



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การแยกบริสุทธิ์เอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก
และศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

โดย

อ.ดร.สมพร เกษแก้ว

พฤษภาคม 2555

สัญญาเลขที่ MRG5280143

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การแยกบริสุทธิ์เอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก
และศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

โดย

อ.ดร.สมพร เกษแก้ว

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุน จากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ตามโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ถึงแม้ว่ารายงานฉบับสมบูรณ์ฉบับนี้จะส่งล่าช้าไปถึง 1 ปีกว่า อุปสรรค และปัญหาต่างๆในระหว่างการทำวิจัยก็ได้สร้างบทเรียนที่สำคัญให้แก่ข้าพเจ้า เพื่อจะเป็นนักวิจัยที่ดีต่อไป งานวิจัยนี้ถึงแม้จะไม่ได้ผลตามสิ่งที่คาดหวังและยังไม่ได้เผยแพร่หรือตีพิมพ์ในวารสารต่างๆ แต่ข้อมูลที่ได้ก็เป็นฐานข้อมูลสำคัญในการสร้างงานวิจัยในเชิงลึกซึ่งต่อไป พร้อมกันนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณ นายชฎาวุฒิ เนืองนนท์ นางสาวนุชจรี เขียวมีส่วน นางสาววรารมณห์ หล่อเจริญชัย นางสาวปวีณา วงศ์ภาคำ และนายอาชนะ แสงวงศ์ นักศึกษาโปรเจกต์ในความดูแลของข้าพเจ้า ที่ช่วยเป็นแรงกายและแรงใจให้ข้าพเจ้าทำงานนี้จนสำเร็จ นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยเพิ่มเติมสำหรับนักวิจัยใหม่ของภาควิชา อำนวยความสะดวกเรื่องห้องปฏิบัติการฯ และเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัยต่างๆเพื่อใช้ในการเริ่มต้นทำวิจัย ขอขอบคุณคณาจารย์ในภาควิชาชีวเคมี และบุคลากร ในการอำนวยความสะดวกและเป็นที่ปรึกษาในการเริ่มต้นทำวิจัย ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คู่ชีวิตและบุตรชาย ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สมพร เกษแก้ว

บทคัดย่อ

MRG5280143

ชื่อโครงการ: การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

นักวิจัย: นายสมพร เกษแก้ว ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อีเมลล์: somkat@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 16 มีนาคม 2552 – 15 มีนาคม 2554

เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (RNase) จัดอยู่ในกลุ่ม EC 3.1.27 เร่งการย่อยสลาย RNA มีบทบาทหน้าที่สำคัญในกระบวนการ transcription, translation และอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ในกลุ่มของ RNase A เช่น Onconase ซึ่งเป็น RNase ที่แยกได้จากกบ Northern Leopard frog (*Rana pipiens*) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ HIV-1 และยังพบบทบาทหน้าที่อื่นๆ อีกมากมาย ประเทศไทยมีความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมาก มีโอกาสสูงที่จะพบโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ทางยาหรือมีประโยชน์ด้านต่างๆ จากการศึกษาเพื่อคัดกรองหาเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากตัวอย่างสัตว์ทดลอง 5 ชนิด ได้แก่ กบนา (*Rana tigerina*) อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*) กบจุก (*Rana pileata*) กบอ่องบ่อ (*Rana nigrovittata*) ปาดบ้าน (*Polypedates mutus*) พบรูปแบบของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเด่นๆ เพียง 2 isoforms ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 และ 14 kDa และพบว่าไรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอึ่งอ่างเป็นตัวแทนที่ดีของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก การศึกษาครั้งนี้จะใช้อึ่งอ่าง (*Kaloula pulchra*) และอึ่งเผ่า (*Glyphoglossus molossus*) โดยโปรตีนสกัดจากไข่จะถูกนำมาแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก และไฮโดรโฟบิกคอลัมน์ พบว่าเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส จากอึ่งอ่างมีค่าความจำเพาะต่อ RNA เท่ากับ 50.95 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 2.07 เท่า สำหรับอึ่งเผ่า มีค่าความจำเพาะเท่ากับ 87.35 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 11.02 เท่า เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่แยกบริสุทธิ์ได้จากอึ่งอ่างและอึ่งเผ่าสามารถทำงานได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 มีความเสถียรในช่วงพีเอช 4.0 ถึงพีเอช 6.0 และอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส ผลของไอออนแมกนีเซียม ไอออนปรอท และไอออนสังกะสี มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่ไอออนแคลเซียม มีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้เพิ่มสูงขึ้น เอนไซม์จากอึ่งเผ่าสามารถย่อยสับสเตรทชนิดที่เป็น โพลีซี และโพลียู แต่เอนไซม์จากอึ่งอ่างสามารถย่อยสับสเตรทได้ทั้ง 3 ชนิดทั้งโพลีซี และโพลียู และโพลีเอได้ เอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากอึ่งอ่าง (0.5-16 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และอึ่งเผ่า (1.28-41 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบได้คือ HCT116, HT29 และ Hela เซลล์ เทียบกับ Vero เซลล์ การวิเคราะห์โปรตีนขนาด 13 กิโลดาลตันของอึ่งอ่าง และ 14 กิโลดาลตันของอึ่งเผ่า ด้วยเทคนิค แอลซีเอ็มเอส (LC/MS) ไม่พบเปปไทด์ของโปรตีนขนาด 13 กิโลดาลตัน ที่เหมือนกับไรโบนิวคลีเอส ในฐานข้อมูล แต่พบบางชิ้นของเปปไทด์จากโปรตีนขนาด 14 กิโลดาลตันเหมือนกับไรโบนิวคลีเอสพี คอมโพเนนต์ ของ *Borrelia turicatae* 91E135, *B. hermsii* DAH *B. duttonii* Ly.

คำหลัก: สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ, การทำบริสุทธิ์, เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส, มะเร็ง

Abstract

MRG5280143

Project Title: Purification of amphibian ribonucleases and study the growth inhibition of cancer cells

Investigator: Mr.Somporn Katekaew Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University

E-mail address: somkat@kku.ac.th

Project period: 16 March 2009 – 15 March 2011

Ribonuclease (RNase, EC 3.1.27) plays an important role in transcription, translation and other processes. Onconase, RNase A isolated from Northern Leopard frog (*Rana pipiens*), has been reported in inhibiting cancerous cell growth, HIV-1 proliferation, and many other pathogenic cells. Thailand has a variety of amphibians, so chances to found the new type of ribonucleases contained the effect of various drugs or useful are high. According to a study to screen for ribonuclease from 5 species of Amphibians; *Rana tigerina*, *Kaloula pulchra*, *Rana pileata*, *Rana nigrovittata* and *Polypedates mutus*. There are only 2 isoforms of ribonuclease with a molecular weight of approximately 13 and 14 kDa, which were found and indicated that *Kaloula pulchra* and *Glyphoglossus molossus* are a good representation of amphibians. This study use extracted oocytes of *K. pulchra* and *G. molossus*, which were purified by cation exchange column chromatography (CM-sepharose) and (C4) RP-HPLC. The RNase of *G. molossus* was purified about 11.02 fold and specific activity of 87.35 unit/mg. The RNase of *K. pulchra* was purified about 2.07 fold and specific activity of 50.95 unit/mg. These RNases had a similar optimum pH and temperature at 5.0 and 60 °C, respectively. These enzymes were stable at broad pH range from 4.0 to 6.0 and stable up to 60 °C after 1 h pre-incubation. They were strongly inhibited by Mg^{2+} , Hg^{2+} and Zn^{2+} but were enhanced by Ca^{2+} . The RNase activities of *G. molossus* toward poly (C) were the highest while those toward poly (U) the second and those toward poly (A) the third which were barely detectable. Conversely, the RNase of *K. pulchra* could cleave poly (A) as well as poly (C) and poly (U). Similarly, however, RNase of *G. molossus* (1.28-41ng/ml) and RNase of *K. pulchra* (0.5-16 ng/ml) had no antiproliferative activity on three cancer cell lines and non cancer cell lines. The peptide mass fingerprints of protein 13 kDa of *K. pulchra* and 14 kDa of *G. molossus* were determined by LC/MS and MASSCOT program. The results showed that 13 kDa of *K. pulchra* no identical peptide mass fingerprint compared to the protein database. However, some peptides fragment of 14 kDa of *G. molossus* showed identical the RNase P proteins component of *Borrelia turicatae* 91E135, *B. hermsii* DAH and *B. duttonii* Ly.

Key words: amphibians, purification, ribonuclease, cancer

ข้อเสนอด้านการวิจัย

1. จากการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสทั้ง 2 Isoforms ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของไทย พบว่าลักษณะส่วนใหญ่คล้ายไรโบนิวคลีเอสในกลุ่มของ RNase A superfamily เหมือนกัน Onconase ที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ Cancer ได้ ยกเว้นความจำเพาะต่อสับสเตรทที่พบว่า RNase จากอึ่งอ่างมีความจำเพาะต่อสับสเตรททั้ง 2 ชนิดคือ ทั้ง pyrimidine และ purine base ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีที่จะทำให้ RNase ชนิดนี้สามารถย่อย Ribonucleic acids ได้ทุกชนิด ซึ่งอาจสามารถพัฒนานำมาใช้ในการวิจัยได้ นอกจากนี้คุณสมบัติดังกล่าวน่าจะเสริมให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ cell มะเร็งได้ดีกว่า RNase ชนิดอื่นๆที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทเพียงชนิดเดียว
2. จากการศึกษาวิเคราะห์โครงสร้างชั้นปฐมภูมิบางส่วนด้วยเทคนิค Mass spectrometry พบว่า RNase จากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนี้น่าจะมีความแตกต่างจาก RNase ในกลุ่ม RNase A super family ซึ่งอาจจะเป็น RNase ชนิดใหม่ที่แตกต่างจาก RNase ที่พบหรือมีรายงานในสัตว์ชนิดต่างๆ
3. ส่วนสกัดหยาบของ RNase จากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของไทย มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอยู่บ้าง แต่เมื่อใช้ส่วนที่ Purified RNase พบว่าไม่มีฤทธิ์ อาจจะเป็นผลจากความเข้มข้นของ purified RNase มีไม่มากพอ หรือไม่ถึงค่า IC50 ของการทดสอบ น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนนี้
4. ปัญหาการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศโลกในช่วงปี 2553-54 ทำให้ฤดูกาลเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกหลายชนิดโดยเฉพาะอึ่งอ่างซึ่งใช้เป็นสัตว์ทดลอง ได้หายไปจากท้องถิ่นที่เคยมี ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ จึงไม่สามารถเตรียม Purified RNase ที่มากพอที่จะหาค่า IC50 และใช้ทดสอบกับ Cell มะเร็งได้อีกครั้ง เป็นอีกส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่น่าจะมีการทดสอบเพิ่มเติมถ้ามีสัตว์ทดลองเพียงพอ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ)	ค
ข้อเสนอแนะการวิจัย	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
แผนการดำเนินการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	6
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส	14
หลักการทฤษฎีทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทดลอง	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	30
วิธีการวิจัย	33
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โรโบนิวคลีเอสด้วยวิธี Activity gel staining ของโปรตีนสกัดจากตัวอย่างสัตว์ สะเทินน้ำสะเทินบก 5 ชนิด	40
-กบนา (<i>Rana tigerina</i>)	40
-อึ่งอ่าง (<i>Kaloula pulchra</i>)	41
-กบอึ่งป๋อ (<i>Rana nigrovittata</i>)	43
-กบจุก (<i>Rana pileata</i>)	44
-ปาดบ้าน (<i>Polypedates mutus</i>)	45
การสกัดโปรตีนจากไข่ของอึ่งอ่าง	47
การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โรโบนิวคลีเอสด้วยวิธี Activity gel staining ของ Crude extracts จากไข่อึ่งอ่าง	47

สารบัญ (ต่อ)

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โรโบนิวคลีเอส จากไข่ของอึ่งอ่าง	48
-วิธี ionexchange chromatography	48
- วิธี HPLC (C4 RP-HPLC)	50
การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอึ่งอ่าง	54
- การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์กับสับเซพ	54
- การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส	55
- การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส	56
- การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส	58
- การศึกษาผลของ Metal ion ต่อการทำงานของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส	59
- การศึกษาสับเซพที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส	60
- การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง	61
- การวิเคราะห์โครงสร้างระดับปฐมภูมิบางส่วนของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส	
จากไข่ของอึ่งเพ้า โดย Mass spectrometry	65
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	65
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.	69

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงประจุสุทธิของกรดอะมิโนไกลซีนเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ต่างกัน	18
ตารางที่ 2 Time program การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โรโบนิวคลีเอสด้วย Cation exchange Chromatography, FPLC	35
ตารางที่ 3 Time program การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โรโบนิวคลีเอสด้วย Reverse phase high performance liquid chromatography, HPLC	36
ตารางที่ 4 แสดงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอีงอ่าง	54
ตารางที่ 5 PMF alignment ของ 14 kDa ของ RNase G. molossus	64

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 กบนา	6
รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกบ	7
รูปที่ 3 อี้งอ่าง ,อี้งยาง	8
รูปที่ 4 อี้งเพ่า	6
รูปที่ 5 กบจุก, กบหงอน, เขียดหัวโล่	11
รูปที่ 6 กบอ่องบ่อ กบอ่องเล็ก, กบอ่องบ่อเล็ก	12
รูปที่ 7 ปาดบ้าน	13
รูปที่ 8 โครงสร้างสามมิติของ RNase	14
รูปที่ 9 โครงสร้าง Onconase	15
รูปที่ 10 การเปลี่ยนสีของ Bradford dye	16
รูปที่ 11 แสดงตัวอย่างโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	21
รูปที่ 12 Ion-exchange chromatography	23
รูปที่ 13 แสดงประจุของหมู่ที่อยู่บน stationary phase ที่นิยมใช้ และการเปลี่ยนแปลงความจุของประจุที่ pH ต่างๆ	24
รูปที่ 14 แสดงส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC	25
รูปที่ 15 หลักการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay	28
รูปที่ 16 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะกบนา	40
รูปที่ 17 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส จากตัวอย่างอวัยวะของกบนา	41
รูปที่ 18 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะของอี้งอ่าง	42
รูปที่ 19 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส จากตัวอย่างอวัยวะของอี้งอ่างบ้าน	40
รูปที่ 20 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะของกบอ่องบ่อ	43
รูปที่ 21 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส จากตัวอย่างอวัยวะของกบอ่องบ่อ	44
รูปที่ 22 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะของกบจุก	44
รูปที่ 23 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส จากตัวอย่างอวัยวะของกบจุก	45
รูปที่ 24 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะของปาดบ้าน	46
รูปที่ 25 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส จากตัวอย่างอวัยวะของปาดบ้าน	46

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 26 การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ใน Crude extract จากไข่อิงเฝ้าและอึ้งยาง	48
รูปที่ 27 แสดงรูปแบบการชะโปรตีนจาก Crude extract ของอึ้งเฝ้า ด้วยวิธี Cation-exchange chromatography	49
รูปที่ 28 แสดงรูปแบบโปรตีนของ pooled fraction F2-FPLC บน SDS-PAGE	50
รูปที่ 29 รูปแบบการแยกของ F2-FPLC RNase จากอึ้งยางและอึ้งเฝ้า บน RP-HPLC	51
รูปที่ 30 SDS-PAGE และ Activity gel staining ของฟีดต่างๆจากการแยกด้วย RP-HPLC ของอึ้งเฝ้า	52
รูปที่ 31 SDS-PAGE และ Activity gel staining ของฟีดต่างๆจากการแยกด้วย RP-HPLC ของอึ้งยาง	53
รูปที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ กับความเข้มข้นของ สับสเตรท	55
รูปที่ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ กับเวลาการทำปฏิกิริยา	56
รูปที่ 34 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ค่า pH ต่างๆ	57
รูปที่ 35 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่เหลืออยู่เมื่ออยู่ใน pH ต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	57
รูปที่ 36 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่อุณหภูมิต่างๆ	58
รูปที่ 37 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่เหลืออยู่เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	59
รูปที่ 38 แสดงผลของ Metal ion ต่อกิจกรรมของ RNase	60
รูปที่ 39 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของ purified RNase ของอึ้งเฝ้าและอึ้งยาง	61
รูปที่ 40 ผลการศึกษาการต้านการเจริญของ Vero cell (non-cancer cell) โดยส่วนของ F2-FPLC ของอึ้งเฝ้า ตรวจสอบด้วย MTT assay ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง	61
รูปที่ 41 ผลการศึกษาการต้านการเจริญของ HTC116 cell โดยส่วนของ F2-FPLC ของอึ้งเฝ้า ของอึ้งเฝ้า ตรวจสอบด้วย MTT assay ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง	62
รูปที่ 42 ผลการศึกษาการต้านการเจริญของ HTC29 cell โดยส่วนของ F2-FPLC ของอึ้งเฝ้า ของอึ้งเฝ้า ตรวจสอบด้วย MTT assay ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง	62
รูปที่ 43 ผลการศึกษาการต้านการเจริญของ Hela cell โดยส่วนของ F2-FPLC ของอึ้งเฝ้า ของอึ้งเฝ้า ตรวจสอบด้วย MTT assay ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง	62

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะเร็ง (cancer หรือ malignant tumor) เกิดจากเซลล์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปทำให้มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากขึ้น จนกลายเป็นก้อนเนื้อใหญ่ (ยกเว้นมะเร็งเม็ดเลือดขาว) หรือที่เรียกกันว่าเนื้องอก (tumors) โดยมะเร็งเป็นเนื้องอกชนิดร้ายมีการเจริญเติบโตลุกล้ำ (invasion) และแพร่กระจาย (metastasis) ไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะอื่นๆ ได้ มะเร็งระยะแรกจะยังไม่มีอาการเจ็บปวด ต่อมาเมื่อเนื้องอกโตมากขึ้น จะเริ่มมีอาการปวดมากขึ้น ทำให้ร่างกายทรุดโทรมจนถึงแก่ชีวิต ความรุนแรงของมะเร็งขึ้นกับชนิดและระดับขั้นของมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นทั้งภายในและ/หรือภายนอกร่างกายอีกมากมายที่เกี่ยวข้องและส่งเสริมให้ความรุนแรง การดำเนินของโรครวดเร็วแตกต่างกัน ปัจจุบันอัตราการตายของคนไทยด้วยโรคมะเร็งถือว่าสูงเป็นอันดับต้นๆ โดยพบว่าสูงเป็นอันดับหนึ่ง จากข้อมูลสาธารณสุขปี 2544-2548 (ศูนย์ข้อมูลข่าวสารสาธารณสุข สำนักนโยบายและแผนสาธารณสุข)

การรักษาโรคมะเร็งมีหลายวิธีเช่นเคมีบำบัด (chemotherapy) การใช้รังสี การผ่าตัด และใช้วิธีผสมผสาน ทั้งนี้ ขึ้นกับชนิดและระยะการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การรักษาด้วยเคมีบำบัด หรือการรักษาโดยการใช้ยาเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้กันมากและถือเป็นทางเลือกต้นๆ ในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น การรักษาด้วยเคมีบำบัดนี้ ยาหลายชนิดมีฤทธิ์ร้ายแรงและออกฤทธิ์ที่ระยะจำเพาะในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) จึงมีฤทธิ์เฉพาะเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเท่านั้น ยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งมีหลายประเภท ตามกลไกการออกฤทธิ์ของยา อย่างไรก็ตามยาหลายชนิดก็มีผลกระทบข้างเคียงต่อเนื้อเยื่อปกติที่มีการแบ่งตัวเร็วคล้ายเซลล์มะเร็ง เช่น ไขกระดูก เซลล์รากขน (hair follicles) และเยื่อบุลำไส้ จึงทำให้มีข้อจำกัดในการรักษาด้วยเคมีบำบัด นอกจากนี้ยาเหล่านี้มักจะมีราคาแพง ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางการรักษาเพื่อเป็นทางเลือกอื่นๆ อีกมากมาย เช่นการรักษาทางยีน (Gene therapy) การใช้ยาสมุนไพร และสารชีวภาพอื่นๆ เป็นต้น

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาการใช้โปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ ในการย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิก (RNA) เป็นเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease, RNase) ที่อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเอ (Ribonuclease A superfamily) เอนไซม์กลุ่มนี้ นอกเหนือจากหน้าที่ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึมและการหมุนเวียนของ RNA ในเซลล์ แล้ว ยังพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic) ความเป็นพิษต่อเซลล์ของไรโบนิวคลีเอสนี้ถูกค้นพบเมื่อประมาณปี 1950 และหลังจากนั้นก็ถูกรายงานว่าสามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ทั้ง in vitro (Ledoux, L. and Baltus, E., 1954) และ in vivo (Ledoux, L., 1955a, 1955b) เมื่อใช้ในปริมาณมากหลายมิลลิกรัม โดยการฉีดเข้าไปในก้อนมะเร็ง (Solid tumor) แต่ถ้าใช้ในปริมาณน้อยๆ จะไม่สามารถเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (D'Alessio, G. and Riordan, J.F., 1997; Raines, R.T., 1998, 1999)

ปัจจุบันมีการค้นพบโปรตีนที่มีลักษณะเหมือน ไรโบนิวคลีเอสหลายชนิด ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งแตกต่างกันไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไรโบนิวคลีเอสที่แยกจากไขของ Bullfrog (*Rana catesbeiana*), Japanese rice paddy frog (*Rana japonica*) และ Northern leopard frog (*Rana pipiens*) โดยทั้งหมดของไรโบนิวคลีเอส ที่ได้จากกบในตระกูล *Rana* นี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงมาก เมื่อทดสอบใน *in vitro* มีค่า IC50 ประมาณ 1 μ M ต่อมาไรโบนิวคลีเอสที่แยกจากไขของ *Rana pipiens* ก็ถูกเรียกชื่อใหม่ว่า Onconase ซึ่งปัจจุบันกำลังอยู่ในระหว่างการทดสอบทางคลินิกในเฟสที่ 3 (Phase III human clinical trials) (Youle, R.J. and D'Alessio, G., 1997; Irie, M. and Nitta, K., 1998) โดยใช้ในการรักษามะเร็งชนิด Solid tumors (Mikulski, S.M., 1993, 1995) เช่นมะเร็งตับอ่อน (Pancreatic adenocarcinoma) และมะเร็งผิวหนัง (malignant mesothelioma) ซึ่งถ้าการทดลองยังดำเนินต่อไปและประสบผลสำเร็จ Onconase ก็จะถูกรับรองและใช้เป็นยาในการรักษามะเร็ง (Cancer chemotherapeutic) ต่อไป นอกจากนี้ ยังพบว่า Onconase ยังมีผลในการยับยั้ง การเพิ่มจำนวนของ HIV-1 ในเซลล์ของผู้ป่วยชนิดเรื้อรัง (Chronically infected human cells) โดยไม่พบผลข้างเคียงในการทำลายเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อ (Youle, R.J., et al., 1994; Saxena, S.K. et al., 1996; Raines, R.T., 1999) ความเป็นพิษต่อเซลล์ของไรโบนิวคลีเอสนั้นเชื่อว่าเกิดจากความสามารถในการย่อย RNA ของไรโบนิวคลีเอส (Ribonucleolytic activity) ดังนั้นการจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้นั้นไรโบนิวคลีเอสจะต้องเข้าสู่เซลล์ เข้าไปใกล้ๆ และจับกับ RNA ของเซลล์จากนั้นจะย่อย จนท้ายที่สุดเซลล์ก็จะตายเนื่องจาก RNA ถูกทำลาย

กลไกการเข้าทำลาย RNA ของไรโบนิวคลีเอสนั้นมีสมมุติฐานเชื่อว่าเมื่อเอนไซม์เข้าจับกับ Glycolipid ที่ผิวเซลล์ก่อน โดยได้มีการศึกษาครั้งแรกในไรโบนิวคลีเอสจากกบในสกุล *Rana* ซึ่งการศึกษาครั้งนั้นไม่ใช่ศึกษาในฐานะเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสแต่ศึกษาในฐานะ Sialic acid binding lectins Titani, K., et al., 1987; Lewis, M., et al., 1989; Kamiya, Y., et al., 1990) ซึ่ง Sialic acids นี้เมื่ออยู่บนผิวเซลล์จะแสดงบทบาทได้หลายรูปแบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปของ Ganglioside ซึ่งเป็น Cell-surface glycolipids ที่ประกอบด้วย Sialic acid จำนวน 1, 2 หรือ 3 หน่วย Ganglioside ที่ประกอบด้วย Sialic acids จำนวนหลายหน่วย จะทำหน้าที่เหมือน Receptor สำหรับไรโบนิวคลีเอสที่เป็นพิษต่อเซลล์ ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างไรโบนิวคลีเอสและ Sialic acid นั้น ก็เหมือนกับเอนไซม์จับกับ Substrate โดยหน่วยของ Sialic acid ก็จะทำหน้าที่เหมือนกับหน่วยโครงสร้างหลัก (Backbone) ของ Ribosyl phosphate ใน RNA หลังจากเข้าจับกับ Cell-surface ganglioside แล้ว ไรโบนิวคลีเอสจะเข้าสู่เซลล์ในรูปของ Endosome หรือไรโบนิวคลีเอสบางตัวก็จะถูกขนย้ายเข้าไปอยู่ในส่วนของ Golgi apparatus และ Endoplasmic reticulum หลังจากนั้นก็จะเคลื่อนย้ายเข้าสู่ Cytosol และที่บริเวณนี้ไรโบนิวคลีเอสก็สามารถเข้าจับกับ RNA และเกิดการย่อยสลายแล้วทำให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด (Raines, R.T., 1999)

จากความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibian) ในประเทศไทย และความเป็นไปได้ในการใช้สารชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์คล้ายไรโบนิวคลีเอส มาใช้เป็นทางเลือกในการรักษามะเร็ง โครงการนี้จะศึกษาและสำรวจหาโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์

คล้ายโรโบนิวคลีเอสนี้ จากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เช่น กบ เขียด คางคก อึ่งอ่าง และอื่นๆ ที่มีในท้องถิ่น จังหวัดขอนแก่นและพื้นที่ใกล้เคียง นำมาศึกษาแยกบริสุทธิ์ ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็ง ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีบางประการและศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของ โปรตีนดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตถึงกลไกการออกฤทธิ์ โครงสร้างทางเคมีและด้านอื่นๆอันจะนำไปสู่การค้นพบยารักษามะเร็งตัวใหม่ ที่เป็นทางเลือกอีกอันหนึ่งสำหรับคนไทยในการลดค่าใช้จ่ายซื้อยารักษามะเร็งที่ราคาแพงจากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โรโบนิวคลีเอสจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibian) บางชนิด
2. ศึกษาความเป็นพิษของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส (purified fractions) ต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง
3. ศึกษาความสามารถของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส (Purified fractions) ในการยับยั้งการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์มะเร็งและการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ Apoptosis
4. ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส
5. ศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส

แผนการดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่าง

จะเก็บรวบรวมตัวอย่างสัตว์ในกลุ่มสะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibians) ชนิดต่างๆที่อยู่ในเขตจังหวัดขอนแก่นและจังหวัดใกล้เคียง ประมาณ 5-10 ชนิด โดยการซื้อโดยตรงจากแหล่งเพาะเลี้ยงหรือซื้อจากตลาด หรือเก็บมาจากแหล่งธรรมชาติ

2. สกัดโปรตีน (Katekaw, S., et al., 2006, 2007)

ไข่ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนต่างๆผสมกับ 0.2 M Citrate buffer, pH 4 ในอัตราส่วน 1:3 ที่มีส่วนผสมของ Protease inhibitor จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer ในที่เย็นหรือแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมความเย็นได้ ที่ 12000 x g 20 นาที 4 °C เก็บไว้เฉพาะส่วนใส (Supernatant) เป็นสารสกัดโปรตีน เก็บรักษาไว้ใน Freezer ได้

3. ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส (Katekaw, S., et al., 2006, 2007)

สารสกัดโปรตีนที่ได้ จะนำมาตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสโดยใช้วิธี Refolding gel electrophoresis ที่มีสาร substrate (RNA) อยู่ในเจล มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1) นำสารสกัดโปรตีนมาละลายใน Sample buffer ที่ไม่มีส่วนผสมของ beta-mercaptoethanol ด้วยอัตราส่วน 1:1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 8 ชั่วโมงก่อนการใช้

