไกการเกิดปฏิกิริยานั้น ยังไม่ทราบแน่ชัด ส่วนการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ C-type lysozyme นั้น ได้มีการศึกษาไว้อย่างมากจากนกหลายชนิด (Prager et al., 1972; Araki et al., 1990; Araki et al., 1991a; Araki et al., 1991b; Araki et al., 1994; Araki and Torikata, 1999) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Ito et al., 1993;

Canfield, 1971; Jolles and Jolles, 1971) ปลา (Dautigny et al., 1991) และในแมลง (Lee and Brey, 1995) ส่วนในสัตว์เลื้อยคลานนั้นมีการศึกษาน้อยมากและพบว่ามีรายงานเพียง 3 ฉบับเท่านั้น คือ การแยกบริสุทธิ์ และสมบัติของไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากไข่ขาวของตะพาน้ำ (*Trionyx gangeticus*) (Gayen et al., 1977) crystal structure ของไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพาน้ำ ชนิด *Trionyx gangeticus* Cuvier (Aschaffenburg et al., 1980) และลำดับกรดอะมิโน และการทำงานของไลโซไซม์จากตะพาน้ำสายพันธุ์ญี่ปุ่น (Araki et al., 1998) Araki และคณะ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างระดับปฐมภูมิของไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้จาก ตะพาน้ำ (*Trionyx sinensis*, *Japonicus*) มี mutation ตรงตำแหน่ง binding subsite E และ F (Araki et al., 1998) ซึ่งการเกิดการแทนที่ของลำดับกรดอะมิโนใน subsite E และ F ของ ไลโซไซม์ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานนี้จะ เป็นข้อมูลที่จะช่วยในการศึกษาปฏิกิริยาการเกิด transglycosylation ได้เป็นอย่างดี ฉะนั้น การศึกษาโครงสร้างและศึกษาสมบัติทางด้านเคมี (characterizations) และทางโครงสร้าง (structure) ของไลโซไซม์จากสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด จะทำให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางด้านสายวิวัฒนาการ รวมทั้งกลไกการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานได้



ข้อมูลทั่วไปของตะพาน้ำ

ปลาฝา บางที่เรียกว่า ปลาเบียน ภาคกลางเรียกว่า ตะพาน้ำ เป็นเต่าน้ำจืดชนิดหนึ่งซึ่งมีกระดองนิ่ม สัตว์เลื้อยคลานชนิดนี้อยู่ในตระกูล Trionychidae ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างไปจากเต่า คือ มีกระดองหลังค่อนข้างเรียบแบน กระดองมีลักษณะเป็นหนังที่ค่อนข้างแข็งเฉพาะในส่วนกลางกระดอง แต่บริเวณขอบจะมีลักษณะนิ่ม แผ่นกระดองจะปราศจากแผ่นแข็ง ซึ่งแตกต่างจากกระดองเต่าอย่างสิ้นเชิง กระดองส่วนท้องหุ้มด้วยผิวหนังเรียบ มีส่วนที่เป็นกระดูกน้อยมาก กระดองจะมีรูปร่างกลมเมื่อยัง

มีขนาดเล็ก และจะรีขึ้นเล็กน้อยเมื่อโตเต็มวัย ตั้งแต่คอส่วนบนไปจรดขอบกระดองจะมีตุ่มแข็งเล็กๆ ขึ้นอยู่ ส่วนหัวมีขนาดใหญ่ มักจะเรียงคอดยาวและสามารถเหียวกลับมาด้านข้างๆ ได้

ปลาฝามีจมูกค่อนข้างยาวแต่มีขนาดเล็กและส่วนปลายจมูกอ่อน ตาโปนออกมาจากส่วนหัวอย่างเห็นได้ชัด มีฟัน ขากรรไกร แข็งแรงและคมมีหนังหุ้มกระดูกคล้ายริมฝีปาก ขาทั้งสี่แผ่กว้างที่นิ้วจะมีพังพืดเชื่อมติดต่อกันแบบใบพายอย่างสมบูรณ์ ปลาฝามีเล็บเพียง 3 นิ้ว และมีหางสั้น หัว กระดอง และขา จะมีสีเทาเข้มหรือเกือบดำ แต่มีจุดเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วกระดอง บนกระดองยังมีลายคล้ายดาว 4-5 แห่ง ท้องมีสีขาวปนเทา มีขนาดเล็กและอ่อนนุ่ม

ปลาฉลามตามสายพันธุ์ที่ค้นพบในประเทศไทย มี 5 ชนิด ชนิดที่พบมากที่สุดในประเทศ คือ ปลาฉลาม หรือ ตะพาบ (*Trionyx cartilagineus*) เมื่อโตเต็มที่จะมีความกว้างของกระดอง ประมาณ 75 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 35 กิโลกรัม ปลาฉลามพบแพร่กระจายอยู่ในอเมริกาเหนือ แอฟริกา เอเชียทางตอนใต้ และตะวันออกจนถึงนิวกินีซึ่งมีอยู่ 32 ชนิด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบ 9 ชนิด ทางตอนใต้ของพม่า ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย และหมู่เกาะต่าง ๆ ในอินโดนีเซีย ส่วนในประเทศไทยพบทั่วทุกภาค ชนิดที่มีการเพาะพันธุ์เชิงพาณิชย์ คือ พันธุ์ไต้หวัน (*Trionyx sinensis Chinese*) ตะพาบน้ำไต้หวันมีกระดองเป็นรูปรีเล็กน้อย ลักษณะโครงร่างแบน ผิวกระดอง เรียบ มีกระดองส่วนที่นิ่ม หรือเชิงค่อนข้างมาก มีหัวใหญ่ คอยาวมาก ปากแหลม ฟันคม และแข็งแรง เมื่อยังเล็ก กระดองสีเขียวเข้ม ด้านท้องจะมีสีส้มและดำสลับกัน 5-6 ตำแหน่ง เมื่อโตเต็มวัย กระดองจะมีสีเขียวอมเหลือง บริเวณเชิงจะมีสีเหลืองเห็นได้ชัดเจน ตรงกลางกระดองจะมีรอยขีด ขวางลำตัว 6-7 ขีด ส่วนท้องอ่อนนุ่มมีสีขาวอมชมพูหรือสีเหลืองอ่อน ๆ

ปลาฉลามส่วนใหญ่ชอบอาศัยตามแม่น้ำ ลำธาร และชอบที่มีน้ำนิ่งพื้นดินก้นน้ำเป็นโคลนหรือตะกอนดิน หรือทราย ในแหล่งน้ำทั่วไปซึ่งมีน้ำขังตลอดปี อาหารของปลาฉลาม ได้แก่ ปลา ปู หอย ลูกกบ ลูกเขียด บางครั้งก็กินพืชจำพวกยกอดไม้และผลไม้ที่หล่นลงในน้ำ โดยลักษณะนิสัยทั่วไปแล้วปลาฉลามเป็นสัตว์กินเนื้อมากกว่าสัตว์กินพืชปลาฉลามหายใจด้วยปอด แต่ขณะที่อยู่ใต้น้ำมันจะใช้อวัยวะที่เรียกว่า *rasculavpharyngcal capacity* เพื่อการหายใจ อวัยวะนี้จะทำหน้าที่คล้ายเหงือกของปลา ดังนั้นปลาฉลามสามารถกอดำอยู่ใต้น้ำได้เป็นเวลานาน ๆ โดยปกติปลาฉลามจะหาอาหารและเจริญเติบโตอยู่ในน้ำ แต่มันก็ชอบที่จะขึ้นมาบนบกและซุกหลุมฝังตัวเองอยู่ในทรายเป็นเวลานาน ๆ และจะโผล่เฉพาะส่วนจมูกขึ้นมาเหนือทรายเท่านั้น

ลักษณะนิสัยของปลาฉลามค่อนข้างดุ ก้าวร้าว ถ้าใช้มือจับที่ลำตัว หรือกระดอง มันจะเอี้ยวคอที่ยาวอยู่แล้ววกกลับมากัดมือได้ ปลาฉลามจะโตเต็มวัยเมื่อมีอายุประมาณ 20 เดือน ในรอบปีเพศเมียจะวางไข่ 3-4 ครั้ง การวางไข่ครั้งแรกขณะที่ปลาฉลามยังไม่โตเต็มที่ที่มีจำนวนระหว่าง 6-10 ฟอง เมื่อโตเต็มที่ที่มีจำนวนประมาณ 20-30 ฟองต่อครั้ง จำนวนไข่จะลดลงเมื่อปลาฉลามอายุมาก ตัวเมียจะวางไข่บนพื้นทรายหรือดินโคลนบนชายฝั่ง จำนวนไข่แต่ละครั้งยังไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับขนาดของแม่พันธุ์ ไข่จะฟักออกเป็นตัว ในเวลาต่อมาลูกปลาฉลามนั้นจะขึ้นมาจากหลุมฟักไข่เอง โดยไม่ต้องให้ความช่วยเหลือ และทันทีที่ขึ้นมาบนบกมักจะเดินไปหาแหล่งน้ำที่ใกล้ที่สุดทันที ปลาฉลามมีศัตรู คือ สัตว์จำพวกชอบกินไข่ปลาฉลาม นกบางชนิดที่ชอบดักกินปลาฉลามขนาดเล็ก กรณีที่ห่าน้ำได้เข้า ลูกปลาฉลามอาจจะถูกมดกัดตาย โรคที่สำคัญของตะพาบน้ำมาจากโปรโตซัว สารพิษ หรือเชื้อโรคต่าง ๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อโรคที่พบทั่วไปในน้ำแทรกซ้อนทำให้อาการรุนแรงยิ่งขึ้น เชื้อที่พบบ่อย ๆ คือ แบคทีเรียชนิดแอโรโมแนสไฮโดรฟิลลา และซุโดโมแนส ที่เป็นเชื้อที่ก่อโรคสำคัญในตะพาบ แต่ศัตรูสำคัญที่สุด คือ มนุษย์ ทั้งนี้เพราะเนื้อของปลาฉลามมีรสชาติอร่อย เนื้อหวาน ถูกใจผู้

บริโภคมันเอง จึงทำให้ปริมาณปลาฝาดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด จึงสมควรจะช่วยกันอนุรักษ์หรือเพาะพันธุ์ปลาฝาดในเชิงวิชาการและเชิงธุรกิจก็จะช่วยให้ปลาฝาดมีอยู่ตลอดไป (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, 2541)



ตะพาบน้ำ *Amyda cartilaginea* เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่จัดอยู่ในตระกูลเดียวกันกับตะพาน้ำพันธุไต้หวัน สายพันธุ์ *Amyda cartilaginea* จัดว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่หายาก เพราะพบได้เฉพาะประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เท่านั้น นอกจากนี้ในเอเชียใต้ก็พบได้ในประเทศเดียวคือ อินเดีย ลักษณะทางชีววิทยาและลักษณะนิสัยรวมทั้งการวางไข่หรือการติดเชื้อต่าง ๆ จะเหมือนกันกับตะพาน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, 2541)



ข้อมูลทั่วไปของเต่าตนุ

เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) เป็นเต่าทะเลที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ และมีน้ำหนักมาก หัวป้อมสั้น ปากสั้น เกล็ดเรียงต่อกัน (ไม่ซ้อนกัน) กระดองหลังโค้งนูนเล็กน้อย บริเวณกลางหลังเป็นแนวนูนเกือบเป็นสัน ท้องแบนราบ ขาทั้ง 4 แขนเป็นใบพาย ขาคู่หลังมีขนาดเล็กกว่าขาคู่หน้ามาก ขาคู่หน้ามีเล็บแหลมเพียงข้างละชิ้น สีของกระดองดูเ็น มีสีน้ำตาลแดงเท่านั้น แต่ถ้าหากพิจารณาให้ละเอียดจะเห็นว่าเกล็ดแต่ละเกล็ดของกระดองหลังมีสีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลอมเขียว ขอบเกล็ดมีสีอ่อน ๆ เป็นรอยต่างและมีลายเป็นเส้นกระจายออกจากจุดสีแดงปนน้ำตาล คล้ายกับแสงพระอาทิตย์ลอดออกจากเมฆ จึงมีผู้เรียกเต่าชนิดนี้ว่า “เต่าแสงอาทิตย์” ส่วนที่ชาวยุโรปเรียกว่า “เต่าเขียว” นั้นมีที่มาจาก 2 ประการ ประการแรก คือ กระดองหลังมีสีเหลืองปนเขียว ส่วนประการที่สองคือ น้ำมันที่ได้จากไขมันของเต่าตนุจะมีสีเขียว (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ , 2530)

เต่าตนุมีกระดองแข็งรูปไข่ เกล็ดกระดองหลังแถวที่สองมี 4 คู่ คู่แรกไม่ชนกับเกล็ดคอ คู่ที่ 4 มีขนาดเล็กที่สุด เกล็ดกระดองหลังไม่ซ้อนกันแต่ต่อกันคล้ายกระเบื้องปูพื้นเรียงกันขอบต่อขอบ เกล็ดหัวระหว่างจะงอยปากกับตา มีเพียง 1 คู่ เกล็ดขอบกระดองปกติมี 11 คู่ ปากสั้นไม่งุ้มลง (บุญเลิศ ผาสุก, 2535)

เต่าตนุชอบอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งและไหล่ทวีปที่เป็นแหล่งหญ้าทะเล ชอบกินพืชเมื่อถึงวัยโตเต็มที่ แต่ขณะที่ยังเป็นลูกเต่าวัยอ่อนและวัยรุ่นจะชอบกินเนื้อสัตว์จำพวกกุ้ง ปลา หอย

และสัตว์อื่น ๆ เตาตุนมีการอพยพย้ายถิ่นไกล ๆ ระหว่างแหล่งที่มีหญ้าทะเลและแหล่งวางไข่ และมักจะกลับมาวางไข่แหล่งเดิมโดยวางไข่ในเวลากลางคืน และเลือกหาวางไข่เช่นเดียวกับเตากระ จึงมักพบเตาทั้งสองชนิดนี้ในแหล่งวางไข่แหล่งเดียวกันเสมอ แต่มักพบเตาตุนในจำนวนมากกว่าเตากระ

เตาตุนเป็นเตาทะเลที่พบอยู่ทั่วโลกในบริเวณที่มีอุณหภูมิของน้ำไม่ต่ำกว่า 20°C แต่อาจจะพบในแหล่งที่มีอุณหภูมิของน้ำต่ำกว่านี้ได้เช่นกัน ชอบแหล่งอาหารและแหล่งวางไข่ที่มีอุณหภูมิสูง ในปัจจุบัน จะพบเตาตุนขึ้นวางไข่ชุกชุมมากในมหาสมุทรแปซิฟิก บริเวณทวีปออสเตรเลีย และอินโดนีเซียและทะเลแคริบเบียน ส่วนในประเทศไทย เตาตุนจัดเป็นเตาที่มีชุกชุมที่สุดในน่านน้ำไทย ในอดีตได้เคยพบเตาตุนขึ้นวางไข่ชุกชุมในบริเวณเกาะต่าง ๆ ของจังหวัดชลบุรี (โดยเฉพาะที่เกาะคราม) เกาะกระของจังหวัดนครศรีธรรมราช ชายหาดของจังหวัดปัตตานีและนราธิวาส รวมทั้งเกาะกูดและเกาะช้างของจังหวัดตราด ส่วนในทะเลอันดามัน จะพบเตาตุนบริเวณเกาะตะรุเตา และเกาะอาดังของจังหวัดสตูล ภูเก็ต และพังงา แต่ในปัจจุบันเหลือแหล่งวางไข่ของเตาตุนเฉพาะที่เกาะครามเท่านั้น ส่วนในแหล่งอื่น ๆ อาจพบเตาตุนขึ้นวางไข่บ้าง แต่มีจำนวนน้อยมาก (บุญเลิศ ผาสุก , 2535)

ในอ่าวไทย เตาตุนขึ้นวางไข่ตลอดทั้งปี แต่มีช่วงที่ขึ้นวางไข่ชุกชุมระหว่างเดือนเมษายนหรือพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคมของทุกปี ถ้าปีใดฤดูฝนมาตามปกติเตาตุนก็จะขึ้นวางไข่ชุกชุมในเดือนเมษายน แต่ถ้าปีใดฝนตกชุกก็จะพบในเดือนพฤษภาคม ส่วนเดือนมิถุนายนจะพบปริมาณมากที่สุด แม้เตาตุนจะวางไข่ 4 ครั้ง/ฤดู (เฉพาะที่สำรวจพบในประเทศไทย) และที่พบมากที่สุด 12 ครั้ง ที่ซาราวักของมาเลเซีย แต่แม่เตาจะไม่วางทุกปี โดยปกติจะมีวงจร 2 ปีกลับมาวางไข่ใหม่ในแหล่งเดิม ส่วน 3 ปี มีพบบ้างในประเทศไทย แต่เตาตุนในแหล่งวางไข่อื่น ๆ ส่วนใหญ่จะมีวงจร 3 ปี เตาตุนจะวางไข่ครั้งละประมาณ 91 ฟอง/ครั้ง เฉลี่ย 148 ฟอง/ฤดู แต่ครั้งมีช่วงเวลาห่างกันประมาณ 37 วัน (พิสัย 3-89 วัน) แม่เตาที่สำรวจพบในประเทศไทยมีกระดองยาวเฉลี่ย 98 ซม. (พิสัย 78-118 ซม.) กว้างเฉลี่ย 86.2 ซม. (พิสัย 69-109 ซม.) และน้ำหนัก 98 กก. (พิสัย 64.5-116.2 กก.) ไข่ในหลุมที่แม่เตาวางไข่ไว้ในธรรมชาติจะใช้เวลาฟักออกเป็นตัวประมาณ 47 วัน (พิสัย 45-48 วัน) อัตราการฟักเฉลี่ยร้อยละ 83.23 อายุที่สามารถสืบพันธุ์ได้ ประมาณ 12-15 ปี แต่เตาตุนในเม็กซิโก สืบพันธุ์ได้เมื่ออายุ 8-9 ปี ขนาดกระดองยาว 68 ซม. วางไข่เฉลี่ย 264 ฟอง/ฤดู (บุญเลิศ ผาสุก, 2535)

เนื้อเตาตุนเป็นที่นิยมของชาวยุโรป โดยนำมาปรุงสุก จัดเป็นอาหารรสเลิศ และราคาแพง ไข่ของเตาชนิดนี้เรียกว่า ไข่จะละเม็ด มีรสอร่อยและราคาแพง กระดองของเตานิยมทำเป็นเครื่องประดับและตกแต่งบ้าน (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2530)

ประชากรของเต่าตนุได้ลดน้อยลงมากทั้งในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน เช่นเดียวกับเต่ากระ แต่ยังมีปริมาณมากกว่าเต่ากระประมาณ 5 เท่า และเป็นเต่าทะเลที่มีชุกชุมมากที่สุดใต้น่านน้ำไทยในปัจจุบัน แต่คงเหลือแหล่งวางไข่ที่สำคัญเฉพาะที่เกาะครามของจังหวัดชลบุรีเท่านั้น (บุญเลิศ ผาสุก, 2535)

จากการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อต่าง ๆ ที่สามารถทำให้เกิดโรคในเต่าตนุ พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย, parasites, *E.coli*, *Salmonella*, *Citrobacter freundii*, *Moraxella* sp. และอื่น ๆ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแกรมลบเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เต่าตนุมีอาการป่วยและตายมากที่สุด (Raidal SR et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีโรคที่นำก๊วและกำลังคุกคามอย่างแพร่หลายในกลุ่มประชากรของเต่าตนุ คือ โรค fibropapillomatosis (papillomas) โรคนี้เกิดครั้งแรกนานกว่า 50 ปีแล้ว และมักเกิดกับเต่าตนุที่โตเต็มวัยโดยจะพบว่าเต่าตนุที่ป่วยเป็นโรคนี้จะมีก้อนอาศัยแถบ Florida, Mexico, Pacific, West Atlantic, Caribbean และ Indian Oceans (Stefanie Barrett, 1996) โรคชนิดนี้เกิดจากเชื้อไวรัส อาการคือเกิดเป็น tumors แข็ง (Aguirre A.A et al., 1999) ซึ่ง tumors นี้จะเกิดบริเวณผิวที่อ่อนนุ่ม เช่น คอ คาง ปาก ตา ครีบก้น และหาง (Stefanie Barrett, 1996) tumors จะมีขนาดประมาณ 1 มม. จนถึง 30 ซม. (Sea Turtle Conservation Bonaire, 1999) และยังพบอีกว่า papillomas สามารถทำให้เต่าตนุตายลงเป็นจำนวนมาก (Sea Turtle Survival League, 1998)

ฉะนั้น ในรายงานฉบับนี้ จะทำการแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติทางด้านเคมีบางประการ (characterizations) พร้อมทั้งมีการศึกษา primary structure และสายวิวัฒนาการของไลโซไซม์จากไขขาวของตะพาบน้ำพันธุ์ Asiatic soft shell turtle ซึ่งเป็นไลโซไซม์จากสัตว์เลื้อยคลานชนิดใหม่ รวมทั้งตะพาบน้ำสายพันธุ์ได้หวัน และเต่าทะเล (green sea turtle) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย เอนไซม์ไลโซไซม์ทั้ง 4 ชนิดที่สามารถแยกบริสุทธิ์ได้นั้นมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านโครงสร้างและการทำงานซึ่งขึ้นกับ pH และ ionic strength ที่แตกต่างกัน และรายงานฉบับนี้ก็เป็นรายงานแรกที่มีการพบ multiple lysozymes ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

