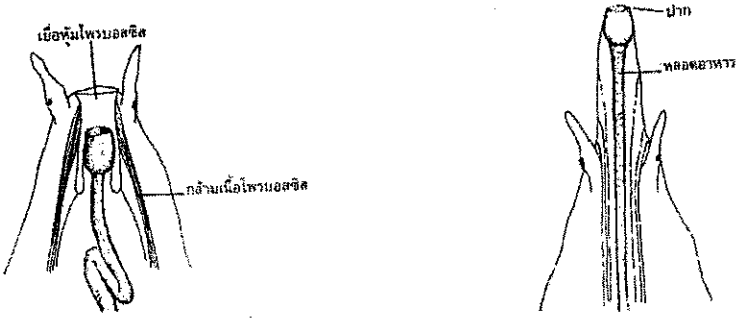
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของหอยหวาน

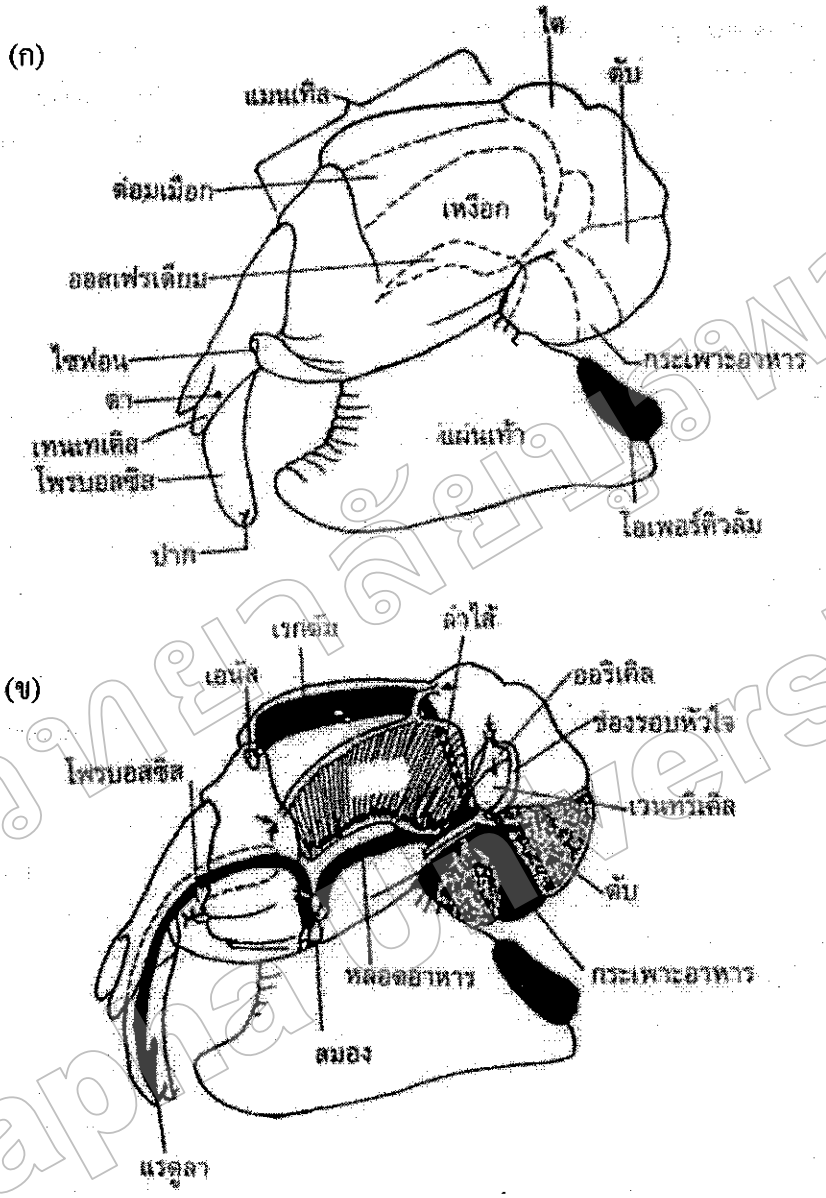
ในประเทศไทยพบหอยหวาน 2 ชนิด คือ *B. areolata* และ *B. spirata* ที่มีชื่อสามัญว่า หอยหมาก แต่ในที่นี้จะขอกล่าวถึงชนิดแรกเป็นหลัก เนื่องจากพบได้ยากกว่าในธรรมชาติและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงกว่าหอยหวานชนิดที่สอง