3.2) เตรียม Separating gel 12% ที่มีส่วนผสมของ RNA 6 mg/ml และ Stacking gel 1.5% จากนั้น โหลดสารตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 3.1 แล้ว Run electrophoresis จนกระทั่ง tracking dye วิ่งถึงปลายเจล แกะแผ่นเจล เขย่าล้างด้วย 25% n-propanol ใน Tris-HCl, pH 7.0 และล้างต่อด้วย Tris-HCl, pH 7.0 จนไม่มี Propanol เหลืออยู่

3.3) Incubate แผ่นเจล ใน Tris-HCl, pH 7.0 ที่ 50°C 50 นาที

3.4) ล้างแผ่นเจลด้วย Tris-HCl, pH 7.0

3.5) ย้อมแผ่นเจลด้วย acidic dye (Toluidine blue O)

3.6) De-stain ด้วย Tris-HCl, pH 7.0 จนกระทั่งเห็น band ของโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ชัดเจน จากนั้นเก็บเจลใน Buffer ที่มี glycerol

4. การแยกบริสุทธิ์ไรโบนิวคลีเอส (Cation exchange chromatography, Reverse phase HPLC, C4 reverse phase column) (Katekaw, S., et al., 2006, 2007)

สารโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส จะนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วย Column chromatography (Cation exchange column, CM-toyopearl) ใน Phosphate buffer, pH 8.0 และชะคอลัมน์ด้วย Linear gradient ของ NaCl แต่ละพีคใน Chromatogram จะถูกนำไปทดสอบของกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส โดยวิธีในข้อ 3 และทำ SDS-PAGE เฉพาะพีคของโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเท่านั้นที่จะถูกรวบรวม นำไปกำจัดเกลือโดยวิธี Dialysis จากนั้นทำให้เข้มข้น และทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization จากนั้นแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้ HPLC ที่ใช้คอลัมน์ C4 reverse phase column ในระบบ Solvent ของ Acetonitrile และ TFA เลือกเฉพาะพีคที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส นำไปทำ Lyophilize เก็บเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ไว้ใน Freezer

5. การตรวจกับเซลล์มะเร็ง (มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งลำไส้, มะเร็งเต้านม)

5.1) ทดสอบการยับยั้งการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ Apoptosis ด้วยวิธี Vybrant Apoptosis Assay (ชุดน้ำยาทดสอบจาก Molecular Probes)

5.2) ทดสอบการยับยั้งการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธี Quick Cell Proliferation Assay II (ชุดน้ำยาทดสอบจาก BioVision)

5.3) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี LDH-Cytotoxicity Assay (ชุดน้ำยาทดสอบจาก BioVision)

6. ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

หาค่าน้ำหนักโมเลกุล ค่า pI, Substrate specificity, Optimum pH, Optimum temperature, pH stability, Temperature stability, Molecular Mass, N-terminal Sequence, Partial sequencing โดยใช้ Mass spectrometry (MS)

7. การศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

วิเคราะห์ Amino acid composition โดยใช้ Amino acid analyzer, วิเคราะห์ N-terminal sequence, C-terminal sequence และ internal sequence โดยใช้ protein sequencer ร่วมกับการใช้ Mass spectrometry (MS/MS)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบแหล่งที่มาของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส
2. ได้เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
3. ได้องค์ความรู้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสและการทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง
4. ทราบคุณสมบัติและคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น และโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
5. ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ความรู้ในวารสารระดับชาติ/นานาชาติ
6. ได้สร้างบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในด้านการวิจัยทางวิทยาศาสตร์
7. สิทธิบัตรของแหล่งที่มา ชนิด (Species) ของสิ่งมีชีวิตที่มีสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง
8. เป็นข้อมูลในการที่จะศึกษาการออกฤทธิ์ กลไกการออกฤทธิ์ของสารไรโบนิวคลีเอสและงานวิจัยด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไป

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibians)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก หรือเรียกอย่างทั่วไปว่า สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Amphibians) เป็นสัตว์ที่อยู่ได้ทั้งในและบนบก มีต่อมเมือกทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นตลอดเวลา ผิวหนังเปียกชื้นอยู่เสมอ ไม่มีเกล็ดหรือขน หายใจด้วยเหงือก ปอด ผิวหนัง หรือผิวหนังในปากในคอ สืบพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ภายนอกแล้วตัวสืบพันธุ์เมื่ออายุ 2-3 ปี ส่วนใหญ่ตัวผู้จะมีถุงลมปากเพื่อใช้ส่งเสียงร้องเรียกตัวเมีย ออกลูกเป็นไข่อยู่ในน้ำ ไม่มีเปลือก วางไข่เป็นกลุ่มในน้ำมีสารวุ้นหุ้ม ลูกอ่อนที่ออกจากไข่มีรูปร่างคล้ายปลา อยู่ในน้ำ หายใจด้วยเหงือก เมื่อเติบโตเต็มที่แล้วมีปอด หายใจ ขึ้นบกได้ แต่ต้องอยู่ใกล้น้ำ เช่น กบ คางคก อึ่งอ่าง เขียด สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกส่วนใหญ่จะมี การ เปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งภายนอกและภายในอย่างสิ้นเชิงไปตามวงจรชีวิต ตัวอ่อนอาศัยอยู่ในน้ำ หายใจ ด้วยเหงือก เมื่อโตขึ้นจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างอาศัยอยู่บนบก หายใจด้วยปอดหรือผิวหนังโดยเฉพาะใน หน้าแล้ง ในช่วงระหว่างฤดูหนาวถึงฤดูร้อน สัตว์พวกนี้ส่วนใหญ่จะขุดรูจำศีลเพื่อหนีความแห้งแล้งไม่ให้ผิวหนังแห้ง ถ้าผิวหนังแห้งมันจะหายใจไม่ได้และอาจตายได้ เพราะก๊าซจากอากาศต้องละลายไปกับน้ำ เมื่อก ที่ผิวหนัง แล้วจึงแพร่เข้าสู่กระแสโลหิตระยะนี้มันจะใช้อาหารที่สะสมไว้ในร่างกายอย่างช้าๆ สัตว์สะเทินน้ำ สะเทินบกเป็นสัตว์เลือดเย็น เช่นเดียวกับสัตว์พวกปลา กิ้งก่าและหนอนที่มีชีวิตอยู่ (<http://th.wikipedia.org/wiki/> 4 ก.พ. 2552) ตัวอย่างของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ได้แก่

1.กบ (Frog) (*Rana rugulosa*)



รูปที่ 1 กบนา

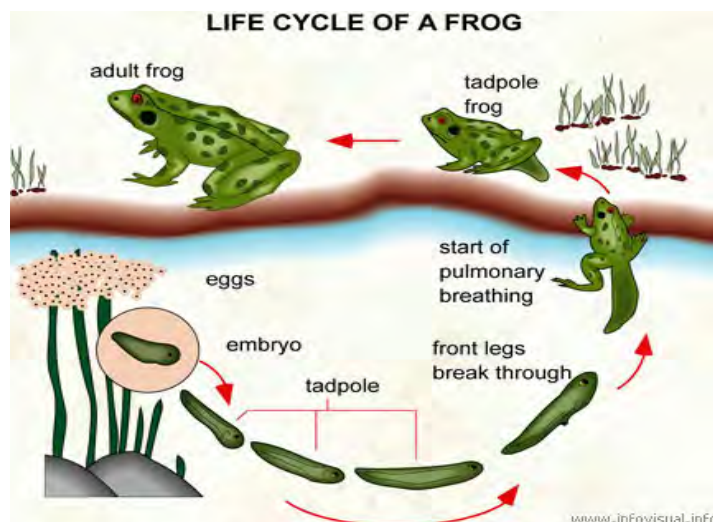
(ที่มา: http://farm2.static.flickr.com/1015/1071514160_b6df0a02b2.jpg?v=0)

กบ เป็นสัตว์สี่เท้าจำพวกสะเทินน้ำสะเทินบก หรือเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่าสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ กบ จัด อยู่ในวงศ์รานิดี (Ranidae) สกุลรานา (Rana) ผิวหนังขรุขระ ไม่มีขนและเกล็ด ที่บริเวณผิวหนังของ

กบจะมีต่อมเมือกและน้ำใส ๆ เพื่อช่วยให้ผิวหนังของกบนั้น มีความชุ่มชื้นอยู่เสมอ กบไม่มีคอและหาง ซึ่งเป็น ประโยชน์ต่อการว่ายน้ำ มีขา 2 คู่ ขาด้านหน้ามีขนาดเล็กและสั้น มีนิ้วเท้าสี่นิ้วที่สามารถ สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน โดยนิ้วที่หนึ่งหรือนิ้วหัวแม่มือ มีลักษณะเป็นตุ่มขนาดเล็ก ขาคู่หลังมีมัด กล้ามเนื้อที่มีความแข็งแรง คอยประคองและค้ำจุนให้กบสามารถกระโดดไปด้านหน้าได้อย่างรวดเร็ว มี ข้อเท้าขนาดยาวช่วยในการ กระโดด ระหว่างนิ้วเท้าทั้งห้าของขาคู่หน้าและหลัง มีหนังบาง ๆ เป็นแผ่น ๆ ยึดติดกันใช้สำหรับว่ายน้ำ (<http://th.wikipedia.org/wiki/4> ก.พ. 2552)

ลักษณะทั่วไป กบเป็นสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ อาศัยอยู่ในบริเวณแหล่งน้ำตื้น ๆ หรือแอ่งน้ำเล็ก ๆ มี หัวลักษณะคล้ายรูปทรงสามเหลี่ยม มีสัณฐานค่อนข้างแบนเรียบ ปากกว้าง นัยน์ตากกลมโตและโปนโดย บริเวณหนังตามีแผ่นเนื้อเยื่อบาง ๆ ซึ่งจะทำหน้าที่เปิดและปิดนัยน์ตาของกบ มีหูอยู่บริเวณด้านหลัง ของนัยน์ตาที่มีลักษณะเป็นแอ่งกลม ๆ ทำหน้าที่เหมือนกับแก้วหูของมนุษย์ มีรูจมูกสองรูอยู่ด้านหน้า ของนัยน์ตา ภายในปากมีฟันขนาดเล็กคล้ายกับซี่เลื่อย ลิ้นมีปลายแยกออกเป็นสองแฉกใช้สำหรับ จับแมลงและสัตว์อื่นเป็นอาหาร หายใจโดยใช้ปอดและสามารถหายใจได้ทางผิวหนัง มีการพบกบบาง ชนิดในอินโดนีเซียไม่มีปอด หายใจโดยผิวหนังอย่างเดียวกบกลายเป็นที่นิยมบริโภคกันมากในปัจจุบัน เนื่องจากเนื้อกบมีโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ทุกส่วนของร่างกายสามารถนำไปทำประโยชน์ได้ หลากหลายชนิด เช่น หนังกบสามารถนำไปทำกระเป๋า รองเท้า เครื่องดนตรี และของชำร่วยต่าง ๆ ส่วน หัว อวัยวะระบบทางเดินอาหารและกระดูกที่ตัดชำแฉแล้ว นำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ได้ ปัจจุบันกบ ได้กลายเป็นสัตว์เลี้ยงในการเกษตรของเกษตรกร

วงจรชีวิตของกบ



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกบ

ที่มา: http://www.infovisual.info/02/029_en.html

เมื่อไข่กบมีการปฏิสนธิแล้ว จะฟักออกจากไข่เป็นลูกอ๊อดแล้วเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นกบ ขั้นตอนการเจริญเติบโตของกบ คือ

1. ไช้กบ มีลักษณะเป็นเม็ดกลม มีสีน้ำตาลปนเขียว เกาะกันเป็นแพลอยปริ่มน้ำ กลุ่มละประมาณ 50 - 150 ฟอง ถ้ามีอุณหภูมิพอเหมาะ ไช้กบที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะฟักเป็นตัวภายใน 3 วัน

2. ลูกอ๊อด มีลักษณะคล้ายลูกปลา หัวโต หางยาว และหายใจด้วยเหงือก

3. กบ อาศัยอยู่บนบก หายใจด้วยปอด มีขา 2 คู่ คือ ขาหน้า 1 คู่ ขาหลัง 1 คู่ เมื่อขาของกบงอกจนครบแล้ว หางก็จะหดหายไป

ประโยชน์ทางตรงของกบ เป็นอุปกรณ์ทางการศึกษาทางการแพทย์ การวิจัย ทางชีววิทยา และการทดลองทางวิทยาศาสตร์ ให้ความเพลิดเพลินเป็นอาหารและเพิ่มพูนรายได้ให้กับครอบครัวและประเทศชาติใช้ประโยชน์จากหนังและอวัยวะอื่นๆ ส่วนประโยชน์โดยอ้อม ได้แก่ ประโยชน์จากระบบนิเวศวิทยาโดยช่วยทำลายแมลง ศัตรูพืช ยุง บั๊ก ฯลฯ ใช้กระดูกทำปุ๋ย เป็นต้น

2. อึ่งยาง (*Kaloula pulchra*)



รูปที่ 3 อึ่งยาง

ที่มา : <http://www.bloggang.com/data/duen/picture/1135929890.jpg>

ชื่อพื้นบ้าน อึ่งยาง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Kaloula pulchra*

ชื่อวงศ์ Microhylidae

ชื่อสามัญ อึ่งอ่างบ้าน

ลักษณะ มีขนาดตัวปานกลาง (จากปลายปากถึงรูทวารประมาณ 60 – 70 มิลลิเมตร) ลำตัวป้อม หัวแหลม ขาสั้น ผิวหนังลำตัวมีตุ่มกระจาย ด้านหลังสีน้ำตาลเหลืองหรือสีน้ำตาลแดงหรือสีน้ำตาลดำ บนหัวมีแถบสีเหลืองพาดขวางทางด้านหน้าของตา ขอบด้านข้างลำตัวมีแถบสีน้ำตาลเหลืองกว้างและมีขอบดำพาดจากด้านท้ายตาไปที่โคนขาหนีบลายอังก๋างกันขีด ตัวแถบสีเหลืองมีขนาดกว้างกว่าของอังก๋างกันขีด ด้านท้องเป็นลายเลอะของสีเทาดำและขาว ขาหน้าค่อนข้างยาวและนิ้วตีนยาว ขาหลังสั้นแต่นิ้วตีนยาว เมื่อพับขาหลังแนบกับลำตัวไปทางด้านหน้า ข้อตีนอยู่ในตำแหน่งทางด้านหน้าของที่ตั้ง

ด้านหน้า นิ้วตีนหน้าไม่มีแผ่นหนังระหว่างนิ้ว นิ้วตีนหลังมีแผ่นหนังมีแผ่นหนังเฉพาะที่โคนนิ้ว ส่วนปลายของนิ้วทุกนิ้วขยายเป็นตุ่มใหญ่ขึ้นเล็กน้อยและส่วนปลายของตุ่มตัดตรง สันใต้ฝ่าตีนหลังมีขนาดใหญ่ขึ้นเดียว (inner metatarsal tubercle) เพื่อใช้ขุดโพรงดิน ลูกอ๊อดมีสีลำตัวและลักษณะโครงสร้างปากเหมือนกับลูกอ๊อดอื่นอย่างกันชัด แต่มีขนาดตัวใหญ่กว่าและส่วนหางไม่มีเส้นตามแนวยาวสีเหลืองพาดบริเวณโคนหาง

การแพร่กระจาย เนปาล ศรีลังกา อินเดีย แผ่นดินใหญ่ของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สิงคโปร์ ในประเทศไทยพบทุกภาคของประเทศ ในพื้นที่สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราชพบในป่าเต็งรังและในป่าดิบแล้ง บริเวณโดยรอบอ่างเก็บน้ำ และบริเวณอาคารของสถานีวิจัยฯ

พื้นที่อาศัย อยู่ตามพื้นล่างของป่าบริเวณที่มีความชุ่มชื้น พื้นที่โดยรอบของอ่างเก็บน้ำ ชอกไม้ที่ชื้น และบริเวณอาคารของสถานีวิจัยฯ

นิสัย หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันและออกหากินเวลากลางคืน หากินอยู่ในพื้นที่เดิมตลอดเวลา เมื่อถูกรบกวนจะสูดอากาศเข้าปอดและทำให้ลำตัวมีขนาดใหญ่มากขึ้น ผสมพันธุ์และวางไข่ในแอ่งน้ำขังชั่วคราวที่กระจายอยู่ในป่าเต็งรังและในป่าดิบแล้งระหว่างฤดูฝน รวมทั้งในอ่างเก็บน้ำและถึงน้ำที่ตื้นใน พื้นที่ป่าลูกอ๊อดที่ออกจากวันไข่ในระยะแรกและเริ่มต้นกินอาหารจะมีพฤติกรรมหมุ่นตัวอยู่ที่พื้นท้องน้ำ เพื่อให้ตะกอนอินทรีย์สารฟุ้งกระจาย พฤติกรรมนี้จะลดลงตามลำดับเมื่อลูกอ๊อดมีขนาดตัวใหญ่ขึ้น

สถานภาพ ไม่ได้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2535 และไม่มีสถานภาพเพื่อการอนุรักษ์ตามกฎหมายของ Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (2005) และตามกฎหมายของ IUCN (2008)

3. อึ่งเพ่า (*Glyphoglossus molossus* Gunther)



รูปที่ 4 อึ่งเพ่า

(https://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=2232)

ชื่อท้องถิ่น: อึ่งเพ่า, เขียดตาโอด

ชื่อสามัญ: อึ่งเพ้า, อึ่งดำ, อึ่งปากขวด, อึ่งโกก, อึ่งกระโดน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Glyphoglossus molossus* Gunther, 1868

ชื่อวงศ์ : Microhylidae

ประเภทสัตว์ : สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

ลักษณะสัตว์ : มีขนาดตัวค่อนข้างใหญ่ (จากปลายปากถึงรูท่อนประมาณ 75 มิลลิเมตร) ลำตัวป้อม ตาเล็ก ขาสั้นแต่ใหญ่ ส่วนปลายของหัวค่อนข้างตัดตรง ปากอยู่ทางด้านล่างของหัวและเป็นช่องเปิดตามขวาง แผ่นเยื่อแก้วหุ้มองเห็นไม่ชัดเจน ผิวหนังลำตัวเป็นรอยย่น ด้านหลังสีน้ำตาลอมเทาหรือสีน้ำตาลดำแต่มีจุดสีขาวเล็กกระจาย ด้านท้องสีขาวหรือสีครีมและมีแต้มหรือปื้น สีเข้มกระจายอยู่ข้างขาหน้าสั้นแต่ขาหลังค่อนข้างยาว เมื่อพับขาหลังแนบกับลำตัวไปทางด้านหน้า ข้อตีนอยู่ในตำแหน่งใกล้ส่วนปลายของปาก นิ้วตีนหน้ามีแผ่นหนังระหว่างนิ้วเฉพาะนิ้วที่สองกับนิ้วที่สาม นิ้วตีนหลังมีแผ่นหนังระหว่างนิ้วใหญ่ สันได้ฝ่าตีนหลัง (inner metatarsal tubercle) มีขนาดใหญ่เพื่อใช้ขุดโพรงดิน ลูกอ๊อดมีลำตัวป้อมและโปร่งแสง หางยาวและยาวมากกว่า 3 เท่าของลำตัวและหัวรวมกัน แผ่นครีบทองใหญ่ตัวหาง(ไม่ใช่แผ่นครีบทอง) มีด้านบนและด้านล่างเป็นสีดำส่วนตรงกลางเป็นสีเหลือง ปากอยู่ทางด้านหน้าสุดของหัวไม่มีตุ่มฟันและไม่มีจะงอยปาก

การแพร่กระจาย ลาว เวียดนาม กัมพูชา ในประเทศไทยพบเฉพาะตอนบนของประเทศตั้งแต่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ขึ้นมา ในพื้นที่สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราชพบในป่าเต็งรังและในป่าดิบแล้งและบริเวณโดยรอบอ่างเก็บน้ำ

พื้นที่อาศัย ขุดโพรงอาศัยตามพื้นล่างของป่าและพื้นที่โดยรอบอ่างเก็บน้ำบริเวณที่ดินมีความร่วนซุย ขุดโพรงดินโดยใช้สันได้ฝ่าตีนหลังที่มีขนาดใหญ่ขุดดินพร้อมกับถอยหลังลงไปดิน เมื่อลงไปอยู่ในโพรงดินแล้วจะมองไม่เห็นตัวโพรงหรือช่องที่อยู่เหนือตัว

นิสัย อาศัยอยู่ในโพรงดินเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในฤดูแล้งจะอาศัยอยู่ในโพรงดินเกือบตลอดเวลา แต่ระหว่างฤดูฝนจะขึ้นมาหากินบนพื้นดินบ้างในช่วงเวลากลางวัน เมื่อถูกรบกวนจะสูบลูกอากาศเข้าปอดและทำให้ลำตัวมีขนาดใหญ่มากขึ้น ผสมพันธุ์และวางไข่ในคืนที่มีฝนตกหนักมากเป็นครั้งแรกของฤดูฝน วางไข่ในแอ่งน้ำขังชั่วคราวที่กระจายอยู่ในป่าเต็งรังและในป่าดิบแล้ง รวมทั้งในอ่างเก็บน้ำ มีนิสัยการสืบพันธุ์รวมกันเป็นกลุ่มก้อนและเป็นจำนวนมาก (Explosive mating aggregation) ช่วงเวลาที่ออกจากโพรงขึ้นมาผสมพันธุ์เร็วกว่าอึ่งอ่างกันขีตและอึ่งลายลูกอ๊อดหากินในระดับต่ำลงไปจากผิวน้ำ มีนิสัยว่ายน้ำหรือลอยตัวอยู่กับที่โดยมีส่วนหัวอยู่ข้างบนและลำตัวเอียงลงเป็นมุม 45 องศา ถ้าลูกอ๊อดในแหล่งน้ำมีจำนวนมากจะรวมกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่และว่ายน้ำไปด้วยกันคล้ายกับลูกบอลเคลื่อนที่ไปได้ น้ำ พฤติกรรมดังกล่าวมีประโยชน์หลายประการคือ ลดโอกาสเสี่ยงต่อการตกเป็นเหยื่อให้กับสัตว์ล่าเหยื่อ ลดการสูญเสียความร้อน และลักษณะการว่ายน้ำแบบอย่างดังกล่าวทำให้ตะกอนของอินทรีย์สารจากพื้นท้องน้ำฟุ้งกระจายจึงมีอาหารกินเป็นปริมาณมากขึ้น แต่การอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อนดังกล่าวก็เป็นข้อด้อยคือ ถูกชาวบ้านจับได้ง่ายและเป็นจำนวนมาก

สถานภาพ ไม่ได้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2535 สำหรับสถานภาพเพื่อการอนุรักษ์ เป็นสัตว์ป่าใกล้ถูกคุกคามตามเกณฑ์ของ Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (2005) แต่ไม่มีสถานภาพเพื่อการอนุรักษ์ตามเกณฑ์ของ IUCN (2008) เป็นชนิดที่ถูกชาวบ้านจับเพื่อบริโภคและเพื่อค้าขายในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก

ผนวกกับพื้นที่อาศัยที่เป็นป่าธรรมชาติถูกเปลี่ยนแปลงเป็นพื้นที่เกษตรกรรม ทำให้ประชากรลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ในพื้นที่สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราชมีประชากรค่อนข้างมาก เนื่องจากมีข้อห้ามมิให้มีการล่าและป้องกันการลักลอบล่า

ถิ่นกำเนิด : ภาคเหนือ อีสาน กลาง รวมไปถึงตะวันออกเฉียงบชายฝั่งทะเล ลาว พม่า

4. กบจุก (*Rana pileata*)



รูปที่ 5 กบจุก, กบหนอง, เขียดหัวโล่

ที่มา : http://www.siamensis.org/images/webboard_images/amphibian__post_06978.jpg

ลักษณะ : ขนาดวัดจากปลายปากถึงกัน 32–50 มม. ขนาดปานกลาง ตัวผู้มีขนาดลำตัว 48–50 มม. ส่วนตัวเมียมีขนาด 3 มม. ตัวผู้มีหัวแผ่กว้างใหญ่กว่าลำตัวมากและมีแผ่นหนังแบนๆ รูปทรงคล้ายโล่อยู่ด้านบนหัวตรงตำแหน่งระหว่างลูกตาทั้งสองข้าง แต่ไม่พบมีในตัวเมีย ลูกตามีขนาดเล็กกว่าแผ่นหู ขาหลังสั้น เวลาเหยียดไปข้างหน้าแล้ว ข้อเท้าจะอยู่ตรงตำแหน่งใกล้รูจมูก นิ้วเท้ามีพังผืดยัด 3 ใน 4 ของความยาวนิ้วเท้า และปลายนิ้วแผ่ออกเล็กน้อยเป็นแผ่นกลม ภายในปากของตัวผู้ จะสังเกตเห็นอวัยวะคล้ายเขี้ยวสั้นๆ หนึ่งคู่ตรงจุดหน้าสุดของขากรรไกรล่างสีลำตัวมีหลายแบบ ตั้งแต่สีน้ำตาลเหลืองน้ำตาล จนถึงสีน้ำตาลคล้ำ ขึ้นอยู่กับอายุของกบ โดยตัวอายุน้อยมีสีออกจางกว่าตัวเต็มวัย บางตัวอาจมีแถบสีจางพาดตรงกึ่งกลางหลัง ใต้คางสีออกเทา ออกและท้องตอนบนสีขาว และท้องตอนล่างรวมถึงใต้ต้นขาสีออกเหลืองบางตัวแขนและขามีลายพาดขวางสีคล้ำกว่า

เขตแพร่กระจาย : เชื่อว่ามีในแถบประเทศใกล้เคียง คือ พม่า ลาว กัมพูชา และในประเทศไทย ในเขตป่าสะแกราช อาศัยอยู่ในลำห้วยที่มีน้ำไหลตลอดปีเกือบทุกห้วย เช่น ห้วยน้ำเค็ม คลองยางแรด ห้วยหินเพลิง และคลองไซกง เฉพาะในส่วนที่ไหลผ่านป่าดิบแล้ง ที่มีเรือนยอดต้นไม้ยืนมาคลุมเหนือลำห้วย ยกเว้นในปลายฤดูแล้งที่มีฝนตกหนักราวเดือนมีนาคม ได้พบกบขนาดเล็ก ย้ายจากลำห้วยที่แห้งไปรวมกันอยู่ในแอ่งน้ำที่ขุดไว้โดยเจ้าหน้าที่สถานีวิจัย ในป่าเต็งรัง

ที่อยู่อาศัย : ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในลำห้วยที่มีน้ำไหลตลอดปีในป่าดิบแล้ง และบางส่วนในป่าเต็งรังที่มีแอ่งน้ำขังเหลืออยู่เป็นตอนๆ ทุกบริเวณที่อาศัยต้องมีเรือนยอดต้นไม้แผ่มาคลุมให้ร่มเงาแก่ลำห้วยหรือแอ่งน้ำ กบขนาดเล็กอยู่ในลำห้วยที่มีน้ำโดยตรง หรือซุกซ่อนอยู่ตามกองหินในลำห้วยกบขนาดใหญ่อยู่ใต้ก้อนหินและในกองซากใบไม้ กิ่งไม้ที่กองอยู่ในซอกหินไกลจากลำห้วย 1–2 ม.