1.1 ไข่ของตะพาบน้ำ และเต่าทะเล

- ไข่ของตะพาบน้ำ soft shell turtle (*Tyonyx sinensis taiwannese*) ที่ได้จากบางเสิร์ฟาร์ม ตะพาบน้ำ ต.บางเสร์ อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี ประเทศไทย
- ไข่ของเต่าทะเล Green sea turtle (*Chelonia mydas*) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี ประเทศไทย
- ไข่ของตะพาบน้ำ Asiatic soft shell turtle (*Amyda cartilaginea*) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด จ.กาญจนบุรี ประเทศไทย
- ไส้โซ่หมึกจากไข่ขาวไข่ไก่ และ *Micrococcus luteus* ที่ได้จากบริษัท Sigma สหรัฐอเมริกา

1.2 สารเคมี และเครื่องมือ

สารเคมีต่าง ๆ รวมทั้งเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ที่ได้จากบริษัทผู้ผลิตผ่านตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมไข่ขาวจากไข่ตะพาบน้ำและไข่เต่าตนุ

นำไข่ตะพาบน้ำและไข่เต่าตนุออกจากตู้แช่ -70°C พร้อมกับภาชนะที่จะเก็บไข่ขาวนำไปแช่ในน้ำแข็ง แบ่งไข่มาครั้งละ 1 ฟอง ใช้ forceps หรือปากคีบค่อย ๆ แกะเปลือกไข่ออกและคีบเอาเฉพาะส่วนของไข่ขาวที่แข็งเป็นเกล็ดน้ำแข็งใส่ลงในปิเปตที่เตรียมไว้ ส่วนไข่ขาวที่ละลายให้ใช้ pasture pipette ดูดเก็บรวมกับส่วนที่เป็นเกล็ดน้ำแข็ง ควรเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นไข่ขาว หากมีไข่แดงปน ควรแยกไข่แดงออกให้ได้มากที่สุด (ถ้าเป็นไข่เต่าใหม่ ๆ ให้เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C หนึ่งคืนแล้วจึงนำไข่มาแยก จะทำให้แยกไข่ขาวได้ง่าย) เมื่อเก็บไข่ขาวได้ประมาณ 50 ml แล้วให้เก็บใส่ขวดพลาสติก เก็บที่อุณหภูมิ -70°C

2.2 การเตรียม resin (activate CM-Toyopearl 650M cation exchange resin)

ละลาย resin ใน 0.5 M HCl stir เบาละ 30 นาที แล้วล้าง resin ด้วยน้ำกลั่นสองครั้งหลาย ๆ รอบ ให้ได้ pH ประมาณ pH 7.0 จากนั้นนำ resin ที่ได้ pH ประมาณ pH 7.0 แล้วแช่ใน 0.5 M NaOH stir เบาละ 30 นาที แล้วนำ resin ไปล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้งหลาย ๆ รอบ ให้ได้ pH ประมาณ pH 7.0 ทำการแช่ resin ใน 0.5 M HCl อีกครั้งและ stir เบาละ 30 นาที

30 นาที แล้วล้าง resin ด้วยน้ำกลั่นสองครั้งหลาย ๆ รอบ จนได้ pH ประมาณ pH 7.0 ขั้นตอนสุดท้ายให้แช่ resin ใน 0.03 M sodium phosphate buffer pH 7.0 เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 °C

2.3 การเตรียม Sephadex G-50

ค่อย ๆ โปรย sephadex G-50 ลงในบีกเกอร์ที่มี 0.03 M PB pH 7.0 (ปริมาณมาก ๆ) พร้อมกวนเบา ๆ ด้วยแท่งแก้วคน เพื่อให้เม็ดเจลพองตัว แล้ววางบีกเกอร์ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ไม่ให้ผิวภาชนะที่ใส่เจลสัมผัสกับก้นอ่างน้ำเดือดหรือเปลวไฟโดยตรง) โดยกวนเบา ๆ เป็นระยะ ๆ ซึ่งทำให้เจลบวมขึ้น และเป็นทั้งการไล่อากาศออกจากเจลไปในตัว เมื่อครบเวลาแล้วให้วางบีกเกอร์ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างรอให้เย็นลงนี้สามารถกำจัดผง fines โดยการกวนเบา ๆ แล้วตั้งไว้ให้เจลทิ้งตัวลงเหลือปริมาณ 90-95% ของ gel slurry ใช้ pasture pipette ดูดผง fines ที่แขวนลอยในชั้นน้ำทิ้ง ทำซ้ำจนเห็นว่าชั้นน้ำใสปราศจากผง fines เจลที่บวมขึ้นและไล่ฟองอากาศออกแล้วนี้ หากเก็บไว้นาน เมื่อจะนำมาใช้ใหม่ จำเป็นจะต้องทำการ activate ใหม่ โดยนำมาต้มในอ่างน้ำโดยใช้อุณหภูมิ 90°C พร้อมกวนเบา ๆ เป็นระยะ ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้นำมาวางไว้ให้เย็น เทชั้นน้ำใสทิ้ง แล้วใส่บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการ equilibrate ลงไปแทน เก็บเจลไว้ที่ 4°C

2.4 การ pack column (CM-Toyopearl 650M cation exchange resin)

ก่อนที่จะทำการ pack column นั้น activated resin ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 °C จะต้องทำให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศขณะ pack column เมื่อ activated resin มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วจึงเริ่ม pack column โดยใช้ column ขนาด 1.5 x 90 cm ให้ค่อย ๆ เท resin ลงใน column แล้วปล่อยให้เม็ด resin ตกลงใน column ตาม flow rate ที่กำหนด (15 ml/hr) และก่อนที่จะเท resin ลงใน column ครั้งต่อไปจะต้องกวนหน้า resin เพื่อให้เกิดการตกแบบ homogeneous หลังจาก pack column เสร็จแล้วให้ equilibrate column ข้ามคืนด้วย 0.03 M sodium phosphate buffer pH 7.0 โดยปรับ flow rate ให้ตรงหรือใกล้เคียงกับ flow rate ที่ต้องการ (15 ml/hr)

2.5 การ pack column (Sephadex G-50)

ก่อนที่จะทำการ pack column นั้น activated resin ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C จะต้องทำให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศขณะ pack column เมื่อ activated resin มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วจึงเริ่ม pack column โดยใช้ column ขนาด 1.6 x 200 cm ให้ค่อย ๆ เท resin ลงใน column ซึ่งจะต้องทำการ pack อย่างต่อเนื่องไม่ปล่อยให้เม็ด resin ตกลงใน column ทั้งหมดโดยกวนหน้าเจลเบา ๆ แล้วเทเจลทันที ทำแบบนี้ไปเรื่อย ๆ จน

กว่าจะได้ระดับของเจลตามต้องการ ด้วย flow rate 30 ml/hr หลังจาก pack column เสร็จแล้วให้ equilibrate column ซ้ำมคืนด้วย 0.03 M sodium phosphate buffer pH 7.0 หรืออย่างน้อย 2 เท่าของ column volume โดยปรับ flow rate ให้ตรงหรือใกล้เคียงกับ flow rate ที่ต้องการ (30 ml/hr)

2.6 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไลโซไซม์จากตะพานน้ำ soft shelled turtles

ไลโซไซม์จากไขขาวของตะพานน้ำ Asiatic soft shelled turtle (ASTL) และตะพานน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน soft shelled turtle (SSTL) จะทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีเดียวกัน คือ ไขขาวจากตะพานน้ำแต่ละชนิด จะถูกเจือจางลง 3 เท่า ด้วย 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 แล้วคนให้เข้ากันที่ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ 12000 xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งส่วนนี้เรียกว่า crude enzyme ไปทำการตกตะกอนด้วยเทคนิค isoelectric precipitation ที่ pH 4.0 ด้วย 1 M HCl คนให้เข้ากันที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 12000 xg เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส แล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ pH 7.0 โดย 1 M NaOH โดยทำเหมือนกันกับการตกตะกอน ที่ pH 4.0 แล้วเก็บ supernatant ไว้ ทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ CM-Toyopearl 650M cation exchange column ขนาด 1.3 x 90 cm ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 แล้ว จากนั้นทำการล้าง column ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ equilibrate แล้วทำการชะโปรตีนที่จับอยู่ใน column โดยใช้ linear gradient ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.0-0.25 M ที่เตรียมใน 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 และใช้อัตราเร็วของการชะ คือ 15 ml/h ทำการรวม fraction ที่มี activity ของเอนไซม์ไลโซไซม์ แล้วนำไปแยกเกลือที่ปนอยู่ออกไปด้วยการทำ Dialysis ในน้ำกลั่น เมื่อเกลือออกมาหมดแล้วก็นำไปทำให้แห้งโดยการทำ lyophilize เพื่อนำไปศึกษาทางด้านเคมี (characterization) ต่อไป

2.7 การแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไขขาวของเต่าทะเล green sea turtle

การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไลโซไซม์จากไขขาวของไขเต่าทะเล green sea turtle จะทำวิธีเดียวกันกับการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไขขาวของตะพานน้ำแต่การทำให้บริสุทธิ์ต้องการการแยกเพิ่มใน gel filtration chromatography ซึ่งมีวิธีการเตรียม Crude enzyme เช่นเดียวกับการเตรียมไขขาวของตะพานน้ำ โดย crude enzyme ที่ได้จะถูก applied ลงใน CM-Toyopearl 650 M cation exchange column ที่ผ่านการ equilibrate ด้วย 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 แล้ว จากนั้นล้าง column ด้วยบัฟเฟอร์เดียวกัน และชะโปรตีนที่ถูกจับใน column ออกมาแบบ linear gradient โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.0-0.3 M ที่เตรียมใน 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 และใช้อัตราเร็วของการชะ คือ 15 ml/h รวม fraction ที่มี activity ของไลโซไซม์เพื่อ

นำไปแยกเกลือออกด้วยวิธี Dialysis ในน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer เอนไซม์ไลโซไซม์ที่ได้นี้ จะยังไม่บริสุทธิ์ (partial purified enzyme) ฉะนั้น จะต้องนำมาแยกบริสุทธิ์ ต่อด้วย sephadex G-50 gel filtration chromatography (1.6x200 cm) ที่ได้ทำการ equilibrated ด้วย 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 แล้ว และชะโปรตีน ด้วยบัฟเฟอร์เดิม จากนั้นจึงรวม fraction ที่มี activity มาทำ dialysis ในน้ำกลั่น แล้วจึงทำ lyophilized ซึ่งจะได้ ไลโซไซม์ที่บริสุทธิ์ ไว้ทำการศึกษาด้านเคมีต่อไป

2.8 การวัด activity ของไลโซไซม์ (Enzyme assay)

การวัด activity ของไลโซไซม์ โดยทำการเตรียมสไลด์สเตรทจากเซลล์แห้งของ *Micrococcus luteus* ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 นำไปวัดค่า OD_{540nm} ให้ได้เท่ากับ 1 แล้วปิเปตมา 3 ml จากนั้นเติมเอนไซม์ไลโซไซม์ ปริมาตร 10-100 μ l ลงในสไลด์สเตรท แล้ววัดค่า OD_{540nm} ที่ลดลงในหน่วย Unit/ml ซึ่ง 1 Unit ของเอนไซม์ไลโซไซม์ หมายถึง ค่า OD_{540nm} ที่ลดลง 0.1 ในเวลา 1 นาที ที่ 25 °C

2.9 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลโซไซม์

การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้นี้ จะใช้วิธีของ Laemmli (1970) คือ SDS-PAGE ซึ่งจะใช้ 4% (w/v) stacking gel และ 12.5% (w/v) resolving gel จากนั้นย้อม gel ด้วย coomassie brilliant blue R-250 (CBB) จะได้แถบโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลได้ โดยเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งได้แก่ phosphorylase B (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa) และ standard marker ของ Precision Plus All Blue Standard (Bio-Rad, USA)

2.10 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

การหาความเข้มข้นของโปรตีน จะทำระหว่างการแยกบริสุทธิ์โดยใช้วิธีของ Lowry (1951)

2.11 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

โปรตีนที่ถูกชะออกมาในระหว่างการแยกบริสุทธิ์ จะถูกนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยใช้เครื่อง Shimadzu UV-160A spectrophotometer

2.12 Refolding gel electrophoresis

เซลล์ของ *M.luteus* ถูกติดฉลากด้วย vinyl-sulfone reactive dye RBB (Rinderknecht et al., 1967) และทำ refolding gel ตามวิธีของ Hardt และคณะ (2003) โดย PAGE จะใช้ 4% (w/v) stacking gel และ 12.5% (w/v) resolved gel ที่มี 0.1% (w/v) blue *M.luteus* cell ซึ่งการทำ refolding gel นี้จะมี 0.1% (w/v) SDS เป็นองค์ประกอบทั้งใน resolving gel และ buffer จากนั้นเตรียมสารตัวอย่างโดยผสมสารตัวอย่างกับ 2x sample buffer ที่ไม่มี reducing agent (62.5 mM Tris buffer pH 6.8, 0.006% (w/v) bromophenol blue as stacking dye, 20% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS) แล้วป้อน สารตัวอย่างที่เตรียมไว้ ปริมาตร 10 μ l มา load ลงบน gel แล้วทำ Electrophoresis โดยใช้เครื่อง Mighty Small SE245 (Hoefer Scientific Instruments Sanfrancisco) เป็นเครื่องมือให้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ รอจนกว่า dye front จะลงมาถึงขอบล่างของแผ่นเจลซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อล้าง SDS ออกจากเจล แล้วแช่เจลลงใน 300 ml refolding buffer (50 mM NaHPO₄, pH 7.0 containing 1% (v/v) Triton X100) และเขย่าเบา ๆ ที่ 37 °C จนมองเห็น clear zone แล้วนำไปถ่ายรูปโดยใช้ background สีดำ ซึ่งอาจมีการย้อมทับด้วย Coomassie brilliant blue R-250 และนำไปถ่ายรูปอีกครั้ง

2.13 การทำ Native-PAGE

การทำ Native-PAGEจะเป็นการแยกโปรตีนที่มีประจุบวก (Reisfeld et al., 1962) โดย ผสมสารตัวอย่างกับ loading dye (50% glycerol-methylene blue) load สารที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วลงใน 18% separating gel, 4% stacking gel ที่มี 0.56 M potassium acetate, 0.56 M Tris pH 6.4 นำไป Run ใน electrode buffer (35 mM β -alanine acetic pH 4.1) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 mA ที่ 4 °C เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย coomassie brilliant blue R-250

2.14 ผลของ pH ต่อการทำงานของไลโซไซม์

เอนไซม์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพาน้ำและเต่าทะเล จะถูกนำมาศึกษาความสามารถในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย (lytic activity) เปรียบเทียบกับไลโซไซม์ HEWL ซึ่งใช้เป็นมาตรฐาน เริ่มจากการเตรียม buffer ที่เรียกว่า Miller & Golder buffer โดยให้มี pH เป็น 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ ionic strength 0.1 จากนั้นเตรียมสับสเตรท ณ pH ต่าง ๆ โดยใช้ buffer ที่เตรียมไว้โดยนำ buffer มา 50-100 ml มา stir เบา ๆ แล้วค่อย ๆ เติม lyophilized *M.luteus* ลงไป

แบ่งไปวัดค่า OD_{540nm} ให้อยู่ในช่วง 0.99-1.00 หากได้ค่าต่ำกว่าให้เติมเซลล์แบคทีเรียลงไปอีก แต่ถ้าค่าสูงไปให้เจือจางด้วย buffer จากนั้นให้ stir ต่ออีกหกชั่วโมง เมื่อได้สับสเตรตที่อยู่ใน buffer ที่มี pH ต่างๆดังกล่าวแล้วนำไปศึกษา pH optimum ซึ่ง *M.luteus* จะถูกเตรียมใน Miller Golder buffer pH 4.0 ถึง pH 9.0 ที่มี ionic strength 0.1 และ 0.05 และนำไปวัด activity ของเอนไซม์

2.15 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการทำงานของไลโซไซม์

สารถละลายเอนไซม์จาก SSTL, GSTL และ HEWL แต่ละชนิดจะถูกนำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 90 °C เมื่อครบ 30 นาที เอนไซม์แต่ละชนิดจะถูกเติมลงใน *M.luteus* ที่เตรียมใน 0.1 M phosphate buffer pH7.0 ionic strength 0.1 แล้ววัดค่า OD_{540nm} ที่ลดลง ซึ่งได้อธิบายการหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไว้แล้วใน Enzyme assay ในกรณีนี้ จะทำการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ ทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.16 การรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ และทำ carboxymethylation

นำโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้ว 10 mg ละลายใน 1 ml ของ 1.4 M Tris-HCl pH 8.6 หลังจากนั้นเติม 100 ul ของ 5% EDTA และ 1.2 g ของ urea เขย่าจน urea ละลายหมดแล้วเติม 33 ul ของ β-mercaptoethanol แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2.5 ml เป่าด้วย N_{2(g)} แล้ว incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 300 ul ของ 1 M NaOH ที่มี 89 mg ของ iodoacetic acid เป่าด้วย N_{2(g)} เก็บที่อุณหภูมิห้องและไม่มีแสงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Crestfield et al., 1963) แยกเกล็ดต่างๆ ออกจาก carboxymethylated protein โดยใช้ Sephadex G-50 column (1x100 cm) โดยใช้ 0.2 M NH₄OH เป็นตัวชะ แล้วทำ lyophilized carboxymethylated protein ก่อนนำไปศึกษาต่อไป

2.17 การตัดไลโซไซม์โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน (tryptic digestion)

ละลาย carboxymethylated lysozyme ด้วย 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1 ml เติม Trypsin TPCK treated ให้ได้อัตราส่วนของ carboxymethylated lysozyme : Trypsin TPCK treated เป็น 50:1 w/w จากนั้น incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยนำออกมาเขย่าทุก ๆ 30 นาที เพื่อช่วยในการละลายและการตัดที่สมบูรณ์ แล้วนำไปกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 um แล้วแช่ไว้ที่ -20 °C ก่อนนำไปแยกด้วย HPLC

2.18 การทำแผนที่โปรตีน (peptide mapping)

ในการทำแผนที่โปรตีนจะใช้เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ตัดไลโซไซม์ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นและทำการแยกเปปไทด์ที่ถูกตัดนี้โดยใช้ C18 reversed phase HPLC แล้วเปรียบเทียบเปปไทด์ chromatogram ของไลโซไซม์จากไข่ไก่ และไลโซไซม์จากไข่ตะพานน้ำซึ่งตัดด้วยเอนไซม์และสภาวะการแยกด้วย HPLC ที่เป็นแบบเดียวกันคือ การใช้ solvent system ของ solvent A : 0.1% TFA solvent B : 60% acetonitrile in solvent A โดยมีการชะแบบ gradient คือ นาที่ที่ 0-130 จะได้ % 0-50 solvent B และสุดท้าย นาที่ที่ 130-140 จะมี 100% solvent B และตรวจวัดเปปไทด์ที่ค่าความยาวคลื่น 220 nm แล้วดูตำแหน่งของ peak บน chromatogram ว่ามี peak ไດที่มีตำแหน่งตรงกัน (มี retention time ที่ตรงกัน) และเมื่อนำ peak ของ เปปไทด์สารตัวอย่าง (ไลโซไซม์จากเต้านู) ไปหาองค์ประกอบของกรดอะมิโนแล้วตรงกันกับของไลโซไซม์ที่แยกได้จากไข่ไก่ (ซึ่งทราบแล้วว่าแต่ละ peak นั้นมีองค์ประกอบและลำดับของกรดอะมิโนเป็นอย่างไร) หรือตรงกับไลโซไซม์ที่แยกได้จากไข่ตะพานน้ำ ก็จะถือว่า peak ดังกล่าวนี้อันดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับไลโซไซม์จากไข่ไก่และไข่ตะพานน้ำ (Araki et al., 1998, Araki et al., 2000, Thammasirak et al., 2002 และ สุทธิเดช ปรีชารัมย์ และสมปอง ธรรมศิริรักษ์, 2546)

2.19 การหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเส้นโปรตีน

ใส่ sample (โปรตีนหรือเปปไทด์) ลงในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 mm ทำให้แห้งโดย speed vac ใช้ตะเกียงบุนเส้นหลอดทดลองบริเวณกลางหลอด เพื่อให้หลอดคอดเล็กน้อยและมีขนาดยาวขึ้น เติม 6 M HCl ที่มี 0.05% β -mercaptoethanol จำนวน 500 μ l ใช้ปิ๊มดูดอากาศออกพร้อมกับปิดผนึกหลอดทดลองโดยใช้ความร้อนจากตะเกียงบุนเส้น ทำการไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยใช้ตู้อบความร้อนสูง (hot air oven) หลังจากนั้นตัดปากหลอดทดลองให้แตก แล้วทำให้ sample แห้งโดยใช้ vacuum ละลาย sample ใน 0.02 M HCl กรอง sample ผ่าน membrane ขนาด 0.45 μ m นำไปวิเคราะห์หากรดอะมิโนอิสระโดยวิธี HPLC แบบ post column derivatization ด้วย OPA ด้วย shimadzu LC10AD system และวิธี post column derivatized with Ninhydrin (Model L8500A, Hitachi Co., Japan)