หอยหวานหรือ หอยตุ๊กแก หรือ หอยเทพรส มีชื่อสามัญว่า Spotted Babylon และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *B. aerolata* Link 1807 จัดอยู่ใน Class-Gastropoda Subclass-Prosobranchia Order-Neogastropoda Family-Buccinidae (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2544) อาศัยอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีพื้นเป็นทรายและทรายปนโคลนที่ระดับความลึกของน้ำประมาณ 10-20 ม. โดยพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน โดยเฉพาะแถบจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง จันทบุรี สุราษฎร์ธานี กระบี่ และสตูล (วารสารการประมง, 2543) สำหรับหอยหมากนั้นส่วนใหญ่ พบแพร่กระจายอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลของจังหวัดสตูล กระบี่ และระนอง (นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์, 2545) หอยหวานเป็นสัตว์กินเนื้อและซาก โดยมีต่อมน้ำลายสำหรับสร้างน้ำย่อยและส่งออกมาทางงวงยาวที่เรียกว่าโพรบอสซิส (Proboscis) ที่มีหลอดอาหารใช้ในการจับและกินอาหาร ช่องบัคคัล และบัคคัลแมสที่มีแรดูลาและปากอยู่ตรงส่วนปลาย โพรบอสซิสนี้บรรจุอยู่ในถุงสามารถยืดหดตัวได้โดยใช้กล้ามเนื้อ แรดูลาที่มีฟันซี่ใหญ่และแข็งแรงและมักจะมีขากรรไกร (ภาพที่ 4) เพื่อย่อยอาหารภายนอกร่างกายบางส่วนแล้วจึงดูดกินเป็นอาหารเข้าไปทำการย่อยต่อในต่อมย่อยอาหารต่อไป (ภาพที่ 5)



(ก) (ข)

ภาพที่ 4 โพรบอสซิสของหอยโพรโซแบรงเคียในระยะหดตัว (ก) และคลายตัว (ข)
(สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)



ภาพที่ 5 ลักษณะกายวิภาคของหอยน้ำเค็มโพรโซแบรงเคีย ออร์เดอร์นีโอแกสโทรโพดา *Busycon canaliculatum*

(ก) การจัดเรียงตัวของอวัยวะภายนอกและภายในมองผ่านผนังลำตัว

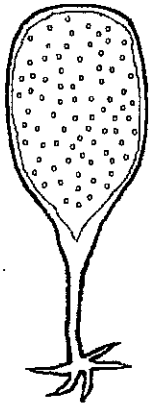
(ข) แสดงอวัยวะต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหาร ระบบลำเลียง ระบบหายใจ และระบบประสาท

(สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การผสมพันธุ์ของหอยหวานเป็นแบบภายในร่างกาย โดยไข่ที่ได้รับการผสมในท่อนำไข่จะถูกหุ้มด้วยปลอกก่อนถูกปล่อยออกสู่ภายนอกร่างกาย ในหอยเพศเมียจะมีต่อมที่บริเวณเท้า (Pedal Gland) ทำหน้าที่ผลิตเมือกสำหรับใช้ยึดไข่ติดกับวัสดุ (ภาพที่ 6) (ธานินทร สิงหะไกรวรรณ, 2539) ได้ทำการศึกษาฤดูกาลวางไข่, ความดกของฝักไข่, การพัฒนาของตัวอ่อน, อัตราการลงพื้น, อัตราการเจริญเติบโต, อัตราการรอดตาย และอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในหอยหวาน *B. aerolata* โดยนำพ่อ-แม่พันธุ์ที่ได้จากธรรมชาติมาทำการเพาะเลี้ยง ในบ่อซีเมนต์ ที่ความเค็ม 27.2-32.7 ppt. อุณหภูมิ 24.5-31.8 องศาเซลเซียส พบว่าแม่พันธุ์หอยหวานสามารถวางไข่ได้ตลอดปีแต่จำนวนวันที่วางไข่จะแตกต่างกันในแต่ละเดือน โดยเดือนที่มีจำนวนวันที่วางไข่สูงสุด คือ เดือนกรกฎาคม (19 วัน) เดือนที่มีจำนวนวันที่วางไข่น้อยที่สุด คือ เดือนมีนาคม 2535 (1 วัน) มีจำนวนฝักไข่ที่รวบรวมได้ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2535-มิถุนายน 2356 อยู่ระหว่าง 200-2,525 ฝัก และได้จำนวนไข่ในฝักระหว่าง 195-893 ฟอง โดยมีขนาดเฉลี่ย 0.263 มม.

อัตราการฟักไข่และช่วงเวลาในการฟักไข่พบว่าตัวอ่อนจะเริ่มฟักออกจากไข่ในวันที่ 5 และฟักเสร็จสิ้นในวันที่ 6 หลังจากการวางไข่ทั้งหมด และมีอัตราการฟักเฉลี่ย 95.1% เมื่อตัวอ่อนของหอยหวานฟักออกมาจากฝักไข่แล้วจะอยู่ในระยะว่ายน้ำ (Veliger) และกินอาหารพวกแพลงค์ตอนที่ล่องลอยอยู่ในน้ำโดยการกรอง จนกระทั่งวันที่ 10 หลังการฟัก ตัวอ่อนบางตัวจะเริ่มลงสู่พื้นและมีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัย จนกระทั่งวันที่ 24 หลังการฟักออกจากไข่ ลูกหอยจึงลงสู่พื้นทั้งหมด อย่างไรก็ตามจำนวนลูกหอยที่ลงสู่พื้นได้จะมีเพียง 0.41-3.30% เท่านั้น (ขึ้นอยู่กับสภาวะและความหนาแน่นของระบบการเลี้ยงลูกหอย) เมื่อลูกหอยลงสู่พื้นแล้วจะมีอัตราการรอดตายจนกระทั่งมีขนาดประมาณ 1 ซม. เฉลี่ย 10.7% และจะเริ่มเปลี่ยนพฤติกรรมในการกินอาหารมาเป็นกินเนื้อและซากสัตว์



ภาพที่ 6 ฝักไข่ของหอยหวาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การประมงหอยหวานในประเทศไทยจะทำด้วยการใช้เครื่องมือประเภทลอบดัก (นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์, 2545) ลอบหอยหวานจะใช้เหยื่อเป็นปลา, ปู ที่ตายแล้ว หรือตองเกลือ เพื่อให้มีกลิ่นดึงดูดหอยหวานให้เข้ามากินเหยื่อในลอบ ลอบหอยหวานมีรูปร่างและวิธีการใช้ที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่ เช่น ลอบที่ใช้บริเวณตำบลบ้านเพ จังหวัดระยอง เป็นลอบทรงสี่เหลี่ยมมีช่องทางเข้า 2 ทาง ตัวลอบ บุด้วยตาข่ายโพลิเอทิลีนขนาดตาห่าง 2.5 ซม. สำหรับลอบหอยหวานที่ใช้ในบริเวณบ้านเก่า จังหวัดเพชรบุรี จะเป็นลอบทรงสี่เหลี่ยมเช่นกัน แต่ช่องทางเข้า 4 ทาง นอกจากนี้การประมงหอยหวานยังสามารถใช้ลอบปูม้าแบบพับได้ โดยหอยหวานที่จับได้จะมีขนาดความยาวเปลือกและน้ำหนักเฉลี่ย 69.0 มม. และ 46.7 กรัมต่อตัว ตามลำดับ การจับหอยหวานด้วยลอบนี้จะมีปริมาณในการจับต่ำและมีความแปรผันในแต่ละลอบและแต่ละวันสูงมาก โดยมีปริมาณการจับเฉลี่ย 3.6 กก.ต่อลอบต่อเที่ยวต่อลำ (3-7 กก. ต่อเที่ยวต่อลำ) โดยเรือหนึ่งลำสามารถบรรทุกลอบได้ประมาณ 50-70 ใบ ปัจจุบันการประมงหอยหวานถือเป็นอาชีพเสริม เพราะปริมาณการจับหอยหวานได้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน

แม้หอยหวานจะเป็นสัตว์น้ำที่มีศักยภาพในการผลิตเป็นสัตว์เศรษฐกิจได้สูง แต่ในแง่ความสามารถในการย่อยและดูดซึมสารอาหารนั้นยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาแต่อย่างใด โดยเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปแล้วว่า หอยหวานนั้นเป็นสัตว์กินเนื้อและซากเป็นอาหาร ดังนั้นผู้ศึกษาจึงคาดว่าระบบเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยอาหารของหอยหวานจึงน่าจะเป็นเอนไซม์โปรติเอสโดยเฉพาะประเภทซีรีนโปรติเอส ซึ่งเป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสารอาหารประเภทโปรตีนในสัตว์น้ำโดยทั่วไป

กระบวนการสลายกรดอะมิโนในหอย

สัตว์จำพวกมอลัสก์สามารถแบ่งตามชนิดของอาหารที่กินได้หลายชนิด ตั้งแต่ กินพืชเป็นอาหาร กินซากเป็นอาหาร กินเนื้อเป็นอาหาร และเป็นปรสิตในสิ่งมีชีวิตอื่น โดยส่วนมากจะมีความต้องการกรดอะมิโนจำเป็นพื้นฐาน 10 ชนิด ได้แก่ อาร์จินีน (Argineine-Arg), ฮิสทิดีน (Histidine-His), ไลซีน (Lysine-Lys), ทริโอนีน (Threonine-Thr), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine-Phe), ทริปโตเฟน (Tryptophan-Trp), เมทไธโอนีน (Methionine-Met), วาลีน (Valine-Val), ลิวซีน (Leucine-Leu) และไอโซลิวซีน (Isoeucine-Ile) แต่มีบางชนิดที่มีความต้องการกรดอะมิโนชนิดอื่นได้แก่ ซิสเทอีน (Cysteine-Cys), เซอรีน (Serine-Ser), ไกลซีน (Glycine-Gly) และโพรลีน (Proline-Pro) หอยส่วนมากสามารถสลายกรดอะมิโนเหล่านี้ได้ แต่ก็มีบางชนิดที่มีข้อจำกัดในการเปลี่ยนรูปและการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (Biosynthesis) รูปแบบการศึกษากระบวนการเมทาบอลิซึมของกรดอะมิโนทั้งหมด ในสัตว์จำพวกมอลัสก์สามารถแสดงเป็นภาพรวมได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รูปแบบการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโนในสัตว์จำพวกมอลัสก์ (Hochachka, 1983)