อุปนิสัย : หากินในเวลากลางคืนอยู่ในลำห้วยเป็นส่วนใหญ่ อาหารได้แก่ แมลงน้ำ ลูกแมลงน้ำ ลูก ปู และไส้เดือนดิน ในเวลากลางคืนจะพบกบขนาดเล็กขึ้นมานั่งอยู่บนก้อนหินริมน้ำหรือบนเชือกกันน้ำขนาดเล็กเวลาตกใจจะพุ่งตัวลงในลำห้วยดำลงไปกบดานอยู่นาน 1-2 นาที ก่อนโผล่ขึ้นมาหายใจริมฝั่งด้านตรงข้าม กบตัวเต็มวัยมักหนีไปได้แล้วมุดตัวเข้าใต้กองใบไม้ที่จมอยู่กันน้ำนาน 3- 5 นาที ก่อนจะโผล่ขึ้นมาหายใจได้พบใบไม้หรือในกอพืชน้ำ

สถานภาพ : พบชุกชุมตามลำห้วยเกือบทุกสายที่มีน้ำไหลตลอดปีในป่าดิบแล้ง ยังมีปริมาณประชากรสูง แต่มีขนาดลำตัวเล็กลงเรื่อยๆ

5.กบอ่องบ่อ (*Rana nigrovittata*)



รูปที่ 6 กบอ่อง, กบอ่องเล็ก, กบอ่องบ่อ

ที่มา: http://calphotos.berkeley.edu/imgs/128x192/0000_0000/0204/1099.jpeg

ลักษณะ : ขนาดวัดจากปลายปากถึงกัน 45-59 มม. ขนาดปานกลางผิวหนังค่อนข้างเรียบ เริ่มขรุขระเป็นปุ่มบริเวณเหนือก้นและบนต้นขาหลัง หลังสองข้างมีสันหนา ซึ่งมีสีจางกว่าสีหลัง พาดตั้งแต่ด้านหลังลูกตาไปจนถึงโคนขาหลัง ตัวผู้มีต่อมเห็นได้ชัดที่โคนแขนด้านใต้ ปลายนิ้วมือและนิ้วเท้าแผ่ขยายออกเป็นแผ่นเล็ก ๆ นิ้วเท้ามีพังผืดยึดอยู่ 3 ใน 4 ของความยาวนิ้วเท้าลำตัวด้านหลังสีน้ำตาลแดงหรือสีน้ำตาลคล้ำ หัวสีคล้ำกว่าสีหลัง บางตัวมีลายประสีคล้ำบนแผ่นหลัง แผ่นหูสีคล้ำและมีปื้นสีดำอยู่ด้านหลังหู ปื้นสีดำนี้จะค่อยจางลงไปทางด้านสีข้างของลำตัว ใต้ท้องสีออกขาว แต่มีจุดประสีคล้ำกระจายอยู่ทั่วไป โดยจุดประนี้จะหนาแน่นบริเวณทางปลายด้านก้น

เขตแพร่กระจาย : มีเขตแพร่กระจายเฉพาะในบริเวณภูมิภาคแผ่นดินใหญ่ของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบตั้งแต่แนวเทือกเขาตะนาวศรีของพม่า ไทย เวียดนาม ลาวกัมพูชา ลงไปจนถึงตอนเหนือของมาเลเซียในพื้นที่ป่าสะแกราช พบอาศัยอยู่ในลำห้วยในป่าดิบแล้ง ร่วมอยู่กับกบหัวโล่ ขอบลำห้วยที่มีน้ำ ไหล ตลอดปี และมีร่มเรือนยอดปกคลุม และในห้วยที่มีน้ำขังอยู่เป็นแอ่งๆ เกาะโผล่หัวตามริมขอบแอ่ง แล้วหนีดำน้ำลงไปซุกใต้ชั้นใบไม้ที่จมอยู่กันแอ่ง ในฤดูฝนตกชุก มักพบกระโดดหากินอยู่ในป่าเต็งรัง และป่าปลุก ในจำนวนประชากรไม่มากนัก

ที่อยู่อาศัย : โดยธรรมชาติพบในสภาพธรรมชาติทั้ง 3 แบบที่พบในบริเวณป่าสะแกราช คือ พบชุกชุมที่สุดในป่าดิบแล้ง มีจำนวนไม่มากนักในป่าเต็งรัง และพบน้อยที่สุดในป่าปลูกกบขนาดใหญ่อาศัยอยู่ในชอกหินริมลำห้วย บางตัวชุกซ่อนตัวในพุ่มพอนต้นไม้ที่อยู่ไม่ไกลจากลำห้วย และใต้กองวัสดุต่างๆ บนพื้นป่า กบขนาดเล็กซ่อนตัวในกองใบไม้และกิ่งไม้ริมลำห้วย

อุปนิสัย : ออกหากินในตอนกลางคืนหรือในเวลากลางวันหลังฝนตกหนักและฟ้าครึ้มพบกระโดดไปตามพื้นป่าไกลจากลำห้วย เคยพบห่างจากลำห้วยถึง 200 ม. ก็มี กินแมลงขนาดเล็ก พวกแมลงเม่า แมลงสาบ จิ้งหรีดขนาดเล็ก ฯลฯ ที่ออกหากินอยู่บนพื้นป่าหลังฝนตก บางครั้งพบกินไส้เดือนดินขนาดเล็ก พวกที่อาศัยอยู่ริมลำห้วย เวลาตกใจมักจะมุดเข้าซ่อนในชอกหินหรือใต้กองวัสดุต่างๆ ริมห้วย ไม่โดดหนีลงในน้ำเหมือนกบหัวโล่ สำหรับพวกที่อยู่ตามแอ่งน้ำขนาดเล็กจะไม่ขึ้นมานบนบก เพียงแต่โผล่หัวขึ้นพ้นน้ำ และ เกาะอยู่ตามขอบชายน้ำเวลาตกใจจะดำน้ำหนีไปชุกอยู่ใต้กองใบไม้ที่จมอยู่ใต้แอ่งน้ำ

สถานภาพ : มีประชากรชุกชุมพอประมาณ โดยพบได้ทั่วไปตามลำห้วย และพื้นป่าไกลจากลำห้วยจำนวนในปัจจุบันลดน้อยไปจากอดีตมาก

6. ปาดบ้าน (*Polypedates mutus*)



รูปที่ 7 ปาดบ้าน

ที่มา: http://www.siamensis.org/images/webboard_images/TravelPics_reply_72531.jpg

ลักษณะ : ขนาดวัดจากปลายปากถึงกัน 60–78 มม. ขนาดใหญ่ ผิวลำตัวดูเรียบ แต่เป็นเม็ดละเอียดคล้ายกระดาษทราย หัวมีส่วนหนังติดแน่นอยู่กับกะโหลก แผ่นหูเห็นได้ชัดเจน นิ้วมือและนิ้วเท้าตอนปลายแผ่ออกเป็นแผ่นกลม ไม่มีพังผืดยี่ดระหว่างนิ้วมือ นิ้วเท้ามีพังผืด 2 ใน 3 ของความยาวนิ้ว ขาหลังยาวปานกลาง เมื่อเหยียดตรงไปด้านหน้า ข้อเท้าจะอยู่ตรงตำแหน่งระหว่างลูกตากับปลายปากสีลำตัวแตกต่างกันออกไปตามเพศ ตัวผู้มีขนาดเล็กกว่าตัวเมียมาก ตัวผู้มีลายสีคล้ำบนแผ่นหลัง เป็นรูปคล้ายนาฬิกาทราย และปื้นขนาดต่างๆ ทัวแผ่นหลัง ขาและแขนมีลายพาดขวางสีคล้ำ ตัวเมียส่วนใหญ่มีลายสี คล้ำ น้อยมาก บางตัวแทบไม่มีลายให้เห็นเลย ใต้ท้องสีคล้ำกว่าด้านหลัง ใต้ฝ่ามือและฝ่าเท้าสีออกคล้ำกว่า ส่วนอื่นๆ

เขตแพร่กระจาย : มีการกระจายอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย เวียดนาม ลาว จีน ตอนใต้ และบางส่วนของกัมพูชาในเขตพื้นที่ป่าสะแกราช ป่าชนิดนี้พบได้ทั้งในป่าดิบแล้ง ป่าเต็งรัง และป่า ปลูก แต่มีจำนวนประชากรแตกต่างกันไปในแต่ละฤดูกาล ในฤดูแล้งพบในป่าดิบแล้งและรอยต่อของป่าดิบแล้งกับป่าเต็งรัง แต่ในฤดูฝนพบมากขึ้นในป่าเต็งรัง และมีจำนวนชุกชุมมากในป่าดิบแล้ง สำหรับป่าปลูกมีจำนวนตัวน้อยตลอดทั้งสองฤดูกาล

ที่อยู่อาศัย : ตามธรรมชาติในฤดูแล้ง เวลากลางวันชุกซ่อนตัวอยู่ในกองใบไม้ ใต้ขอนไม้ และฝังตัวลงในดินชั้นๆ โคนต้นไม้ ในซอกพุ่มพอน และในตอนกลางคืนเกาะอยู่ในพุ่มไม้เตี้ย ๆ สูงจากพื้นดินไม่เกิน 1 ม.ในฤดูฝนออกมาเกาะเถาวัลย์และกิ่งไม้เล็กๆ ใต้เรือนยอดตลอดทั้งวัน เวลาฝนตกจะมารวมกลุ่มกันรอบแอ่งน้ำฝนขัง พร้อมส่งเสียงร้องกันระงมไปทั่ว บ่อยครั้งที่พบมานั่งอยู่บนถนนที่ไปสู่สามแยก และเลยไปจนถึงสถานี อุตุณิยมหาวิทยาลัย

อุปนิสัย : วางไข่เฉพาะในแอ่งน้ำฝนขังบนพื้นป่า ปกติจะซ่อนตัวอยู่ในป่าดิบแล้งหรือในบริเวณรอยต่อระหว่างป่าดิบแล้งกับป่าเต็งรัง เวลาที่ฝนตกจะแพร่กระจายออกไปในป่าเต็งรัง ตรงจุดที่มีแอ่งน้ำฝน ขัง ขณะรวมกลุ่มกันเพื่อวางไข่ ตัวเมียจะมาชุมนุมกันรอบๆ แอ่งน้ำ ส่วนตัวผู้เกาะอยู่บนต้นไม้หรือพุ่มไม้รอบบริเวณเวลาจะวางไข่ทั้งสองเพศจะก่อกองสีขาวขึ้นมาริมแอ่งน้ำ ภายในกองมีไข่สีขาวขุ่นจำนวนมาก ลูกอ๊อดจะฟักออกจากกลุ่มฟอง แล้วออกมาเติบโตในแหล่งน้ำต่อไป

สถานภาพ : พบมีประชากรชุกชุมมาก โดยเฉพาะในฤดูฝนมีการกระจายออกไปทั่วบริเวณ

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease) หรือเรียกสั้นๆว่า RNase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเอนไซม์ Nuclease ซึ่งมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย Ribonucleic acid (RNA) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ endoribonuclease และ exoribonuclease เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสอาจจะทำปฏิกิริยากับ single stranded-RNA หรือ double stranded-RNA หรือ DNA-RNA hybrid ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของ RNase แต่ละชนิด

ตัวอย่างเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

1) RNase A



รูปที่ 8 โครงสร้างสามมิติของ RNase A

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Ribonuclease_A

เอนไซม์ Ribonuclease A หรือ Bovine pancreas ribonuclease เป็นเอนไซม์ที่ได้จากตับอ่อนของวัว จัดเป็น secretory RNase และ endoribonuclease ย่อยสลาย single stranded RNA ย่อย 3' pyrimidine ได้เป็น 3'phosphorylate mono- or oligonucleotide โครงสร้างประกอบด้วย 150 amino acid มี 4 disulfide bond ได้แก่ (26-84), (40-95), (65-72) และ (58-110) The catalytic triad of RNase A, His12, Lys41 and His119, binding site คือ binding subsite1 (B1) ได้แก่ Thr45, Phe120, Ser123 binding subsite2(B2) ได้แก่ Gln69, Asn71, Glu111 binding subsite3 (B3) ได้แก่ Lys1

Isoelectric Point (pI) = 8.64

EC = 3.1.27.5

Molecular Weight = 13690.19

Amino acid sequence : 150 AA.

MALKSLVLLSLLVLVLLLVRVQPSLGKETAAAKFERQHMDSSSTAASSSNYCNQMMKSRN

LTKDRCKPVNTFVHESLADVQAVCSQKNVACKNGQTNCYQSYSTMSITDCRETGSSKYPN

CAYKTTQANKHIIVACEGNPYVPVHFDASV

2) Onconase



รูปที่ 9 (9A)โครงสร้าง Onconase และ (9B)กบ *Rana pipiens* (northern leopard frog)หรือกบเสือดาว (ที่มา : http://www.nmr.sinica.edu.tw/~thh/Research/structure_gallery/structure.html)

Onconase เป็นเอนไซม์ RNase ชนิดหนึ่งที่แยกได้จากไขของกบ *Rana pipiens* (northern leopard frog) หรือกบเสือดาว เนื่องจากมีการทดสอบทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงมาก จึงถูกเรียกว่า Onconase ตามความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โครงสร้างมีทั้งหมด 104 amino acid มี 4 disulfide bond ได้แก่ ตำแหน่งที่ (19-68), (30-75), (48-90) และ (87-104), catalytic site คือตำแหน่ง His10, Lys31 and His97 binding site คือ binding subsite1(B1) ได้แก่ตำแหน่ง Lys33, Thr35, Asp67 และ Phe68 ส่วน binding subsite2(B2) ได้แก่ตำแหน่ง Thr89, Glu91 และ His97

Isoelectric Point (pI) = 9.7

Molecular Weight = 11844.57

Amino acid sequence :

QDWLTFQKKH ITNTRDVDCD NIMSTNLFHC KDKNTFIYSR PEPVKAICKG

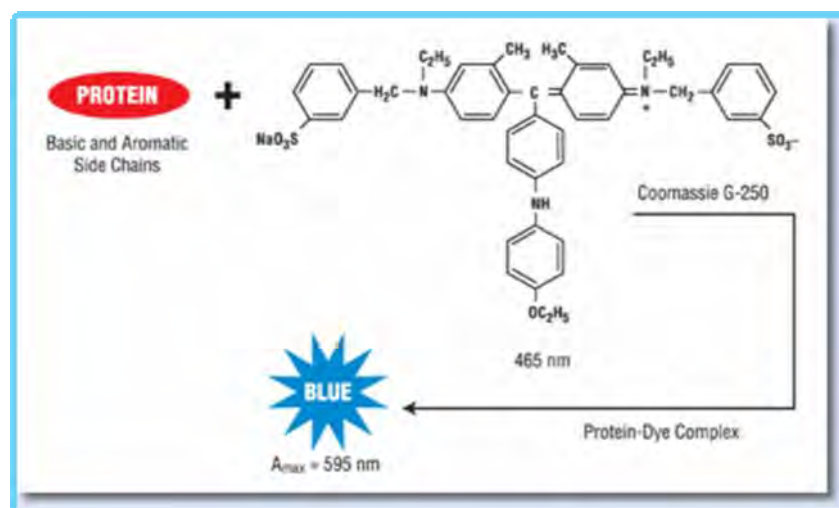
IIASKNVLTG SEFYLSDCNV TSRPCKYKLK KSTNKFCVTC ENQAPVHFVG VGSC

หลักการและทฤษฎีทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทดลอง

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Bradford method

หลักการของ Bradford method

ใช้หลักการในการสังเกตการดูดกลืนแสงสูงสุด สำหรับ acidic solution ของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งจะเปลี่ยนค่าของการดูดกลืนแสงจาก 465 nm ไปเป็น 595 nm เมื่อสารมีการจับกับ Basic and Aromatic side chain ของโปรตีน ทั้ง hydrophobic และ ionic interactions จะไปทำให้ anionic form ของ dye เกิดการเปลี่ยนสีของ dye จากน้ำตาลเป็นฟ้า ดังรูป



รูปที่ 10 การเปลี่ยนสีของ Bradford dye

ที่มา : http://www.biomaxkorea.com/product/dojindo/dpo-appli/detergent/clip_image025.gif

2. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคทางชีวเคมีที่นิยมใช้แพร่หลายในงานวิเคราะห์และวิจัยในห้องปฏิบัติการต่างๆ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ทั้งด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ วิทยาศาสตร์การแพทย์และเทคโนโลยีชีวภาพหลายแขนง Reuss ได้รายงานปรากฏการณ์การเคลื่อนที่ของสารภายใต้สนามไฟฟ้าเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1809 หลักการดังกล่าวได้ถูกนำมาประยุกต์เพื่อใช้แยกโปรตีนในซีรัมเป็นครั้งแรกโดย Tiselis ในปี ค.ศ. 1937 จากนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสเรื่อยมาจนถึงปัจจุบันเป็นเทคนิคที่มีอำนาจในการแยกแยะสูง สามารถ

แยกสารชนิดต่างๆ ภายใต้สนามไฟฟ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสมีมากมายหลายชนิด เช่น SDS-PAGE IEF เป็นต้น

หลักการ

อิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นการแยกสารหรืออนุภาคภายใต้สนามไฟฟ้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคนอกจากจะขึ้นกับแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่กระทำต่ออนุภาคแล้ว ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นอีกหลายอย่าง เมื่อพิจารณาแรงที่กระทำต่ออนุภาคใดๆ ที่มีประจุสุทธิ Q ในสนามไฟฟ้าที่มีความแรงของสนามไฟฟ้า E จะเห็นว่าแรงผลัก (Driving force, DF) ที่ทำให้อนุภาคเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า คือ

$$DF = EQ$$

แรงเสียดทาน (Retrading force, RF) ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของอนุภาค คือ

$$RF = 6\epsilon r\eta v$$

เมื่อ r คือ รัศมีของอนุภาค

η คือ ความหนืดของสารตัวกลาง

v คือ ความเร็วของการเคลื่อนที่

เมื่ออนุภาคเคลื่อนที่ในสนามด้วยความเร็วด้วยคงที่

$$DF = RF$$

ดังนั้น

$$EQ = 6\epsilon r\eta v$$

นั่นคือ

$$v = EQ / 6\epsilon r\eta \quad \dots\dots\dots(1)$$

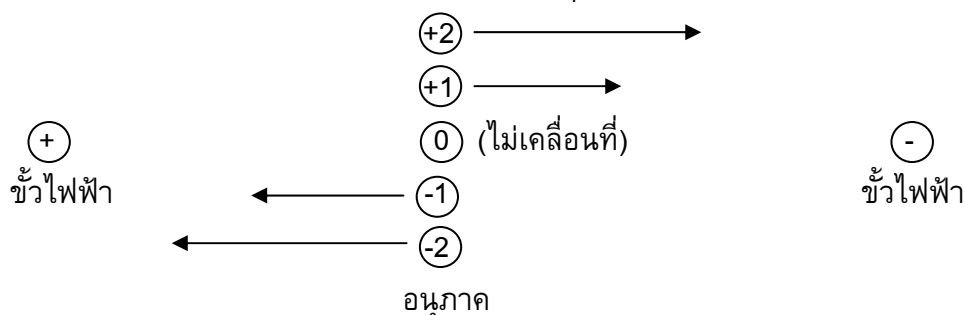
จะเห็นว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอนุภาคใดๆ ภายใต้สนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้า (Electrical field strength) และประจุสุทธิของอนุภาค แต่แปรผกผันกับขนาดและความหนืดของตัวกลางนั้น



2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคในอิเล็กโตรโฟรีซิส

1. คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

1.1 ชนิดและปริมาณประจุ อนุภาคที่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต้องมีประจุ ชนิดของประจุเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ ในขณะที่ปริมาณของประจุเป็นตัวกำหนดความเร็วในการเคลื่อนที่



1.2 pH ของสารตัวอย่างและบัฟเฟอร์ในระบบ ชนิดและปริมาณของประจุในสารชีวโมเลกุล ส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงตามภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากชีวโมเลกุลทั่วไปไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก มักมีหมู่ที่แสดงประจุบวกและลบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีค่าการแตกตัว(dissociation constant, pK) ต่างๆ กัน การแตกตัวของหมู่ประจุเหล่านี้ขึ้นกับค่า pH ของสารละลายนั้นๆ โดยหลักการทั่วไปหมู่ที่แสดงประจุได้เหล่านี้จะแตกตัวเมื่อค่า pH ของสารละลายสูงกว่าค่า pK ของมัน เช่น กรดอะมิโนไกลซีน มีหมู่อะมิโน (NH_3^+) และคาร์บอกซิล(COOH) ริงมีค่าการแตกตัวที่ 9.6 และ 2.34 ตามลำดับ เมื่อไกลซีนอยู่ในตัวกลางที่มีค่า pH 8.0 ซึ่งต่ำกว่าค่า pK ของหมู่อะมิโนแต่สูงกว่า pK ของหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นหมู่อะมิโนจะไม่แตกตัวและคงแสดงประจุบวก (NH_3^+) ในขณะที่หมู่คาร์บอกซิลจะแตกตัวและแสดงประจุลบ (COO^-) ดังนั้นไกลซีนในที่นี้จะมีประจุสุทธิ = 0 แต่เมื่อไกลซีนอยู่ในตัวกลางที่มีค่า pH = 10 ซึ่งสูงกว่าค่า pKa ของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นหมู่ทั้งสองจะแตกตัว โดยที่หมู่อะมิโนจะอยู่ในรูป NH_2 และหมู่คาร์บอกซิลอยู่ในรูป COO^- ดังนั้นไกลซีนในที่นี้จะมีประจุสุทธิเป็นลบ ในทำนองเดียวกันหากไกลซีนอยู่ในสารละลายกรดที่มี pH= 2 ซึ่งต่ำกว่าค่า pKa ของหมู่ทั้งสอง ทั้งหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลจะไม่แตกตัว หมู่อะมิโนจะอยู่ในรูป NH_3^+ และคาร์บอกซิลจะอยู่ในรูป COOH ดังนั้นไกลซีนในภาวะนี้จะมีประจุสุทธิเป็นบวก เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงประจุสุทธิของกรดอะมิโนไกลซีนเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ต่างๆ กัน

	$\text{H}_3^+\text{N-CH}_2\text{-COOH}$	$\text{H}_3^+\text{N-CH}_2\text{-COOH}^-$	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-COO}^-$
pH ของสารละลาย	acidic (<2.43)	isotonic	Alkaline (>9.6)
Ionic form	Cation	zwitterions	anion
ประจุสุทธิ	+	(+ = -) 0	-
ทิศทางการเคลื่อนที่	ไปขั้วลบ	ไม่เคลื่อนที่	ไปขั้วบวก

จากตัวอย่างข้างต้นจะเห็นว่า pH ของสารละลายตัวอย่างและ pH ของบัฟเฟอร์ในระบบบัลลิสโตรโฟรีซิส จึงมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของสาร ทั้งนี้เนื่องจาก pH เป็นตัวกำหนดชนิดและปริมาณของประจุสารนั่นเอง

1.3 ขนาด จากสมการที่ 1 จะเห็นว่าการเคลื่อนที่ของอนุภาคแปรผกผันกับขนาดของอนุภาคนั้น กล่าวคือ โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทานสูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็กเมื่อมีประจุเท่ากัน

1.4 รูปร่าง โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน โมเลกุลที่มีรูปร่างทรงกลม (globular) จะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี (fibrous) ทั้งนี้เนื่องจากแรงเสียดทานที่เกิดขึ้นแตกต่างกันตามรูปร่างนั่นเอง

2. สนามไฟฟ้า

อัตราการเคลื่อนที่ของอนุภาคแปรผันโดยตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้าซึ่งอยู่กับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า(volt) แต่แปรผกผันกับระยะทางระหว่างขั้วไฟฟ้า ดังนั้นแม้ว่าจะให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเดียวกัน อิเล็กโทรโฟเรซิสที่มีระยะทางระหว่างขั้วไฟฟ้าสั้นจะมีความแรงของสนามไฟฟ้ามากกว่าอิเล็กโทรโฟเรซิสที่มีระยะทางระหว่างขั้วไฟฟ้ายาว ความแรงของสนามไฟฟ้ายังทำให้เกิดความร้อนขึ้นในระบบอิเล็กโทรโฟเรซิส ความร้อนที่เกิดขึ้นแปรผันโดยตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้า เมื่อเกิดความร้อนขึ้น ค่าความหนืดของสารตัวกลางจะลดลง ความต้านทานในระบบจะลดลง ทำให้กระแสในระบบเพิ่มขึ้น(เมื่อ volt คงที่) เป็นผลให้การเคลื่อนที่ของอนุภาคมามากขึ้น ในขณะเดียวกันก็ทำให้ pH ของระบบลดลงซึ่งมีผลต่อชนิดและปริมาณของประจุของสารตัวอย่าง ในบางระบบความร้อนที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการระเหยของน้ำ เป็นผลให้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในระบบเปลี่ยนไป และมีผลต่ออัตราการวิ่งของสารตัวอย่าง ดังนั้นอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ต้องใช้ความแรงของสนามไฟฟ้าสูงจึงมักมีเครื่องทำความเย็นในระบบด้วยเสมอ การทำอิเล็กโทรโฟเรซิสให้ได้ผลดีจึงควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าให้เหมาะสม

3. บัฟเฟอร์ในระบบ

บัฟเฟอร์นอกจากทำหน้าที่รักษาภาวะความเป็นกรดต่างของระบบในขณะที่ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสให้คงที่และมีผลต่อชนิดและปริมาณของประจุของสารตัวอย่างดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้าด้วย ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์หรือปริมาณของอิเล็กโทรไลต์ในบัฟเฟอร์ ซึ่งวัดในค่า ionic strength นั้น นอกจากทำหน้าที่เป็นสื่อไฟฟ้าในสนามแล้วยังมีผลต่อความร้อนที่เกิดขึ้นในระบบ กล่าวคือ บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ การนำไฟฟ้าจะลดลงทำให้กระแสไฟฟ้าในระบบต่ำลงและความร้อนเกิดขึ้นน้อย ทำให้สามารถใช้ความต่างศักย์สูงได้ และในทางกลับกันบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูง การนำไฟฟ้าดีแต่เกิดความร้อนในระบบสูง ด้วยหลักการพื้นฐานนี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถพัฒนาระบบอิเล็กโทรโฟเรซิสชนิด iso electro focusing ได้

การใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูงจะลดอัตราการเกิด diffusion ทำให้ได้แถบของการแยกที่คมชัด แต่อัตราการเคลื่อนที่ของสารจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก electrolyte ในระบบบัฟเฟอร์จะจับกับประจุของสาร บดบังชนิดและปริมาณประจุที่แท้จริงของสารนั้น ดังนั้นการเลือกชนิดและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ เพื่อใช้ในระบบอิเล็กโทรโฟเรซิสจึงเป็นสิ่งสำคัญและต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์

4. ตัวกลางค้ำจุน

ตัวกลางค้ำจุนที่ดีไม่ควรดูดซับหรือแลกเปลี่ยนประจุกับสารตัวอย่างในขณะที่ทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เพราะจะทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสารช้าลง โดยเฉพาะการเกิด electro-endosmosis ปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดจากตัวกลางค้ำจุนที่มีประจุบนพื้นผิว เช่น หมูคาร์บอกซิลของกระดาษและหมูซัลโฟนิคของ agarose ซึ่งแสดงประจุลบใน pH ที่เป็นด่าง เนื่องจากประจุบนผิวตัวกลางค้ำจุนเหล่านี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้า จึงเปรียบเสมือนมีขั้วไฟฟ้าลบขนาดเล็กๆ อยู่ในระบบจำนวนมาก ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ electrolyte ประจุตรงข้าม (ในที่นี้คือประจุบวก) ไหลจากขั้วบวกไปยังขั้วลบ ซึ่งสวนทางกับการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างที่เคลื่อนจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ในภาวะดังกล่าว

นอกจากเป็นการต้านหรือลดอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง แล้วยังทำให้สารที่ไม่มีประจุหรือมีประจุอ่อนๆ เคลื่อนตามกระแส electrolyte ไปยังขั้วลบอีกด้วย

จะเห็นได้ว่าการเลือกตัวกลางคำจุนที่เหมาะสมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การแยกสารด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิสสัมฤทธิ์ผลหรือไม่และมากน้อยเพียงใด ดังนั้นตัวกลางคำจุนที่ดีจึงควรมีคุณสมบัติพื้นฐาน คือ ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา ไม่ดูดซับสารตัวอย่าง สามารถแยกสารตัวอย่างได้อย่างชัดเจน สามารถแบ่งหรือแยกเป็นส่วนๆ ได้ง่าย ตัวกลางคำจุนมีหลายชนิด จะเลือกใช้ชนิดใดขึ้นอยู่กับลักษณะงาน วัตถุประสงค์ และชนิดของสารตัวอย่างที่ต้องการแยก

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาปล่อยความร้อนหรือปล่อยพลังงานออกมา (exothermic reaction) เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นจะปล่อยความร้อนออกมาซึ่งมีผลทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น อุณหภูมิมีผลต่อคุณสมบัติของเจลด้วย ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 0-4 °C มีผลทำให้เจลขุ่น เป็นรูพรุน ไม่ยืดหยุ่น เจลมีความไม่สม่ำเสมอทำให้การแยกสารได้ผลไม่ดี ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 25 °C เจลมีความโปร่งใสมากกว่า มีรูพรุนน้อยกว่าและมีความยืดหยุ่นมากกว่า ถ้าอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาสูงเกินไปจะเกิดสายโซ่พอลิเมอร์สั้นๆ และเจลไม่ยืดหยุ่น

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเจลคือที่ 25-30°C สารละลายมอโนเมอร์ แผ่นกระจกหรือหลอดแก้วควรมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเมื่อเทเจล เนื่องจากสารละลายมอโนเมอร์และสารละลายบัฟเฟอร์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จึงควรปล่อยให้สารละลายนี้มีอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้องเสียก่อนจึงเตรียมเจล

2. ออกซิเจน (O₂)

การเตรียมเจลโดยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันซึ่งใช้อนุมูลอิสระถูกยับยั้งได้โดยธาตุหรือสารประกอบที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ O₂ ก็เป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) ตัวหนึ่ง O₂ ในอากาศและ O₂ ที่ละลายอยู่ในสารละลายเจล สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องไล่อากาศออกจากสารละลายเจลก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายมอโนเมอร์ที่เก็บไว้ที่ 4 °C มีความสามารถละลายเก็บ O₂ ได้ดีกว่า การไล่อากาศหรือ O₂ ออกจากสารละลายใช้เวลารวดเร็วและสมบูรณ์มากกว่าถ้าสารละลายมีอุณหภูมิ 23-25°C ก่อนนำไปไล่อากาศ นอกจากนี้ถ้านำสารละลายเจลที่เย็นมาไล่อากาศออกภายใต้สุญญากาศจะทำให้สารละลายยังคงเย็นอยู่ และการไล่อากาศเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ซึ่งเมื่อนำสารละลายเย็นมาเตรียมเจล จะทำให้มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาและคุณภาพของเจลที่เตรียมขึ้นด้วยเหตุดังกล่าวนี้นี้ การเตรียมเจลที่มีคุณภาพดีทำให้มีการแยกสารได้ดี จึงจำเป็นต้องทำให้สารละลายเจลมีอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องก่อนแล้วจึงนำมาไล่อากาศออก การไล่อากาศใช้เวลาอย่างน้อย 15 นาทีที่ 23-25°C ภายใต้สุญญากาศ 125 torr ถ้าเขย่าหรือกวนสารด้วยจะใช้เวลาอย่างน้อยประมาณ 8-10 นาที

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสมีระบบบัฟเฟอร์ที่ pH เป็นกลางหรือ pH เป็นต่าง ซึ่งเหมาะสำหรับตัวเริ่มต้นที่ใช้คือ TEMED แอมโมเนียมซัลเฟต และไรโบฟลาวิน ที่ pH เป็นกลางหรือ pH เป็นต่าง การทำงานของตัวเริ่มต้นเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพ แต่ที่ pH เป็นกรด TEMED จะกลายเป็นรูปกรด (protonated form) ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันช้าลง เนื่องจาก TEMED รูปเบสอิสระ (free base form) เป็นรูปที่ทำให้เกิดการเริ่มต้นของปฏิกิริยา

3. Activity gel electrophoresis

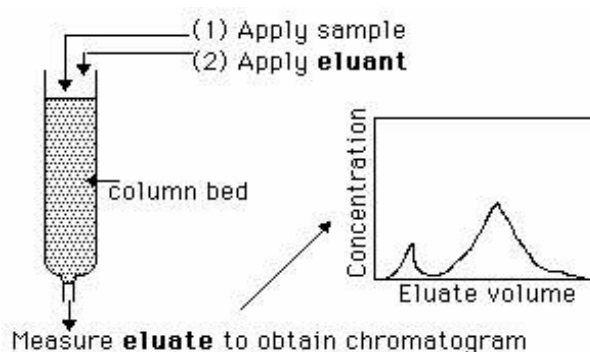
หลักการของ Activity gel electrophoresis

หลักการเหมือนกับของ SDS-PAGE คือโปรตีนจะถูกแยกตามขนาด โดยวิธีนี้ภายในเนื้อเจลจะมี substrate (RNA solution) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ RNase ได้ ซึ่งถ้ามีการล้างเอา SDS ออกด้วย 25% iso-propanol/0.01M Tris-HCl, pH 7.0 จะทำให้ SDS หลุดออกจากแถบโปรตีนทำให้โปรตีนสามารถ refold กลับมามีโครงสร้างและมีแอกติวิตีตามสภาวะธรรมชาติ ซึ่งเมื่อ RNase ที่แยกได้จับกับ substrate (RNA) ที่อยู่ในเจลจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายทำให้เกิดเป็น clear zone ขึ้นเมื่อย้อมด้วย Toluidine blue O เนื่องจากบริเวณดังกล่าวในเนื้อเจลไม่มี RNA ผสมอยู่แล้ว

4. เทคนิคโครมาโทกราฟี

Chromatography เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารชีวโมเลกุล เนื่องจากมีหลักการประยุกต์ใช้ได้หลากหลายและสารที่แยกได้นั้น สามารถนำมาวิเคราะห์หรือวัดปริมาณได้ทันที แล้วยังสามารถเตรียมสารในปริมาณมากได้

ผลลัพธ์ของการแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟี เรียกว่า 'Chromatogram'



รูปที่ 11 แสดงตัวอย่างของโครมาโตกราฟี แบบคอลัมน์ (Column chromatography)

(จาก <http://www.phys.uts.edu/au/subjects91326/Section3/section3.html>)

โครมาโทกราฟีเป็นวิธีแยกสารให้บริสุทธิ์โดยให้องค์ประกอบของสารที่ต้องการแยกแผ่กระจายอยู่

ระหว่างเฟส (phase) 2 เฟส เฟสหนึ่งอยู่กับที่เรียกว่าเฟสคงที่ (stationary phase) หรือตัวกลาง (medium) อีกเฟสหนึ่งเคลื่อนที่ผ่านไปตามเฟสคงที่ (mobile phase) หรือตัวชะ (elute) เฟสคงที่อาจเป็นของแข็ง ของเหลว หรือของแข็งผสมของเหลว ส่วนเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นของเหลว หรือแก๊สก็ได้แล้วแต่ชนิดของ โครมาโทกราฟี ส่วนใหญ่สารที่แยกได้โดยวิธีนี้ยังคงมีสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์เหมือนเดิมทุก ประการ โครมาโทกราฟีมีหลายรูปแบบ การเรียกชื่อส่วนมากจะใช้ความนิยมหรือความเคยชินในหมู่นักวิทยาศาสตร์แต่ก็พบว่าจะมีหลักในการเรียกชื่ออยู่ 4 ประการคือ

1). ลักษณะทางกายภาพหรือชนิดของเฟสคงที่ เช่น thin layer chromatography (เฟสคงที่มีลักษณะเป็นแผ่นบาง) column chromatography (เฟสคงที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้ว) paper chromatography (เฟสคงที่เป็นกระดาษ)

2). ลักษณะทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่ เช่น gas chromatography (เฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส) liquid chromatography (เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว)

3). ปรากฏการณ์ที่ทำให้เกิดการแยกสาร เช่น adsorption chromatography (โครมาโทกราฟีที่แยกสารได้โดยใช้หลักของการดูดซับสารที่แยกได้โดยเฟสคงที่) gel filtration chromatography (โครมาโทกราฟีที่แยกสารโดยใช้หลักในการกรองโมเลกุลด้วยเฟสคงที่ซึ่งเป็นเจล) ion-exchange chromatography (โครมาโทกราฟีที่แยกสารโดยการแลกเปลี่ยนไอออน) partition chromatography (โครมาโทกราฟีที่แยกสารโดยใช้หลักการละลายของสารระหว่างตัวทำละลายสองชนิด)

4). ความก้าวหน้าของเทคโนโลยี เช่น high performance liquid chromatography (HPLC) เนื่องจากหลักการในการเรียกชื่อโครมาโทกราฟีมีหลายอย่าง ดังนั้นจึงมีการทับซ้อนกันเกี่ยวกับชนิดของโครมาโทกราฟีแต่ละแบบได้ Chromatography ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ได้แก่ Stationary phase, Mobile phase, สารผสมที่จะนำมาแยก (Sample mixture)

หลักการของโครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟี อาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ โดยสารที่ต้องการนำมาแยกโดยวิธีนี้จะมีสมบัติการละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน และตัวถูกดูดซับโดยตัวดูดซับได้ไม่เท่ากัน ทำให้สารเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน

วิธีการทำโครมาโทกราฟี

นำสารที่ต้องการแยกมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วให้เคลื่อนที่ไปบนตัวดูดซับ การเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารแต่ละชนิดในตัวทำละลาย และความสามารถในการดูดซับที่มีต่อสารนั้น กล่าวคือ สารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดี และถูกดูดซับน้อยจะถูกเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดี จะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง ถ้าใช้ตัวดูดซับมากๆ จะสามารถแยกสารออกจากกันได้

การเลือกตัวทำละลายและตัวดูดซับ

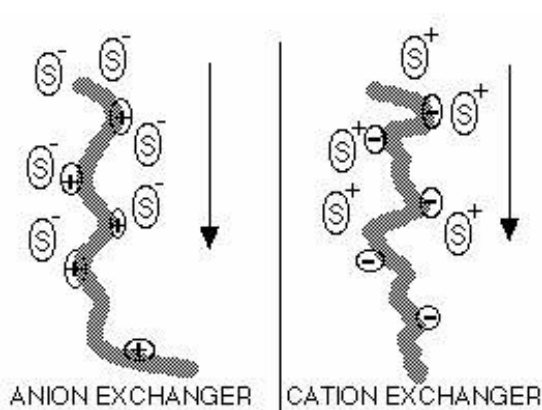
1. ควรเลือกตัวดูดซับที่มีการดูดซับสารได้ไม่เท่ากัน
2. ถ้าต้องการแยกสารที่ผสมกันหลายชนิด อาจต้องใช้ตัวทำละลายหลายชนิดหรือใช้ตัวทำละลายผสม
3. ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ เฮกเซน ไโซโคลเฮกเซน เบนซีน อะซีโตน คลอโรฟอร์ม เอทานอล
5. ตัวดูดซับที่นิยมใช้ ได้แก่ อะลูมินาเจล(Al_2O_3) ซิลิกาเจล (SiO_2)

ข้อดีของโครมาโทกราฟี

1. สามารถแยกสารที่มีปริมาณน้อยได้
2. สามารถแยกได้ทั้งสารที่มีสีและไม่มีสี
3. สามารถใช้ได้ทั้งปริมาณวิเคราะห์(บอกได้ว่าสารที่แยกออกมามีปริมาณเท่าใด) และคุณภาพวิเคราะห์(บอกได้ว่าสารนั้นเป็นสารชนิดใด)
4. สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้
5. สามารถแยกสารออกจากกระตาะกรองหรือตัวดูดซับโดยสกัดด้วยตัวทำละลาย

4.1 Ion-exchange chromatography

อ็อนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลชนิดต่างๆ ออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของค่าประจุ (Net charge) ของโมเลกุลเหล่านั้น นั่นคือสารที่จะนำมาแยกจะต้องมีความสามารถในการแตกตัวให้ประจุ โดยสารจะถูกดึงไว้โดยแรงดึงดูดระหว่างหมู่บน stationary phase ซึ่งมีประจุตรงข้ามกับสารที่ต้องการแยก ion-exchange chromatography มี 2 แบบคือ Anion-exchange และ Cation-exchange ซึ่งเรียกตามประจุของสาร แต่คอลัมน์จะบรรจุด้วย stationary phase ที่มีประจุตรงข้าม



รูปที่ 12 Ion-exchange chromatography

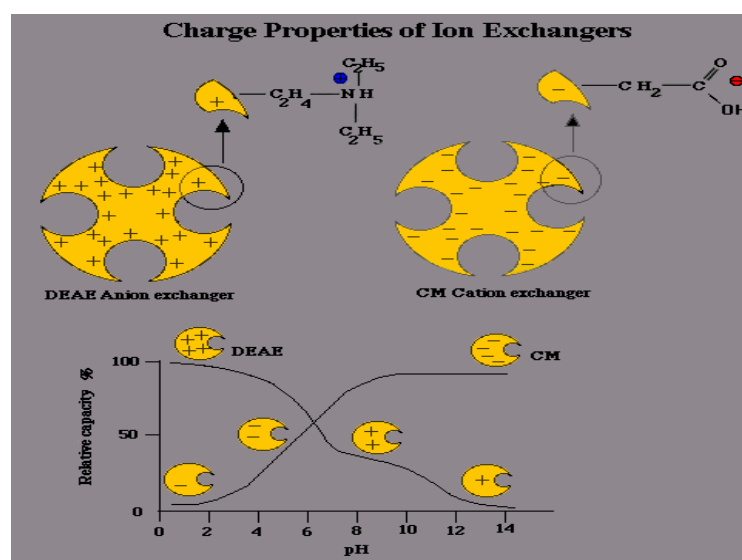
(ที่มา <http://www.phys.uts.edu/au/subjects91326/Section3/section3.html>)

เกณฑ์พิจารณาในการเลือกชนิดเรซินสำหรับการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

โปรตีนเป็นชีวโมเลกุลชนิด polyionic molecule ซึ่งมีสมบัติเป็น amphoteric molecule คือ โปรตีน 1 โมเลกุลอาจเป็นทั้งประจุบวกหรือประจุลบขึ้นกับค่า pH ของสารละลายโปรตีนและค่าไอโซอิเล็กตริก (pI) ของโปรตีนนั้น ณ พีเอชซึ่งเป็นค่า pI ของโปรตีนหนึ่งๆ ประจุสุทธิของโปรตีน (Net charge) ของโปรตีนประมาณว่าเป็น “ ศูนย์ ” คือเสมือนว่าไม่มีประจุ (neutral) ถ้าพีเอชมากกว่าค่า pI โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ พีเอชต่ำกว่าค่า pI โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นบวก ดังนั้นจะเห็นว่าเมื่อจะแยกให้โปรตีนชนิดหนึ่งบริสุทธิ์ น่าจะมีโอกาสเลือกได้ทั้งแอนไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซินและแคทไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซิน กรณีที่จะต้องพิจารณาประกอบคือ โปรตีนนั้นมีความเสถียรในช่วงพีเอชใด ซึ่งหมายถึงโปรตีนสามารถละลายอยู่ในค่าพีเอชนั้นได้โดยไม่สูญเสียแอกติวิตีทางชีวภาพ (biological activity)

การชะสารทำได้โดย

- การเปลี่ยนแปลง pH เพื่อจะ neutralize หมู่ที่มีประจุทั้งที่อยู่บนโมเลกุลของสารและบน stationary phase
- เพิ่มความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะ เพื่อไปแทนที่ไอออนที่จับอยู่
- ใช้ pH หรือ salt gradient เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแยก matrix ตัวกลางที่ใช้แยกสารแบ่งออกตามประจุ ชั่วคราว



รูปที่ 13 (บน) แสดงประจุของหมู่ที่อยู่บน stationary phase ที่นิยมใช้ได้แก่ diethylaminoethyl (DEAE) carboxymethyl (CM) (ล่าง) แสดงการเปลี่ยนแปลงความจุของประจุที่ pH ต่างๆ (ที่มา

<http://www.phys.uts.edu.au/subjects91326/Section3/section3.html>)

การปรับสภาพเรซิน (Regeneration) และการเก็บรักษา (Storage)

คอลัมน์ไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟีที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว สามารถปรับสภาพให้ใช้งานได้ดังเดิมโดยไม่ต้องเทเรซินออกจากคอลัมน์ วิธีการปรับสภาพเรซินในคอลัมน์ คือล้างแคตไอออนเอกซ์เชนจ์เรซินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง หรือล้างแอนไอออนเอกซ์เชนจ์เรซินด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง ใช้ปริมาณมากๆ แล้วล้างซ้ำด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็น Equilibration buffer ปริมาณมากๆ คอลัมน์ก็พร้อมที่จะใช้งานได้ซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ในเวลาที่ต้องเนื่องกัน แต่หากคอลัมน์ถูกตั้งทิ้งไว้นานๆ อาจจะมีจุลินทรีย์ขึ้นได้ โดยเฉพาะเรซินที่เป็น เซลลูโลส อะกาโรส หรือพวากอนพังก์ คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ก็จะต้องมีวิธีเก็บที่เหมาะสม ภายหลังการล้างเรซินแล้ว เรซินบางชนิดอาจเก็บได้ในสภาพเป็นผงแห้ง (dry power) ตามเดิม แต่บางชนิดอาจเก็บได้ในสภาพเป็นเรซินแขวนลอย (suspension) ในน้ำที่มีสารป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) สารเคมีนั้นควรเป็นชนิดที่ไม่แตกตัวเป็นไอออนจับกับลิแกนด์ได้

4.2 high performance liquid chromatography (HPLC)



รูปที่ 14 แสดงส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC

(ที่มา: <http://share.psu.ac.th/blog/science-equipment/945>)

หลักการ

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่างที่เราสนใจ โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสคงที่ (stationary phase ในที่นี้คือ column) และ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็ว สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ

stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาที่หลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ(detector)ที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรม โดย HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC

1. Mobile phase / Solvent : หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์
2. Degaser : ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector
3. Pump : ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC
4. Injector / Autosampler : ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC
5. Column : หรือจะเรียกว่า stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase แต่สำหรับ HPLC : Agilent 1100 มีอุปกรณ์เพิ่มเติมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ Column จึงเรียกว่า column thermostat
6. Detector : คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี ได้แก่ Ultraviolet-Visible detector, Fluorescence detector, Refractive index detectors (RI detector), Electrochemical detectors, Conductivity detectors

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการทดลอง

1. การเตรียม mobile phase

น้ำที่จะนำมาใช้ในการเตรียมควรเลือกใช้น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น น้ำกลั่น 2-3 ครั้ง (DDW) และปราศจากไอออนชนิดต่างๆ (DI) สำหรับเตรียมสารเคมีที่ใช้ เช่น buffer เป็นต้น ส่วน reagent หรือ modifier ควรใช้เกรดอย่างต่ำเป็น analytical grade (methanol สามารถใช้ analytical grade ได้) แต่ Acetonitrile (ACN) (ต้องใช้ HPLC grade เท่านั้น) เมื่อผสม mobile phase เสร็จแล้วต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน (สำหรับ membrane filter ก็ต้องเลือกให้ถูกว่าชนิดใดใช้กรอง aqueous mobile phase หรือชนิดใดใช้กรอง organic solvent) หลังจากกรองแล้วนำ mobile phase ไปทำการ degas โดยอาจใช้ sonicate ในเครื่อง ultrasonic ประมาณ 15 นาที หรือผ่านการ degas helium นาน 15 นาที

2. การเลือก column และ detector

เลือกชนิดของ column ให้เหมาะสมกับงาน และควรล้าง column (ไม่ต่อเข้า detector) ก่อนทุกครั้งตามวิธีที่เหมาะสม Detector ควรเลือกให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์

3. การ pump mobile phase ใหม่ เข้าแทนที่ของเก่าที่ค้างใน column

ปกติต้องไล่ solvent ที่ค้างอยู่ใน tubing และ pump ออกโดยการ purge (10ml/min) ด้วย mobile phase ประมาณ 30 ml (3min) แล้วหยุด pump mobile phase ผ่าน column โดยรอให้ condition สมดุลก่อน คือ pump mobile phase ผ่าน column ประมาณ 5 เท่าของปริมาตร column ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์

4. ตรวจสอบว่า flow rate คงที่หรือไม่

โดยสังเกตจากความดัน ถ้าคงที่ (50 psi) จึงเริ่มวิเคราะห์ได้ ถ้ายังไม่คงที่อาจมีปัญหากว่าการ degas ไม่ดีพอ ต้องทำการ degas ใหม่

5. การทดสอบว่า baseline ใน chromatogram เรียบหรือไม่ โดยการเปิด integration หรือ recorder และ run ดู ซึ่ง baseline ที่ดีควรจะเรียบ

6. การล้าง injection loop ให้สะอาดก่อนทำการฉีดสารเข้า loop โดยใช้ syringe ดูด solvent ฉีดล้าง loop และควรล้างก่อนทุกครั้งที่มีการฉีด sample

7. การล้าง column หลังการใช้งาน ให้ run น้ำผ่านเข้าไปให้ได้ปริมาตร 3 เท่าของ column จากนั้นเปลี่ยนเป็น run methanol ปริมาตร 3 เท่าของ column เช่นเดียวกัน แล้วเก็บ column เพื่อใช้ครั้งต่อไป

การประยุกต์ใช้ HPLC

1) Preparative HPLC หมายถึงการใช้ HPLC ในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ แยก

เป็นสารเดี่ยวที่สำคัญ คือระดับความบริสุทธิ์ของสารละลาย ซึ่งเป็นจำนวนของสารประกอบที่ถูกผลิตขึ้นต่อหนึ่งหน่วยเวลา สิ่งที่จะได้จากการวิเคราะห์ HPLC คือ ข้อมูลเกี่ยวกับสารประกอบตัวอย่างซึ่งข้อมูลเหล่านั้นได้แก่ ชนิด ปริมาณ และการแยกออกจากกันของสารประกอบ

2) Chemical separation ในการแยกสารเคมีสามารถใช้ HPLC ทำได้ โดยอาศัย

ประโยชน์จากคุณสมบัติของสารประกอบที่มีอัตราการแพร่ภายใน column และ Mobile phase ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแยกสารประกอบเคมีหลายๆชนิดออกจากกันได้ และในการใช้ HPLC ในการแยกสารประกอบเคมี สิ่งที่เป็นตัวควบคุมหรือมีอิทธิพลต่อการแยกของสารเคมีคือ การเลือกใช้ stationary phase และ mobile phase

3) Purification หมายถึง ขบวนการแยกหรือขบวนการสกัดสารประกอบเคมีที่เรา

ต้องการออกจากสารประกอบอื่นหรือสิ่งเจือปนต่างๆ สารประกอบแต่ละตัวจะมีลักษณะของ peak ภายใต้เงื่อนไขของ Chromatographic ที่จะสามารถรับรู้ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าสารประกอบที่จะทำการแยกคืออะไร และสัมพันธ์กับสารตัวอย่างอย่างไร Chromatographer อาจต้องเลือกเงื่อนไข เลือกคุณสมบัติ

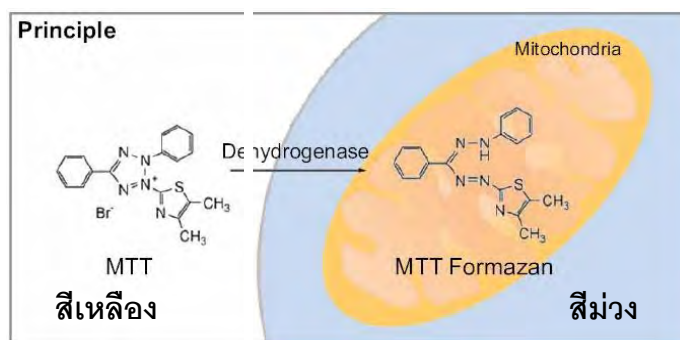
ของ mobile phase ติดตามกระบวนการแยก ตลอดจนกระทั่งสารประกอบที่ต้องการมีการรวมกันและหลุดออกจาก stationary phase การแพร่ของสารประกอบและสารปนเปื้อนอื่นๆจะแพร่ผ่าน column แตกต่างกันพอที่จะได้สารที่มีความบริสุทธิ์

4) Identification การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC นั้น เป็นขั้นตอนหนึ่งของการตรวจสอบด้วย HPLC ในการจำแนกสารประกอบใด ๆ ก็ตาม สิ่งที่เราควรเลือกเป็นอันดับแรกคือ Detector เมื่อเลือกแล้วก็นำมาติดตั้งในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำการตรวจสอบ พารามิเตอร์ของกระบวนการตรวจสอบนี้ จะให้ peak ของสารประกอบตัวอย่างชัดเจน ซึ่งสังเกตได้จาก peak ที่ปรากฏบน Chromatogram การจำแนก peak จะใช้ retention time และใช้ peak ที่แยกออกจาก peak ที่ไม่ต้องการ ซึ่งกระบวนการตรวจสอบจะแสดงออกมา การเปลี่ยนแปลง retention time ของสารประกอบพารามิเตอร์หลายๆตัว สามารถตรวจจับได้ การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC กระทำได้โดยการค้นคว้าจากหนังสือ, วารสาร และการลงมือทดลองดู ตัวอย่างของสารประกอบที่เราทราบแล้วว่าเป็นอะไร จะเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกชนิดของสารประกอบที่เรายังไม่ทราบได้ การจำแนกสารประกอบเพื่อยืนยันความถูกต้องนั้นควรใช้วิธีการตรวจสอบตั้งแต่ 2 วิธีขึ้นไปประกอบกัน

5) Quantification การหาปริมาณของสารประกอบโดยใช้ HPLC เป็นกระบวนการเปรียบเทียบ

สารประกอบที่ไม่ทราบความเข้มข้น ทำได้โดยฉีดชุดของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเข้าไปใน HPLC เพื่อทำการตรวจสอบ chromatograph จะแสดง peak ของชุดข้อมูลที่สัมพันธ์กันกับความเข้มข้นของสารละลายที่ฉีดเข้าไป ใช้สูตรการหาพื้นที่รูปสามเหลี่ยม คำนวณหาพื้นที่ใต้ peak แต่ละ peak นำข้อมูลมาทำเป็น calibration curve โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทำได้

5. หลักการวัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิต (MTT assay)



รูปที่ 15 หลักการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (ที่มาดัดแปลงจาก : http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay)

หลักการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) คือการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจากการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial succinic dehydrogenase ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์นี้ทำงานอยู่ใน mitochondria ในวิถีของ krebs cycle ซึ่งเป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และ ไขมัน โดยขั้นต้นคือการเปลี่ยนแปลงจาก succinate ไปเป็น fumarate โดยsuccinic dehydrogenase (SDH) โดยมี FAD เป็นโคเอนไซม์ที่เกิด reduction เปลี่ยนเป็น FADH_2 และ FADH_2 นี้จะสามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazan ที่มีสีน้ำเงิน และตกตะกอนใน mitochondria โดยการทดสอบนี้ต้องการ disodium succinate เป็นตัวตั้งต้นเมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์ มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีม่วง และระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzyme reduction ของ tetrazolium salt ผลึกของ MTT formazan สามารถละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ก่อนที่จะนำไปอ่านค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 570 nm (OD_{570}) ค่าที่อ่านได้จะบอกถึง mitochondrial activity และ เซลล์ที่ยังมีชีวิต

6. Mass spectrophotometry

Mass spectrometry คือ เทคนิควิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้หลักการการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออน (ionization) ในส่วนประกอบแรกของเครื่องมือที่เรียกว่า ส่วนผลิตไอออน (ionization source) โดยมีวิธีการเปลี่ยนสารตัวอย่างหลายวิธี เช่น ใช้ลำอิเล็กตรอนเข้าชน (electron impact) เป็นต้น เมื่อสารตัวอย่างเปลี่ยนไปเป็นไอออนแล้วจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ที่มีหลายประเภทเช่นกัน ตัวอย่าง เช่น ควอดรูโพล (Quadrupole) ที่ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าและคลื่นความถี่วิทยุในการจำแนกมวล ส่วนประกอบสุดท้ายได้แก่ ส่วนตรวจวัด(detector) ทำหน้าที่เป็นฉากรับเมื่อมีไอออนมาตกกระทบเพื่อส่งข้อมูลไปยังส่วนประมวลผล ได้แก่ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม เพื่อจะแสดงผลออกมาในกราฟที่มีชื่อเรียกเฉพาะว่า แมสสเปกตรัม (Mass Spectrum) ที่มีแกนตั้งเป็นค่า relative intensity และแกนนอนเป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z) เทคนิคนี้ใช้ในการหามวลโมเลกุล (molecular mass) องค์ประกอบของธาตุ โครงสร้าง และ chemical species

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์ :

1. 96 well plate
2. Aluminium foil
3. Auto pipette set
4. Column แก้วขนาด 1.5 × 30 cm
5. Cover slip , hemacytometer
6. Flask สำหรับเลี้ยงเซลล์
7. Forceps
8. Hand homogenizer
9. Hot plate
10. Magnetic bar
11. Magnetic stirrer
12. Mask
13. Micro centrifuge tube
14. Para film
15. Pipette
16. Pipette aid
17. Pipette ขนาด 5-10 ml (Cleaned)
18. Strip holder
19. Thermometer
20. Tip ขนาดต่างๆ
21. Tube ขนาดต่างๆ
22. Wrap
23. กรรไกร
24. กรวยแก้ว
25. กระดาษกรอง Whatman No.1
26. กระดาษขาว
27. กระดาษหิซชู
28. กระบอกตวงขนาดต่างๆ

29. กล้องจุลทรรศน์
30. กล่องพลาสติกสำหรับล้างเจล
31. กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง
32. ขวดแก้วเก็บสาร (ISOLAB, SCHOTT DURAN)
33. ขวดน้ำกลั่น
34. เครื่อง Autoclave (ALP)
35. เครื่อง Centrifuge (CENTURION SCIENTIFIC LTD.)
36. เครื่อง Centrifuge (HITACHI)
37. เครื่อง pH meter
38. เครื่อง Power supply (BIO-RAD)
39. เครื่อง Shaker
40. เครื่อง Spectrophotometer, Jenway รุ่น 6400 Spectrophotometer
41. เครื่องชั่งสองตำแหน่ง (METTLER TOLEDO)
42. เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง (SCIENTIFIC PROMOTION)
43. ข้อนตักสาร
44. ชุด Pump, สายยาง, pasturepipette
45. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (ATTO CORPORATION)
46. ตะกร้า
47. ตู้อบ GRIEVE-HENDRY
48. ถังพลาสติกแบบเลื่อนปิด
49. ถังมือ
50. ถังร้อนและยางรัด
51. แท่งแก้วคนสาร
52. นาฬิกาจับเวลา
53. ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ
54. ปากกา Label
55. พลาสเจอร์ปีเปิด
56. ลูกยาง
57. หม้อต้มน้ำ

สารเคมี :

1. 1X PBS
2. Acetic acid
3. Acrylamide (BIO-RAD)

4. Ammonium persulphate
5. Comassie brilliant blue G 250
6. Comassie brilliant blue R 250
7. DDW
8. Distilled water
9. Distilled water
10. DMSO
11. Double distilled water
12. Double distilled water
13. Ethanol
14. Glacial acetic acid
15. Glycerol
16. Glycine
17. HPLC water
18. Hydrochloric acid
19. Iso propanol
20. Medium
21. Methanol
22. MTT
23. N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)
24. N,N-bis-methylene-acrylamide (SIGMA CHEMICAL)
25. Phosphoric acid
26. PMSF
27. Protein marker (LMW protein marker, BioRad)
28. Ribonucleic acid (RNA)
29. Sodium dodecyl sulphate (SDS) (SERVA)
30. Toluidine blue O
31. Tris (Fisher Scientific)
32. Trypsin
33. Zinc chloride
34. β -mercaptoethanol

3.2 วิธีการทดลอง

ข้อควรปฏิบัติสำหรับการทำการทดลอง

1. ขณะทำการทดลองจะต้องสวมเสื้อผ้าให้รัดกุม สวมถุงมือ ป้องกันการปนเปื้อนสารเคมี และสารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง
2. สวม mask ในกรณีที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อโรค ผ่นละอองสารเคมีในห้องปฏิบัติการ
3. อุปกรณ์ทุกอย่างที่ใช้สำหรับการทดลองจะต้องผ่านล้างทำความสะอาด และอบให้แห้ง
4. ตัวอย่างโปรตีนที่นำมาทดลองจะต้องทำในอ่างน้ำแข็ง เพื่อรักษาสภาพโปรตีน

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง สารสกัดโปรตีน

เตรียมเครื่องมือ-อุปกรณ์สำหรับการผ่าและเก็บเนื้อเยื่อให้เรียบร้อย นำสัตว์ทดลองออกจากกล่องเก็บตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส มาแช่ไว้ให้คืนสภาพในอ่างน้ำแข็ง ทำการผ่าซากเพื่อเก็บเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ต้องการ และแช่เก็บไว้ที่ -20°C รอการสกัดโปรตีน

นำเนื้อเยื่อที่ต้องการสกัดโปรตีน มาหั่นด้วยมีดที่สะอาดเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในหลอดบด (Polytron homogenizer) ที่แช่ในกล่องน้ำแข็ง เติมสารละลาย 0.2 M acetic acid (ที่เย็น) ที่มีสารยับยั้งการทำงานของ proteases บดจนละเอียด ให้เป็นเนื้อเดียว จากนั้นนำ homogenate ที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm 4 °C เป็นเวลา 15 min เก็บส่วนที่เป็น supernatant ไว้ ไปทำ dialysis ต่อน้ำกลั่น นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บเฉพาะส่วนใส เรียกสารละลายที่ได้นี้ว่า crude extract นำไปศึกษาชั้นต่อไป หรือเก็บไว้ที่ -20 °C

3.2.2 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการวัดปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Bradford (Bradford,1976) เพื่อให้ทราบปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ทั้งหมดในสารสกัดที่สกัดได้

- 1). เตรียม Bradford's dye เพื่อใช้ในการวัดปริมาณโปรตีน
- 2). ปิเปตสารสกัดโปรตีน 10 ul ลงใน micro tube
- 3). เติม Bradford's dye 1 ml ทิ้งไว้ 10 นาที
- 4). วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm
- 5). คำนวณปริมาณโปรตีนโดยใช้สมการที่ได้จากการทำ standard protein ด้วยปฏิกิริยา Bradford.