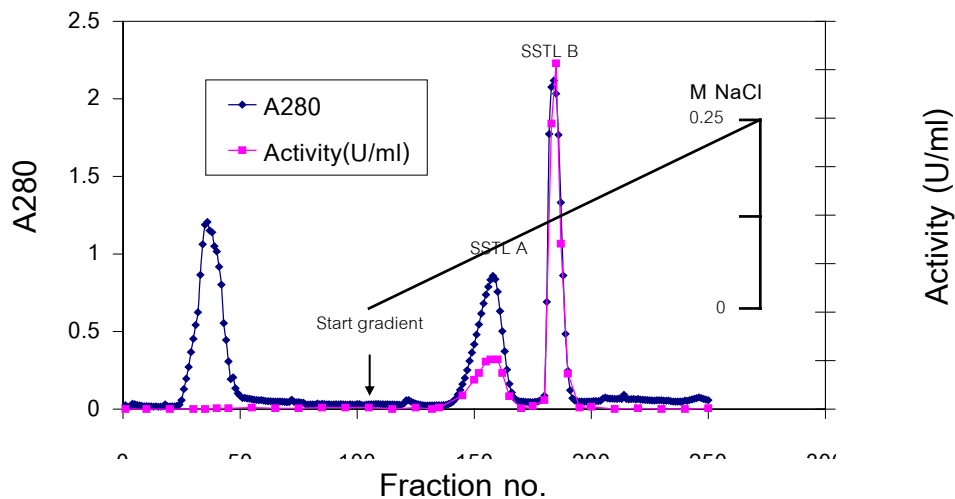
2.20 การหาลำดับกรดอะมิโนของไลโซไซม์

ไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากตะพานน้ำและจากเต้านู จะถูกนำไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง automated protein sequencer (PSQ-1-Shimadzu Co., Japan), ที่ประเทศญี่ปุ่น และเครื่อง ABI Model 473A Applied Biosystems Co., Japan. ที่ศูนย์วิจัยจุฬารักษ์ กรุงเทพมหานคร

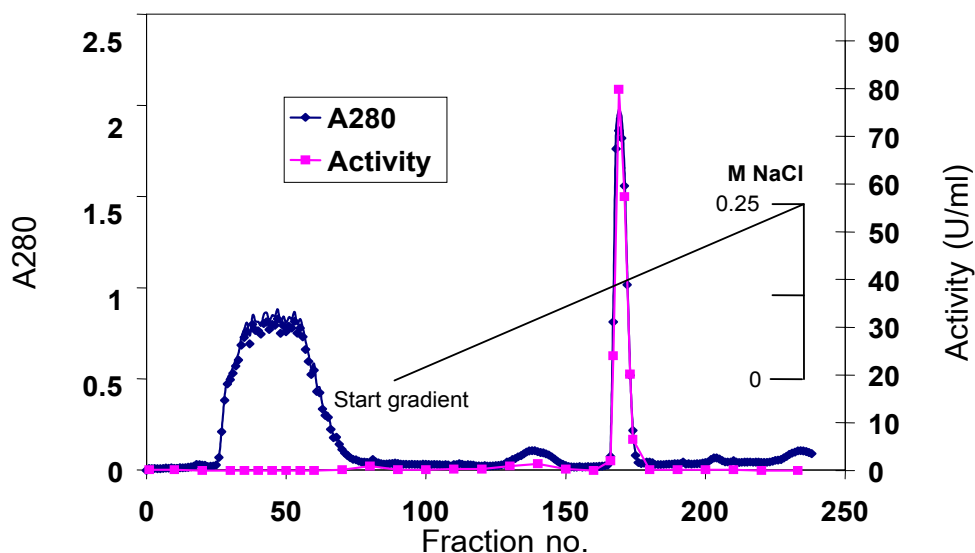
ผลการทดลอง

1. การแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของ ตะพาน้ำและเต่าทะเล

จากการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไลโซไซม์จากไข่ขาวโดยใช้ pH precipitation และ CM-toyopearl 650M column chromatography จะพบว่า ไลโซไซม์ที่แยกได้จากไข่ขาวของไข่เต่าและ ตะพาน้ำแต่ละชนิดจะมีจำนวนและ elution profile ของเอนไซม์ที่แตกต่างกันดังรูปที่ 1-4

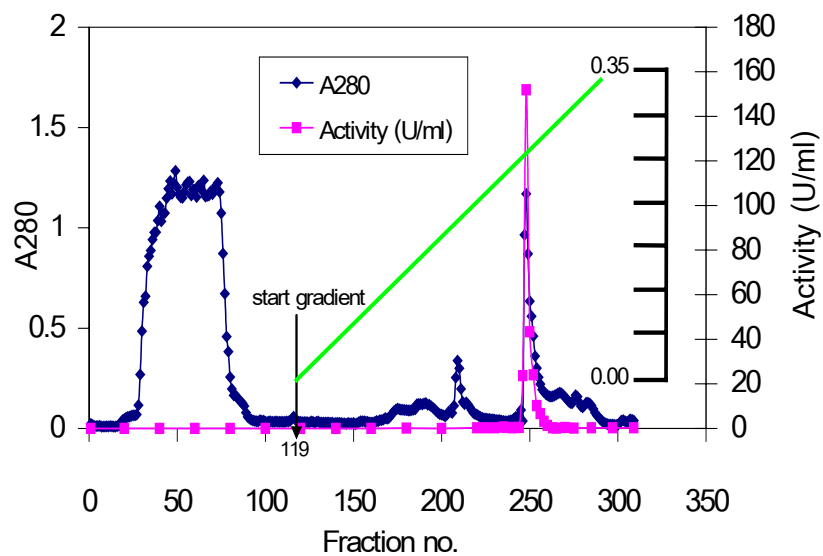


รูปที่ 1 elution profile ของการทำบริสุทธิ์ SSTLs ด้วย CM-Toyopearl 650M cation exchange column chromatography ขนาด 1.5 x 85 cm flow rate 15 ml/hr ทะโพรตีนออกจากคอลัมน์แบบ linear gradient ของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จาก 0.00-0.25 M

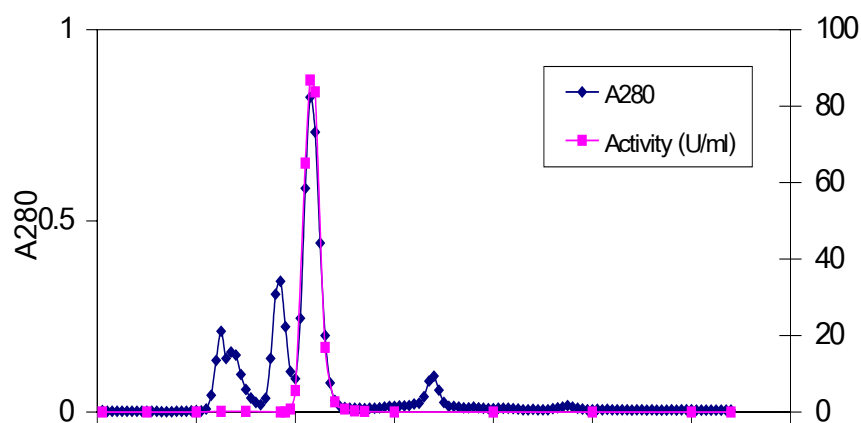


รูปที่ 2 elution profile ของการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพาน้ำ (*Amyda cartilaginea*) ด้วย CM-Toyopearl 650 M cation exchange column chromatography

ขนาด 1.5×85 cm flow rate 15 ml/hr จะโปรตีนออกจากคอลัมน์แบบ linear gradient ของความเข้มข้นของเกลือ 0.00-0.25 M NaCl ใน 0.03 M phosphate buffer pH 7.0



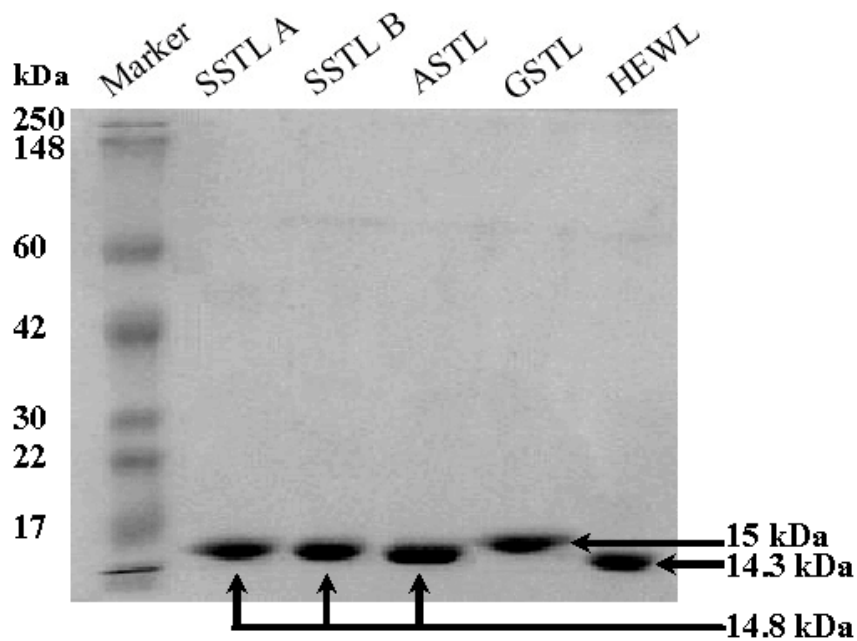
รูปที่ 3 elution profile ของการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่เต่าตนุ (GSTL) ด้วย CM-Toyopearl 650 M cation exchange column chromatography ขนาด 1.5 x 85 cm flow rate 15 ml/hr แบบ linear gradient 0.00-0.35 M NaCl ใน 0.03 M PB pH 7.0 และ wash ตามด้วย 0.5 M NaCl ใน 0.03 M PB pH 7.0



รูปที่ 4 elution profile ของการแยกบริสุทธิ์ GSTL ด้วย Sephadex G-50 column chromatography ขนาด 1.6 x 200 cm flow rate 30 ml/hr จะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย 0.03 M phosphate buffer pH 7.0

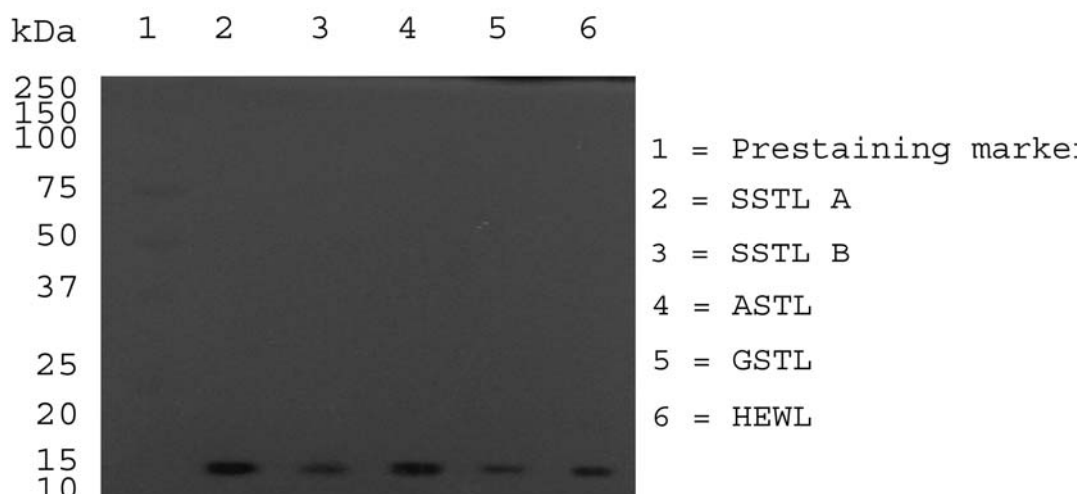
จากผลการทดลองพบว่าไลโซไซม์ตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน (SSTLs) และไลโซไซม์จากตะพาบน้ำ Asiatic soft shelled turtle (ASTL) สามารถแยกบริสุทธิ์ได้โดยใช้เทคนิค pH precipitation และ CM-Toyopearl 650M cation exchange chromatography ซึ่งผลของการแยกบริสุทธิ์ SSTL พบว่า จะได้ โปรตีน 2 peak (Peak A ; SSTL A และ Peak B ; SSTL B) ที่มี activity ของไลโซไซม์ซึ่งจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วยเกลือความเข้มข้นประมาณ 0.05 M และ 0.1 M NaCl ตามลำดับ (รูปที่ 1) ส่วน ASTL (*Amyda cartilaginea*) และ GSTL (*Cheloniamydas*) นั้นก็ถูกแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีเดียวกันกับ SSTL และพบว่า elution profile ของ ASTL จะแยกโปรตีนได้ 2 peak เช่นเดียวกันกับ SSTL แต่จากผลการศึกษาพบว่าโปรตีนเพียง peak เดียวที่มี activity ของไลโซไซม์สูงที่สุดคือสามารถทำลายผนังเซลล์ของ *M. Luteus* ได้ดีที่สุด (รูปที่ 2) ส่วนการแยกบริสุทธิ์ GSTL พบว่า จะต้องใช้อย่างน้อยสองคอลัมน์ในการทำบริสุทธิ์ โดยเมื่อแยกโปรตีนไลโซไซม์โดย CM-Toyopearl 650M cation exchange chromatography จะมีโปรตีนเพียง peak เดียวเท่านั้นที่มี activity ของเอนไซม์ไลโซไซม์ (รูปที่ 3) แต่เมื่อนำ peak ของเอนไซม์นี้ไปตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่ายังมีโปรตีนอื่นปน จึงแยกบริสุทธิ์สารละลายโปรตีนที่ได้จากคอลัมน์นี้โดย gel filtration และสามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของเต่าตนุได้ (รูปที่ 4)

การศึกษครั้งนี้ได้แยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่ในกลุ่มของเต่า 3 ชนิด นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาไลโซไซม์ในไข่ขาวของสัตว์เลื้อยคลานชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น เต่าทะเล Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricate*) เต่าน้ำจืด (*Cuora amboinensis*) อีกัวนา (*Eguanes eguna*) จากไข่ขาวของจิ้งจก และตุ๊กแก แต่พบว่าในไข่ขาวของสัตว์เลื้อยคลานเหล่านี้ไม่มี activity ของ lysozyme (ไม่สลายผล) การที่พบว่าในไข่ขาวของตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวันพบไลโซไซม์ 2 ชนิด แต่ในไข่ขาวของเต่าทะเล green sea turtle พบเพียง 1 ชนิดเท่านั้น ผลการทดลองแสดงได้ว่า ไลโซไซม์ในไข่ขาวของสัตว์เลื้อยคลานมีการแสดงออกที่ต่างกันและการพบไลโซไซม์หลายชนิดในไข่ขาวนี้ก็อาจแสดงถึงการมี biological function ที่แตกต่างกันของไลโซไซม์ จากที่เคยมีรายงานพบว่า ไข่ขาวของไข่เป็ด (Prager and Wilson, 1971) นกกระทา (Baker and Manwell, 1967) น้ำตากระต่าย (Saleh and Ibrahim, 1995) และผิวมิวโคซาของปลาเทราต์ (Fernandes, et al., 2004) พบไลโซไซม์หลายชนิด จากข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้ ชี้ให้เห็นว่าไลโซไซม์นั้น มีตำแหน่งของยีนส์ หรือ multiple genes ที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองยังพบว่า ทั้ง SSTL และ GSTL มีไลโซไซม์ที่แตกต่างกันในแง่ของ enzymatic activity และปริมาณ แม้ว่าสัตว์ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากก็ตาม ซึ่งมีผลอาจทำให้ มี biological function ของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ส่วนผลการทำ SDS-PAGE ของ SSTL A , SSTL B , ASTL และ GSTL เทียบกับ HEWL ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ผลการทำ SDS-PAGE ของ SSTL A , SSTL B , ASTL และ GSTL เทียบกับ HEWL ใน 12.5% separating gel และ 4% stacking gel

จากรูปที่ 5 พบว่าไลโซไซม์ของ SSTL A , SSTL B และ ASTL มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.8 kDa ส่วน GSTL ก็มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวเช่นกัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15.2 kDa อย่างไรก็ตามจากน้ำหนักโมเลกุลของไลโซไซม์ทุกชนิดที่พบนี้ คาดว่าจะเป็น C-type lysozyme ที่พบได้ในไข่ไก่ หรือ สัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ คือ มีน้ำหนักโมเลกุล 14 kDa (Grutter, et al., 1979, Araki, et al., 1990, Araki et al., 1991)



รูปที่ 6 ผลการศึกษาและยืนยัน activity ของไลโซไซม์ทั้ง 4 ชนิด โดย refolding gel เทียบกับ HEWL

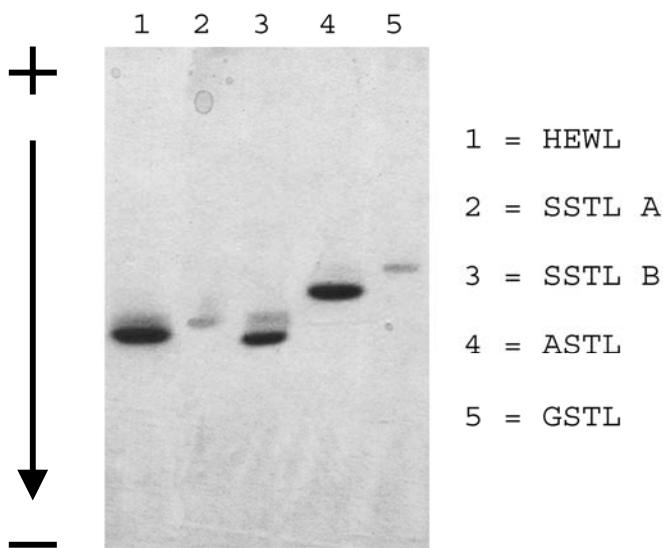
การศึกษา refolding gel ของไลโซไซม์ทั้ง 4 ชนิดเพื่อเป็นการยืนยันว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.8 และ 15.2 kDa จากการทำ SDS-PAGE เป็นไลโซไซม์จริงนั้นจะเกิด clear zone เฉพาะตำแหน่งของแถบโปรตีนที่เป็นไลโซไซม์เท่านั้นซึ่งจากผลการทำ refolding gel ก็พบ clear zone ตรงแถบโปรตีนประมาณ 14.8 และ 15.2 kDa จึงการทดลองนี้สามารถยืนยันผลการแยกบริสุทธิ์ และพบว่าเอนไซม์ไลโซไซม์ที่แยกได้จากตะพาน้ำทุกชนิดเป็น monomeric protein นอกจากนี้ยังพบว่า SSTL B มี activity สูงที่สุด (รูปที่ 6) จากตารางสรุปการแยกบริสุทธิ์ ในตารางที่ 1 พบว่า SSTL A มีความบริสุทธิ์มากขึ้นถึง 6 เท่า ปริมาณไลโซไซม์ที่ได้คืนกลับ คือ 53% และ SSTL B มีความบริสุทธิ์มากขึ้นถึง 3 เท่า ปริมาณไลโซไซม์คืนกลับ 55% ส่วน ASTL จะได้ไลโซไซม์ที่บริสุทธิ์ถึง 5 เท่าและได้ปริมาณคืนกลับ 19% สำหรับ GSTL นั้น ได้ไลโซไซม์ที่บริสุทธิ์ ถึง 17 เท่าซึ่งโปรตีนมี specific activity ประมาณ 54 unit/mg

ตารางที่ 1 ตารางสรุปการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลโซไซม์

Samples	total volume (ml)	total activity (Units)	total protein (mg)	specific activity (Units/mg)	purification fold	% Recovery
1. SSTLs						
Crude	54	1,506.60	3,229.41	0.47	1.00	100.00
pH 4.0	53	1,807.30	2,426.47	0.75	1.60	119.96
pH 7.0	52	1,450.80	1,997.06	0.73	1.55	96.30
CM-toyopearl of SSTL A	65	806.00	291.18	2.77	5.93	53.50
CM-toyopearl of SSTL B	27	837.00	698.53	1.20	2.57	55.56
2. ASTL						
Crude	186	7,784.10	362.09	21.50	1.00	100.00
pH 4.0	187	5,941.93	169.96	34.96	1.63	76.33
pH 7.0	190	4,270.25	176.91	24.14	1.22	54.86
CM-toyopearl of ASTL	108	1,506.60	13.80	109.17	5.08	19.35
3. GSTL						
Crude	140	1,432.20	371.00	3.86	1.00	100.00
pH 4.0	139	1,508.20	227.62	6.63	1.71	105.30
pH 7.0	137	1,337.81	254.48	5.26	1.36	93.41
CM-toyopearl	63	927.68	19.63	47.25	12.24	64.77
Gel filtration	24	174.84	3.24	53.96	17.17	15.17
The activity was measured by lytic activity. The protein concentration was assayed by the Lowry method.						