กระบวนการทางชีวภาพ	เอนไซม์หรือกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง
1. Ammonia Formation and Fixation	1. L-Amino Acid Oxidase
	2. D-amino Acid Oxidase
	3. Glutamate Dehydrogenase
	4. Alanine Dehydrogenase
	5. Glutamate Synthetase and Glutaminase
	6. L-Serine Dehydrase
2. Transamination	1. Alanine Aminotransferase and Aspatate Aminotransferase
	2. Ornithine Aminotransferase
	3. Tyrosine Aminotransferase
3. Biosynthesis and Catabolism	1. Alanine and Iminodipropionic Acid
	2. Glutamine
	3. Asparagine
	4. Arginine and Urea Biosynthesis
	5. Arginine and Urea Catabolism
	6. Ornithine, Proline and Glutamate
	7. Serine, Glycine and Treonine
	8. Sulfur Amino Acids: Taurine and Methylated Amines
	9. Histidine
	10. Aromatic Amino Acid Decarboxylation, Hydroxylase, Amine Oxidase and Metabolism of Aromatic Amino Acid in Neural Tissue
	11. Aromatic Amino Acid in Non-Neural Tissue
	12. Purine Metabolism
	13. Pyrimidine Metabolism

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 (ต่อ)

กระบวนการทางชีวภาพ	เอนไซม์หรือกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง
4. Nitrogen loss and Excretion	1. Bivalve and Cepharopods
	2. Prosobranch Gastropod
	3. Pulmonate Gastropod
	- Terrestrial Pulmonate Snail,
	- Slug
	- Fresh Water Pulmonate

เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์ คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตโดยสามารถทำให้อัตราเร็วของการเกิด ปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นได้ 10^{8}-10^{20} เท่าของปฏิกิริยาเดิมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (พัชรา วีระกะลัส, 2541) สารที่เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาเรียกว่าสับสเตรท (Substrate) และส่วนมากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทชนิดใดชนิดหนึ่ง

เอนไซม์เป็นสารประเภทโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม (Globular Protein) มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 12,000 ถึงมากกว่าหนึ่งล้านดัลตัน (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2534) ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ มารวมกันเป็นรูปร่างที่แน่นอน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ เอนไซม์จะถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และสูญเสียสภาพ (Denature)ได้หากได้รับ ความร้อน กรดแก่ ด่างแก่ หรือตัวทำละลายอินทรีย์ (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537 ก)

เอนไซม์สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะของสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) คือ

1. เอนไซม์โอลิโกเมอริค (Oligomeric Enzyme) คือ เอนไซม์ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ตั้งแต่ 2 สายขึ้นไป มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 35,000 ขึ้นไป จากการศึกษาพบว่ามีเอนไซม์จำนวนมากที่เป็น เอนไซม์โอลิโกเมอริค เช่น เอนไซม์ทุกชนิดในวิถีไกลโคไลซิส

2. เอนไซม์โมโนเมอริค (Monomeric Enzyme) คือ เอนไซม์ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวจึงเป็นหน่วยย่อยที่สุดของเอนไซม์ แม้ว่าจะมีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่มากนักแต่พบว่าทุกชนิดจะเร่งปฏิกิริยา Hydrolysis โดยทั่วไปจะมี 100-300 กรดอะมิโน และมีมวลโมเลกุล13,000-35,000 ดัลตัน

พบว่าเอนไซม์โมโนเมอริคจำนวนหนึ่งเป็นพวกเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งจะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเปปไทด์ของโปรตีนชนิดอื่น ในสิ่งมีชีวิตนั้นเอนไซม์โปรติเอสจะถูกผลิตให้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อยู่ในภาพที่ไม่ทำปฏิกิริยา เพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อเซลล์ เรียกว่าโปรเอนไซม์ (Proenzyme) หรือไซโมเจน (Zymogen) ซึ่งต้องมีการทำให้อยู่ในรูปที่จะทำปฏิกิริยาได้ก่อนจึงจะสามารถทำงานได้ เอนไซม์เหล่านี้อาจเรียกได้เป็นซีรีนโปรติเอส (Serine Protease) เนื่องจากต้องมีปลายหมู่ Serine ที่เป็นบริเวณที่จับกับสับสเตรทซีรีนโปรติเอส ประกอบด้วย ทริปซิน (Trypsin), ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) และ อิลาสเทส (Elastase) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีโครงสร้างพื้นฐานที่มีลักษณะคล้ายกันแต่ปลายที่ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างมีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกัน ช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานคือ 7-9 ทั้งหมดเป็นEndopeptidase ทำหน้าที่ ย่อยสลายพันธะด้วยน้ำ (Hydrolyse) ในส่วนกลางของสายโพลีเปบไทด์