3.2.3 การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

ตรวจสอบรูปแบบโปรตีน ความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ 0.5% stacking gel และ 12.5% separating gel ใช้กำลังไฟฟ้า 15 mA (constant current) ในส่วน stacking gel และ 20 mA ในส่วน separating gel ย้อมเจลด้วย 0.1% CBB และทำการล้างเจลด้วย

10% acetic acid จำนวน 2 ครั้ง ละ 10 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย methanol/acetic จนกว่าจะพบแถบโปรตีนที่คมชัด มี background สี น้ำแผ่นแข็งที่ย้อมเสร็จไป scan เก็บเป็นข้อมูลไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.4 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ด้วยวิธี Activity gel staining

กิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส จะตรวจสอบตามวิธีของ Katekaew et al., (2006) โดยเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 12.5% ที่มีส่วนผสมของ RNA ความเข้มข้นประมาณ 2.06 mg/ml ทำการโหลดโปรตีนที่เตรียมใน sample buffer ที่ไม่มี beta-mercaptoethanol หลังจากการทำ electrophoresis แล้ว separating gel จะถูกแยกนำมาล้างในสารละลาย 0.01 M tris-HCl buffer (pH 7.0) ที่มีส่วนผสมของ isopropanol ความเข้มข้น 25% เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้งโดยการ shake เบาๆ เพื่อเป็นการกำจัด SDS ออกจากรูพรุนของเจล จากนั้นล้างเจลด้วยสารละลาย 0.01 M tris-HCl, pH 7 ที่มีส่วนผสมของ $ZnCl_2$ ความเข้มข้น 2 μM จำนวน 2 ครั้ง ในเครื่องเขย่า เพื่อให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส จะนำเจลไปแช่ในสารละลาย 0.1 tris-HCl, pH 7.0 เป็นเวลา 50 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำเจลมาล้างด้วยสารละลาย 0.01 M tris-HCl, pH 7.0 เป็นเวลา 10 นาที ทำการย้อมเจลด้วยสารละลาย 0.2% Toluidine blue O ที่ละลายอยู่ใน 0.01 M tris-HCl, pH 7 เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเจลด้วยสารละลายเดียวกันนี้ จำนวน 2 ครั้ง แถบโปรตีนใดที่กิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส จะปรากฏ Clear zone ตรงตำแหน่งของโปรตีนนั้นอยู่ การศึกษานี้ใช้ RNase A เป็น (standard)

3.2.5 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (RNase activity assay)

กิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส สามารถตรวจวัดโดยวัดจำนวนของ acid-soluble nucleotides ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์โดยย่อยสารตั้งต้นที่เป็น RNA (Torula yeast RNA type VI ตามวิธีของ Leimoni et al., (2003); Zimmerman และ Sandeen (1965) โดยปฏิกิริยาเกิดในปริมาตร 40 μl ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0 ที่บรรจุด้วย RNA ความเข้มข้น 50 $\mu g/40 \mu l$ ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ 10 μl ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 200 μl ของ 0.75% (w/v) sodium tungstate ใน 25% (v/v) perchloric acid และแช่ในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm 15 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใส (acid-soluble nucleotide) 200 μl เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ml จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm โดยปริมาณ acid-soluble nucleotide คำนวณได้จากค่า molar absorption coefficient ที่ 10,600 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ดังนั้น One unit ของเอนไซม์ คือจำนวนของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแล้วได้ปริมาณของ acid-soluble nucleotide 1 $\mu mol/min$ ภายใต้สภาวะที่ศึกษา

3.2.6 ทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

3.2.6.1 Cation- exchange chromatography (CM-sepharoseTM) FPLC

นำ crude extract ที่ได้มาทำการแยกบริสุทธิ์เอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอส ด้วย UNO Q1 column (Bo-Rad, USA) cation exchange chromatography (CM-sepharoseTM fast flow resin) ขนาด 0.9x23 cm คอลัมน์ equilibrate ด้วย Buffer A (0.03 M phosphate buffer, pH 7.0) อัตราการไหล 2 ml/min ควบคุมด้วยระบบ linear gradient จาก 0-0.3 M NaCl ของ Buffer A ไป Buffer B (0.3 M NaCl ใน 0.03 M phosphate buffer, pH 7.0) ตาม Time program ที่แสดงดังตารางที่ 2 เก็บ fraction ที่ออกจากคอลัมน์ fraction ละ 2 ml นำทุก fraction ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm เขียนกราฟระหว่าง fraction number และค่าการดูดกลืนแสง จากรูปแบบการดูดกลืนแสงที่ได้ (elution profile) เลือก fraction ในพีคที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบรูปแบบโปรตีนและความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอสโดยวิธี SDS-PAGE และศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอสด้วยเทคนิค Activity gel staining

ตารางที่ 2 Time program การแยกบริสุทธิ์เอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอส ด้วย Cation-exchange chromatography, FPLC

Volume (ml)	STEP	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow rate (ml/min)
0.00	Isocratic flow	100	0	1.0
2.00	Zero base line	100	0	1.0
2.00	Injection	100	0	2.0
3.00	Isocratic flow	0	0	2.0
5.00	Gradient	0	100	2.0
15.00	Isocratic flow	0	100	2.0
21.00	Stop			

3.2.6.2 การแยกบริสุทธิ์เอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอสด้วยวิธี Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Column : C4 Jupiter[®] HPLC column 5 μ m:4.6x15 cm

Condition : Solv.A : 0.1%, TFA Solv.B : 60% Acetonitrile in 0.1% TFA

Gradient : 0-100% Solv.B Wave length : 280 nm

Range (AUFS) : 200 mAU Flow rate : 1 ml/min

Inject vol : 40 μ l

กรองสารละลายโปรตีนตัวอย่างด้วย filter membrane ขนาด 0.45 μ m เก็บที่อุณหภูมิ 4°C โหลดตัวอย่างโปรตีนลงใน C4-reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ใช้คอลัมน์ขนาด 250 mm x 4.6 mm Jupiter 5 μ m C4 300 Å ทำการ equilibrate ด้วย Solvent A (0.1% TFA/water) โดยมีอัตราการไหล 1.0 ml/min ควบคุมด้วยระบบ linear gradient ของ 0-100%

solvent (60% acetonitrile/0.1% solvent A) เป็นเวลา 30 นาที ตาม Time program ในตารางที่ 3 สารที่ผ่านออกจากคอลัมน์ จะถูกตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 และเก็บ fractions ในตำแหน่งที่ปรากฏ ผิดไปทำการ lyophilized และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

ตารางที่ 3 แสดง Time program การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ด้วย Reverse phase high performance liquid chromatography (C4-RP-HPLC)

Time(min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow rate
0-15	50	50	0
15-30	100	0	100
30-60	0	100	100
61	Stop		0

3.2.7 ศึกษากระบวนการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

3.2.7.1 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่อสับสเตรต

1. เตรียม RNA solution (Substrate) ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 – 200 ug RNA ในปริมาณ 40 ul ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0
2. นำสารละลายเอนไซม์ RNase solution (sample) 10 ul เติมลงใน RNA solution
3. นำไปบ่มที่ 37 °C , 60 min
4. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.75% (w/v) Sodium tungstate ใน 25 % (v/v) Perchloric ปริมาตร 200 ul แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 min ในอ่างน้ำแข็ง
5. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm , 10 min , 4 °C
6. ดูดเก็บส่วนใส 200 ul แล้วเจือจางด้วย DDW ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1 ml.
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} เพื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมาะสมของเอนไซม์ต่อสับสเตรต

3.2.7.2 ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

(Optimum pH)

1. เตรียม stock RNA solution (Substrate) โดยละลาย 150 ug RNA ใน 40 ul ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0
2. เติมสารละลายเอนไซม์ RNase solution (sample) 10 ul ลงใน 0.2 M Britton Robinson buffer (pH 4.0–11.0) 20 ul เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม RNA solution 20 ul (ความเข้มข้นสุดท้ายของ RNA ในปฏิกิริยา 50 ug/ 40 ul ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0)
3. บ่มที่ 37 °C , 60 min

4. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.75% (w/v) Sodium tungstate ใน 25 % (v/v) Perchloric ปริมาตร 200 μ l ตั้งทิ้งไว้ 30 min ในอ่างน้ำแข็ง
5. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm , 10 min , 4 °C
6. ดูดส่วนใส 200 μ l แล้วเจือจางด้วย DDW ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml.
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260}

3.2.7.3 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ ค่า pH ต่าง ๆ

(pH stability)

1. เตรียม stock RNA solution (Substrate) โดยละลาย 150 μ g RNA ใน 40 μ l ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0
2. เติมสารละลายเอนไซม์ RNase solution (sample) 10 μ l ลงใน 0.2 M Britton Robinson buffer (pH 4.0–11.0) 20 μ l เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มที่ 37 °C, 1 h. ก่อนที่จะเติมด้วยสารละลาย RNA solution 20 μ l (ความเข้มข้นสุดท้ายของ RNA ในปฏิกิริยา 50 μ g/ 40 μ l ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0)
4. บ่มที่ 37 °C, 60 min
5. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.75% (w/v) Sodium tungstate ใน 25 % (v/v) Perchloric ปริมาตร 200 μ l ตั้งทิ้งไว้ 30 min ในอ่างน้ำแข็ง
6. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm , 10 min , 4 °C
7. ดูดส่วนใส 200 μ l แล้วเจือจางด้วย DDW ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml.
8. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260}

3.2.7.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

(Optimum temperature)

1. เตรียม stock RNA solution (Substrate) โดยละลาย 150 μ g RNA ใน 40 μ l ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0
2. เติมสารละลายเอนไซม์ RNase solution (sample) 10 μ l ลงใน 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0 20 μ l เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม RNA solution 20 μ l (ความเข้มข้นสุดท้ายของ RNA ในปฏิกิริยา 50 μ g/ 40 μ l ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0)
3. บ่มที่ 30, 37, 50, 60, 70 และ 80 °C , 60 min
4. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.75% (w/v) Sodium tungstate ใน 25 % (v/v) Perchloric ปริมาตร 200 μ l ตั้งทิ้งไว้ 30 min ในอ่างน้ำแข็ง
5. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm , 10 min , 4 °C
6. ดูดส่วนใส 200 μ l แล้วเจือจางด้วย DDW ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml.
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260}

3.2.7.5 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ ค่าอุณหภูมิต่าง ๆ

(Temperature stability)

1. เตรียม stock RNA solution (Substrate) โดยละลาย 150 ug RNA ใน 40 ul ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0
2. เติมสารละลายเอนไซม์ RNase solution (sample) 10 ul ลงใน 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0 20 ul เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มที่ 30, 37, 50, 60, 70 และ 80 °C, 1 h. ก่อนที่จะเติมด้วยสารละลาย RNA solution 20 ul (ความเข้มข้นสุดท้ายของ RNA ในปฏิกิริยา 50 ug/ 40 ul ของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0)
4. บ่มที่ 37 °C, 60 min
5. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.75% (w/v) Sodium tungstate ใน 25 % (v/v) Perchloric ปริมาตร 200 ul ตั้งทิ้งไว้ 30 min ในอ่างน้ำแข็ง
6. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm , 10 min , 4 °C
7. ดูดส่วนใส 200 ul แล้วเจือจางด้วย DDW ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml.
8. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A260

3.2.7.6 ศึกษาอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

(Effects of divalent metal ions on RNase activity)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบมาทำ Pre-incubate กับสารละลายโลหะ (metal ions) ชนิดต่างๆ (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+}) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีที่อธิบายไว้แล้วด้านบน

3.2.7.7 ศึกษาความเหมาะสมของสารตั้งต้นต่อการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (Substrate specificity of RNase)

(Substrate specificity of RNase)

นำสารละลายเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นหลายชนิด เช่น poly (A), poly (C) และ poly (U) การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์จะใช้วิธีปรับปรุงของ Leimoni et al., (2003); Zimmerman และ Sandeen (1965) โดยสารตั้งต้นแต่ละชนิดจะนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 20mM HEPES/KOH, pH 6.5 ที่มี 2 mM dithiothreitol เป็นองค์ประกอบ เตรียมความเข้มข้นเป็น 50 ug/40ul ในสารละลายของสารตั้งต้น 40 ul จากนั้นทำปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายเอนไซม์ 10 ul แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.75% (w/v) Sodium tungstate ใน 25 % (v/v) Perchloric ปริมาตร 200 ul ตั้งทิ้งไว้ 30 min ในอ่างน้ำแข็ง นำปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm , 10 min , 4 °C ดูดเอาส่วนใส 200 ul แล้วเจือจางด้วย DDW ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A260 เพื่อประเมินค่า acid-soluble nucleotide ที่ได้

3.2.7.8 ศึกษาความสามารถในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง

(Antiproliferative activity of RNase)

การตรวจวัดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์จะใช้วิธีของ MTT assay โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะใช้เอ็นไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึมของ mitochondria บางอย่างเปลี่ยนสาร tetrazolium salt (MTT) ซึ่งมีสีเหลือง ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นสีม่วงของสาร formazan ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีการทำงานของเอ็นไซม์ reductase ใน mitochondria เซลล์มะเร็ง (cancer cell lines) ที่ใช้ในการศึกษาคือ HeLa, HT29 และ HCT116 ส่วน non-cancer cell line คือ Vero cells ทำการเก็บเซลล์โดยการทำ trypsinization ด้วย 0.25% trypsin เลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate ด้วยความเข้มข้นของเซลล์ 10×10^4 / 100 ul/well หลังจาก 24 ชั่วโมง เซลล์จะถูก treat ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอสความเข้มข้นต่างๆ นำเซลล์ไปบ่มต่อเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นอาหารใหม่และถูก treat ต่อด้วยสาร MTT นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นอาหารเลี้ยงจะถูกนำออกแล้วเติมแต่ละ well ด้วยสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ul นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C และวัดค่าการดูดกลืนแสง (A value) ที่ความยาวคลื่น 550 nm อัตราการอยู่รอดของเซลล์คำนวณได้จากสมการ survival rate (%) = [(control A550 – sample A550)/control A550] x 100 ทุกการทดลองทำ 2 ซ้ำและนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยของข้อมูลบวก/ลบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2.7.9 การวิเคราะห์มวลของเปปไทด์ (Peptide mass analysis)

เพื่อการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีนอะไรบางอย่างในฐานข้อมูลของโปรตีน (protein database) แถบโปรตีนไรโบนิวคลีเอสจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จะถูกตัดจากเจลของ SDS-PAGE ชิ้นส่วนของเจลที่มีโปรตีนไรโบนิวคลีเอสจะนำไปย่อยด้วย trypsin ตามวิธีการของ In gel digestion เพื่อให้ได้ tryptic peptides ผสมซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ต่อยด้วย SYNAPTTM HDMS mass spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK) ใช้โหมดการวิเคราะห์ positive nanoelectrospray ion ด้วยเครื่องวิเคราะห์มวลแบบ time-of-flight การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนจะใช้ spectrum ของ Mass ในรูปของ PMF (peptide mass fingerprinting) ไปสืบค้นความเหมือนในฐานข้อมูลของโปรตีน (protein database) โดยใช้ program online MASCOT (<http://www.matrixscience.com>)

บทที่ 4

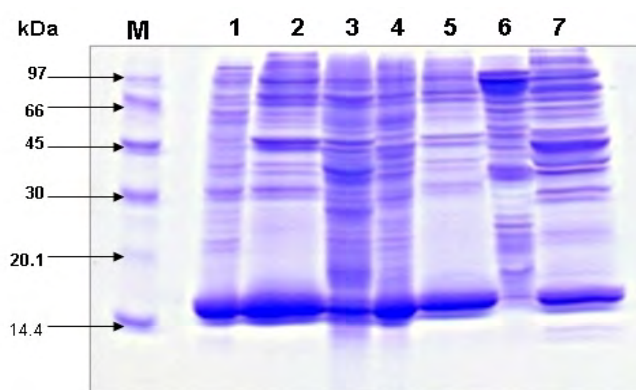
ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์- โรโบนิวคลีเอสด้วยวิธี Activity gel staining ของโปรตีนสกัดจากตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทิน บก 5 ชนิด

ตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 5 ชนิด คือ กบนา (*Rana tigerina*), อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*), กบจุก (*Rana pipaeate*), กบอ้อมบ่อ (*Rana nigrovittata*), และปาดบ้าน (*Polypedates mutus*) ที่ถูกเก็บรักษาใน freezer (-40°C) นำมาผ่าซากเพื่อเก็บอวัยวะต่างๆ จากนั้นทำการตัดแบ่งบางส่วนมาสกัดโปรตีนโดยใช้ hand homogenizer ใน extraction buffer (0.1 M Tris-HCl, pH7.0) จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบ (crude extract) มาตรวจสอบรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้โดยวิธี SDS-PAGE ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส โดยวิธี activity gel staining

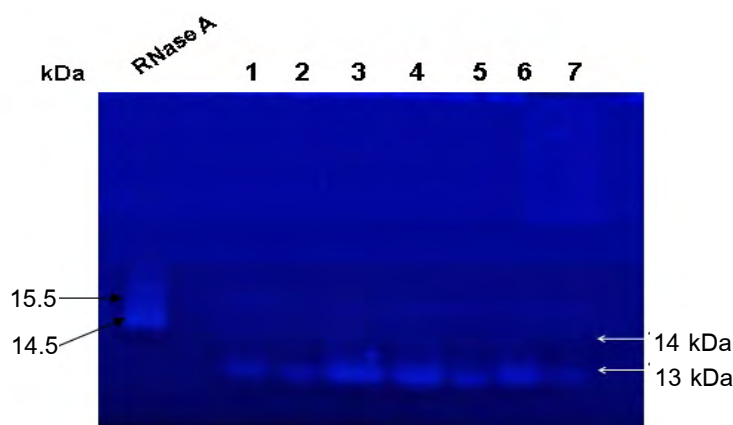
1.1 กบนา (*Rana tigerina*)

ส่วนสกัดหยาบ (crude extract) ของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ (Liver), หัวใจ (heart), กระเพาะอาหาร (stomach), ท่อนำไข่ (oviduct), ฤๅนม, คอหอย และไข่ (eggs) ของกบนาถูกนำมาตรวจสอบรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้ด้วย 15% SDS-PAGE โดยให้สารละลายโปรตีนที่โหลดมีปริมาณ 0.02 mg เท่ากัน จากนั้นย้อมดูแถบโปรตีนด้วย 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะกบนาด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250, M = Marker, 1= liver, 2 = heart, 3 = stomach, 4 = oviduct, 5 = ฤๅนม, 6 = คอหอย, 7 = eggs ปริมาณการโหลด M = 3 μl , sample = ตามปริมาณโปรตีนโดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

พบว่าแต่ละเลน (Lane) ปรากฏรูปแบบ (Pattern) การแยกของโปรตีนคล้ายกัน และจากรูปแบบโปรตีนข้างต้นแสดงว่าโปรตีนที่สกัดได้ส่วนใหญ่กระจายอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 14-100 kDa เมื่อโหลดโปรตีนในปริมาณที่เท่ากัน แถบโปรตีนที่ได้จะมีความเข้มใกล้เคียงกันและแสดงรูปแบบแตกต่างกันไปในแต่ละอวัยวะ จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบ (Crude extract) ของทุกอวัยวะไปตรวจหา กิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสโดยวิธี Activity gel staining โดยใช้ 15% gel ที่มี RNA ผสมอยู่ เพื่อดูการแสดงออกและรูปแบบของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส วิธีการดังกล่าวนี้จะใช้เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเอ (RNase A) เป็นเอนไซม์มาตรฐาน (marker) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 17



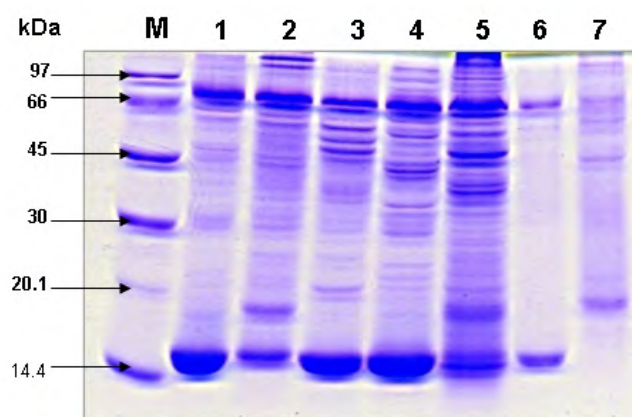
รูปที่ 17 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากตัวอย่างอวัยวะกบนา ย้อมด้วย Toluidine blue O : M = Marker, 1 = liver, 2 = heart, 3 = stomach, 4 = oviduct, 5 = ไข่, 6 = คอหอย, 7 = ไข่ ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีนโดยให้มีปริมาณโปรตีน 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

พบว่า สารสกัดหยาบจากทุกอวัยวะของกบนา มีรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่คล้ายกัน คือ ปรากฏแถบของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจำนวน 2 รูปแบบ (รูปที่ 17) อยู่ต่ำกว่าแถบเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสมาตรฐานที่ใช้ (RNase A) จากการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ค่า Relative mobility ของแถบที่ปรากฏเทียบกับตำแหน่งแถบของไรโบนิวคลีเอสมาตรฐานและโปรตีนมาตรฐาน (standard marker protein, BIO-Rad) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 kDa และ 14 kDa และยังพบว่าขนาด 13 kDa มีกิจกรรมสูงกว่า โดยดูจากความเข้มของแถบเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ปรากฏให้เห็น เพราะตัวอย่างที่โหลดจะมีปริมาณโปรตีนเท่ากันจึงสามารถบอกได้และในแต่ละอวัยวะก็มีความแตกต่างกันเล็กน้อย

1.2 อึ่งอ่าง (*Kaloula pulchra*)

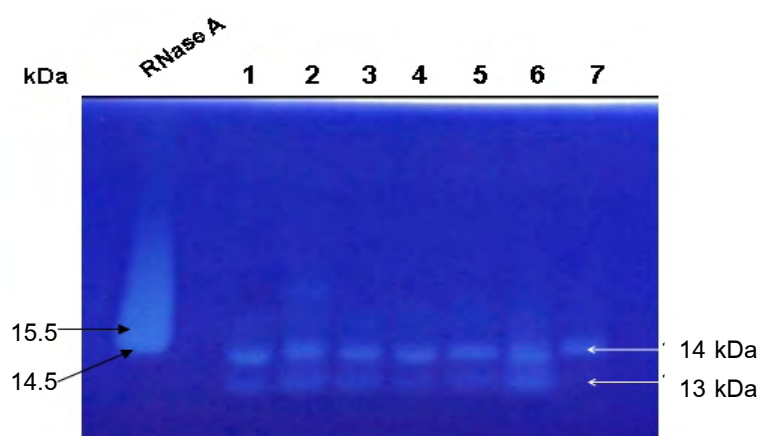
ส่วนสกัดหยาบ (crude extract) ของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ (Liver), หัวใจ (heart), กระเพาะอาหาร (stomach), ท่อนำไข่ (oviduct), ไข่, คอหอย และไข่ (eggs) ของอึ่งอ่างถูกนำมาตรวจสอบ

รูปแบบโปรตีนที่สกัดได้ด้วย 15% SDS-PAGE โดยให้สารละลายโปรตีนที่จะโหลดมีปริมาณโปรตีน 0.02 mg เท่ากัน จากนั้นย้อมดูแถบโปรตีนด้วย 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อดูผลของการสกัดและรูปแบบการแยกโปรตีน (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะของอ่างย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250: M = Marker, 1= lung, 2 = fat body, 3 = liver, 4 = heart, 5 = stomach, 6 = ไข่หลัง, 7 = eggs ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีนโดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

พบว่า รูปแบบการแยกโปรตีนมีลักษณะคล้ายกัน โปรตีนส่วนใหญ่ที่สกัดได้อยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14-100 kDa จากรูปแบบของแถบโปรตีนหลักที่ปรากฏบนเจลจะมีลักษณะคล้ายกับรูปแบบของโปรตีนที่แยกได้จากกบนา จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบ (Crude extract) ของทุกอวัยวะไปทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสโดยวิธี Activity gel staining โดยใช้ 15% gel ที่มี RNA ผสมอยู่ จากส่วนสกัดหยาบของอ่างย้อมเพื่อดูการแสดงออกและรูปแบบของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ผลการทดลองแสดงดังรูป