Native-PAGE of reptile lyszyme

จะเห็นได้ว่าไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากไข่ขาวของตะพานน้ำทั้ง 2 ชนิด และจากไข่ขาวของเต่าทะเลมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน เพื่อเป็นการศึกษาสมบัติประจุและรูปร่างของโปรตีนทั้งสี่ชนิด Native-PAGE ในระบบของ β -alanine เปรียบเทียบกับ HEWL จึงถูกนำมาศึกษาจากผลการทดลองพบว่า SSTLs, ASTL และ GSTL สามารถเคลื่อนที่ได้ใกล้เคียงกับ HEWL (รูปที่ 7) โดยที่ GSTL จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบได้ช้ากว่า ASTL, SSTL A, SSTL B และ HEWL แต่ SSTL B เคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบได้เร็วเท่า ๆ กับ HEWL ซึ่งจากผลที่ได้สอดคล้องกับผลจากการทำ CM-Toyopearl column คือ SSTL B จะเป็น basic protein มากกว่า SSTL A ฉะนั้น SSTL B จึงถูกจับไว้ใน column ได้ดีกว่าแล้วถูกชะออกมาทีหลัง SSTL A และจากข้อมูลเหล่านี้จึงเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนได้ว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในไลโซไซม์มีประจุที่ต่างกัน ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์



รูปที่ 7 การศึกษา Native-PAGE (18% separating gel, 4% stacking gel) ของ SSTL ทั้งสองชนิด ASTL และ GSTL เปรียบเทียบกับ HEWL

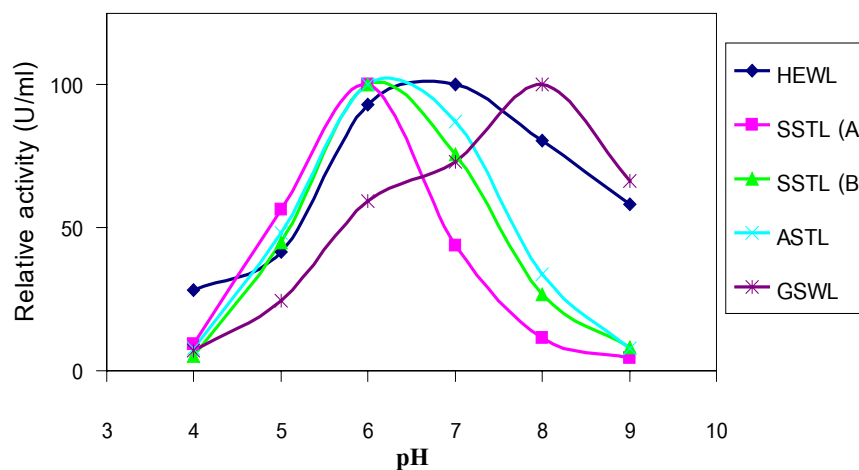
2. การศึกษาสมบัติทางเคมีของเอนไซม์ไลโซไซม์ที่แยกได้ทั้ง 4 ชนิด

2.1 Effect of pH and ionic strength on lytic activity of reptile lysozyme

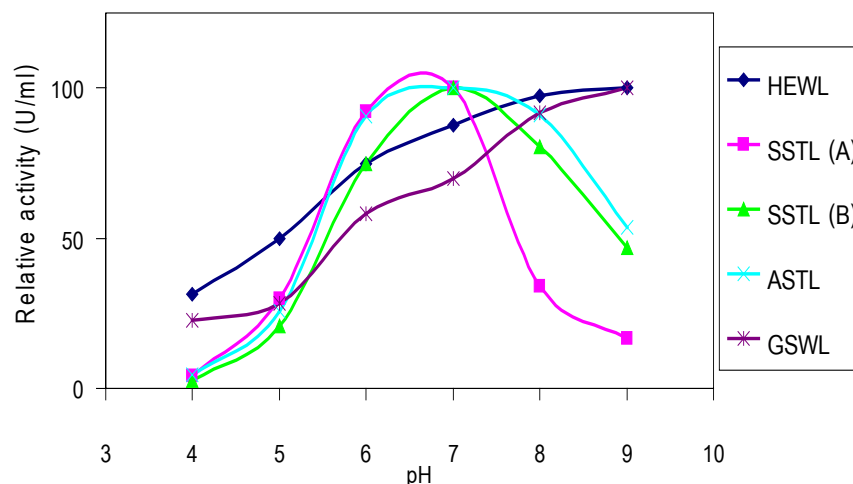
การวัดความสามารถในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย (Activity) ของไลโซไซม์ ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากเต่าและตะพานน้ำชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ HEWL โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH และ ionic strength ที่แตกต่างกัน พบว่าไลโซไซม์จากตะพานน้ำ SSTLs และ ASTL ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ที่ต่างจาก GSTL และ HEWL ที่ ionic strength 0.1 (รูปที่ 8) พบว่า SSTL A , SSTL B และ ASTL มี pH ที่ทำงานได้ดีที่สุดในช่วง pH ที่แคบ (pH optimum) ที่ pH เดียวกัน คือ pH 6.0 ใน

ionic strength 0.1 แต่ใน ionic strength 0.05 SSTL B และ ASTL จะมีลักษณะของการทำงานได้ดีใน pH ที่กว้างขึ้น คือสามารถทำงานได้ดีตั้งแต่ pH 6.0-8.0 (รูปที่ 9) ซึ่งต่างจาก GSTL ที่ดูเหมือนว่าสามารถทำงานได้ดีทั้งสองช่วง pH (dual pH optimum) คือ pH 6.0 และ pH 8.0 ใน ionic strength 0.1 และ 0.05 (รูปที่ 9)

ผลการทดลองนี้อาจจะแสดงได้อย่างชัดเจนว่า ไลโซไซม์ที่แยกได้จากแหล่งของสัตว์เลื้อยคลานที่ใกล้สูญพันธุ์ จากทั้ง Family Trionychidae และ Family Cheloniidae จะมีการทำงานและคุณสมบัติที่แตกต่างกัน



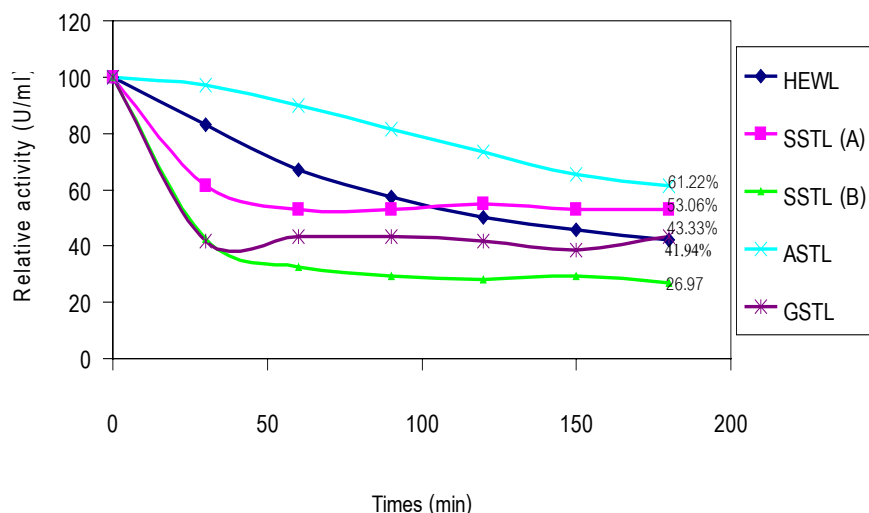
รูปที่ 8 แสดง pH optimum ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสผนังเซลล์แห้งของ *M. luteus* ของ HEWL, SSTL A, SSTL B, ASTL และ GSTL ที่ ionic strength 0.1



รูปที่ 9 แสดง pH optimum ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสผนังเซลล์แห้งของ *M. luteus* ของ HEWL, SSTL A, SSTL B, ASTL และ GSTL ที่ ionic strength 0.05

2.2 Effect of temperature on lytic activity of reptile lysozymes

เนื่องจาก c-type lysozyme มีคุณสมบัติเป็น thermo stable enzyme ในการศึกษาครั้งนี้ จึงจะศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ทั้ง 4 ชนิด โดยในการทดลองจะใช้ อุณหภูมิ 90 °C ในการต้มเอนไซม์โดยเตรียมสับสเตรทใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 ionic strength 0.1 (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 การศึกษาแอคติวิตีของ HEWL, SSTL A, SSTL B, ASTL และ GSTL ที่ 90 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

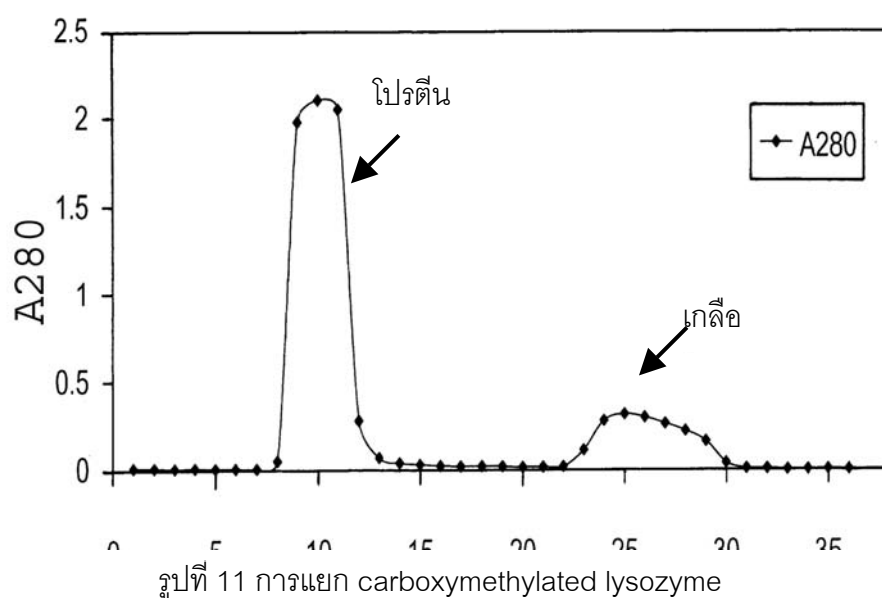
จากรูปที่ 10 พบว่าไลโซไซม์จากทั้งวงศ์ตะพาบน้ำ และเต่าทะเลยังคงมี activity สูง แม้ว่า จะถูกต้มในอุณหภูมิที่สูงนานกว่า 1 ชั่วโมง โดยเฉพาะพบว่า ASTL จะมี activity เหลืออยู่ อย่างน้อย 60% หลังจากถูกต้มไป 3 ชั่วโมง และนอกจากนี้ ASTL จะมี activity สูงที่สุดในจำนวน ไลโซไซม์ทั้ง 4 ชนิด ที่ทำการทดลอง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ไลโซไซม์จากสัตว์เลื้อยคลาน มีพันธะ ไดซัลไฟด์เหมือนกันกับ HEWL แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อ lytic activity อาจมา จากการให้ความร้อนแก่ไลโซไซม์ หรือ interaction อื่น ๆ เช่น hydrophobic interaction ก็ได้ ซึ่งถือ ว่าเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากอย่างหนึ่งในโครงสร้างของไลโซไซม์ด้วย

3. การศึกษา primary structure ของ reptile lysozymes

3.1 การรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ และทำ carboxymethylation

เพื่อเป็นการลดผลกระทบของพันธะไดซัลไฟด์และง่ายต่อการตัดโดยเอนไซม์ทริปซิน ไลโซไซม์ทั้ง 3 ชนิด SSTL A, SSTL B, and ASTL (Primary structure ของ GSTL มีรายงานใน

Swiss protein databank accession No. JC7918) จะถูกรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์และทำ carboxymethylation ด้วย iodoacetic acid ซึ่งจะต้องนำ carboxymethylated protein ไปแยกโดยใช้ Sephadex G-50 column ซึ่งมี 0.2 M NH_4OH เป็นตัวชะโปรตีนที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 11



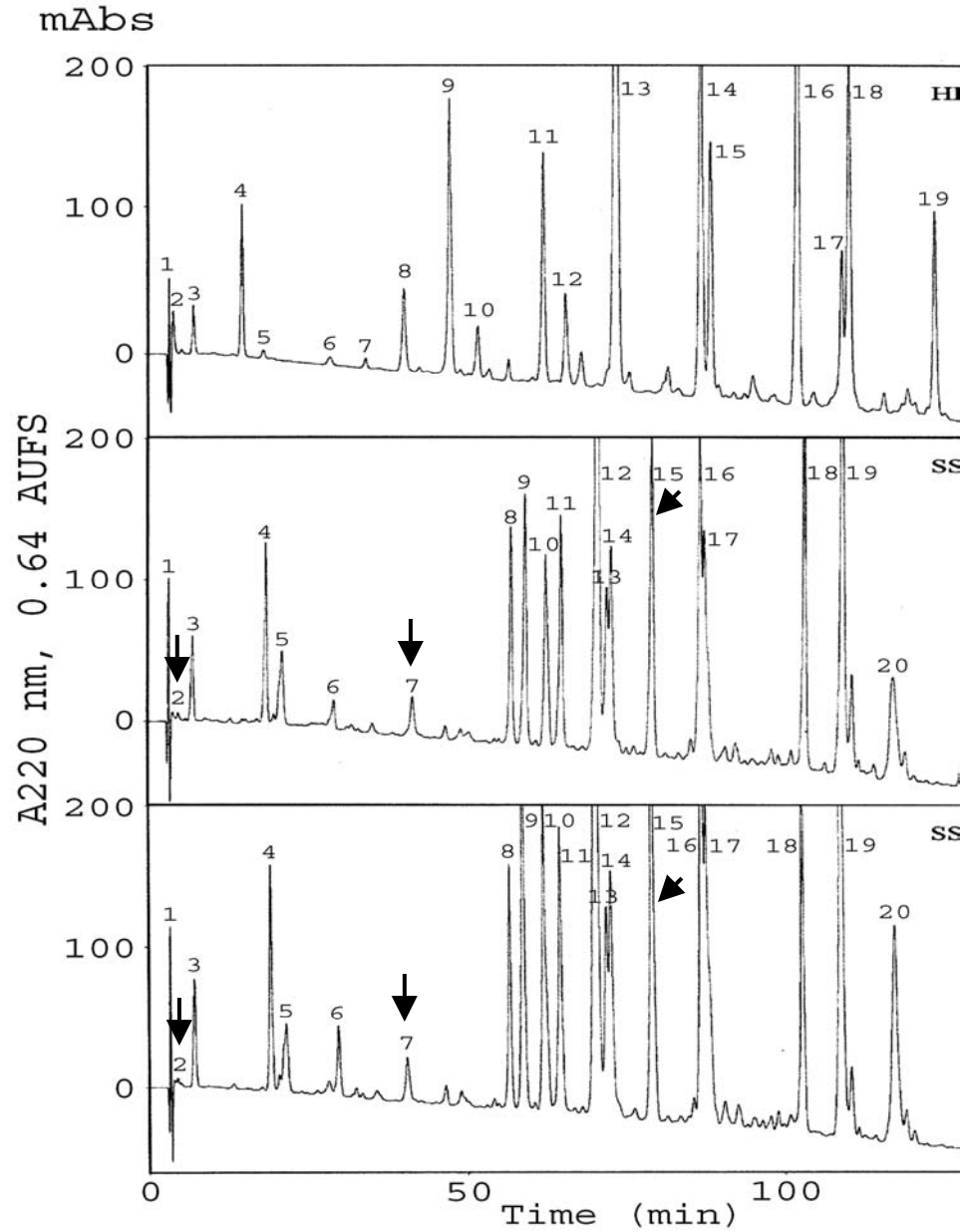
รูปที่ 11 การแยก carboxymethylated lysozyme ด้วย Sephadex G50 column chromatography

จากรูปโปรตีนซึ่งมีโครงสร้างที่ใหญ่กว่าเกลือจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อนแล้ว เกลือจึงจะถูกชะออกมา หลังจากนั้นจึงจะนำ carboxymethylated protein ไปตัดด้วยเอนไซม์ทริปซินต่อไป

3.2 การทำแผนที่โปรตีน (peptide mapping)

เมื่อไลโซไซม์ถูกตัดให้เป็นเปปไทด์สายสั้นด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) แล้วทำการแยกเปปไทด์ที่ถูกตัดนี้ด้วย C18 reversed phase HPLC แล้วเปรียบเทียบ elution profile ของ chromatogram ของไลโซไซม์จากไข่ไก่ และไลโซไซม์จากไข่ตะพาน้ำ (SSTLS) ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์และสภาวะการแยกด้วย HPLC ที่เป็นแบบเดียวกัน แล้วดูตำแหน่งของ peak บน chromatogram จากผลการทดลองพบว่า (รูปที่ 12) มีตำแหน่งของ peak ใน SSTLS ที่ต่างจาก HEWL ซึ่งจะต้องมีการศึกษาหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบและลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดจาก

SSTLs เพราะ SSTL A มี peptide map ที่เหมือนกับ SSTL B โดยมีตำแหน่งของ peak เกือบจะตรงกันทุก peak



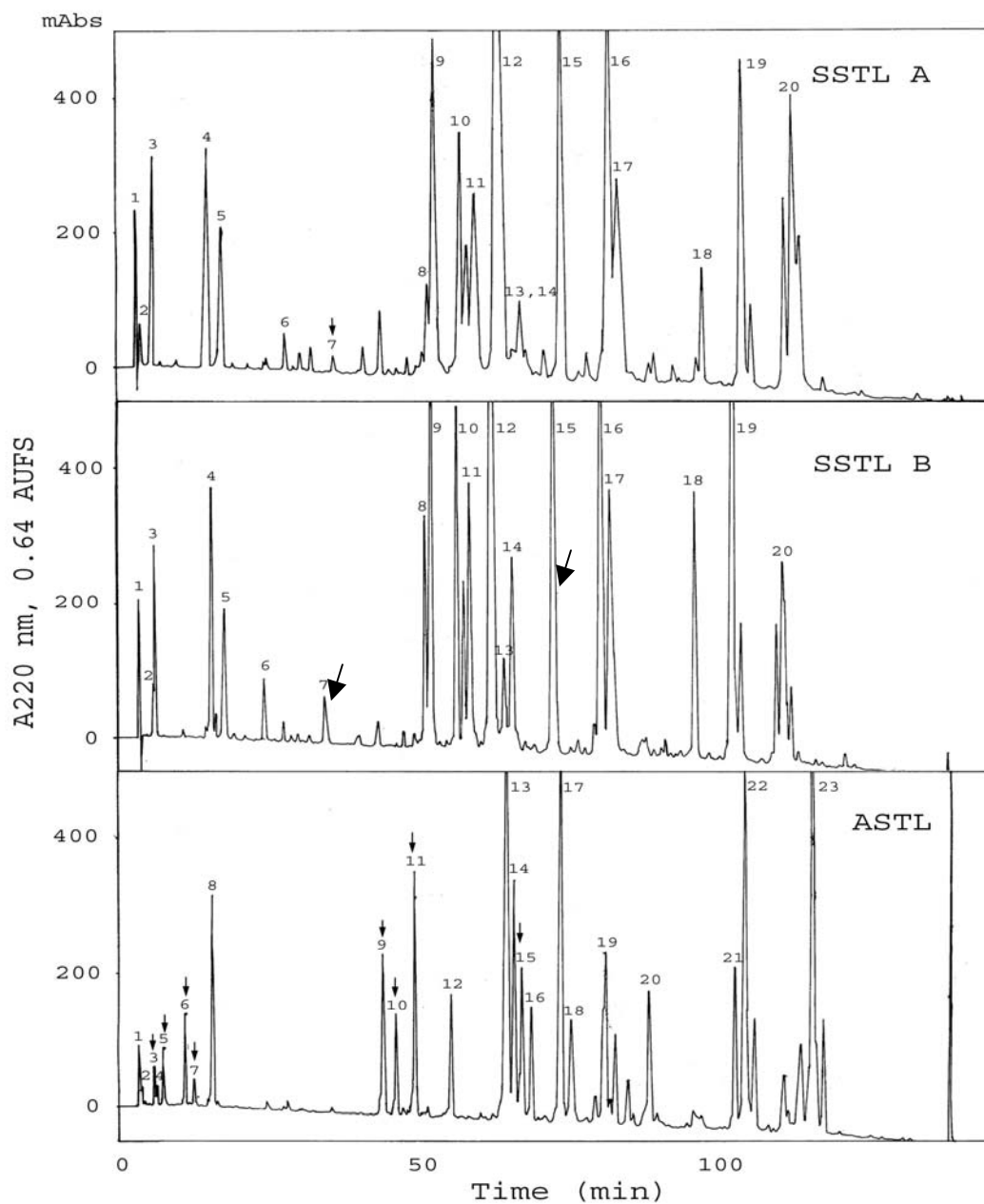
รูป

ด

hy

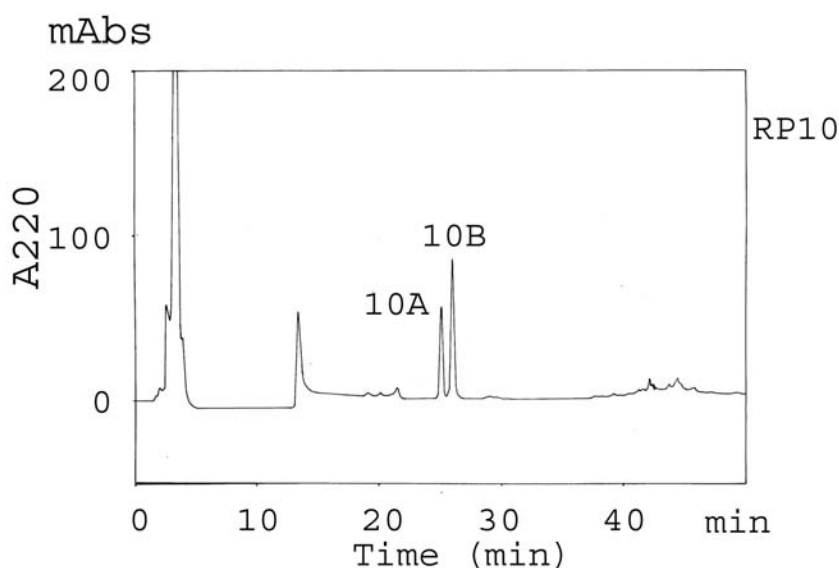
(YMC ODS 120,S5.4.6 x 250 mm)