เอนไซม์โปรติเอส (Protease)

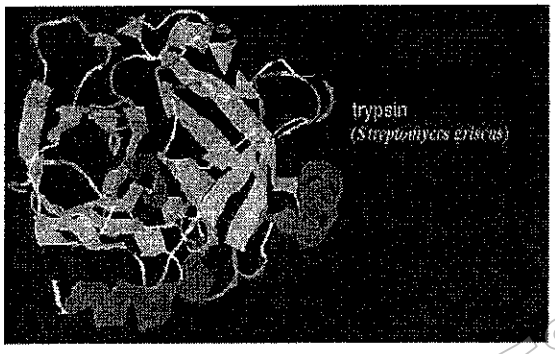
เนื่องจากหอยหวานเป็นสัตว์ที่กินเนื้อและซากเป็นอาหารดังนั้นจึงคาดว่าระบบเอนไซม์ที่ใช้น่าจะอยู่ในกลุ่มโปรติเอสเป็นหลัก ส่วนกลุ่มที่รองลงมาจึงเป็นไลเปส (Lipase)

โปรติเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ Peptide Hydrolase, Peptidase, Proteinase, Protease และ Proteolytic Enzyme ทำปฏิกิริยาโดยสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ (พัชรา วีระกลัส, 2541) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในระบบย่อยอาหารของสิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่ในการย่อยสารอาหารประเภทโปรตีน (Trevor Palmer, 1991) เช่น

- ทริปซิน (Trypsin) เป็นโมโนเมอริคเอนไซม์ที่แท้จริง โดยมีหมู่อะมิโนที่ส่วนปลายด้าน *N* ของทริปซิโนเจน (Trypsinogen) ซึ่งเมื่อกำจัดออกที่ลำไส้เล็กจะทำให้เอนไซม์ อยู่ในรูปที่สามารถทำปฏิกริยาได้และมีความจำเพาะในการแยกพันธะที่อยู่ใกล้กับส่วนปลายของกรดอะมิโนที่มี Side Chain อย่างง่าย เช่น ไลซีน หรืออาร์จินีน (ภาพที่ 7)

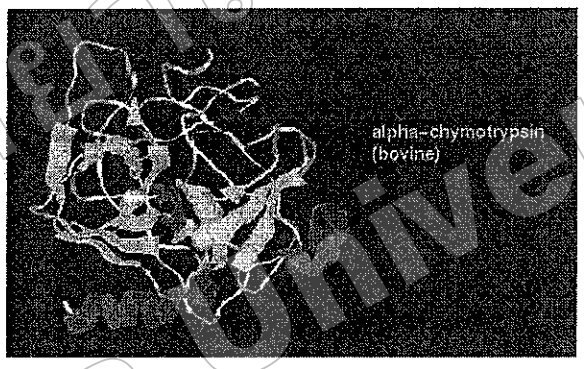
- ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) ถูกสังเคราะห์จากตับอ่อนในรูปของ Zymogen Chymotrypsinogen เป็นสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) เดี่ยวที่มีสะพาน Disulphide 5 แห่ง เมื่อเข้าสู่ลำไส้เล็ก จะถูกจับโดยทริปซินทำให้ ทำปฏิกริยาได้ ทำหน้าที่แยกพันธะเปบไทด์ของหมู่คาร์บอนิล (Carbonyl) ในสายโปรตีนที่ถูกจับ (ภาพที่ 8)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 7 โครงสร้างของทริปซิน