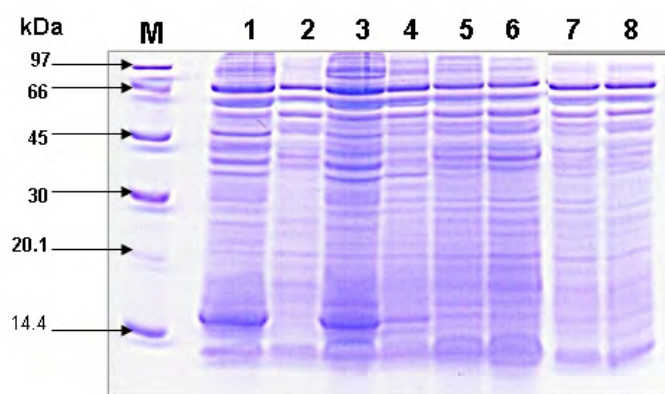


รูปที่ 19 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของ RNase อ่างย้อมด้วย Toluidine blue O M = Marker, 1= lung, 2 = fat body, 3 = liver, 4 = heart, 5 = stomach, 6 = kidney, 7 = eggs ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีนโดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

พบว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบทุกอวัยวะมีการแสดงออกของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส จำนวน 2 แถบ คือ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 และ 14 kDa ซึ่งทั้งสองแถบนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงใกล้เคียงกัน

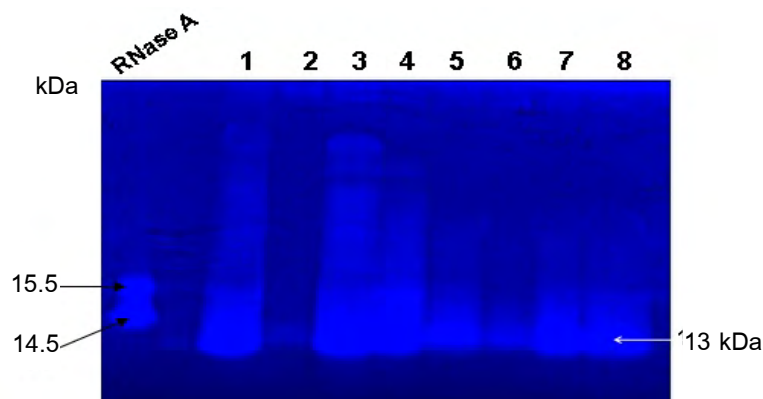
1.3 กบอึ่งป๋อ (*Rana nigrovittata*)

ส่วนสกัดหยาบ (crude extract) ของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ (Liver), หัวใจ (heart), ตับอ่อน (pancreas), ลำไส้เล็ก (small intestine), ลำไส้ใหญ่ (large intestine), ม้าม, กระเพาะ (stomach), และ fat body ของกบอึ่งป๋อถูกนำมาตรวจสอบรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้ด้วย 15% SDS-PAGE โดยให้สารละลายโปรตีนที่จะโหลดมีปริมาณโปรตีน 0.02 mg เท่ากัน จากนั้นย้อมดูแถบโปรตีนด้วย 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อดูผลของการสกัดและรูปแบบการแยกโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะกบอึ่งป๋อย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250: M = Marker, 1 = heart, 2 = small intestine, 3 = lung, 4 = pancreas, 5 = stomach, 6 = large intestine, 7 = ม้าม, 8 = liver, 9 = fat body ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีนโดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

พบว่ารูปแบบการแยกของโปรตีนมีความคล้ายกัน ซึ่งกระจายอยู่ในช่วง 14-100 kDa จากนั้นทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสโดยวิธี Activity gel staining เพื่อดูการแสดงออกของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส โดยใช้ 15% gel ที่มีส่วนผสมของ RNA ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 21

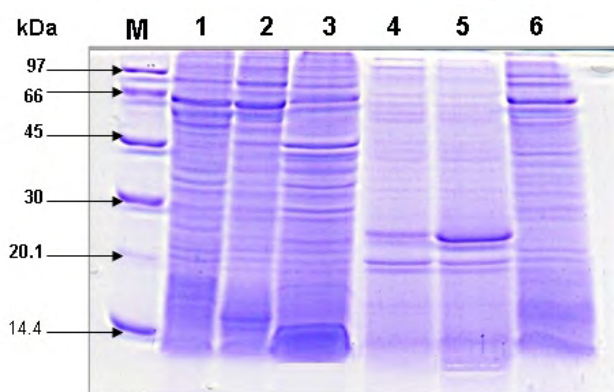


รูปที่ 21 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากตัวอย่างอวัยวะกบอ้อมบ่อด้วย Toluidine blue O: M = Marker, 1 = heart, 2 = small intestine, 3 = lung, 4 = pancreas, 5 = stomach, 6 = large intestine, 7 = ม้าม, 8 = liver, 9 = fat body ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีน โดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

พบว่ามีการแสดงออกของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น คือ อยู่ในช่องน้ำหนักโมเลกุลขนาด 13 kDa ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสปรากฏให้เห็น

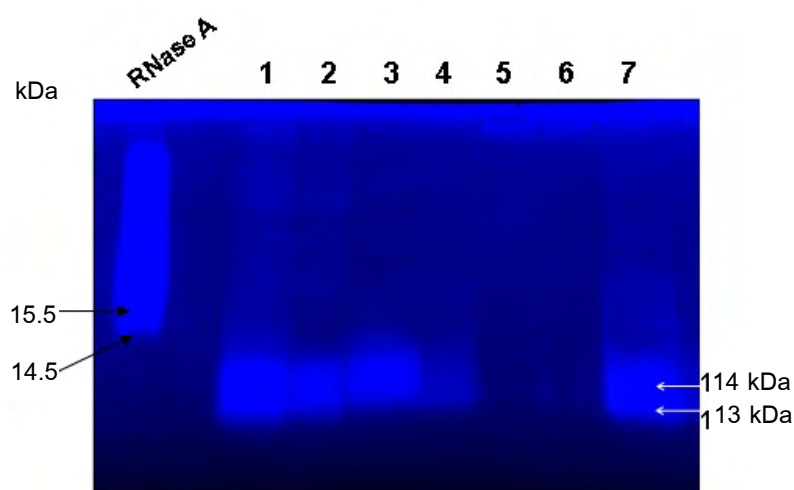
1.4 กบจุก (*Rana pipae*)

ส่วนสกัดหยาบ (crude extract) ของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ (Liver), หัวใจ (heart), ไต (kidney), กระเพาะอาหาร (stomach), ลำไส้เล็ก (small intestine), ลำไส้ใหญ่ (large intestine) และ fat body ของกบจุกถูกนำมาตรวจสอบรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้ด้วย 15% SDS-PAGE โดยให้สารละลายโปรตีนที่จะโหลดมีปริมาณโปรตีน 0.02 mg เท่ากัน จากนั้นย้อมดูแถบโปรตีนด้วย 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อดูผลของการสกัดและรูปแบบการแยกโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะกบจุกด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250: M = Marker, 1 = liver, 2 = heart, 3 = stomach, 4 = fat body, 5 = small intestine, 6 = large intestine ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีน โดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

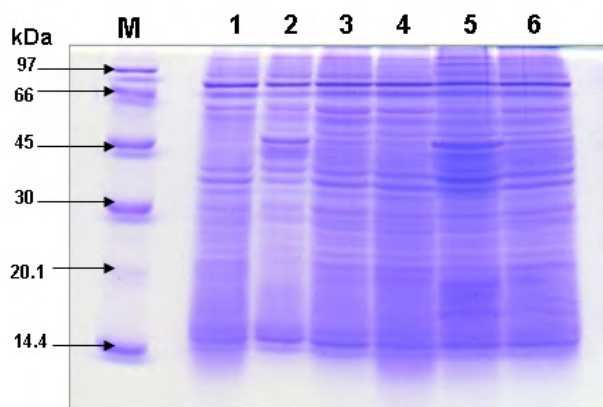
พบว่ารูปแบบการแยกโปรตีนในแต่ละเลนมีลักษณะคล้ายกัน แต่ความเข้มของแถบโปรตีนแตกต่างกัน แม้ว่าจะโหลดโปรตีนในปริมาณที่เท่ากัน และโดยภาพรวมจะเห็นว่าแถบโปรตีนส่วนใหญ่ที่สกัดได้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14-100 kDa เมื่อนำส่วนสกัดหยาบของตัวอย่างอวัยวะกบจุกมาทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสโดยวิธี Activity gel staining โดยใช้ 15% gel ที่มี RNA ผสมอยู่ เพื่อการแสดงออกและรูปแบบของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส โดยใช้ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 23 พบแถบการแสดงออกของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส 2 แถบเช่นเดียวกับอึ้งอ่าง



รูปที่ 23 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากตัวอย่างอวัยวะกบจุกย้อมด้วย Toluidine blue O: M = Marker, 1 = liver, 2 = heart, 3 = stomach, 4 = fat body, 5 = small intestine, 6 = large intestine ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีนโดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

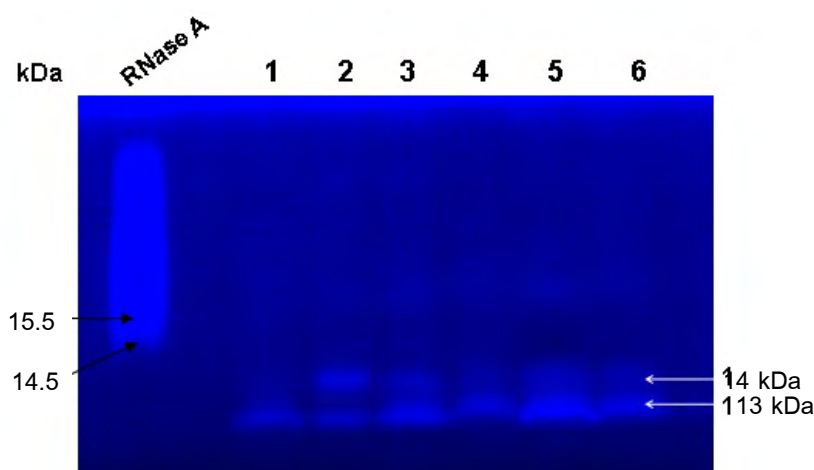
1.5 ปาดบ้าน (*Polypedates mutus*)

ส่วนสกัดหยาบ (crude extract) ของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ (Liver), หัวใจ (heart), ไต (kidney), กระเพาะอาหาร (stomach), ลำไส้เล็ก (small intestine) และลำไส้ใหญ่ (large intestine) ของกบจุกถูกนำมาตรวจสอบรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้ด้วย 15% SDS-PAGE โดยให้สารละลายโปรตีนที่จะโหลดมีปริมาณโปรตีน 0.02 mg เท่ากัน จากนั้นย้อมดูแถบโปรตีนด้วย 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อดูผลของการสกัดและรูปแบบการแยกโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 SDS-PAGE แสดงรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างอวัยวะปาดบ้านย้อมด้วย Coomassie Brilliant BlueR-250: M = Marker, 1 = small intestine 2 = heart, 3 = liver, 4 = large intestine, 5 = stomach, 6 = kidney ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีนโดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

พบว่ารูปแบบการแยกโปรตีนที่ปรากฏมีความคล้ายกัน ซึ่งโปรตีนทุกเลนจะกระจายอยู่ในช่วงประมาณ 14-100 kDa เมื่อนำมาตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสโดยวิธี Activity gel staining เพื่อดูการแสดงออกและรูปแบบของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส โดยใช้ 15% gel ที่มีส่วนผสมของ RNA ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 Activity gel staining แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสจากตัวอย่างอวัยวะปาดบ้านย้อมด้วย Toluidine blue O: M = Marker, 1 = small intestine 2 = heart, 3 = liver, 4 = large intestine, 5 = stomach, 6 = kidney ปริมาณการโหลด M = 3 μ l, sample = ตามปริมาณโปรตีนโดยให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.02 mg เท่ากันทุกอวัยวะ

พบแถบการแสดงออกของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสในตำแหน่งประมาณ 13 และ 14 kDa เหมือนกับกับจุลและความเข้มข้นในแต่ละเลนไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับแต่ละอวัยวะ

จากการศึกษารูปแบบของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 5 ชนิด ที่พบในประเทศไทย ดังผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น จะพบรูปแบบของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเด่นๆ เพียง 2 isoforms ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 และ 14 kDa ซึ่งแต่ละชนิดจะมีรูปแบบแตกต่างกันไป บางชนิดพบเพียงขนาด 13 kDa หรือ 14 kDa อย่างใดอย่างหนึ่ง และบางชนิดก็พบทั้ง 2 isoforms เช่นในอีงอ่างเป็นต้น โดยทั้ง 2 isoforms นี้มีการแสดงออกในอีงอ่างอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่นๆ ดังนั้นอีงอ่างจึงเป็นตัวแทนที่ดีของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในการศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณลักษณะด้านต่างๆของเอนไซม์กลุ่มนี้ต่อไป โดยอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการนำมาสกัดโปรตีนคือไข่ เนื่องจากเป็นส่วนที่มีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับอวัยวะหรือเนื้อเยื่ออื่นๆในกลุ่มของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

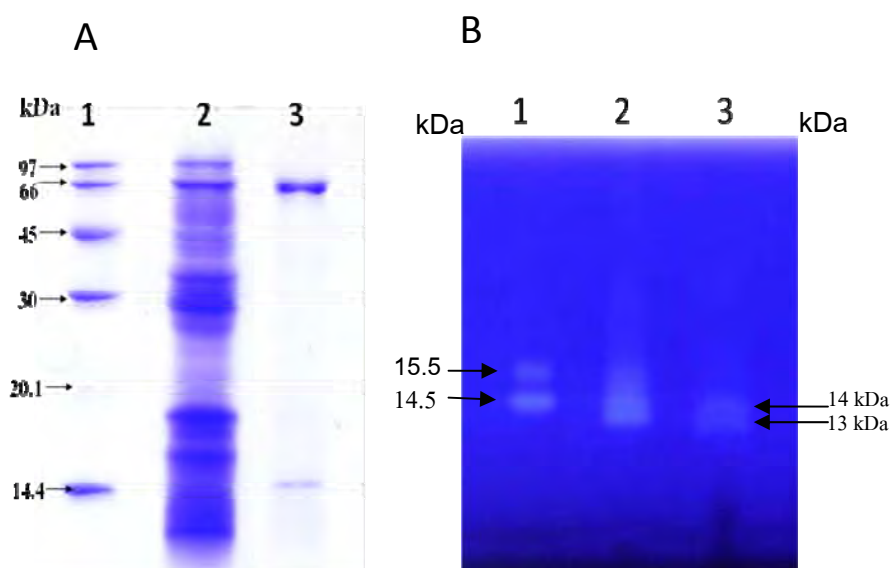
2. การสกัดโปรตีนจากไข่ของอีงอ่าง

อีงอ่างที่จะใช้ในการศึกษารังนี้มี 2 ชนิด อีงเพา (*Glyphoglossus molossus* Gunther) และอีงยาง (*Kaloula pulchra*) ที่เก็บรักษาไว้ที่ -20°C ถูกนำมาแยกเอาเฉพาะไข่เพื่อนำมาสกัดโปรตีนโดยใช้ hand homogenizer ใน 0.2 M acetic acid นำส่วนใสที่ได้ไปทำ dialysis ต่อน้ำกลั่นเพื่อกำจัดความเป็นกรด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและเก็บเฉพาะส่วนใส เรียกส่วนนี้ว่าส่วนสกัดหยาบ (crude extract) ทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford ส่วนสกัดหยาบที่ได้จะแบ่งเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้สำหรับทำการทดลองต่อไป บางส่วนจะนำไปตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE (12.5% Gel) และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส โดยวิธี Activity gel electrophoresis

3. การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ไรโบนิวคลีเอส ด้วยวิธี Activity gel staining ของ crude extracts จากไข่อีงอ่าง

ส่วนสกัดหยาบจากไข่ของอีงเพาและอีงยาง ถูกนำมาเตรียมเพื่อใช้ในการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีการในบทที่ 3

การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของรูปแบบโปรตีนด้วย 12.5% SDS-PAGE อีงเพาจะพบโปรตีนหลักกระจายอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12-20, 25-35, 60-97 kDa ส่วนในอีงยางพบเพียง 2 แถบที่ตำแหน่ง 14.4 และ 66.2 kDa การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสโดย Activity Gel staining พบทั้ง 2 isoforms ของ RNase ที่ขนาดประมาณ 13 และ 14 kDa ทั้งในอีงยางและอีงเพา และมีขนาดเล็กกว่า RNase A เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งบนเจล ผลของ SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่สกัดได้ของอีงยางมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับอีงเพา ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26 การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE (A) และการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (B) ใน Crude extract จากไข่อึ่งเพาและอึ่งยาง เลขที่ 1A คือ LMW Marker เลขที่ 1B คือ Standard RNase A , เลขที่ 2 คือ Crude extract (อึ่งเพา) และเลขที่ 3 คือ Crude extract (อึ่งยาง) โดยมีปริมาตรการโหลดคือ 4 μ l.

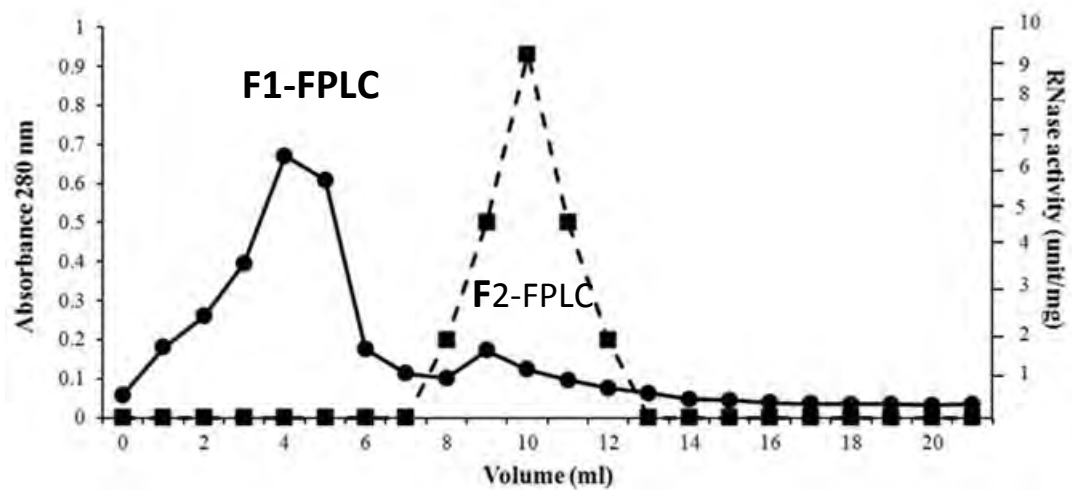
4. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากไข่อึ่งอ่าง

4.1 การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ด้วยวิธี Cation exchange chromatography (CM-sepharoseTM fast flow) FPLC

นำสารสกัดหยาบ (crude extract) ของไข่อึ่งเพา (*G. molossus*) และของไข่อึ่งยาง (*K. pulchra*) มาทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ด้วยวิธี Cation exchange chromatography (CM-sepharoseTM) FPLC โดยใช้ 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 เป็น solvent A และทำการชะคอลัมน์แบบ Linear gradient โดยใช้ 0 - 0.3 M NaCl ใน 0.03 M phosphate buffer, pH 7 เป็น solvent B ทำการเก็บ fractions ด้วยเครื่องเก็บปริมาตร 2 ml /fraction ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm รูปแบบการชะโปรตีนแสดงดังรูปที่ 27 จากนั้นนำแต่ละ fraction ของแต่ละ Peak มาเทรวมกันเพื่อนำไปทำ Dialysis โดยใช้ DDW เสร็จแล้วนำแต่ละ Fraction ไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสด้วยเทคนิค Activity staining on gel electrophoresis (รูปที่ 28)

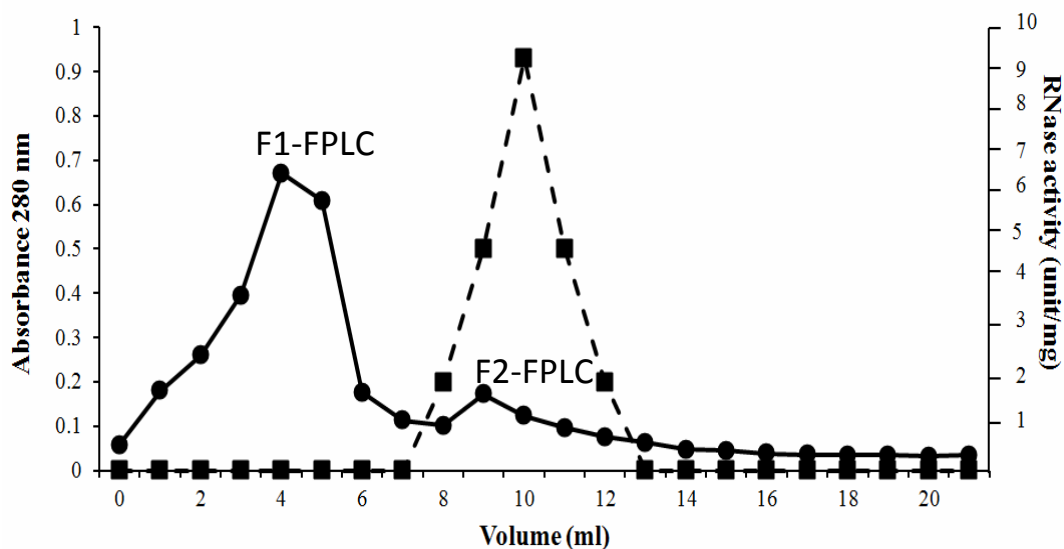
จะเห็นว่ารูปแบบการแยกของส่วนสกัดหยาบจากไข่อึ่งยางและอึ่งเพา เหมือนกัน โดยปรากฏพีคใหญ่จำนวน 2 พีค (F1-FPLC และ F2-FPLC) และจากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสโดยวิธี Activity assay ก็พบเช่นกันว่าพีคที่ 2 (F2-FPLC) ของอึ่งอ่างทั้งสองชนิดเท่านั้นที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ (รูปที่ 27) ทั้งสองพีคนี้ได้นำไปตรวจสอบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี Activity gel staining อีกครั้ง ผลแสดงดังรูปที่

A *G.molossus*



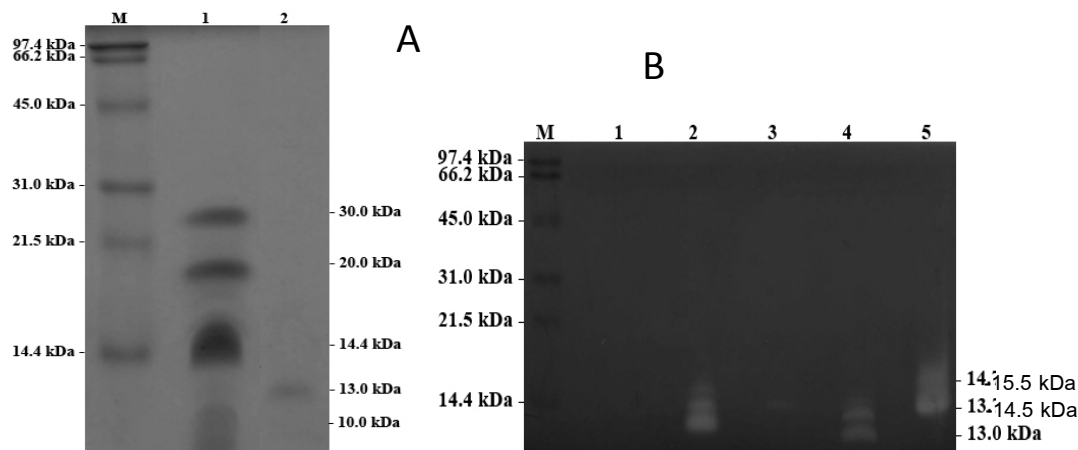
B

K.pulchra



รูปที่ 27 แสดงรูปแบบการชะโปรตีนจาก Crude extract ของอิ่งเฝ้า (27A) และอิ่งยาง (27B) ออกจากคอลัมน์ Cation exchange chromatography (CM-sepharose™ fast flow) โดยแต่ละ fraction จะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} (—●—) และกิจกรรมของเอนไซม์ (---■---)

การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ด้วยวิธี activity gel staining ของ F1-FPLC และ F2-FPLC ของอิ่งยางและอิ่งเฝ้า แสดงดังรูปที่ 28

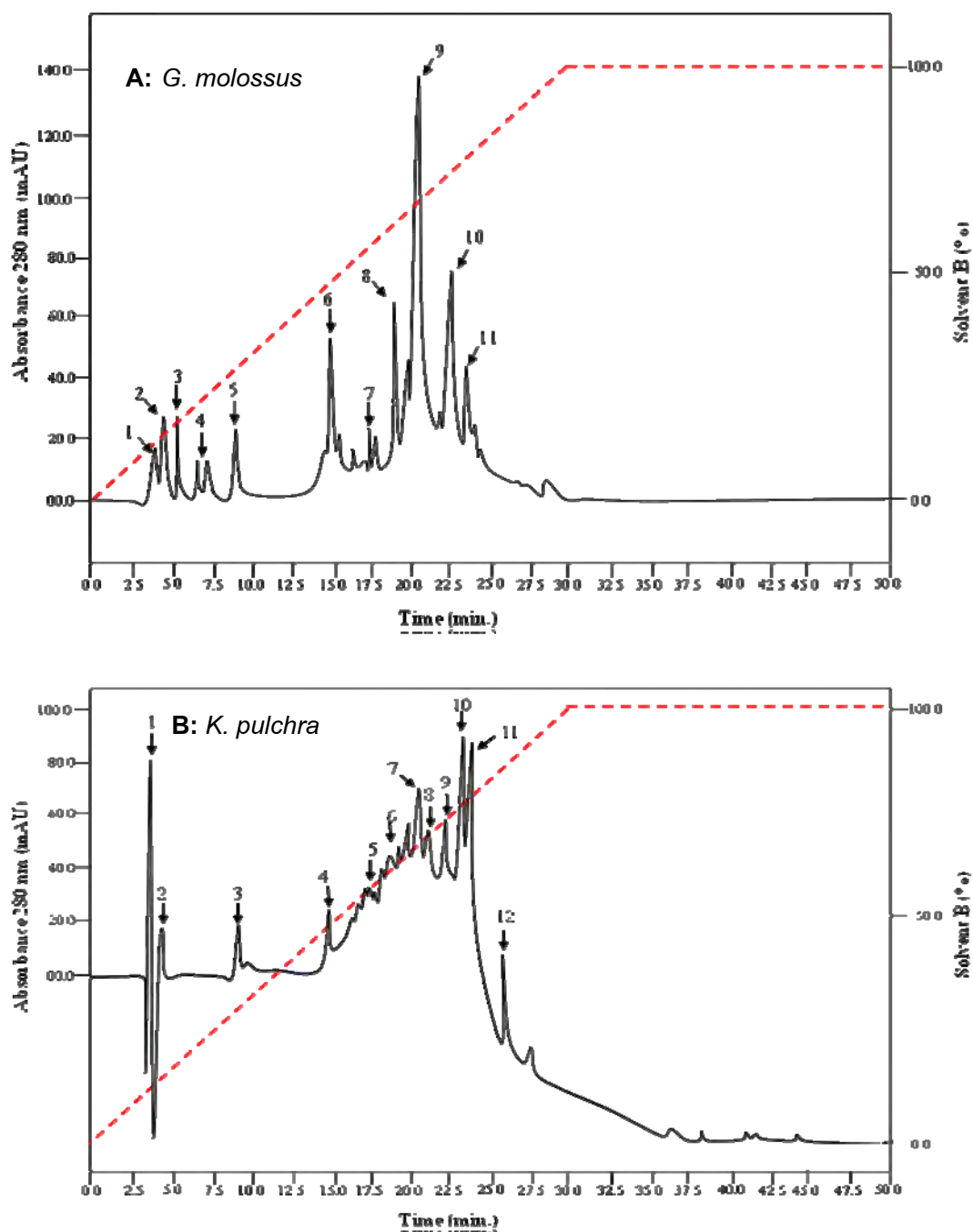


รูปที่ 28A) แสดงรูปแบบโปรตีนของ pooled fractions F2-FPLC. เตรียมเจลความเข้มข้น 12.5 % ย้อมเจลด้วย 0.1 % Coomassie brilliant blue R- 250. Lane M, standard marker; Lane 1, F2-FPLC ของ *G. molossus* และ Lane 2; F2-FPLC ของ *K. pulchra*. 28B) แสดงรูปแบบ RNase activities ของ pooled fractions จาก cation exchange FPLC. เตรียมเจลความเข้มข้น 12.5 % SDS-PAGE ย้อมด้วย 0.1 % toluidine blue O. Lane M, Standard marker; Lane 1, F1-FPLC ของ *G. molossus*; Lane 2, F2-FPLC ของ *G. molossus*; Lane 3, F1-FPLC ของ *K. pulchra*; Lane 4; F2-FPLC ของ *K. pulchra* และ Lane 5, RNase A.