จากการศึกษาพบว่าเกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนใน SSTL A และ SSTL B จึงใช้ SSTL A และ SSTL B เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบตำแหน่งของ peak กับ ASTL ซึ่งต่างก็เป็น reptile เหมือนกันโดยได้ผลดังรูปที่ 13

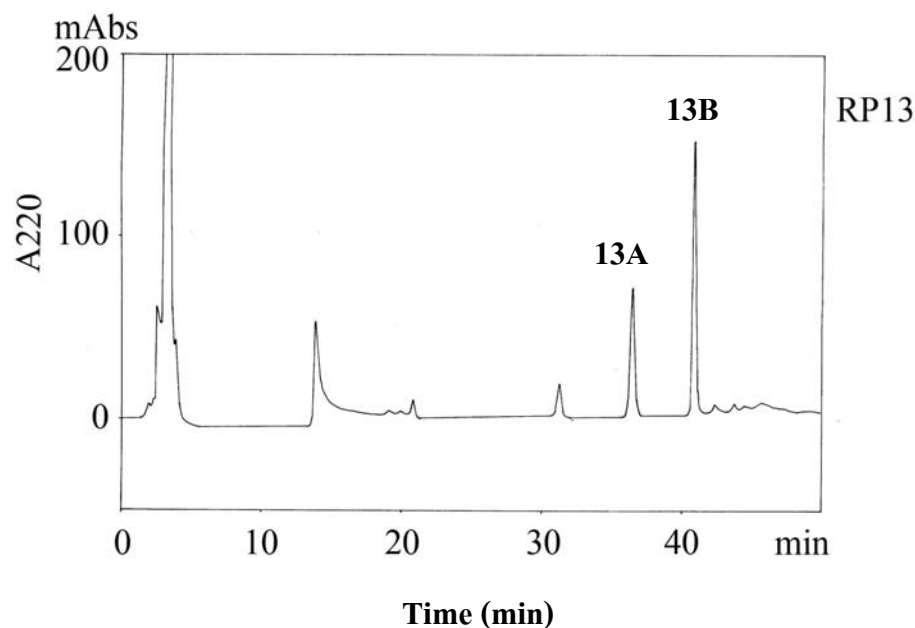


รูปที่ 13 แผนที่โปรตีน (peptide mapping) ของ SSTL A, SSTL B และ ASTL ที่ได้จากการแยก tryptic peptide ด้วย C18 reversed phase column chromatography (YMC ODS 120,S5.4.6 x 250 mm)

จากผลการทำแผนที่โปรตีนของ SSTL A, SSTL B และ ASTL พบว่า ตำแหน่งของ peak ใน chromatogram ระหว่าง SSTL A และ SSTL B นั้นแทบจะเหมือนกันทุกตำแหน่ง ยกเว้น peak ที่ 2 peak ที่ 7 และ peak ที่ 15 ที่มี retention time ต่างกันเล็กน้อย (ดูครีซีใน SSTL B) แสดงว่าทั้ง SSTL A และ SSTL B น่าจะมีโครงสร้างระดับปฐมภูมิที่คล้ายกันมาก ส่วนแผนที่โปรตีนระหว่าง SSTLs กับ ASTL นั้น เห็นได้ชัดว่า มี peak หลาย peak ที่มีตำแหน่งต่างกัน (ดูครีซีใน ASTL) แสดงว่า ASTL น่าจะมีโครงสร้างระดับปฐมภูมิต่างจาก SSTLs ฉะนั้นทุก peak ของ SSTL A จะถูกนำไปหาส่วนประกอบของกรดอะมิโนและหาลำดับกรดอะมิโนเป็นการศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิและจะใช้ peptide map นี้เป็น reference ในการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของไลโซไซม์ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานต่อไป ผลการทดลองของ ASTL พบว่ามี peak ที่มีตำแหน่งต่างจาก SSTLs ดังรูปที่ 13 (ดูครีซี) ซึ่งทุก peaks จะถูกนำไปศึกษาหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบและหาลำดับกรดอะมิโน นอกจากนี้ส่วนของ peak ที่แยกออกจากกันไม่ได้ไม่สมบูรณ์ เช่น peak 10, 11 ของ SSTL B จะถูกนำมาทำ rechromatogram โดยใช้ column ชนิดเดียวกันกับการทำแผนที่โปรตีน แต่เปลี่ยน solvent A เป็น 5 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 และ solvent B เป็น 60% ACN ใน solvent A ซึ่งจะสามารถแยก peak ของเพปไทด์ได้ 2 peak อย่างชัดเจนคือ peak 10A และ peak 10B ดังรูปที่ 14 นอกจากนี้ยังมี peak 13, 14 และ peak 16, 17 ที่จะต้องทำ rechromatogram เช่นเดียวกับ peak 10, 11 ซึ่งได้ผลดังในรูปที่ 15 ตามลำดับ จากนั้นจึงจะถูกนำไปศึกษาหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบ และหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป



รูปที่ 14. rechromatogram ของ peak 10, 11 ของ SSTL B โดยใช้ solvent A เป็น 5 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 และ solvent B เป็น 60% ACN ใน solvent A

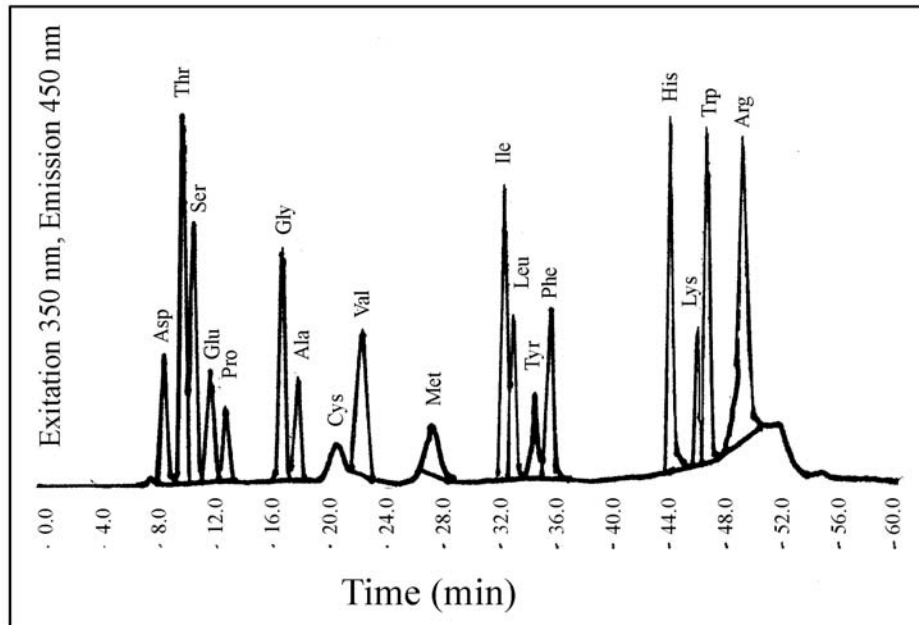


รูปที่ 15 ตัวอย่างการทำ rechromatogram ของ peak ที่ 13,14 โดยใช้ C18 reversed phase column ซึ่ง solvent A เป็น 5 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 และ solvent B เป็น 60% ACN ใน solvent A

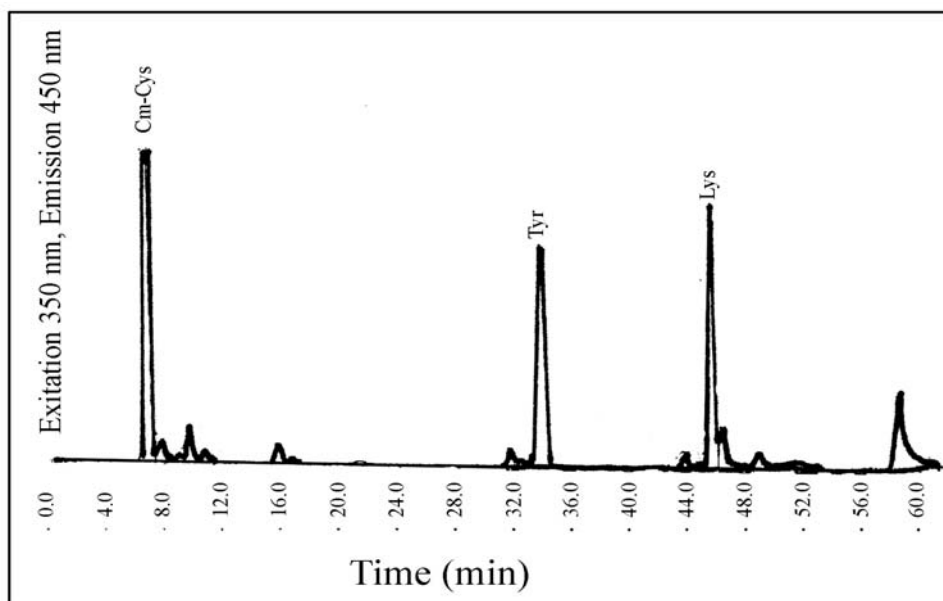
ส่วน peak ของ ASTL ที่มีตำแหน่งต่างจาก SSTLs บาง peak ก็จะถูกนำมาทำ rechromatogram แล้วนำไปศึกษากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งหาลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ peak ของ SSTLs อีกต่อไป

3.3 ผลการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบ (amino acid composition) และ ลำดับกรดอะมิโนของ

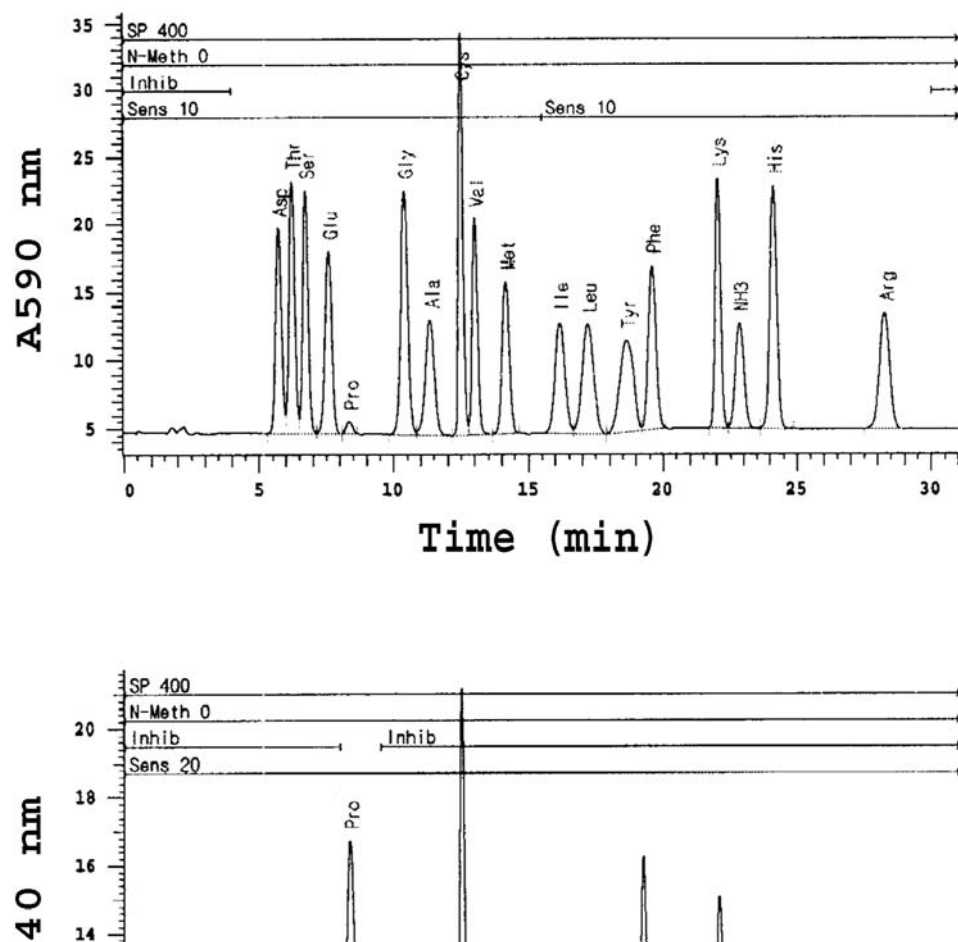
ไลโซไซม์จาก SSTL A, SSTL B และ ASTL ที่แยกบริสุทธิ์ไว้แล้วจะถูกนำมาทำการรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ และ ทำ Carboxymetylation ซึ่งเป็นพันธะที่อยู่ในโครงสร้างของไลโซไซม์ จากนั้นนำไลโซไซม์ไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) แล้วนำไลโซไซม์ที่ถูกย่อยแล้วมาทำแผนที่โปรตีน (peptide mapping) และจาก profile ที่ได้จาก HPLC พบว่าไลโซไซม์จากตะพานน้ำมี profile ที่ค่อนข้างต่างจาก HEWL ที่ใช้เป็นมาตรฐาน ซึ่ง peak ที่มีตำแหน่งที่ต่างจาก HEWL นี้จะถูกนำไปศึกษาหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบโดยวิธี post column derivatized with OPA ซึ่งถือได้ว่าเป็นวิธีที่มีความไวสูง โดยการบ่งบอกชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนจะเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐานที่ฉีดเข้าไปใน column โดยสภาวะเดียวกัน (รูปที่ 16 และ 17) และนอกจากนี้ยังมีการยืนยันผลศึกษาหาส่วนประกอบของกรดอะมิโนแบบ post column derivatized with ninhydrin โดยเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐานเช่นกัน (รูปที่ 18 และ 19)



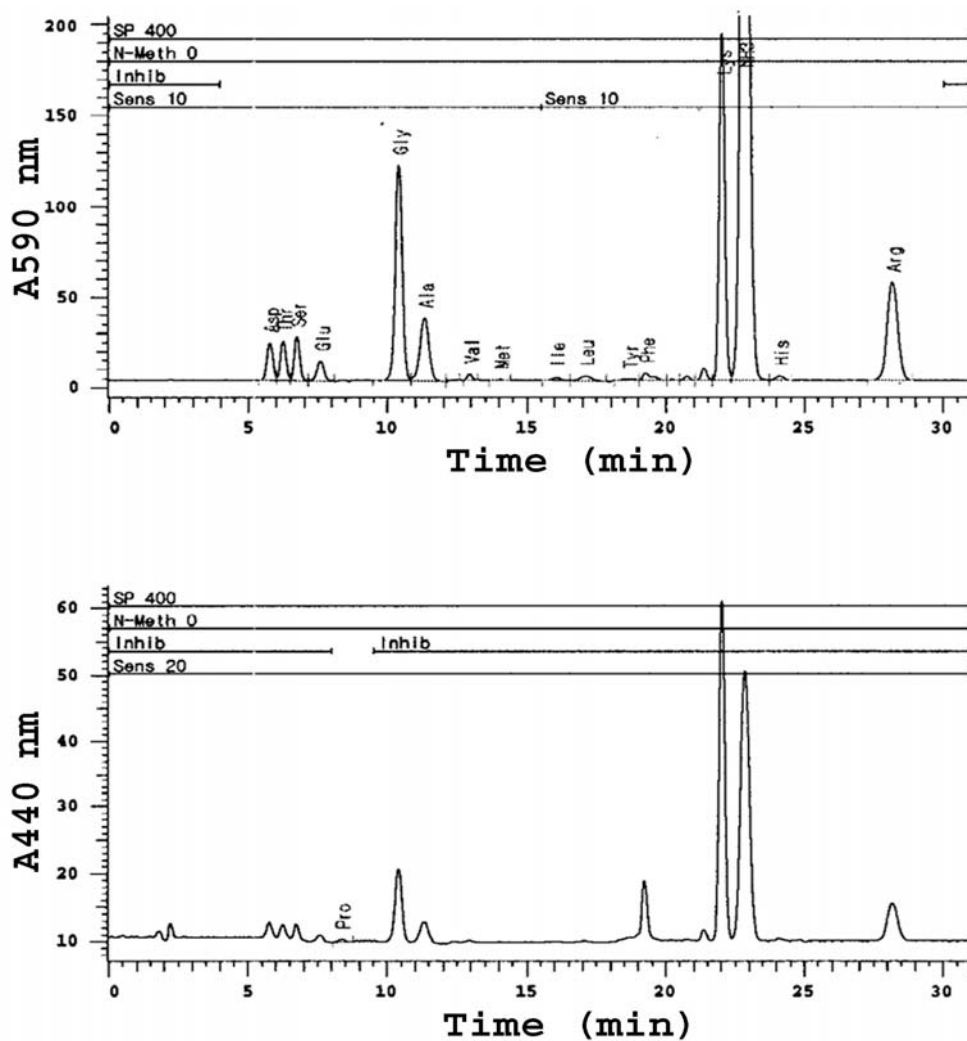
รูปที่ 16 Chromatogram ของกรดอะมิโนที่ใช้เป็นมาตรฐานในการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบแบบ post column derivatized with OPA



รูปที่ 17 ตัวอย่างการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบใน peak 4 ของ SSTL A เทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐานที่ถูกชะออกจากคอลัมน์แบบ post column derivatized with OPA



รูปที่ 18 Chromatogram ของกรดอะมิโนที่ใช้เป็นมาตรฐานในการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบแบบ post column derivatized with ninhydrin



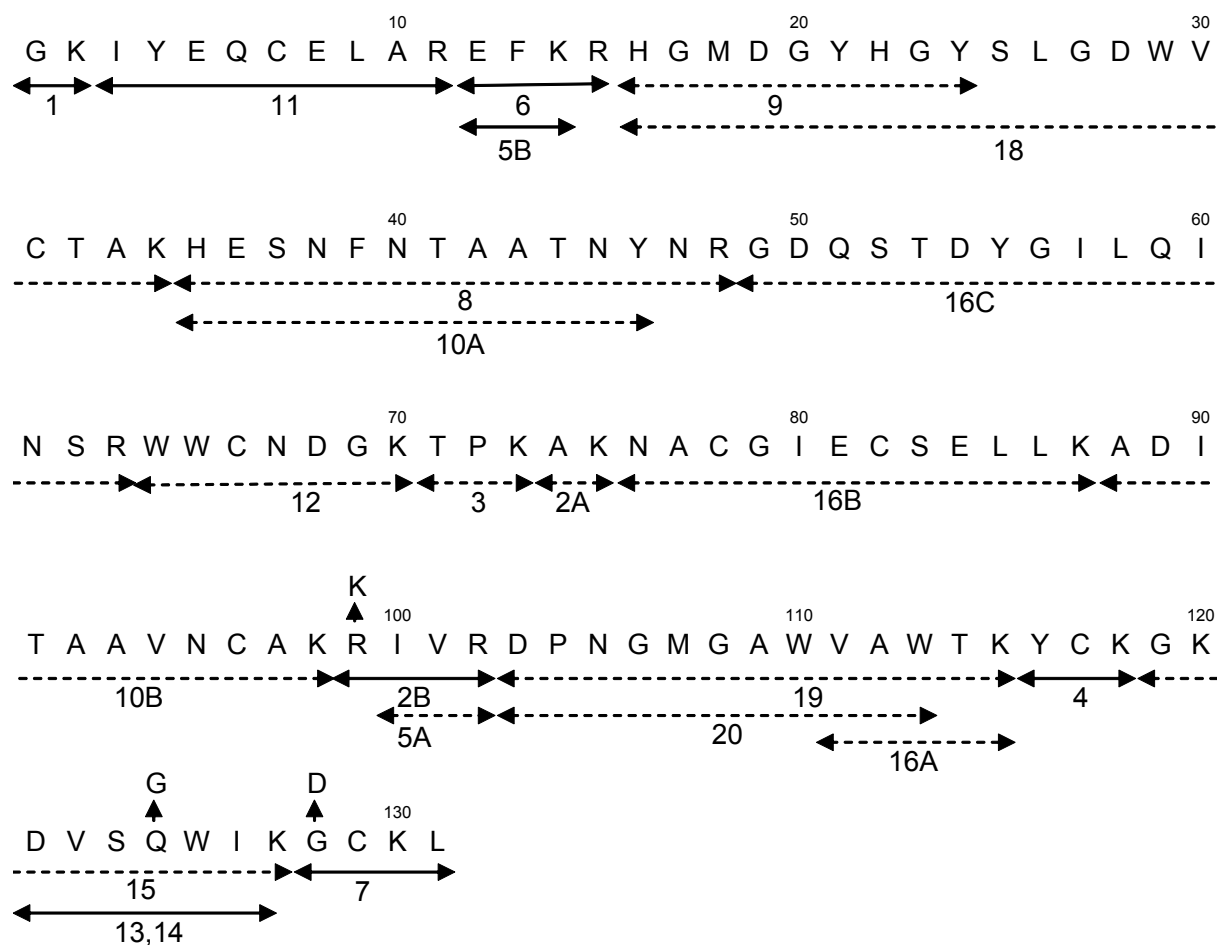
รูปที่ 19 ตัวอย่างการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของ SSTL A เทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐาน
ฐานในรูปที่ 18 ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์แบบ post column derivatized with ninhydrin

จาก chromatogram ของการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบในไลโซไซม์แบบ post column derivatized with OPA หรือ ninhydrin ก็สามารถที่จะนำพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ peak ตัวอย่างมาคำนวณหาจำนวน nmol เทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของกรดอะมิโนมาตรฐานได้และสามารถสรุปได้ว่าแต่ละ peak ตัวอย่างมีกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบชนิดใดบ้างดังผลการศึกษารายละเอียดของกรดอะมิโนทุก peak ของ SSTL A ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางสรุปผลการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบใน SSTL A

Amino acid composition of tryptic peptide of Solf shelled turtle Lysozyme A																								
	1	2A	2B	3	4	5A	5B	6	7	8		9	10A	10B	11	12	13,14	15	16A	16B	16C	18	19	20
Cm-Cys					0.9(1)				0.92(1)		Cm-Cys		1.1(1)	1(1)	0.9(1)				2.3(2)		0.9(1)			
Asp				0.96(1)					0.99(1)	4.1(4)	Asp	1(1)	3.1(3)	1.8(2)		1.5(2)	1.4(1)	1(1)		1.0(1)	2.78(3)	1.7(2)	1.9(2)	2.3(2)
Thr										2.28(2)	Thr		2.28(2)	1.02(1)					0.8(1)		0.98(1)	1(1)	1(1)	
Ser										1.12(1)	Ser		1.12(1)				1.1(1)	0.9(1)		0.7(1)	1.65(2)	1(1)		
Glu							0.55(1)	1.05(1)		1.18(1)	Glu		1.0(1)		3.1(3)		0.8(1)	1(1)		2.2(2)	2.03(2)			
Pro				1(1)							Pro													1(1)
Gly	0.8(1)										Gly	3.4(3)				0.7(1)	1.6(2)			1.3(1)	2.36(2)	4.9(5)	2.6(2)	3.2(3)
Ala		0.45(1)								2.0(2)	Ala		2.0(2)	4.1(4)	1(1)				1.1(1)	1.1(1)		0.9(1)	1.6(2)	2(2)
Cys											Cys													
Val			0.5(1)			0.8(1)					Val			0.45(1)			0.6(1)	0.9(1)	0.9(1)			0.8(1)	1(1)	1.2(1)
Met											Met	0.9(1)					0.7(1)					1(1)	1(1)	1.1(1)
Ile			0.7(1)			0.55(1)					Ile			0.36(1)	1(1)			0.9(1)		0.7(1)	1.56(2)			
Leu									1.1(1)		Leu				1(1)					2.1(2)	1.02(1)	1(1)		
Tyr					1.2(1)					1.01(1)	Tyr	1.8(2)	1.01(1)		1(1)						1.08(1)	1.9(2)		
Phe							0.9(1)	0.91(1)		1.21(1)	Phe		1.21(1)											
Lys	1.0(1)	1(1)	1(1)	1(1)	1(1)		1(1)	1(1)	1(1)		Lys			1(1)		1(1)	2(2)	1(1)	1(1)	1(1)		1(1)	1(1)	
His										1.28(1)	His	2.1(2)	1.28(1)									2.2(2)		
Trp											Trp					w	0.4	0.2(1)	w			w	w	w
Arg			0.8(1)			1(1)		0.84(1)		1(1)	Arg				1(1)						1.0(1)			
Total	2	2	4	3	4	3	3	4	4	14	Total	9	12	11	9	7	10	7	5	11	15	20	13	11
nmol	0.2	2.53	0.5	4.4	7.04	0.54	0.5	1.54	5.4	2.68	nmol	4.52	1.67	0.6	8.36	8.69	2.29	4.28	0.12	0.56	0.89	2.74	2.5	1.35
position	1	74-75	99-102	71-73	116-118	100-102	12'-14	12-15	128-131	35-48	position	16-14	35-46	88-98	3-11	64-70	119-127	121-127	111-115	76-87	49-63	16-34	103-115	103-113

Peak อื่น ๆ ที่มีตำแหน่งต่างกันทั้งใน SSTL B และ ASTL ก็ถูกนำไปหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบ และหาลำดับกรดอะมิโนเช่นเดียวกันกับ peak ใน SSTL A (ไม่โซว์ผล) เมื่อได้ผลการทดลองทั้งหมดคือส่วนประกอบของกรดอะมิโนและการหาลำดับกรดอะมิโนในทุกเพปไทด์ก็จะนำข้อมูลที่ได้มา alignment กับลำดับกรดอะมิโนของ Soft shelled turtle lysozyme สายพันธุ์ญี่ปุ่น ที่ใช้เป็นมาตรฐานซึ่งได้ผลดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 ลำดับกรดอะมิโนของ SSTL A and SSTL B โดยเส้นทึบคือหาลำดับกรดอะมิโนแล้ว ส่วนเส้นประคือการหาลำดับกรดอะมิโนโดยการหาจากส่วนประกอบของกรดอะมิโน

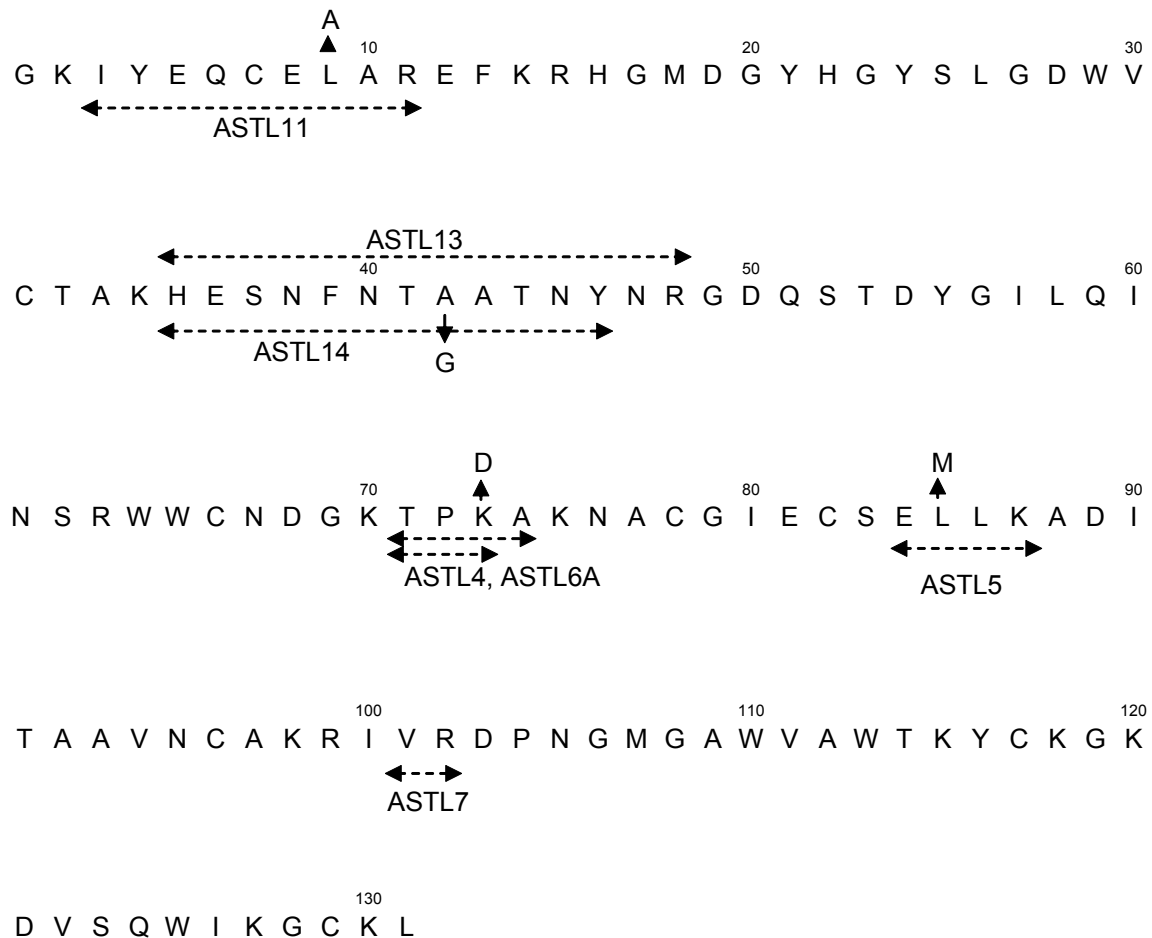
เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน รวมทั้งกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของ SSTL A เทียบกับ SSTL Japonicus ที่มีการรายงานไว้แล้วโดยเส้นประจะเป็นผลที่ได้จากการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบ และเส้นทึบจะเป็นผลจากการหาลำดับกรดอะมิโนที่ได้หาลำดับไว้แล้ว ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบพบว่า SSTL A มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก SSTL B อยู่เพียง สาม ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง Arg 97 ใน SSTL B เปลี่ยนเป็น Lys ใน SSTL A, Gln122 ใน SSTL B

เปลี่ยนเป็น Gly และ Gly126 ใน SSTL B เปลี่ยนเป็น Asp ใน SSTL A นอกจากนี้จากผลการทดลองนี้แสดงได้อย่างชัดเจนว่าบริเวณ N-terminus ของโปรตีนมี insertion ด้วยกรดอะมิโน Gly นอกจากนี้ ยังพบ insertion ด้วยกรดอะมิโน Gly ระหว่างตำแหน่งที่ 47 และ 48 ซึ่งการ insertion ในตำแหน่งนี้เคยมีรายงานใน Human lysozyme จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ไลโซไซม์จากไขขาวของตะพาน้ำทั้งสองชนิดคือ SSTL A และ SSTL B มีกรดอะมิโน 131 ตัว ซึ่งต่างจาก HEWL ที่มีกรดอะมิโน 129 ตัว เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ SSTL B ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับ SSTL Japonicus พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ SSTL B เหมือนกับ SSTL Japonicus ทุกลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่า ตะพาน้ำสายพันธุ์ได้หวนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตะพาน้ำสายพันธุ์ญี่ปุ่นมาก

เมื่อได้ Completed amino acid sequence ของ SSTLs จึงใช้ peptide mapping ของ SSTLs เป็นมาตรฐานในการศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิของ ASTL ในทำนองเดียวกันกับการศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิของ SSTLs การศึกษาหาลำดับกรดอะมิโนของ ASTL ก็จะทำให้การศึกษาหาลำดับกรดอะมิโนในเส้นเปปไทด์และทำการหาลำดับกรดอะมิโนในเส้นเปปไทด์ที่มีตำแหน่งของ peaks หรือมี retention time ที่ต่างจาก SSTLs จากรูปที่ 13 พบว่ามีอย่างน้อย จำนวน 8 peak คือ ASTL3, ASTL5, ASTL6, ASTL7, ASTL9, ASTL10, ASTL11 และ ASTL15 โดยลำดับกรดอะมิโนที่ได้ทั้งหมดมาจากการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบตารางที่ 3 และจากการหาลำดับกรดอะมิโนโดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ SSTL B พบว่ามี amino acid substitutions อย่างน้อย 4 ตำแหน่ง ดังรูปที่ 21 Leu8 เปลี่ยนเป็น Ala, Ala41 เปลี่ยนเป็น Gly, Lys71 เปลี่ยนเป็น Asp และ Leu 83 เปลี่ยนเป็น Met

ตารางที่ 3 ตารางสรุปผลการหากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของ peaks เพปไทด์ของ ASTL ที่ต่างจาก SSTLs

Amino acid composition of tryptic ASTL										
Amino acid	3	4	5	6	6A	7	11	12	13	14
Cm-Cys							1.13 (1)	1.02(1)		
Asp		1.0 (1)		1.66 (2)	1.0 (1)				4.43 (4)	2.47 (3)
Thr		0.91 (1)		1.11 (1)	0.95 (1)				2.17 (2)	1.58 (2)
Ser				3.02 (3)				1.75 (2)	1.24 (1)	1.24 (1)
Glu			1.20 (1)	2.41 (2)			3.55 (3)	0.75 (1)	1.37 (1)	0.94 (1)
Pro		0.83 (1)		0.68 (1)	0.93 (1)					
Gly	1.68 (1)			2.88 (3)				1.21 (1)	1.31 (1)	1.10 (1)
Ala				1.44 (1)	0.99(1)		2.27 (2)	1.0 (1)	1.20 (1)	1.0 (1)
Cys										
Val						1.17 (1)				
Met			0.97 (1)							
Ile							0.94 (1)			
Leu			0.47 (1)	0.54 (1)						
Tyr							0.96 (1)		1.06 (1)	0.76 (1)
Phe									1.0 (1)	0.70 (1)
Lys	1.0 (1)		1.0 (1)	1.0 (1)						
His									0.94 (1)	0.68 (1)
Trp										
Arg						1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)	
Total	2	3	4	15	4	2	9	5	14	12
nmol	0.19	1.86	8.32	1.06	0.25	3.75	3.43	5.34	2.67	1.71
position	1	71-73	84-87	65-73	71-74	99-100	2-10	49-61	35-48	35-46



Amino acid sequence of ASTL on SSTL B

———— = amino acid sequenced
 - - - - - = deduced from amino acid composition

รูปที่ 21 ลำดับกรดอะมิโนของ ASTL เทียบกับ SSTL B

เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของ GSTL มีผู้เคยรายงานไว้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว กอปรกับปริมาณโปรตีนของ GSTL ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์นั้นน้อยมาก คณะผู้วิจัยจึงไม่สามารถนำ GSTL มาศึกษาแผนที่โปรตีน กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งหาลำดับกรดอะมิโนด้วย แต่ก็ได้นำลำดับกรดอะมิโนของ GSTL มาใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลองดังรายละเอียดในอภิปรายผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานสาม species คือ *Trionyx sinensis Chinese* (ตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน) *Amyda cartilaginea* (Asiatic soft shelled turtle) และ *Chelonia mydas* จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของโปรตีนไลโซไซม์ในไข่ขาวของสัตว์เลื้อยคลาน มีความแตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณ จำนวน และ activity ของเอนไซม์ จากการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นรายงานแรกที่พบไลโซไซม์สองชนิดในไข่ขาวของสัตว์เลื้อยคลานสำหรับการค้นพบนี้จะตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ ดังรายละเอียดในภาคผนวก

ในขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มนี้ ขั้นตอนการแยกไข่ขาว การเตรียมไข่ขาว การ activate resin การ pack column การเตรียมสารต่าง ๆ และขั้นตอนต่างๆ ล้วนเป็นปัจจัยและมีความสำคัญต่อการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน (*Trionyx sinensis Chinese*) ไข่ขาวของตะพาบน้ำ asiatic soft shell turtle (*Amyda cartilaginea*) ไข่ขาวของเต่าตนุ green sea turtle (*Chelonia mydas*) ทั้งสิ้น เพราะทุกขั้นตอนมีผลต่อการแยกและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ รวมทั้งปริมาณ (yield) ที่จะได้

ขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวันในครั้งนี้ ได้มีการปรับปรุงให้ดีขึ้นกว่าวิธีของรัฐบาล ขานฉนวนและสมปอง ธรรมศิริรักษ์ (2546) โดยในการทำบริสุทธิ์ไลโซไซม์ครั้งนี้จะแยกไลโซไซม์ด้วย CM-Toyopearl 650M cation exchange column chromatography แบบ linear gradient เพียงคอลัมน์เดียวสามารถแยกไลโซไซม์ได้ 2 ชนิด คือ peak A (SSTL A) และ peak B (SSTL B) ส่วนไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพาบน้ำ Asiatic soft shelled turtle (*Amyda cartilaginea*) ก็จะถูกแยกบริสุทธิ์โดยวิธี cation exchange column chromatography เช่นเดียวกันกับตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน (*Trionyx sinensis chinese*) แล้วจะโปรตีนออกแบบ linear gradient โดยใช้ NaCl ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.00-0.25 M ใน 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 พบว่า elution profile ที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับ elution profile ของไลโซไซม์จากตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน (*Trionyx sinensis tiwanese*) ที่พลากร พลโยธีและสมปอง ธรรมศิริรักษ์ (2546) เคยรายงานไว้ ดังนั้นเป็นไปได้ว่าไลโซไซม์จากตะพาบน้ำ *Amyda cartilaginea* อาจจะมี expression ของไลโซไซม์สองชนิดเช่นเดียวกับในไข่ขาวของตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเพียง peak เดียวที่มีแอดติวิตีสูง ซึ่งไลโซไซม์จาก *Amyda cartilaginea* จะถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือประมาณ 0.12-0.13 M NaCl เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์จาก SDS-PAGE พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของ

ตะพานน้ำพันธุ์ได้หวนและตะพานน้ำพันธุ์เอเชียได้โดยใช้คอลัมน์เดียวคือ CM-Toyopearl 650M cation exchange column chromatography โดยระบบ linear gradient

สำหรับการแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของเต่าทะเล (green sea turtle) ด้วย CM-Toyopearl 650 M cation exchange column chromatography ขนาด 1.5 x 85 cm flow rate 15 ml/hr และ elute โปรตีนแบบ linear gradient ด้วยความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ความเข้มข้น 0.00-0.25 M NaCl ที่เตรียมใน 0.03 M PB pH7.0 พบว่า ไลโซไซม์จะถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นประมาณ 0.2 M NaCl ในลักษณะเป็น sharp peak มีสมมาตรระหว่างโปรตีนและ activity แต่ไม่สามารถแยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์โดยใช้คอลัมน์เดียวต้องแยกต่อกับ Sephadex G50-Gel filtration chromatography จึงประสบผลสำเร็จในการแยกบริสุทธิ์ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงว่าโปรตีนในไข่ขาวของสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน

หลังจากนั้นทดสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้ทั้ง 4 ชนิด คือ SSTL A, SSTL B, ASTL และ GSTL โดย SDS-PAGE พบว่า ไลโซไซม์ทั้ง 4 ชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.8, 14.8, 14.8 และ 15.2 kDa ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับขนาดของไลโซไซม์จากไข่ไก่ที่เคยมีรายงานไว้ (Grutter, et al., 1979, Araki, et al., 1990, Araki et al., 1991) แต่ก็มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่เล็กกว่า reptile lysozyme ที่เคยมีรายงานไว้ (Gayen, et al., 1977) จากผลการทดลองนี้อาจบอกได้ว่า SSTL A, SSTL B, ASTL และ GSTL น่าจะเป็นไลโซไซม์ type C เพราะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับไลโซไซม์ type C นอกจากนี้ยังพบว่าไลโซไซม์ที่ผ่านการ purified นี้มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปศึกษาสมบัติทางเคมีและโครงสร้างต่อไปได้ ในการศึกษาี้ยังมีการ confirm activity ของไลโซไซม์ที่แยกได้ในเจล ด้วย Zymogram refolding gel เพื่อยืนยันว่าแถบโปรตีนที่ประมาณ 14.8 kDa และ 15.2 kDa นั้น เป็นไลโซไซม์จริงโดยทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเจล พบว่าแถบโปรตีนที่ประมาณ 14.8 kDa และ 15.2 kDa มีแอคติวิตีของไลโซไซม์คือสามารถย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียได้จึงทำให้สีที่ติดอยู่กับแบคทีเรียหลุดออกจึงเห็นเป็น clear zone และยืนยันว่าเอนไซม์ที่แยกได้จากตะพานน้ำทุกชนิดเป็น monomeric protein นอกจากนี้ยังพบว่า SSTL B มี activity สูงที่สุด การศึกษาเป็นรายงานแรกที่พบสองไลโซไซม์ในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน การพบไลโซไซม์หลายชนิดเคยมีรายงานใน นกและสัตว์หลายชนิด เช่น ไนไข่เปิด (Prager and Wilson, 1971) ไช่นกกระทา (Baker and Manwell, 1967) น้ำตากระต่าย (Saleh and Ibrahim, 1995), ผิวมิวโคซาของปลาเทราต์ (Fernandes, et al., 2004) และในพวงหอย (Olsen, et al., 2003). ผลการทดลองนี้อาจจะบอกได้ว่าไลโซไซม์เป็นโปรตีนที่สำคัญและมีหน้าที่ในการป้องกันกรดติดเชื้อของไข่ขาว นอกจากนี้ผลการทดลองนี้ยังแสดงความเป็นไปได้ว่า ยีนของไลโซไซม์อาจจะมีหลาย loci ในกรณีของไลโซไซม์ในตะพานน้ำ นอกจากนี้การแสดงออกของไลโซไซม์ที่แตกต่างกันในด้านจำนวนคือพบไลโซ