จากรูปที่ 28 แสดงให้เห็นว่าการใช้วิธี Cation exchange chromatography (CM-sepharose fast flow) สามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากอึ่งย่างและอึ่งเผ่าได้บางส่วน เนื่องจากยังพบแถบโปรตีนอื่นอย่างน้อย 4 ชนิด ปรากฏมาด้วย (Lane 1 รูปที่ 28A) แต่จากการทำ activity gel พบส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉพาะ F2-FPLC ของทั้งอึ่งเผ่าและอึ่งย่างเท่านั้น แสดงว่าเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากอึ่งอ่าง มีความสามารถในการจับคอลัมน์ ชนิด cation exchange ได้ที่สภาวะในการแยกนี้ ดังนั้นเพื่อความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นส่วน F2-FPLC ของอึ่งอ่างทั้งสอง จะถูกนำไปทำบริสุทธิ์เพิ่มเติมโดยวิธี HPLC

4.2 การแยกบริสุทธิ์ไรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอึ่งอ่างโดย HPLC โดยใช้ reverse phase C4 column

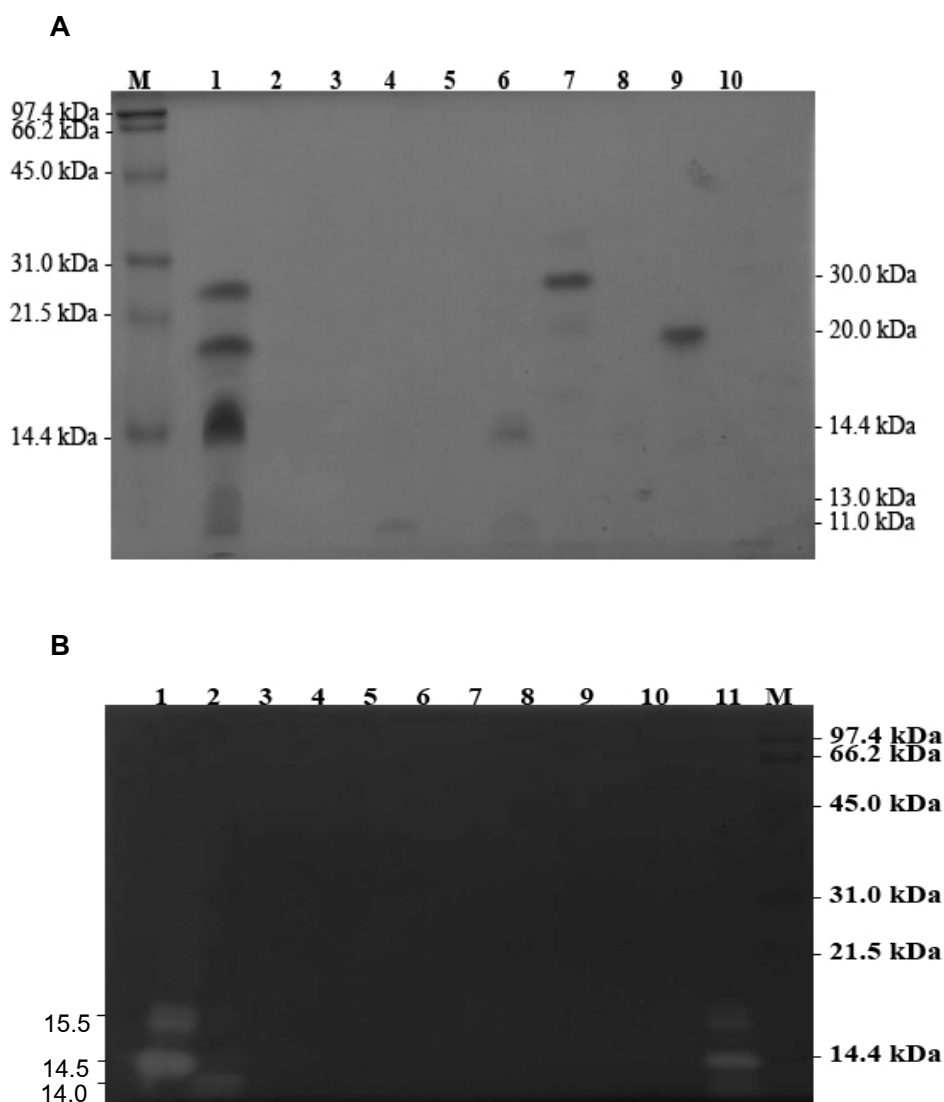
ไรโบนิวคลีเอสที่ถูกทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้วจากอึ่งย่างและอึ่งเผ่า (F2-FPLC) ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C4-RP-HPLC (Jupiter 5 um C4 300Å) ใช้ระบบ Solvent ของ TFA/Acetonitril (วิธีการในบทที่ 3) ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่ง elution profile การแยกของ F2-FPLC จากอึ่งเผ่าและอึ่งย่างแสดงดังรูป 29A และ 29B ตามลำดับ



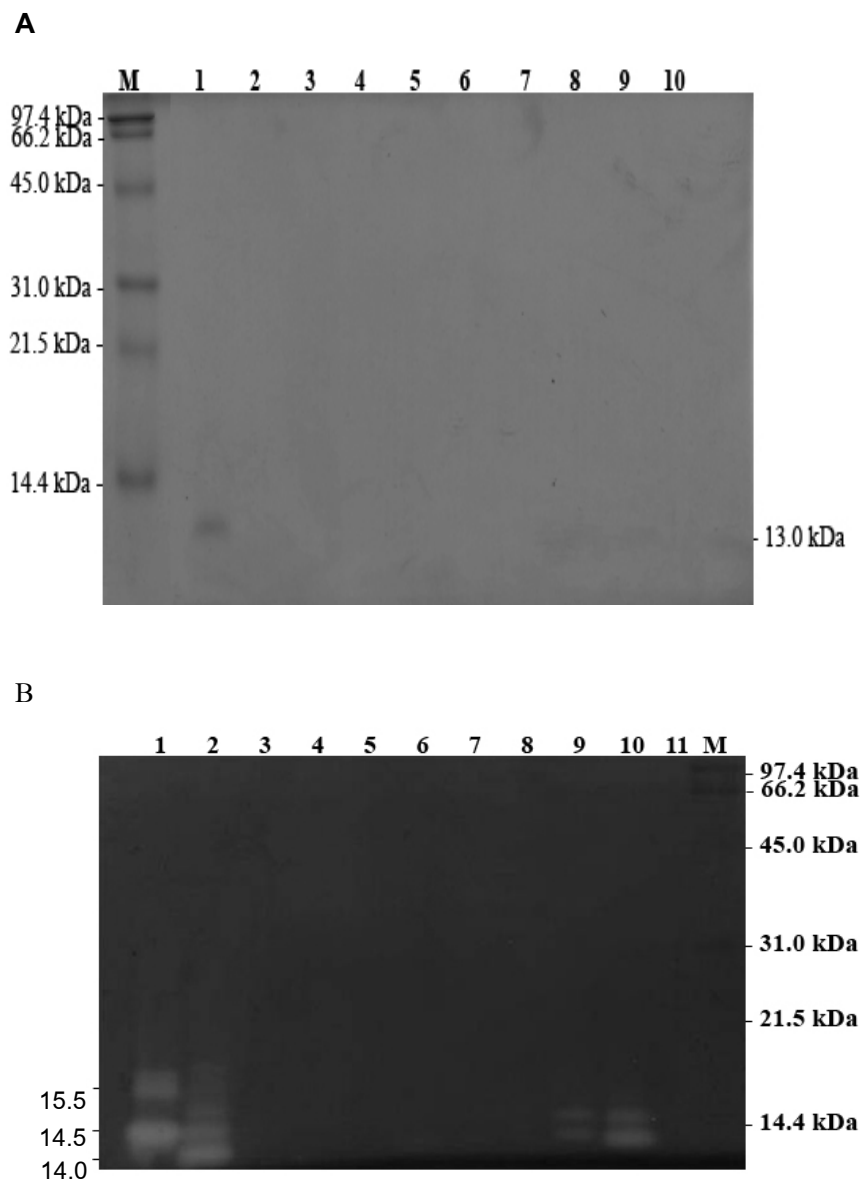
รูปที่ 29 รูปแบบการแยกของ F2-FPLC RNase จาก *G. molossus* (29A) และ *K. pulchra* ชะคอแลมน์แบบ linear gradient จาก 0 ถึง 100 % ของ solvent B (60 % Acetonitrile ใน 0.1% TFA)

จากผลการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส จาก F2-FPLC ของอึ่งเพ้า (*G.molossus*) และ อึ่งย่าง (*K. pulchra*) ด้วยเทคนิค RP-HPLC (C4) พบว่าสามารถแยกออกได้ทั้งหมด 11 และ 12 พีกตามลำดับ แต่ละพีกถูกเก็บและนำไปทำให้เข้มข้น และเมื่อนำไปตรวจสอบรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ด้วยเทคนิค Activity gel staining พบว่ามีเพียงพีกที่ 11 เท่านั้นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล

ประมาณ 13.0 kDa และ 14.0 kDa แต่ไม่สามารถตรวจพบแถบโปรตีนจากฟีดดังกล่าวนี้ได้ด้วย 12.5 % SDS-PAGE (รูปที่ 30 และ 31)



รูปที่ 30 SDS-PAGE (A) และ Activity gel staining (B) ของฟีดต่างๆ จากการแยกของ RP-HPLC ของ *G. molossus*. ใช้ 12.5 % SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย 0.1 % Coomassie brilliant blue R-250. Lane M, Standard marker; Lane 1, F2-FPLC; Lane 2, p3; Lane 3, p4; Lane 4, p5; Lane 5, p6; Lane 6, p7; Lane 7, p8; Lane 8, p9; Lane 9, p10 และ Lane 10, p11 of RP-HPLC ส่วนใน activity gel staining (B) ใช้ 12.5 % SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย 0.1 % toluidin blue O. Lane 1, RNase A; Lane 2, F2-FPLC; Lane 3, p3; Lane 4, p4; Lane 5, p5; Lane 6, p6; Lane 7, p7; Lane 8, p8; Lane 9, p9; Lane 10, p10; Lane 11, p11 of RP-HPLC และ Lane M, Standard molecular weight marker.



รูปที่ 31 SDS-PAGE (A) และ Activity gel staining (B) ของพีคต่างๆ จากการแยกของ RP-HPLC ของ *K. pulchra*. ใช้ 12.5 % SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย 0.1 % Coomassie brilliant blue R-250. Lane M, Standard marker; Lane 1, F2-FPLC; Lane 2, p4; Lane 3, p5; Lane 4, p6; Lane 5, p7; Lane 6, p8; Lane 7, p9; Lane 8, p10; Lane 9, p11 และ Lane 10, p12 of RP-HPLC ส่วนใน activity gel staining (B) ใช้ 12.5 % SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย 0.1 % toluidin blue O. Lane 1, RNase A; Lane 2, F2-FPLC; Lane 3, p4; Lane 4, p5; Lane 5, p6; Lane 6, p7; Lane 7, p8; Lane 8, p9; Lane 9, p10; Lane 10, p11; Lane 11, p12 of RP-HPLC และ Lane M, Standard molecular weight marker.

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอีงอ่างทั้ง 2 ชนิด ด้วย Caion exchange chromatography (FPLC) และ RP-HPLC (C4) พบว่าไรโบนิวคลีเอสจากไข่อีงอ่างมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 11 เท่า ส่วนอีงอ่างบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2 เท่า ปริมาณโปรตีนเอนไซม์ที่ได้มีน้อยมาก เป็น minor protein ที่พบเป็นสัดส่วนใน acid soluble proteins ทั้งหมดเพียงร้อยละ 0.01 และ 0.03 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ด้วยข้อจำกัดของปริมาณโปรตีนที่ได้ และข้อจำกัดของสัตว์ตัวอย่างที่หาไม่ได้เลยในช่วงฤดูกาลปี 2554 ดังนั้นการศึกษาคูณสมบัติด้านต่างๆของเอนไซม์ จะใช้ตัวอย่างโปรตีนเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากส่วนของ F2-FPLC ในการศึกษา

ตารางที่ 4 แสดงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากไข่อีงอ่าง

A: *G. molossus*

Purification steps	Total Vol. (ml)	Protein Conc. (mg/ml)	Total proteins (mg)	Total activity (units)	Specific activity (Units/mg)	Recovery (%)	Purification folds
Crude	100.00	8.33	832.80	6629.98	7.96	100.00	1.00
F1-FPLC	32.00	4.10	131.33	1256.18	9.57	32.00	2.04
F11-HPLC	1.00	0.09	0.09	7.55	87.35	0.08	11.02

B: *K. pulchra*

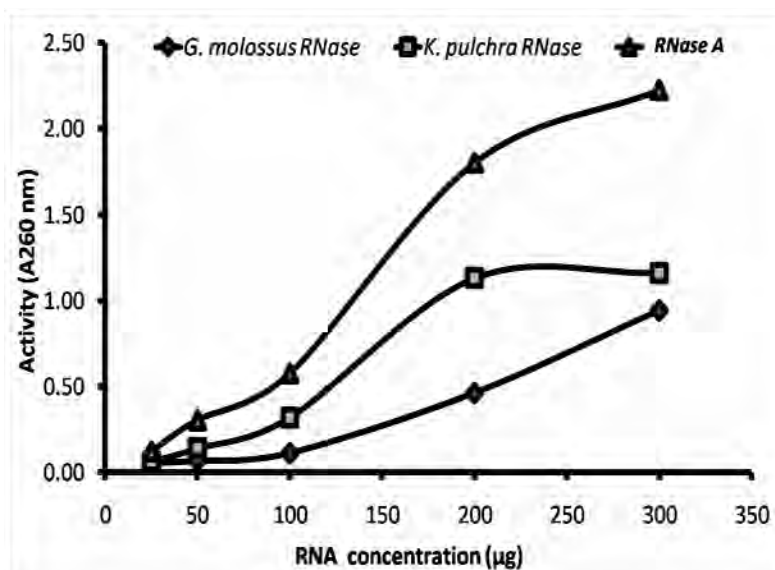
Purification steps	Total Vol. (ml)	Protein Conc. (mg/ml)	Total proteins (mg)	Total activity (units)	Specific activity (Units/mg)	Recovery (%)	Purification folds
Crude	80	2.04	163.20	3991.61	24.46	100.00	1.00
F1-FPLC	24	1.61	38.59	1207.54	31.29	31.29	1.26
F11-HPLC	1	0.04	0.04	2.20	50.96	0.06	2.07

5. การศึกษาคูณลักษณะของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอีงอ่าง

ในการศึกษาคูณลักษณะต่างๆของเอนไซม์ การศึกษาครั้งนี้จะใช้เอนไซม์ในส่วนที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน (partial purified) ด้วย cation exchange chromatography คือ ส่วน F2-FPLC ไม่สามารถใช้ส่วนที่ทำบริสุทธิ์ด้วย HPLC ได้เนื่องจากปริมาณโปรตีนมีปริมาณน้อย

5.1 การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์กับสับสเตรท

เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนเปรียบเทียบกันได้ จึงทำการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์กับสับสเตรท โดยการให้ปริมาณเอนไซม์คงที่ คือ 10 ug แล้วปรับความเข้มข้นของสับสเตรทตั้งแต่ 25-300 ug ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 32

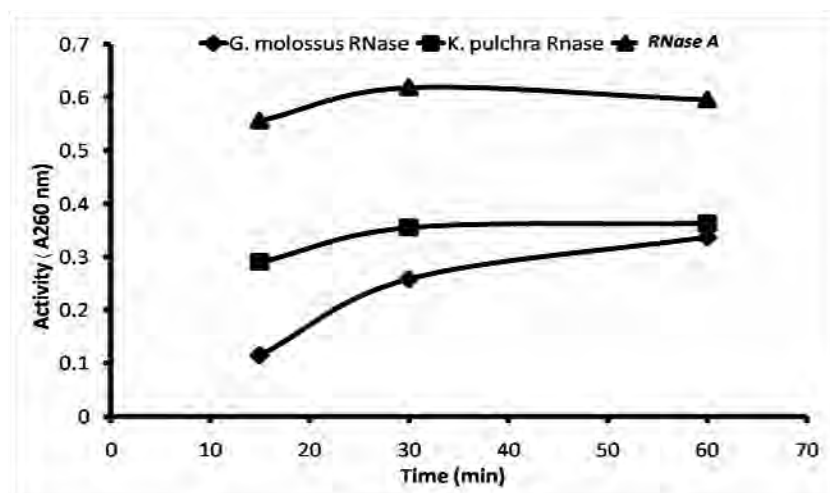


รูปที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ (Activity, A₂₆₀) กับความเข้มข้นของสับสเตรท (RNA, ug) เพื่อศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์กับสับสเตรท โดยแกน X แสดงถึงค่าความเข้มข้นของสับสเตรท และแกน Y แสดงค่าการดูดกลืนแสง 260 nm (Activity enzyme)

จากผลการทดลองที่ได้ (รูปที่ 32) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้นค่าการดูดกลืนแสง A₂₆₀ ก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกันและเริ่มจะมีค่าการดูดกลืนแสง (กิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส) ที่คงที่ความเข้มข้นของสับสเตรทตั้งแต่ 150 ug และสัดส่วนที่เหมาะสมที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ 150 ug

5.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (Effect of incubation Time)

เมื่อได้สัดส่วนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทที่เหมาะสมแล้ว ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่จะทำให้ผลของปฏิกิริยามีความชัดเจนและมีความเหมาะสมยิ่งขึ้น โดยการให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท ที่เวลาต่างกันคือ 15, 30, 60 min หยุดปฏิกิริยาด้วย 25 % Perchoric contein 0.75% Sodium tungstrate และนำไปวัดค่าการดูดกลืน 260 nm ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 33



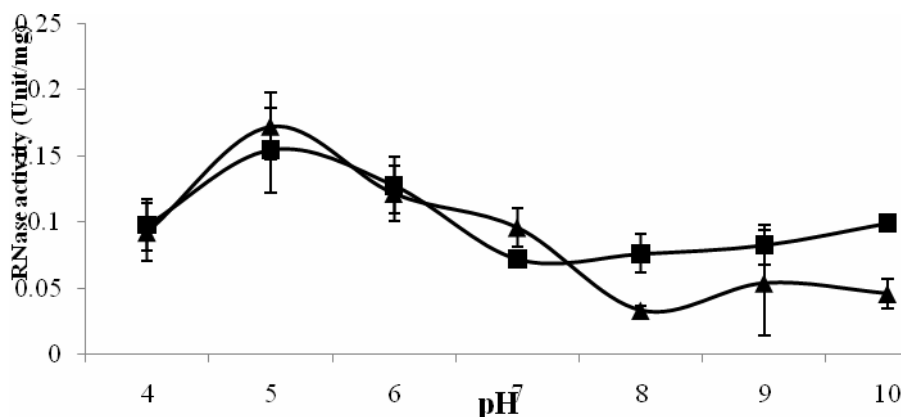
รูปที่ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ (Activity, A260) กับระยะเวลาการทำปฏิกิริยา (Time, min) เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยแกน X แสดงถึงเวลาต่างที่ใช้ในการทดลอง (min) และแกน Y แสดงค่าการดูดกลืนแสง 260 nm (Activity enzyme)

จากผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ได้ กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส หรือค่าการดูดกลืนแสง 260 nm และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา โดยจะเห็นได้ว่าที่เวลา 15 min ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์จะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นและจะเริ่มคงที่ตั้งแต่เวลา 30 min ดังนั้นจึงได้ถือว่าเวลาที่ 15 min เป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ต่อสับสเตรทในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (รูปที่ 33)

5.3 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

pH เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยจะมีเสถียรภาพหรือคงตัวและทำงานได้ดีในช่วงพีเอชหนึ่งๆ เท่านั้น เพราะการเปลี่ยนแปลงประจุบนกรดอะมิโนที่มีหมู่ข้างแตกตัวได้ (ionizable amino acid residue) จะมีผลต่อโครงรูป (conformation) และเสถียรภาพ (denature) ในที่สุด เนื่องจากพีเอชจะมีผลต่อ pK_a ของหมู่ที่แตกตัวได้ ของเอนไซม์หรือของสารตั้งต้น โดยผู้ทำการทดลองได้ศึกษาผลของพีเอชที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้สูงสุดและสถานะของพีเอชที่เอนไซม์มีความเสถียรภาพ ดังการทดลองที่ 5.3.1 และ 5.3.2 ตามลำดับ

5.3.1 Optimum pH Optimum pH หรือสภาวะของพีเอสค่าใดค่าหนึ่งที่เอนไซม์ทำงานได้ดี ซึ่งทำได้โดยการให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทเมื่ออยู่ใน pH ตั้งแต่ 4.0–10.0 เป็นเวลา 30 min แล้วหยุดปฏิกิริยาโดย 25 % Perchloric contein 0.75% Sodium tungstrate จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm

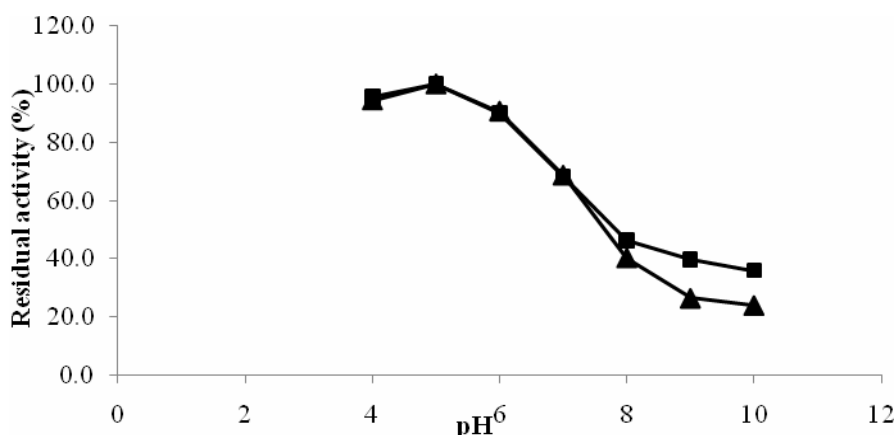


รูปที่ 34 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ค่า pH ต่างๆ โดยแกน X แสดงถึงค่า pH และแกน Y แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Unit/mg), *G. molossus* (—▲—) และ *K. pulchra* (—■—) ทุกค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย +/- ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส ที่อยู่ในสภาวะที่มีพีเอสต่างๆ พบว่า *K. pulchra* RNase และ *G. molossus* RNase มีค่า optimum pH เท่ากันอยู่ที่ pH 5.0

5.3.2 pH stability

pH stability เป็นการศึกษาความเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอสต่างๆ โดยทำการบ่มเอนไซม์ให้อยู่ในพีเอสต่างๆตั้งแต่ pH 4.0–10.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำปฏิกิริยากับสับสเตรทในสภาวะมาตรฐาน ซึ่งผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 35



รูปที่ 35 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่เหลืเมื่ออยู่ใน pH ต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยแกน X แสดงถึงค่า pH และแกน Y แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ (Unit/mg), *G. molossus* (—▲—) และ *K. pulchra* (—■—) ทุกค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

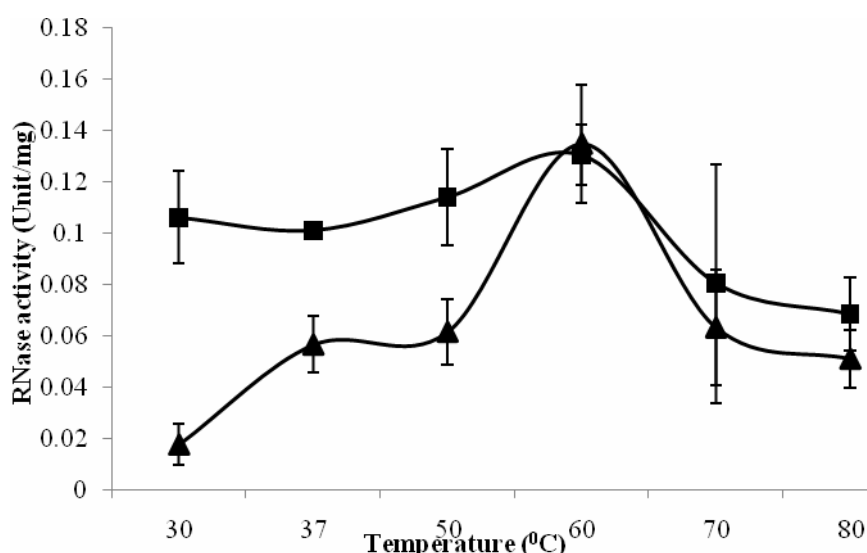
สำหรับการทดสอบความเสถียรภาพของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส จะพบว่า เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสทั้ง 2 ชนิด มีความเสถียรภาพอยู่ในช่วง pH 4.0–6.0

5.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่แล้วจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนกระทั่งถึงจุดหนึ่งที่เอนไซม์เกิดการเสียสภาพไป เมื่อถึงจุดนี้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วและมักจะย้อนกลับไม่ได้ (Irreversible) ซึ่งทั้งนี้ผู้ทำวิจัยได้ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลในการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสในด้านอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด (Optimum temperature) และอุณหภูมิที่เอนไซม์มีเสถียรภาพ (Temperature stability)

5.4.1 Optimum temperature

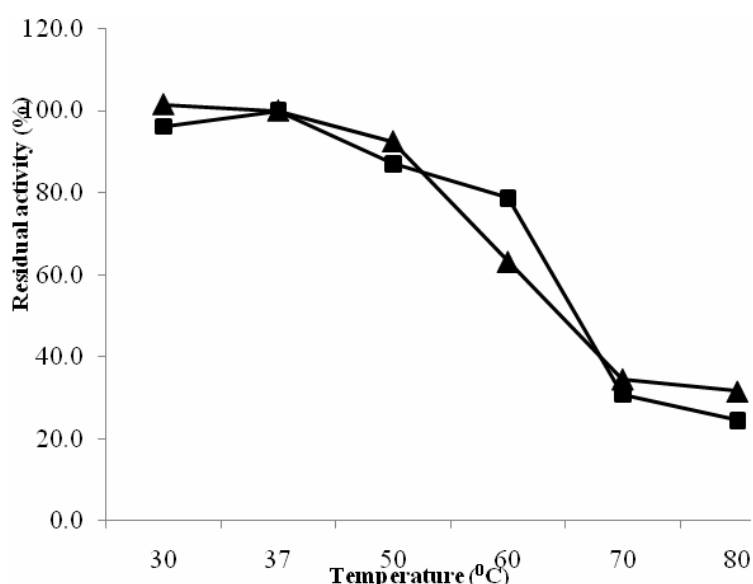
Optimum temperature หรือสภาวะของอุณหภูมิค่าใดค่าหนึ่งที่เอนไซม์ทำงานได้ดี ซึ่งทำได้โดยการให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30–80 °C เป็นเวลา 30 min แล้วหยุดปฏิกิริยาโดย 25 % Perchloric contain 0.75% Sodium tungstate จากนั้นวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 36



รูปที่ 36 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่อุณหภูมิต่างๆโดยแกน X แสดงค่าอุณหภูมิต่างๆ แกน Y แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ (Activity enzyme) และแกน Y, *G. molossus* (—■—) และ *K. pulchra* (—▲—) ทุกค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5.4.2 Temperature stability

Temperature stability เป็นการศึกษาความมีเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทในสภาวะมาตรฐาน ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 37