ไซม์สองชนิดใน species ของ *Trionyx sinensis* และอาจจะมีการพบใน *Amyda cartilaginea* ผลการทดลองนี้อาจจะช่วยในการยืนยันบทบาทและหน้าที่ของไลโซไซม์ที่แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด

เนื่องด้วยไลโซไซม์ทั้ง SSTL A, SSTL B ASTL และ GSTL มีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันจึงต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบประจุที่มีอยู่ในโมเลกุลด้วย Native-PAGE พบว่า ไลโซไซม์ทั้งสี่ชนิดจะวิ่งเข้าหาขั้วลบได้แตกต่างกัน โดย SSTL B มีความสามารถในการวิ่งเข้าหาขั้วลบได้ดีกว่า ไลโซไซม์ตัวอื่น ๆ เมื่อเทียบกับ HEWL ผลการทดลองนี้แสดงว่า ในโครงสร้างปฐมภูมิของไลโซไซม์ทั้งสี่ชนิด น่าจะมีการดะมิโนใน primary structure ที่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบการวิ่งเข้าหาขั้วลบ ของ SSTL A และ SSTL B พบว่า SSTL B น่าจะมีการดะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส (basic amino acid residues) หรือประจุบวกมากกว่า SSTL A หรือในทางกลับกัน SSTL B น่าจะมีการดะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ (acidic amino acid residues) น้อยกว่า SSTL A นั่นเอง ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถยืนยันได้กับ elution profile ที่เกิดจากการแยกด้วย cation exchanger chromatography จะเห็นว่า SSTL B ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของเกลือที่สูงกว่านั้นแสดงว่า SSTL B มีประจุบวกมากกว่า SSTL A จึงสามารถจับกับเรซินที่เป็นประจุลบในคอลัมน์ได้แน่นกว่าซึ่งเหตุผลดังกล่าวต่างก็สนับสนุนสมมุติฐานซึ่งกันและกัน และจากรูปที่ 7 GSTL เคลื่อนที่ได้ช้าที่สุดเมื่อเทียบกับไลโซไซม์ชนิดอื่นๆ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าภายในโครงสร้างของ GSTL ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุลบมากกว่าไลโซไซม์อื่น ๆ และอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ GSTL มี activity ที่ต่ำกว่าเอนไซม์อีกสามชนิดด้วยเช่นกัน

ผลการศึกษา pH optimum พบว่า HEWL จะมี broad pH optimum คือจาก 6.5-8.5 และ HEWL มี activity ดีกว่าไลโซไซม์จากตะพานน้ำถึง 8 เท่า ที่ pH 6.0 ส่วน SSTLs และ ASTL มี sharp pH optimum ที่ pH 6.0 ที่ pH สูงกว่า pH 6.0 activity ของไลโซไซม์จากตะพานน้ำจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเหลือเพียง 60% ที่ pH 7.0 ในขณะที่ HEWL ยังมีมากกว่า 50% ที่ pH 8.2 แต่อย่างไรก็ตาม GSTL ก็มี pH optimum ที่ต่างจากที่เคยมีรายงานไว้ในไลโซไซม์จากตะพานน้ำ คือที่ pH 7.5 ที่ ionic strength 0.1 (Gayen, et al., 1977) สำหรับ ionic strength 0.05 เอนไซม์ไลโซไซม์ทั้ง 4 ชนิดจะมี activity เพิ่มขึ้นเนื่องจาก ionic strength ที่ลดลงจะไปช่วยให้ binding affinity ของเอนไซม์ที่มีประจุบวกจับกับแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์เป็นประจุลบเกิดขึ้นได้ดีขึ้น สาเหตุของความแตกต่างของคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ไลโซไซม์ ที่ได้จากสัตว์เลื้อยคลานนั้น น่าจะเนื่องมาจากโครงสร้างที่มีการม้วนตัวในรูปแบบที่แตกต่างกัน และจากที่ pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ก็แสดงให้เห็นว่า basic amino acid residues นั้นเกี่ยวข้องกับ electrostatic interaction ระหว่างประจุสุทธิ (net charge) ที่เป็นบวก ของไลโซไซม์ กับประจุลบ (negative charge) ของผนังเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อ lytic activity ของไลโซไซม์ (Imoto, et al., 1972,

Muraki, et al., 1988) ไลโซไซม์จากสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มตะพาบน้ำสามารถทำงานได้ดีที่ pH ที่เป็นกรด อาจจะเป็นเนื่องมาจากการมีประจุสุทธิในโมเลกุลของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปโดยอาจจะมี การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนที่มีประจุลบมากขึ้น หรือมีจำนวนของกรดอะมิโนที่มีประจุบวกลดลง นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานไว้ว่า ถ้าอัตราส่วนของ Lys/Arg มีมาก อาจมีผลต่อการลดลงอย่างรวดเร็วของ lytic activity ของไลโซไซม์ (C-type) จากไตของกระต่าย ในช่วง pH ที่เป็นตัวต่าง (Ito et al., 1990)

สำหรับ GSTL จะมีความแตกต่างจากไลโซไซม์จากตะพาบน้ำ คือมี pH optimum ที่ pH 6.0 และ pH 8.0 ซึ่งพบเป็นครั้งแรกใน C-type แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเคยมีรายงานใน chitinase บางชนิดที่พบว่ามี dual pH optima และใน G-type lysozyme (Thammasirirak, et al., 2002) ซึ่งจากการศึกษา tertiary structure ของไลโซไซม์และโคติเนส พบว่ามีบริเวณที่เป็นแกนของโครงสร้าง 3 มิติที่เหมือนกับ C-type lysozyme (Grutter, et al., 1983) และแม้ว่า GSTL จะมี pH optimum profile ที่คล้ายกันกับ HEWL มากกว่า SSTL แต่ GSTL กลับมี activity ที่ต่ำกว่า HEWL จากเหตุผลนี้ชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการจับกับสับสเตรทของไลโซไซม์ และ mode of action ของเอนไซม์เหล่านี้จะขึ้นกับ จุดต่าง ๆ ในโครงสร้างบริเวณที่เป็น active site มากกว่าที่จะเป็น การม้วนเป็นก้อนในโครงสร้างแบบ 3 มิติ

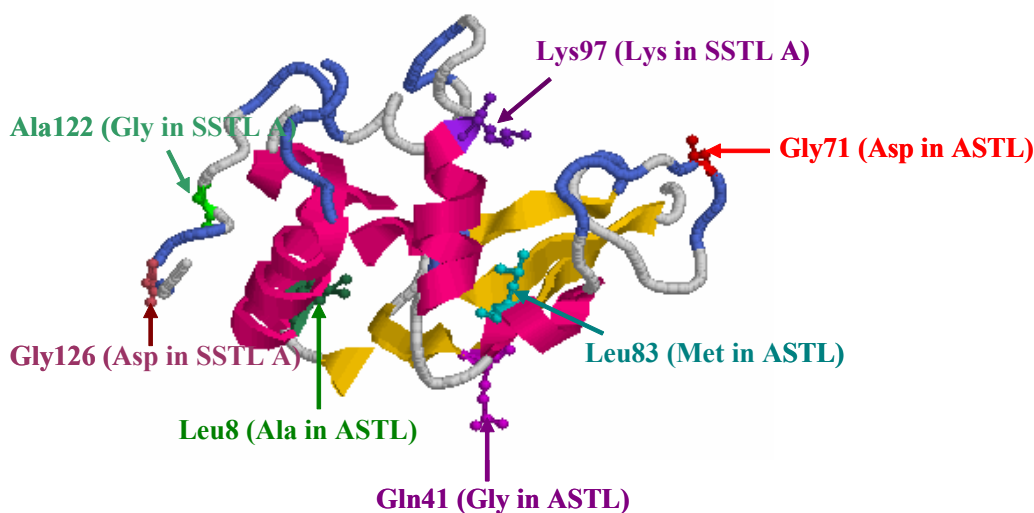
ผลการศึกษาหาอุณหภูมิที่เอนไซม์ไลโซไซม์จากไขขาวของตะพาบน้ำ (ASTL) ทำงาน ได้คงทนและนานที่สุดเปรียบเทียบกับไลโซไซม์จากตะพาบน้ำสายพันธุ์ได้หวนทั้งสองชนิด (SSTL A, SSTL B), ไลโซไซม์จากเต่าตนุ (GSTL) และไลโซไซม์จากไขขาวของไก่ (HEWL) โดยทำการ ศึกษาที่ 90 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วไลโซไซม์จากไขขาวของไก่ไม่มีสมบัติเป็น thermostable enzyme จากรายงานการวิจัยของ Thammasirirak et al.(2001) พบว่า HEWL สามารถมี lytic activity ได้ถึง 80% แม้จะ incubate ที่ 90 °C นานถึง 2 ชั่วโมง และจากผลการ ทดลอง จะเห็นได้ว่าไลโซไซม์ในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานก็มีสมบัติเป็น thermo stable enzyme โดย พบว่าเอนไซม์ทั้งห้าชนิด สามารถคงทนและทำงานได้เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่าน ไป 3 ชั่วโมง ASTL ยังมีแอกติวิตีอยู่ถึง 61% ซึ่งถือว่ายังมีแอกติวิตีสูงเมื่อเปรียบเทียบกับไลโซไซม์ อื่น ๆ ทั้งนี้คุณสมบัติในการทนความร้อนอาจจะเนื่องมาจากพันธะไดซัลไฟด์และการมีรูปร่างของ โมเลกุลอย่าง compact และจากผลการทดลองนี้อาจแสดงว่าไลโซไซม์ทั้งจากไขของสัตว์ปีกและ สัตว์เลื้อยคลานจะมี topology fold ของพันธะไดซัลไฟด์ที่เหมือนกัน

จากการศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิของไลโซไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้ โดยนำไลโซไซม์ที่ purified แล้วมาทำรีดิวซ์และทำ carboxymethylation ซึ่งเป็นการ block หมู่ -SH ของกรดอะมิโน Cystein ทำให้ไม่สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้อีก จากนั้นทำการแยก carboxymethylated lysozyme (CM-Lysozyme) ด้วย Sephadex G-50 column ซึ่งมี fractionation range อยู่ระหว่าง

1,500-30,000 Da สังเกตได้ว่า CM-Lysozyme จะชะออกมากับ void volume เนื่องจาก CM-Lysozyme ถูกรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์แล้วเส้นเพปไทด์จะไม่อยู่ในลักษณะที่เป็น globular ทำให้ผ่านรูพรุนของเมดเจลไม่ได้จึงถูกชะออกมาก่อนซึ่งการที่ CM-Lysozyme ไม่อยู่ในลักษณะ globular นั้นจะช่วยให้เอนไซม์ทริปซินเร่งการไฮโดรไลซ์พันธะเพปไทด์ได้ง่ายขึ้นในขั้นตอนการตัดด้วยทริปซิน เมื่อแยก tryptic peptides โดย C18-reversed phase HPLC สามารถแยก tryptic peptide ได้หลายขนาดตั้งแต่เพปไทด์ที่มีความเป็น hydrophobic ต่ำสุดซึ่งจะถูกชะออกมาก่อนไปจนถึงเพปไทด์ที่มีความเป็น hydrophobic สูงสุดจะถูกชะออกมาหลังสุด นำ chromatogram ที่ได้มาทำแผนที่โปรตีน (peptide mapping) โดยเปรียบเทียบกับไลโซไซม์จากตะพาน้ำสายพันธุ์ไต้หวันทั้งสองชนิดเทียบกับ tryptic peptide ของ HEWL ซึ่ง peak (peptide) ใดของ SSTL A หรือที่มี retention time ตรงกับ retention time ของ HEWL จะถือว่ามีการดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (amino acid composition) และมีลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ตรงกัน ซึ่ง peak (peptide) ใดที่มี retention time ที่ต่างออกไปได้นำไปหาลำดับกรดอะมิโน (amino acid composition) ผลจากการทำ peptide mapping พบ peak (peptide) ที่มีตำแหน่งหรือ retention time ของ SSTL A และ SSTL B ที่ต่างออกไปจาก HEWL จึงได้นำ peak ของ SSTL A และ SSTL B มาหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเส้นเพปไทด์ (amino acid composition) ด้วย HPLC (Post column derivatized with ninhydrin, post-column OPA derivatization) แต่เนื่องจาก มีบาง peak ที่มีลักษณะเป็น broad peak จำเป็นต้องทำ rechromatogram ซึ่งทำให้แยก peak ออกจากกันได้ชัดเจนขึ้น แล้วนำ peak เหล่านี้ไปหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ จากนั้นคำนวณจำนวนหน่วยของกรดอะมิโน (residue) ในแต่ละเส้นเพปไทด์ แล้วนำชนิดและจำนวน (residue) กรดอะมิโนที่ได้นั้นมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ SSTL ทั้งสองชนิด กับ HEWL ที่ทราบลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดแล้วและเทียบกับ SSTL *Japonicus* พบว่า SSTL A มีลำดับกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกับ SSTL B มาก โดยพบว่า มี substitution 3 ตำแหน่งคือ คือ ตำแหน่ง Arg 97 ใน SSTL B เปลี่ยนเป็น Lys ใน SSTL A, Gln122 ใน SSTL B เปลี่ยนเป็น Gly ใน SSTL A และ Gly126 ใน SSTL B เปลี่ยนเป็น Asp ใน SSTL A นอกจากนี้จากผลการทดลองนี้แสดงได้อย่างชัดเจนว่าบริเวณ N-terminus ของโปรตีนมี insertion ด้วยกรดอะมิโน Gly นอกจากนี้ยังพบ insertion ด้วยกรดอะมิโน Gly ระหว่างตำแหน่งที่ 47 และ 48 ซึ่งการ insertion ในตำแหน่งนี้เคยมีรายงานใน Human lysozyme จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ไลโซไซม์จากไขขาวของตะพาน้ำทั้งสองชนิดคือ SSTL A และ SSTL B มีกรดอะมิโน 131 ตัว ซึ่งต่างจาก HEWL ที่มีกรดอะมิโน 129 ตัว เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ SSTL B ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับ SSTL *Japonicus* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ SSTL B เหมือนกับ SSTL *Japonicus* ทุกลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่า

ตะพานน้ำสายพันธุ์ไต้หวันมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตะพานน้ำสายพันธุ์ญี่ปุ่นมากซึ่งเป็นไปได้ว่าตะพานน้ำสองสายพันธุ์นี้มีสายวิวัฒนาการมาร่วมกัน

การมี Substitutions เกิดขึ้นสามตำแหน่งระหว่างเอนไซม์ไลโซไซม์สองชนิด จากไข่ขาวของ *Trionyx sinensis Chinese* นี้เหมือนกับที่เคยมีรายงานใน multiple duck egg white lysozyme (Prager and Wilson, 1971) และ quail lysozyme (Thammasirak et al. unpublished data) พบว่าจะมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันน้อยตั้งแต่ 1-3 ตัว จากข้อมูลโครงสร้างสามมิติและกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น binding subsite ของ HEWL (Blake, C.C.F et al., 1965) พบว่าการ substitutions ที่ ตำแหน่ง 97, 122 และ 126 จะอยู่บริเวณผิวรอบนอกของโมเลกุลของไลโซไซม์ไม่เกี่ยวข้องกับ binding subsites ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 โครงสร้าง 3 มิติ (Three dimensional structure) ของ เอนไซม์ไลโซไซม์จาก HEWL

แต่การเกิด Substitutions ในสามตำแหน่งนี้อาจทำให้ประจุสุทธิ (net charge) บริเวณผิวของไลโซไซม์ทั้งสองชนิดแตกต่างกันจนสามารถแยกได้อย่างสมบูรณ์โดย cation exchanger column chromatography และนอกจากนี้การมี ประจุสุทธิ (net charge) บริเวณผิวที่เปลี่ยนแปลงไปอาจจะมีผลต่อ enzymatic activity โดยเฉพาะ lytic activity ที่ใช้ ionic interaction ระหว่างเซลล์แบคทีเรีย กับโมเลกุลของเอนไซม์ในขั้นตอนแรกของการเกิด catalysis mechanism

เมื่อศึกษา peptide mapping ระหว่าง SSTL A, SSTL B และ ASTL พบว่า peak ของ ASTL มี retention time ต่างจาก SSTL B อย่างน้อย 7 ตำแหน่งซึ่งได้นำมาหาลำดับกรดอะมิโน ก็พบว่าเกิด substitution ขึ้นใน ASTL อย่างน้อย 4 ตำแหน่งคือ Leu 8 เปลี่ยนเป็น Ala, Ala 41 เป็น Gly, Lys 71 เปลี่ยนเป็น Asp และ Leu 83 เปลี่ยนเป็น Met เมื่อเปรียบเทียบกับ SSTL B การ substitutions ในตำแหน่งบริเวณดังกล่าวนี้ ไม่ได้อยู่บริเวณ binding subsite ของไลโซไซม์

เช่นกัน แต่การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 8 คือ Leu เปลี่ยนเป็น Ala และตำแหน่งที่ 83 คือ Leu เป็น Met จะพบเป็นครั้งแรกในกลุ่มของ C-type lysozyme ถึงแม้ว่าการ substitution อาจจะไม่มียผลกระทบที่รุนแรงจากการเปลี่ยนแปลง charge ของ amino acid แต่ก็อาจจะมีผลต่อการทำงานของไลโซไซม์ที่จับกับสับสเตรท และอาจจะส่งผลให้แอคติวิตีของไลโซไซม์เปลี่ยนแปลงไปซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป

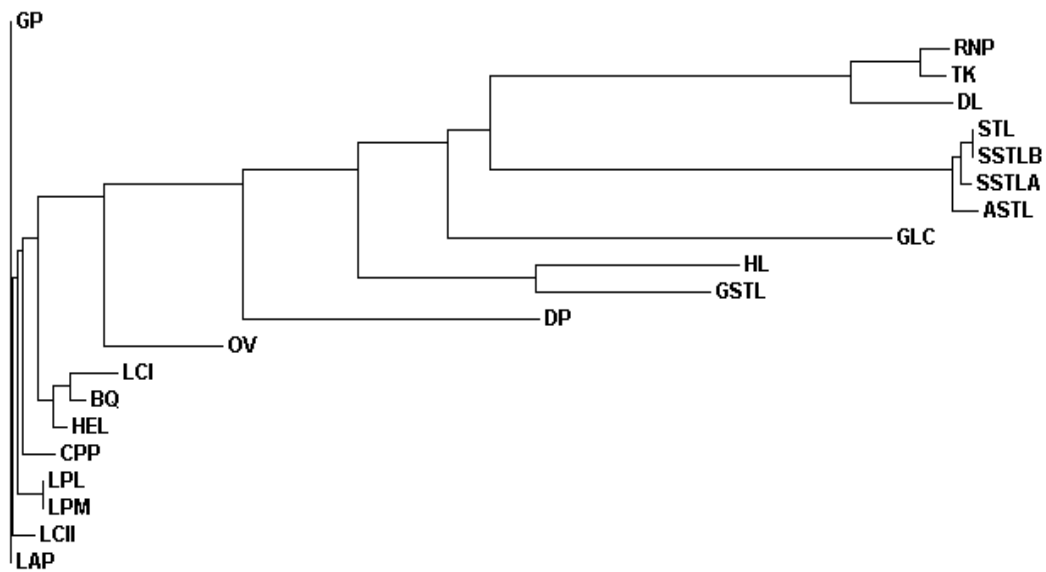
เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไลโซไซม์ที่แยกได้สามตัวกับ HEWL Human lysozyme ดังรูปที่ 23 พบว่าไลโซไซม์ type C ทุกชนิดจะมี completely conserve ของ Glu 35 และ Asp 52 ซึ่งเป็น catalytic amino acid นอกจากนี้กรดอะมิโน cystein ทั้งแปดตำแหน่งก็มี conserve ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่านอกจากการมี conserve catalytic amino acid เพื่อการเกิด catalysis แล้วการมี conserve topology folding ใน three dimensional structure ก็มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์เช่นกัน การเกิด Gly แทรกทางด้านปลาย N (N-terminal) ของ SSTLs เหมือนที่ Araki และคณะ (1998) ได้เคยรายงานไว้ และยังพบว่ามี Gly แทรกในลำดับกรดอะมิโนระหว่างตำแหน่งที่ 47 และ 48 ของ SSTL (*Trionyx sinensis Japonicus*) ซึ่งพบในไลโซไซม์ของมนุษย์ด้วย นอกจากนี้ ไลโซไซม์จาก Japanese pheasant และ ring neck pheasant (Jolles, et al. 1979) ก็พบว่ามี Gly แทรกในลำดับกรดอะมิโนทาง N-terminal ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าไลโซไซม์จากสัตว์เลื้อยคลานนั้นมีขบวนการ posttranslational modification ที่ต่างจาก C-type lysozyme ชนิดอื่นๆ และในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานเองก็มีความแตกต่างกันซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเกิด insertion ไม่ได้เกิดจากการทำงานของยีนแต่เกิดจาก ขบวนการ posttranslational modification ที่ต่างกัน ส่วนลำดับกรดอะมิโนของ GSTL นั้นมีลำดับกรดอะมิโนทาง N-terminal เกือบจะเหมือนกันกับ HEWL และ human lysozyme และไม่พบการ insertion ที่ N-terminal และแม้ว่า SSTLs และ GSTL อยู่ใน class เดียวกัน แต่ทั้ง SSTLs และ GSTL ก็มีขบวนการ posttranslational modification ที่ต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้มีคุณสมบัติทางด้าน biological function ที่แตกต่างกันด้วย

จากรูปที่ 23 ยังพบว่า ในกลุ่มของ reptile lysozymes จะมีการ substitution เกิดขึ้นที่บริเวณ binding subsite คือ site E และ site F เมื่อเทียบกับ HEWL (label สีเทา) คือ Phe34, Arg45, Thr47 และ Arg114 จะถูกแทนที่โดย His, Tyr, Arg และ Tyr ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในบริเวณนี้มีผลกระทบต่อการ catalysis ของเอนไซม์ไลโซไซม์อย่างแน่นอนโดย Araki และคณะ (1998) พบว่า มีการลดลงของค่าคงที่ของอัตราเร็วในการตัดพันธะไกลโคซิดิกและมีการเพิ่มขึ้นของ binding free energy ใน subsite E และ F ซึ่งจากการศึกษา primary structure ของ reptile lysozyme เปรียบเทียบกันหลายๆ ชนิดดังเช่นในรายงานฉบับนี้ซึ่งพบว่า ไลโซไซม์ในสัตว์เลื้อยคลานมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันซึ่งการแตกต่างกันของกรดอะมิโนทั้งในตำแหน่งของ

binding subsite หรือ อยู่นอก binding subsite ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาต่อเนื่องถึง catalysis mechanism อาจจะนำไปสู่การเข้าใจหรือกลไกการเกิด transglycosylation ในไลโซไซม์ได้ดีมากขึ้น เพราะมีหลายรายงานที่กล่าวว่า binding subsite E และ F เกี่ยวข้องโดยตรงกับกลไกการเกิด transglycosylation (Inoue, et al., 1992, Smith-Gill, et al., 1984, Pincus and Scheraga 1981) ซึ่งน่าสนใจอย่างมากในการศึกษาต่อไป และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ reptile lysozymes ที่แยกได้ไปศึกษาสายวิวัฒนาการเปรียบเทียบกับไลโซไซม์ชนิดอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 24 คือ จะเห็นได้ว่ากลุ่มของ reptile lysozymes (STL, SSTL A, SSTL B and ASTL) ยกเว้น GSTL จะมีสายวิวัฒนาการที่อยู่ระหว่างพวก bird lysozyme และ human lysozyme นอกจากนี้ยังพบว่า GSTL มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ Human lysozyme ซึ่งจากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า การใช้ morphology อย่างเดียวในการ classification อาจจะมีปัญหาได้ แต่อย่างไรก็ตามรายงานนี้อาจจะเป็นรายงานแรกที่ทำให้ทั้งรายละเอียดของ primary structure และ catalysis mechanism ของ reptile lysozyme ซึ่งการมีการศึกษาทั้งในด้าน diversity และ catalysis mechanism อาจจะนำไปสู่การเข้าใจการทำงานของไลโซไซม์ได้ดีมากขึ้น

โดยสรุปแล้วคุณสมบัติด้านเอนไซม์ของ SSTL A, SSTL B, ASTL และ GSTL ค่อนข้างที่จะมีความแตกต่างจากไลโซไซม์จากเต่าที่เคยมีรายงานไว้แล้ว ซึ่งคุณสมบัติที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนใน pH optimum คุณสมบัติในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย และผลการศึกษานี้ก็ยืนยันอย่างชัดเจนว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีโครงสร้างระดับปฐมภูมิที่แตกต่างกัน และความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างของโปรตีนก็มีผลกระทบต่อกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่ง substrate binding mechanism และ catalytic mechanism จะได้ทำการศึกษาต่อไปซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะการเกิด transglycosylation reaction ของไลโซไซม์ ในโครงการวิจัยนี้ได้ข้อมูลใหม่ในหลาย ๆ ด้านของเอนไซม์ไลโซไซม์ซึ่งได้ส่งตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศและมีการเข้าร่วมเสนอผลงานทั้งระดับ International และ Local ดังรายละเอียดในภาคผนวก

[illegible]



รูปที่ 24 Phylogenetic tree of C-type lysozyme

GP	(JH0212)	: golden pheasant
RNP	(LZFER)	: Ring-necked pheasant
TK	(P00703)	: Lysozyme C (<i>Meleagris gallopavo</i> (Turkey))
DL	(P00705)	: Duck Lysozyme
STL		: <i>Trionyx sinensis japonicus</i>
SSTL B		: Chinese soft shell turtle
SSTL A		: Chinese soft shell turtle
GLC	(NP001001470)	: Gallus (Chicken)
HL		: Human Lysozyme
GSTL		: Green sea turtle lysozyme
DP	(P00708)	: Domestic pigeon
OV	(P00707)	: <i>Ortalis vetula</i>
LC I	(P00704)	: Lysozyme C (Quinea-hen)
BQ	(P00700)	: Northern bobwhite quail
HEL		: Hen egg white lysozyme
CPP	(AAB31830)	: Copper pheasant
LPL	(AAB20837)	: <i>Lophura leucomelana</i> : Kali pheasant
LPM	(P24364)	: Lysozyme C (<i>Lophura leucomelanos</i>)
LC II	(P24533)	: Lysozyme C
LAP	(P22910)	: Lady Amherst's pheasant

บรรณานุกรม

- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์., 2530. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย.กรุงเทพมหานคร :
- องค์การค้าคุรุสภา
- จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์., 2541. การเพาะเลี้ยงและโรคของตะพาบน้ำในประเทศไทย. คู่มือการทำ
กำไรด้วยการเพาะเลี้ยงตะพาบน้ำ ฉบับสมบูรณ์แบบ. 2, 7-26
- พลากร พลโยธี., 2546. การศึกษาเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) ในไข่ขาวของตะพาบน้ำสายพันธุ์
ไต้หวัน *Trionyx sinensis tiwanese*. โครงการวิจัยหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีว
เคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- บุญเลิศ ผาสุก., 2535. การอนุรักษ์เต่าทะเลในประเทศไทย. วารสารการประมง. 45(3), 807-819
- สุทธิเดช ปรีชารัมย์., 2546. การทำแผนที่โปรตีน (peptide mapping) สำหรับหาโครงสร้างปฐม
ภูมิของไลโซไซม์ในไข่ขาวของตะพาบน้ำพันธุ์ไต้หวัน (*Trionyx sinensis tiwanese*) โครง
การวิจัยหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ขอนแก่น
- รัฐกาล ขาลฉนวน., 2546. การทำบริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติทางเคมีและทางโครงสร้างของ
เอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) ในไข่ขาวของตะพาบน้ำสายพันธุ์ไต้หวัน *Trionyx sinensis*
tiwanese. โครงการวิจัยหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- Aguirre A.A, Colin J. Limpus, Terry R. Spraker, and George H. Balazs ., 1999.
Survey of Fibropapillomatosis and other potential diseases of marine turtles from
Moreton Bay, Queensland, Australia. FP papers presented at the 19th Annual
Sea turtle Symposium.
- Anderson, W.F., Grutter, M.G., Remington, S.J., Matthews, B.W., 1981. Crystallographic
determination of the mode of binding of oligosaccharide to T4 bacteriophage
lysozyme: implications for the mechanism of catalysis. J. Mol. Biol. 147, 523-543.
- Araki, T., Kuramoto, M., Torikata, T., 1990. The amino acid sequence of Lady Amherest's
pheasant (*Chrysolophus amherstiae*) and golden pheasant (*Chrysolophus*
pictus) egg-white lysozymes. Agric. Biol. Chem. 54, 2299-2308.

- Araki, T., Kudo, K., Kuramoto, M., Torikata, T., 1991a. The amino acid sequence of lysozyme from kalij pheasant (*Lophura leucomelana*) egg- white. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1701-1706.
- Araki, T., Kuramoto, M., Torikata, T., 1991b. The amino acid sequence of reeves' pheasant (*Syrmaticus reevesii*) lysozyme. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1707-1713.
- Araki, T., Kuramoto, M., Torikata, T., 1994. The amino acid sequence of copper pheasant lysozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 794-795.
- Araki, T., Yamamoto, T., Torikata, T., 1998. Reptile lysozyme: The complete amino acid sequence of soft-shelled turtle lysozyme and its activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 316-324.
- Araki, T., Torikata, T., 1999. The amino acid sequence of wood duck lysozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 220-222.
- Aschaffenburg, R., Blake, C.C., Dickie, H.M., Gayen S.K., Keegan, R., Sen, A., 1980. The crystal structure of tortoise egg-white lysozyme at 6 Å resolution. *Biochim. Biophys. Acta.*, 625, 64-71.
- Baker, C.M.A., Manwell, C. 1967. Molecular genetics of avian proteins. 8. Egg white proteins of the migratory quail, *Coturnix coturnix*--new concepts of "hybrid vigour". *Comp. Biochem. Physiol.* 23, 21-42.
- Barrett, S., 1996. Disease Threatens Green Sea Turtles. *The Endangered Species Bulletin.* 21, 2.
- Blake, C.C.F., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillip, D.C., Serma, V. R., 1965. Structure of hen egg white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2° Å resolution. *Nature* 206, 757-761.
- Canfield, R. E., 1963. The amino acid sequence of egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.* 238, 2698-2707.
- Crestfield, A. M., Moore, S., Stein, W.H., 1963. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622-627.
- Dautigny, A., Prager, E.M., Pham-Dinh, D., Jollès, J., Pakdel, F., Grinde, B., Jollès, P., 1991. cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin. *J. Mol. Evol.* 32, 187-198.

- Fernandes, J.M.O., Kemp, G.D., Smith, V.J., 2004. Two novel muramidases from skin mucosa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 138, 53-64.
- Gayen, S.K., Som, S., Sinha, N.K., Sen, A., 1977. Lysozyme in egg whites of tortoises and turtle. Purification and properties of egg white lysozyme of *Trionyx gangeticus* Cuvier. *Arch. Biochem. Biophys.* 183, 432-442.
- Grutter, M.G., Rine K.L., Mathews, B.W., 1979. Crystallographic data for lysozyme from the egg white of the Embden goose. *J. Biol. Chem.* 135, 1029-1032.
- Grutter, M.G., Weaver, L.H., Matthews, B.W., 1983. Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozyme?. *Nature* 303, 828-831.
- Hardt, M., Guo, Y., Henderson, G., Laine, R.A., 2003. Zymogram with remazol brilliant blue-labeled *Micrococcus lysodeikticus* cells for the detection of lysozymes: example of a new lysozyme activity in Formosan termite defense secretions. *Anal. Biochem.* 312, 73-76.
- Imoto, T. Johnson, L.N., North, A.C.T., Phillips, D.C., and Rupley, J.R., 1972. *Enzyme* (Boyer, P.D., ed.) 3rd 7, Academic press, New York, pp. 665-868.
- Inoue, M., Imada, M., Tsugita, A. 1970. The amino acid sequence of T4 phage lysozyme. IV. Diluted acid hydrolysis and order of tryptic peptides *J. Biol. Chem.* 245, 3479-3484.
- Inoue M, Yamada H, Yasukochi T, Miki T, Horiuchi T, Imoto T. 1992 Left-sided substrate binding of lysozyme: evidence for the involvement of asparagine-46 in the initial binding of substrate to chicken lysozyme. *Biochemistry.* 31 : :10322-30.
- Ito, Y., Yamada, H., Nakamura, S., Imoto, T., 1990. Purification, amino acid sequence, and some properties of rabbit kidney lysozyme. *J. Biochem. (Tokyo).* 107, 236-241.
- Ito, Y., Yamada, H., Nakamura, M., Yoshikawa, A., Ueda, T., Imoto, T., 1993. The primary structures and properties of non-stomach lysozymes of sheep and cow, and implication for functional divergence of lysozyme. *Eur. J. Biochem.* 213, 649-658.

- Jolles J., Jauregui-Adell, J., Bernier, I., Jolles, P., 1963. La structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule: etude detailee. *Biochim. Biophys. Acta.* 78, 668-689.
- Jolles, J., Jolles, P., 1971. Human milk lysozyme: unpublished data concerning the establishment of the complete primary structure; comparison with lysozyme of various origins. *Helv. Chim. Acta.* 54, 2668-2675.
- Jolles, J., Ibrahimi, I.M., Prager, E.M., Schoentgen, P., Jolles, P., and Wilson, A.C., 1979. Amino acid sequence of pheasant lysozyme. Evolutionary change affecting processing of prelysozyme. *Biochemistry* 18, 2744-2752
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, W.J., Brey, P.T., 1995. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Gene* 161, 199-203.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A.L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Matthews, B.W., Remington, S.J., 1974. The three dimensional structure of the lysozyme from bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71, 4178-4182.
- Matthews, B.W., Remington, S.J., Grütter, M.G., Anderson, F.W., 1981. Relation between hen egg-white lysozyme and bacteriophage T4 lysozyme: evolutionary implication. *J. Mol. Biol.* 147, 545-558.
- Muraki, M., Morikawa, M., Jigami, Y., Tanaka, H., 1988. Engineering of human lysozyme as a polyelectrolyte by the alteration of molecular surfacecharge. *Protein Eng.* 2, 49-55.
- Olsen, O. M., Nilsen, I.W., Sletten, K., Myrnes B. 2003. Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 136, 107-115.
- Pincus MR, Scheraga HA. 1981. Prediction of the three-dimensional structures of complexes of lysozyme with cell wall substrates. *J. Biol. Chem.* 256(14):3960-5.
- Prager, E. M., Wilson, A.C., 1971. Multiple lysozymes of duck egg white. *J. Biol. Chem.* 246, 523-530.
- Prager, E.M., Arnheim, N., Mross, G.A., Wilson, A.C., 1972. Amino acid sequence studies on bobwhite quail egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.* 247, 2905-2916.

- Raidal, SR., Ohara, M., Hobbs, RP., and Prince, R., 1998. Gram-negative bacterial infections and cardiovascular parasitism in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Aust Vet J.* 76, 6.
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E., 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195, 281-283.
- Rinderknecht, H., Widding, P., Haverback, B. J., 1967. A new method for the determination of alpha-amylase. *Experientia.* 23, 805.
- Saleh, A.M., Ibrahimi, I.M., 1995. Electrophoretic polymorphism in rabbit tear lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B, 21-30.
- Sea turtle Survival League., 1998. 566 sea turtle found dead along Florida shores from January to June 1998 ; boat/sea turtle collisions twice that of previous ten-year average.
- Simpson, R.J., Begg, G.S., Dorow, D.S., Morgan, F.J., 1980. Complete amino acid sequence of goose type lysozyme from the egg white of black swan. *Biochemistry* 19, 1814-1819.
- Smith-Gill SJ, Rupley JA, Pincus MR, Carty RP, Scheraga HA. 1984 Experimental identification of a theoretically predicted "left-sided" binding mode for (GlcNAc) 6 in the active site of lysozyme. *J. Biol. Chem.* 259:993-7.
- Strynadka, N.C.J., James, M.N.G. 1991. Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D. *J. Mol. Biol.* 220, 401-424.
- Thammasirirak, S., Torikata, T., Takami, K., Murata, K., Araki, T. 2002. The primary structure of cassowary (*Casuarius casuaris*) goose type lysozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 147-156.
- Weaver, L.H., Grutter, M.G., Remington, S. J., Gray, T. M., Isaacs, N.W. and Mathews B.W. 1985. Comparison of goose type, chicken type, and phage type lysozyme illustrates the change that occurs in both amino acid sequence and three dimensional structure during evolution. *J. Mol. Evol.* 21, 97-111.

ภาคผนวก

Out put ที่เกิดจากโครงการ

1. Publications in International Journals

- 1.1 Sompong Thammasirirak, Pornpimol Ponkham, Sutthidech Preecharram, Rathakarn Khanchanuan, Phalakorn Phonyothee, Sakda Daduang, Chantragan Srisomsap, Tomohiro Araki and Jisnuson Svasti. Purification, characterization and comparison of reptile lysozyme (Submitted) *Comparative Biochemistry and Physiology*. (2005)
- 1.2 Pornpimol Ponkham, Sakda Daduang, Tomohiro Araki, Chantragan Srisomsap, Darunee Chokchaichamkit, Jisnuson Svasti, and Sompong Thammasirirak. Complete amino acid sequence of three reptile lysozymes. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry* (In preparation) (2005)

2. Abstracts in National and International Meetings and Other Presentations of Research Results

2.1 Presentations at International Meetings

- 2.1.1 Sompong Thammasirirak, Pornpimol Ponkham, Sutthidech Preecharram, Somchart Wongkeaw, Sakda daduang and Jisnuson Svati (2003) Multiple lysozymes of quail (*Coturnix Coturnix*) egg white. 29TH Congress on Science and Technology of Thailand 2003, 20-22 October, 2003 Khon Kean, Thailand. (Oral presentation)
- 2.1.2 Pornpimol Ponkham, Sompong Thammasirirak, and Sakda Daduang (2003) Purification and characterization of green sea turtle (*Chelonia mydas*) egg. 29TH Congress on Science and Technology of Thailand 2003, 20-22 October, 2003 Khon Kean, Thailand. (Poster)
- 2.1.3 Sutthidech Preecharram, Sompong Thammasirirak, Rathakarn Khamchanuan, Sakda Daduang and Jisnuson Svasti (2003) Partial amino acid sequence of soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis tiwanese*) egg white lysozyme by peptide mapping. 29TH Congress on Science and Technology of Thailand 2003, 20-22 October, 2003 Khon Kean, Thailand. (Poster)

- 2.1.4 Pornpimol Ponkham, Sompong Thammasirak, Phalakorn Phonyothee, Sakda Daduang, Jisnusun Svati and Tomohiro Araki. LYSOZYME IN EGG WHITE OF REPTILES. Second Protein research Network Symposium (2005) Bangkok Thailand 22-23 September 2005
- 2.1.5 Pornpimol Ponkham, Sompong Thammasirak, Sakda Daduang, Jisnusun Svati and Tomohiro Araki. PEPTIDE MAPPING OF REPTILE LYSOZYMES. 31TH Congress on Science and Technology of Thailand 2005, 18-20 October, 2005 Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhonrachasima, Thailand.

2.2 Presentations at National Meetings

- 2.2.1 Sompong Thammasirak, Sutthidech Preecharram and Jisnusun Svati. Primary structure of Reptile lysozyme. Joint Senior Research Scholar Meeting. Royal River Hotel, Bangkok, Thailand 22-23 August 2003
- 2.2.2 Sompong Thammasirak, Pornpimol Ponkham, Sutthidech Preecharram, Sakda Daduang, Chantragan Srisomsap and Jisnusun Svasti. Primary structure of Reptile lysozyme. Joint Senior Research Scholar Meeting. Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand 14-15 September 2004
- 2.2.3 พลากร พลโยธี ศักดา ดาดวง ธีรศักดิ์ สมดี และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์ (2004). การแยกบริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางเคมีและทางโครงสร้างของโปรตีนไลโซไซม์ในไข่ขาวของตะพาบน้ำ (*Trionyx sinensis tiwanese*) The 2nd TRF undergraduate Technology Development Exhibition 30 April-2 May 2004, IT Mall, Fortune Town, Bangkok, Thailand
- 2.2.4 อรุณรัตน์ มานอก ศักดา ดาดวง และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์ (2005). การทำแผนที่โปรตีน (peptide mapping) ของไลโซไซม์จากไข่ขาวของตะพาบน้ำ (*Amyda cartilaginea*). งานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 3 วันที่ 1-3 พฤษภาคม 2548 ณ ฮอลล์พระราม 2 ชั้น 4 ห้างสรรพสินค้าเซ็นทรัลพระราม 2 กรุงเทพมหานคร.
- 2.2.5 Thammasirak, S., Ponkham, P., Preecharram, S., Daduang, S., Araki, T. and Svasti, J. (2005) Purification and characterization of reptile lysozymes. นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 14-16 มกราคม 2548 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว กาญจนบุรี