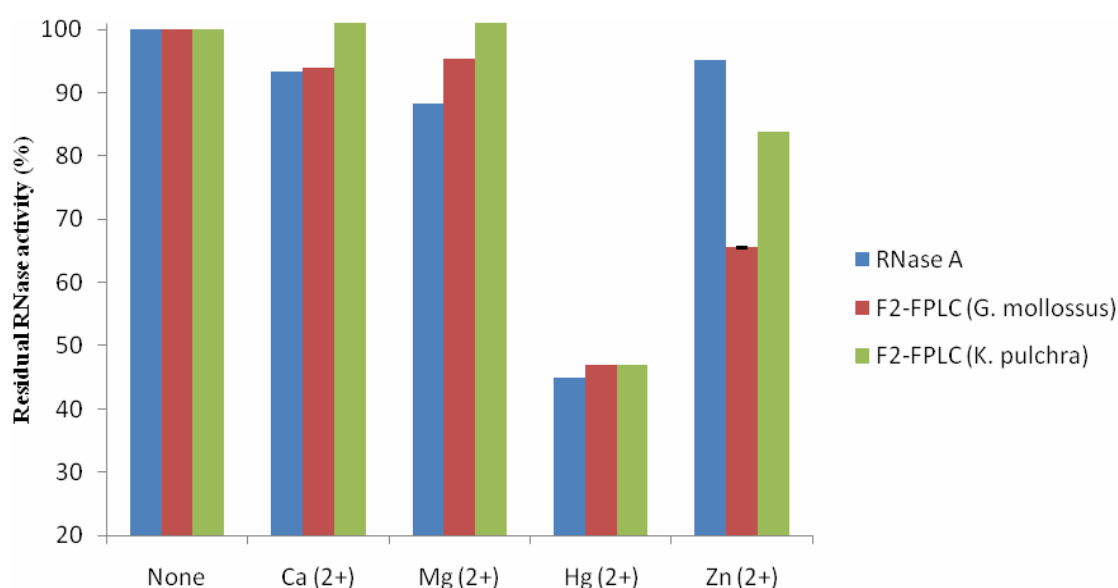
รูปที่ 37 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่เหลือเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยแกน X แสดงอุณหภูมิต่างๆที่ใช้ในการทดลอง แกน Y แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Activity enzyme) *G. molossus* (—■—) และ *K. pulchra* (—▲—) ทุกค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการศึกษาความมีเสถียรภาพของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่างๆ พบว่าเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากอิ่งอ่างทั้ง 2 ชนิด มีเสถียรภาพอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30 – 50 °C

5.5 การศึกษาผลของ Metal ion ต่อการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

เพื่อศึกษาผลของ metal ion ที่มีต่อการทำงานของ RNase activity หลังทำการแยกบริสุทธิ์ได้จาก FPLC โดยนำส่วน F2-FPLC (10 ul) ปะปนกับ metal ion (Ca (2+), Mg (2+), Hg (2+) และ Zn

(2+)) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายสับสเตรท 50 ug/40 ul ของ RNA บ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 25 % perchoric acid (250 ul) ตั้งทิ้งไว้ในกล่องน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 rpm เป็นเวลา 15 นาที ตูดส่วนใส 200 ul มาปรับปริมาตรเป็น 1 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm

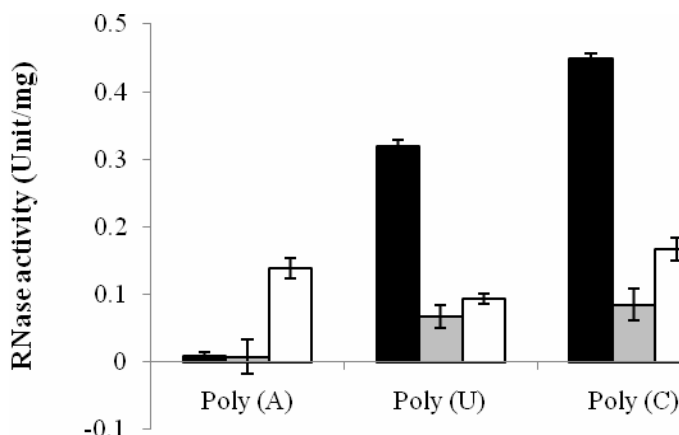


รูปที่ 38 แสดงผลของ Metal ion ต่อกิจกรรมของ RNase ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย $\pm$ STDEV จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

การตอบสนองต่อ Metal ion ของไรโบนิวคลีเอสจากไขของอึ่งอ่าง ทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะใกล้เคียงกับกลุ่ม RNase A family คือสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ด้วย Hg(2+) และเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่ไม่ต้องการ metal ion ร่วมในการทำงานของเอนไซม์ Ca(2+) และ Mg(2+) มีผลยับยั้งการทำงานของ RNase A และ RNase *G. mollossus* เพียงเล็กน้อยประมาณร้อยละ 5-10 แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมของ RNase *K. pulchra* ส่วน Zn(2+) มีผลยับยั้งกับ RNase ทั้ง 3 ชนิดแต่มีผลยับยั้งกับ RNase *G. mollossus* มากที่สุดถึงร้อยละ 30

5.6 การศึกษาสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำส่วนของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC (F11-HPLC) ของ *G. molossus* และ *K. pulchra* มาทำปฏิกิริยากับสับสเตรท 3 ชนิด poly (C), poly (U) และ poly (A) ภายใต้สภาวะมาตรฐาน แล้วตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 39

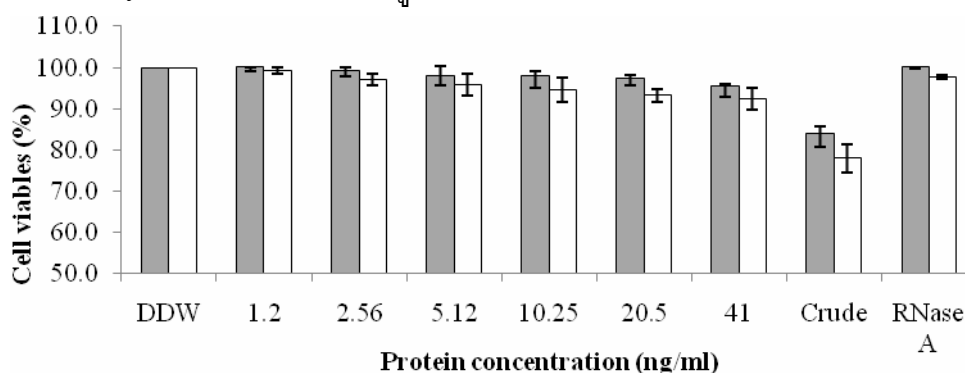


รูปที่ 39 ความจำเพาะต่อสับสเตรท ของ purified RNase; *G. molossus* (■) และ *K. pulchra* (□) เปรียบเทียบกับ RNase A (■) ข้อมูลเสนอเป็นค่าเฉลี่ย(±STDEV)

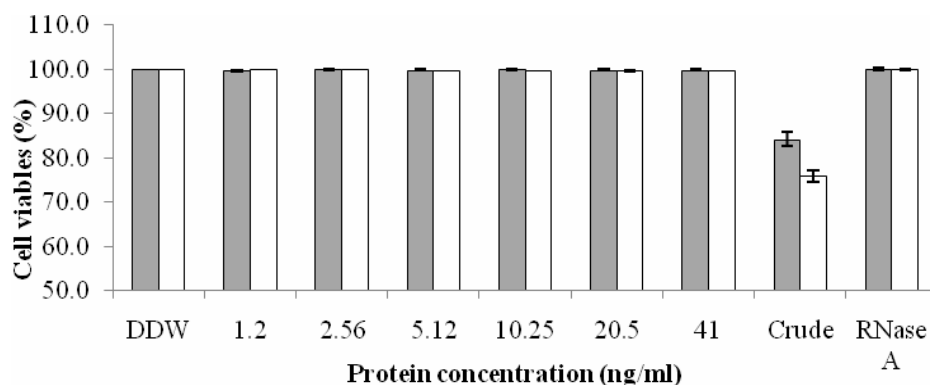
จากรูปจะพบว่า activity ของ RNase A จำเพาะกับ pyrimidine bases โดยจำเพาะกับ poly(C) มากกว่า poly (U) ส่วน RNase *K. pulchra* มีความจำเพาะกับทั้ง pyrimidine และ purine bases โดยจำเพาะกับ poly (A) เท่ากับ poly (C) และ poly (U) ลดลงตามลำดับ ส่วน RNase *G. molossus* มีความจำเพาะกับ pyrimidine bases เท่านั้นโดยจำเพาะกับ poly (U) และ poly (C) เท่ากัน

5.7 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

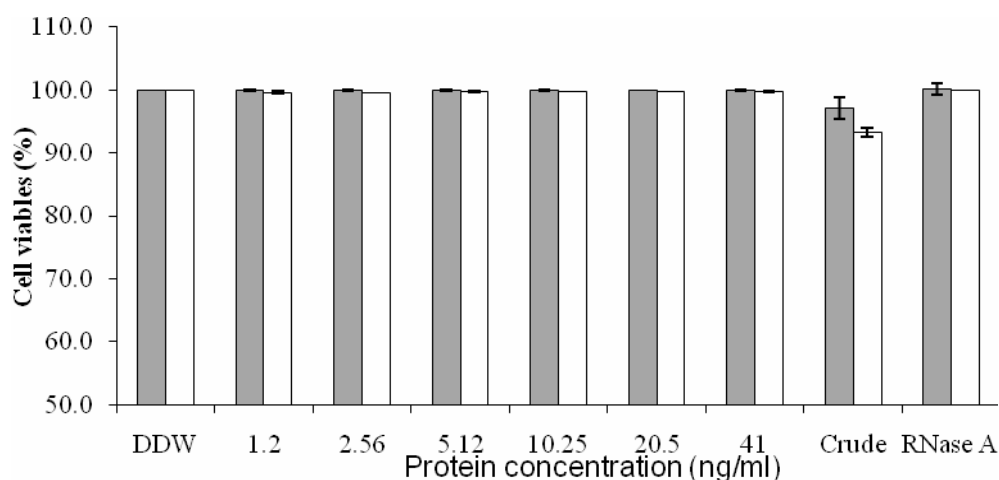
เพื่อประเมินความสามารถของ RNase จากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของไทยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง การศึกษาครั้งนี้จะทำการทดสอบความสามารถของ *G. molossus* RNase และ *K. pulchra* RNase ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ Cell lines 4 ชนิดคือ HCT116, Hela, HT29 และ Vero (non cancer cells) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ cell lines นี้จะประเมินโดยใช้ปฏิกิริยา MTT assay ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 40-43



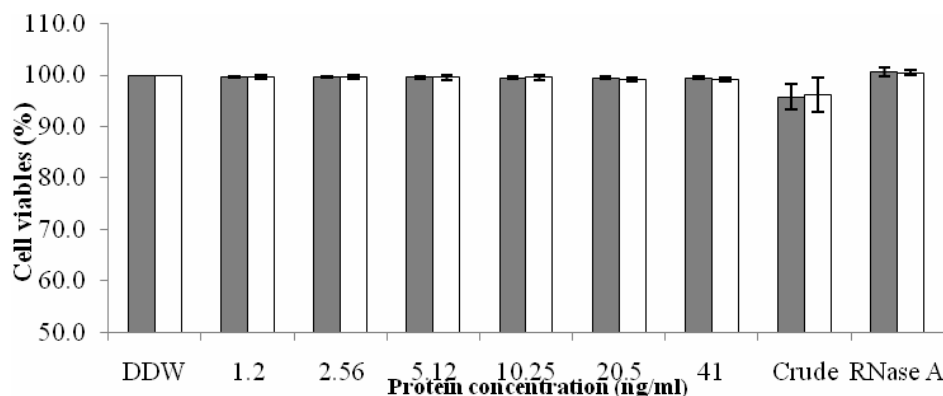
รูปที่ 40 ผลการศึกษาการต้านการเจริญของ Vero cell (non-cancer cell) โดยใช้ส่วนของ F2-FPLC ของ *G. molossus* RNase ทำการตรวจสอบด้วย MTT assay ที่เวลา 48 hrs (แท่งทึบ) และ 72 hrs (แท่งโปร่ง). ทุกข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ STDEV ใช้ DWW เป็น negative control.



รูปที่ 41 ผลการศึกษาการต้านการเจริญของ HTC116 cell โดยใช้ส่วนของ F2-FPLC ของ *G. molossus* RNase ทำการตรวจสอบด้วย MTT assay ที่เวลา 48 hrs (แท่งทึบ) และ 72 hrs (แท่งโปร่ง). ทุกข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ STDEV ใช้ DWW เป็น negative control.



รูปที่ 42 ผลการศึกษาการต้านการเจริญของ HT29-cell โดยใช้ส่วนของ F2-FPLC ของ *G. molossus* RNase ทำการตรวจสอบด้วย MTT assay ที่เวลา 48 hrs (แท่งทึบ) และ 72 hrs (แท่งโปร่ง). ทุกข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ STDEV ใช้ DWW เป็น negative control.



รูปที่ 43 ผลการศึกษาการต้านการเจริญของ Hela cell โดยใช้ส่วนของ F2-FPLC ของ *G. molossus* RNase ทำการตรวจสอบด้วย MTT assay ที่เวลา 48 hrs (แท่งทึบ) และ 72 hrs (แท่งโปร่ง). ทุกข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ STDEV ใช้ DWW เป็น negative control.

จากผลการทดสอบ แสดงให้เห็นว่า ส่วน Partial purified (F2-FPLC) (ในรูปที่ 40-43) และส่วน purified (F11-HPLC) ของ *G. molossus* (ไม่ได้แสดงผล) ไม่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ Cell lines ทั้ง 4 ยกเว้น Crude extract จะมีผลยับยั้งอยู่บ้างแต่ไม่มาก นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า Crude extract โปรตีนจาก ไข่ของ *G. molossus* มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 40) ซึ่งเซลล์ทดสอบเป็น Vero cell (non-cancer cell line) ส่วนของ *K. pulchra* นั้นพบว่าโปรตีนสกัดทุกส่วนไม่ว่าจะเป็น Crude extracted, partial purified และส่วน purified ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ Cell lines ทั้ง 4 (ไม่ได้แสดงผล)

5.8 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับปฐมภูมิบางส่วนของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอึ่งเพ้า (*G. molossus*) โดย Mass spectrophotometry

จากการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส โดยเทคนิค Activity Gel staining พบว่าในกลุ่มของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีการแสดงออกของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสเพียง 2 isoforms คือขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 และ 14 kDa ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์เหล่านั้น บางชนิดแสดงออกเพียง 13 kDa หรือ 14 kDa บางชนิดแสดงออกทั้ง 2 isoforms โดยเฉพาะกลุ่มอึ่งอ่าง ดังนั้นอึ่งอ่างจึงเป็นตัวแทนที่ดีในการที่จะใช้เป็นโมเดลในการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาระดับโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสในสัตว์กลุ่มนี้ ดังนั้นจึงทำการตัดแถบโปรตีน F2-FPLC ของ *G. molossus* จาก SDS-PAGE ที่ตำแหน่งประมาณ 13 และ 14 kDa ไปทำ In-gel digestion ย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin แล้วนำ peptides mixture ไปวิเคราะห์และหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ LC/MS

Peptide Mass Fingerprint (PMF) ของ 13 และ 14 kDa ที่ได้จากการวิเคราะห์ของ LC/MS ได้นำไปทำ PMF searching กับฐานข้อมูลของ MASSCOT (<http://matrixscience.com>) พบว่าไม่ตรง

กับ PMF ของสารหรือโมเลกุลใดเลยในฐานข้อมูลโปรตีน อย่างไรก็ตาม amino acid sequence ของ peptides บางอันของ 14 kDa ตรงกันกับโปรตีน RNase P ของ *Borrelia turicata* 91E135, *B. hermsii* DAH และ *B. duttonii* Ly ซึ่งผลการทำ PMF alignment ของ 14 kDa ของ RNase *G. molossus* แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 PMF alignment ของ 14 kDa ของ RNase *G. molossus*

Type of protein	Organism	Amino acid sequence
Ribonuclease P protein component	<i>Borrelia turicatae</i> 91E135	VDVNYCEVDTMLKNIIHVHMK
Ribonuclease P protein component	<i>Borrelia hermsii</i> DAH	DVNYHEVETILKNIVVYIMK
Ribonuclease P protein component	<i>Borrelia duttonii</i> Ly	NINYHEVKTILKNMIVYVIK

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษารูปแบบโปรตีนและการแสดงออกของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibians) 5 ชนิด ได้แก่ กบนา (*Rana rugulosa*) อึ่งอ่าง (*Kaloula pulchra*) กบจุก (*Rana pileata*) กบอ่องบ่อ (*Rana nigrovittata*) และปาดบ้าน (*Polypedates mutus*) จากรูปแบบการแยกของโปรตีนเมื่อใช้ 12.5% SDS-PAGE โดยภาพรวมพบว่าโปรตีนจะกระจายตัวอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 14-100 kDa รูปแบบโปรตีนของอวัยวะต่างๆของสัตว์แต่ละชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป อาจเนื่องจากอวัยวะที่นำมาสกัดมีโครงสร้าง องค์ประกอบ และหน้าที่ของอวัยวะนั้นๆที่ต่างกัน และเมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสของสัตว์แต่ละชนิดแล้ว พบการแสดงออกของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสในสัตว์ทดลองทั้ง 5 ชนิดนี้เพียง 2 isoform ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน คือ ขนาด 13, 14 kDa ซึ่งแตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของสัตว์เช่น ในกบนาจะพบ 2 isoform คือ ขนาด 13 และ 14 kDa แต่เมื่อเปรียบเทียบ activity ของทั้งสอง isoform จะพบว่าขนาด 13 kDa มี activity สูงกว่า อึ่งอ่างพบ 2 isoform เช่นกันคือ ขนาด 13 และ 14 kDa ซึ่งทั้งสอง isoform มี activity สูงใกล้เคียงกัน ส่วนในกบอ่องบ่อพบเพียง isoform เดียวเท่านั้นคือ ขนาด 14 kDa ส่วนในกบจุกและปาดบ้านนั้นพบ 2 isoform คือขนาด 13 และ 14 kDa มี activity สูงใกล้เคียงกัน ซึ่งความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดที่แตกต่างกันออกไป อาจเกี่ยวข้องกับ species สิ่งแวดล้อม หรือวงจรชีวิตของสัตว์แต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกันออกไป สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Pyrimidine ribonuclease ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเอ และน่าจะเป็นสมาชิกตัวหนึ่งในกลุ่มของ RNaseA superfamily และสมาชิกบางชนิดของเอนไซม์กลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการเป็น onconase จึงเป็นที่น่าสนใจว่า เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจาก amphibians อาจมีคุณสมบัติในการเป็น onconase ได้เช่นเดียวกัน จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการศึกษากการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสด้วยวิธี Cation-exchange chromatography ร่วมกับวิธี HPLC โดยคัดเลือกตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่เป็นตัวแทนกลุ่ม ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสสูง และแสดงออกทั้ง 2 isoforms ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงใกล้เคียงกัน ด้วยเงื่อนไขนี้ทำให้อึ่งอ่างถูกเลือกเป็นตัวแทนของกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่เหมาะสมของอึ่งอ่างที่มีความเหมาะสมในการนำมาสกัดโปรตีนคือไข่ เพราะเป็นส่วนที่มีมวลมากที่สุดเมื่อเทียบกับอวัยวะหรือเนื้อเยื่ออื่น แต่เนื่องจากในประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตจังหวัดขอนแก่นที่เป็นพื้นที่ในการศึกษา พบอึ่งอ่าง 2 สายพันธุ์คือ อึ่งย่าง (*K. pulchra*) และอึ่งเพ่า (*G. molossus*)

การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอึ่งอ่าง จะทำการสกัดเอนไซม์จากไข่ของอึ่งอ่าง 2 สายพันธุ์ คือ อึ่งเพ่า และ อึ่งย่าง ทำการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วย 12.5% SDS-PAGE อึ่งเพ่าจะพบโปรตีนหลักกระจายอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12-20, 25-35, 60-100 kDa การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสโดย Activity Gel staining พบทั้ง 2 isoforms ของ RNase ที่ขนาดประมาณ 13 และ 14 kDa ซึ่งอึ่งย่างพบว่ามีประมาณโปรตีนน้อยมากจน

ไม่สามารถตรวจสอบรูปแบบโปรตีนได้แต่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส Crude extract จากไข่ของอึ่งอ่างทั้ง 2 จะถูกนำมาทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Cation exchange chromatography (CM-sepharoseTM fast flow) ในระบบบัฟเฟอร์ของ 0.03M Phosphate buffer, pH 7.0 จะคอลัมน์ด้วยระบบ linear gradient 0-0.3 M NaCl ใน 0.03M Phosphate buffer, pH 7.0 ร่วมกับ HPLC โดยใช้คอลัมน์ ชนิด C4-Reverse phase ด้วยระบบ solvent ของ TFA/Acetonitrile ได้เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอึ่งอ่าง (*G. molossus* RNase) บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 11 เท่าและเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากไข่ของอึ่งอ่าง (*K. pulchra* RNase) บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า

การศึกษาคุณลักษณะต่างๆของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากอึ่งอ่างทั้ง 2 พบว่า *G. molossus* RNase และ *K. pulchra* RNase มี Activity สูงสุดเมื่ออยู่ใน pH 5.0 เอนไซม์มีเสถียรภาพเมื่ออยู่ใน pH อยู่ในช่วง pH ระหว่าง 4.0 – 6.0 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 60°C เอนไซม์มีเสถียรภาพเมื่ออยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-60 °C สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยไอออนโลหะ Mg²⁺, Hg²⁺ และ Zn²⁺ แต่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ด้วย Ca²⁺ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเอนไซม์จากไข่ของอึ่งอ่างทั้ง 2 เป็น Ca²⁺ dependent RNase การศึกษาความจำเพาะต่อ substrate พบว่า *G. molossus* มีความจำเพาะกับ poly (C) ได้ดีกว่า poly (U) ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ poly (A) ได้ ซึ่งแสดงว่า *G. molossus* RNase เป็น RNase ในกลุ่มของ pyrimidine base specific RNase ในทางกลับกัน *K. pulchra* RNase สามารถย่อยสลาย poly (A) ,poly (C) และ poly (U) ได้ในระดับใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงว่า *K. pulchra* เป็นเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสในกลุ่มของ non base specific RNase. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ Cell lines ทั้ง 4 ชนิดพบว่า ส่วน Partial purified (F2-FPLC) และส่วน purified (F11-HPLC) ของ *G. molossus* ไม่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ Cell lines ยกเว้น Crude extract จะมีผลยับยั้งอยู่บ้างแต่ไม่มาก นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า Crude extract จากไข่ของ *G. molossus* มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบกับ Vero cell (non-cancer cell line) ส่วนของ *K. pulchra* นั้นพบว่าโปรตีนสกัดทุกส่วนทั้ง Crude extracted, partial purifiedและส่วน purified ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ Cell lines เช่นเดียวกัน การศึกษาโครงสร้างบางส่วนโดย Mass spectrometer พบว่า Peptide Mass Fingerprints (PMF) ของ 13 kDa ไม่ตรงกันกับ PMF ใดๆเลยในฐานข้อมูลของ protein database แต่ลำดับกรดอะมิโนของ peptides fragment ของ 14 kDa ของ *G. molossus* มีความเหมือนกับ RNases P proteins ของ *Borrelia turicatae* 91E135, *B. hermsii* DAH และ *B. duttonii* Ly.

เอกสารอ้างอิง

- D'Alessio, G. and Riordan, J.F. (eds), Ribonucleases: Structure and Functions, Academic Press, New York, 1997.
- D'Alessio, G., Di Donato, A., Mazzearella, L., Piccoli, R., Seminal ribonuclease: the important of diversity, in: D'Alessio, G., Riordan, J.F. (Eds.), Ribonucleases: Structure and Functions, Academic Press, New York, 1997, pp. 383-423.
- Irie, M., Nitta, K., and Nonaka, T., Biochemistry of frog ribonucleases, *Cell. Mol. Life Sci.* 54(1998) 775-784.
- Kamiya, Y., Oyama, F., Oyama, R., Sakakibara, F., Nitta, K., Kawauchi, H., Takayanagi, Y., Titani, K., Amino acid sequence of a lectin from Japanese frog (*Rana japonica*) eggs, *J. Biochem. (Tokyo)* 108(1990) 139-143.
- Riordan, J. F., Structure and Function of angiogenin, in: D'Alessio, G, Riordan, J. F. (Eds.), Ribonucleases: Structure and Functions, Academic Press, New York, 1997, pp. 445-489.
- Ledoux, L. and Baltus, E., Action de la ribonuclease sur les cellules du carcinoma d'Ehrlich, *Experientia* 10 (1954) 500-501.
- Ledoux, L., Action of ribonuclease on certain ascites tumours, *Nature* 175 (1955a) 258-259.
- Ledoux, L., Action of ribonuclease on two solid tumours in vivo, *Nature* 176 (1955b) 36-37.
- Lewis, M., Hunt, L., Barker, W., Striking sequence similarity among sialic acid-binding lectin, pancreatic ribonucleases and angiogenin: Possible structural and functional relationships, *Protein Seq. Data Anal.* 2(1989) 101-105.
- Mikulski, S.M., Grossman, A.M., Carter, P.W., Shogen, K., Costanzi, J.J., Phase I human clinical trial of ONCONASE (P-30) protein administered intravenously on a weekly schedule in cancer patients with solid tumors, *Int. J. Oncol.* 3 (1993) 57-64.
- Mikulski, S.M., Chun, H.G., Mittelman, A., Panella, T., Puccio, C.A., Shogen, K., Costanzi, J.J., Relationship between response rate and median survival in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of ONCONASE® with other anticancer agents, *Int. J. Oncol.* 6(1995) 889-897.
- Raines, R.T., Ribonuclease A, *Chem. Rev.* 98(1998), 1045-1065.

- Raines, R.T., Ribonuclease A: From model system to cancer chemotherapeutic, In: Frey, P.A., Northrop, D.B. (eds), *Enzymatic Mechanisms*, IOS Press, Washington, DC, 1999, pp. 235-249
- Saxena, S.K., Gravell, M., Wu, Y.-N., Mikulski, S.M., Shogen, K., Ardelt, W. and Youle, R.J., Inhibition of HIV-1 Production and Selective Degradation of Viral RNA by an Amphibian Ribonuclease, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 20784-20788.
- Katekaew, S., Torikata, T., and Araki, T., The complete amino acid sequence of green turtle (*Chelonia mydas*) egg white ribonuclease, *Protein J.* 25(5), (2006) 316-327.
- Katekaew, S., Torikata, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., and Araki, T., Enzymatic properties of newly found green turtle egg white ribonuclease, *Protein J.* 26(2), (2007) 75-87.
- Titani, K., Takio, K., Kawada, M., Nitta, K., Sakakibara, F., Kawauchi, H., Amino acid sequence of sialic acid binding lectin from frog (*Rana catesbeiana*), *Biochemistry* 26(1987) 2194-2198.
- Youle, R.J., Wu, Y.-N., Mikulski, S.M., Shogen, K., Hamilton, S.R., Newton, D., D'Alessio, G, and Gravell, M., RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(1994) 6012-6016.
- Youle, R.J. and D'Alessio, Antitumor RNases. In: D'Alessio, Riordan, J.F (eds), *Ribonucleases: Structure and Functions*, Academic Press, New York, 1997, pp.491-514.
- ศักดิ์ดา ดาดวง . การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น (Enzyme-substrate complex formation) ใน เอกสาร คำสอน วิชา 318 305 ชีวเคมี.หน้าที่ 9 . ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

International symposium

1. Katekaew, S., Nuengnant, C., Khiawmeesuan, N., Senawong, T. 2011. Screening and purification study of ribonuclease expressed in Thai amphibians. Poster presentation in the 3rd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (3rd STGMS) The Second International Conference on Applied Science (2nd ICAS) 24-25 March 2011, Souphanouvong University, Luang Prabang, LAO People's Democratic Republic. p94.
2. Achana Sangwong, Paweena Wongphakham and Somporn Katekaew. (2012). Characterization of ribonuclease from oocytes of *Kaloula pulchra*. Oral presentation at the fourth International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (4th STGMS) to be held during 23-24th January 2012 at Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand. KKU Science Journal 2555; 40 (Supplement), p144.

ด้านวิชาการ

1. สร้างบัณฑิตในระดับปริญญาตรี จำนวน 4 คน
 - 1.1 นายชฎาวุฒิ เนืองนันทน์ (ปี 2552)
โครงการวิจัยเรื่อง : การคัดเบื่องแรกและการศึกษาแสดงออกของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสจาก
 สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด
 - 1.2 นางสาวนุชจรี เขียวมีส่วน (ปี 2553)
โครงการวิจัยเรื่อง : การศึกษาการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โรโบนิวคลีเอสจาก
 สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก
 - 1.3 นางสาวราภรณ์ หล่อเจริญชัย (ปี 2554)
โครงการวิจัยเรื่อง: การศึกษาการแสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์โรโบนิวคลีเอส
 จากไข่อิงอ่าง (อิงเพ่า)
 - 1.4 นางสาวปวีณา วงศ์ภาคคำ (ปี 2555)
โครงการวิจัยเรื่อง: ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์
 โรโบนิวคลีเอสจากไข่อิงอ่างและอิงเพ่า
2. สร้างมหาบัณฑิตระดับปริญญาโท 1 คน (ปี 2555)
โครงการวิจัยเรื่อง: การศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของเอนไซม์โรโบนิวคลีเอส จากสัตว์
 สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด ในประเทศไทย