(http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section12/serprot1.html)



ภาพที่ 8 โครงสร้างของไคโมทริปซิน

(http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section12/serprot1.html)

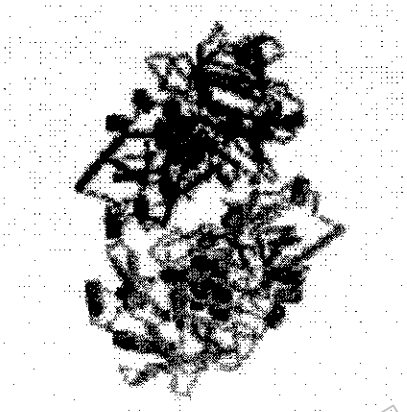
โมโนเมอริคเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ที่เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Protease ได้แก่

1. เปปซิน (Pepsin) เป็น Serine Protease ที่ผลิตขึ้นจากตับอ่อน ทำงานที่ pH ต่ำ (ที่เหมาะสม คือ 2-4) เช่นในกระเพาะของมนุษย์ (ภาพที่ 9)

2. คาร์บอกซีเปปติเดส เอ (Carboxypeptidase A) สร้างจาก Bovine Pancreas เป็น Monomeric Enzyme ที่มี Zinc Ion 1 หมู่ต่อโมเลกุล ทำหน้าที่แยกพันธะเปปไทด์ (Peptide) ที่เชื่อมระหว่างปลายด้านC ของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วออกจากสายโปรตีน ถูกทำให้ทำปฏิกิริยาได้โดยทริปซินที่จะตัดส่วนเปปไทด์จากไซโมเจนของคาร์บอกซีเปปติเดส เอ (ภาพที่ 10)

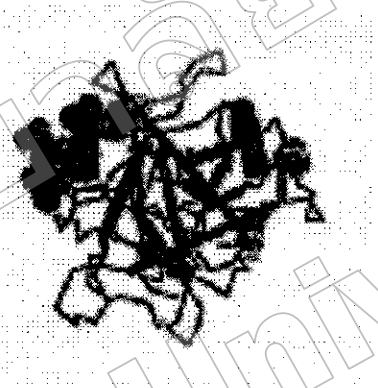
3. คาร์บอกซีเปปติเดส บี (Carboxypeptidase B) สร้างจาก Bovine Pancreas มีลักษณะที่คล้าย คาร์บอกซีเปปติเดส เอ ในแง่ที่มีความจำเพาะต่อปลายด้าน C ของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วใน Side Chain ที่ไม่สลับซับซ้อนเช่นกัน (ภาพที่ 11)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 9 โครงสร้างของเปปซิน (http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1psa/main.html)

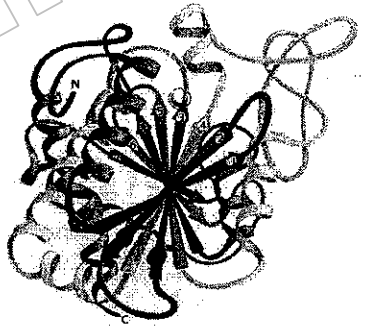
A



ภาพที่ 10 โครงสร้างของคาร์บอกซีเปปทิเดส เอ

(http://www.duke.edu/~ab11/prisant2/carboxypeptidase_a/carb-main.html)

B



ภาพที่ 11 โครงสร้างของคาร์บอกซีเปปทิเดส บี

(http://www-biology.ucsd.edu/classes/bibc100.WI01/tests/key1.html)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติบางประการของซีรีนโปรติเอสและไลเปส (ดัดแปลงจาก Beynon & Bond, 1990 และ http://www.worthington-biochem.com/default.html)

	Chymotrypsin	Trypsin	Pepsin
ความจำเพาะเจาะจง	$-P_1-P_{1'}-$ (P_1 = สารอะโรมาติก, Trp, Tyr, Phe ส่วน $P_{1'}$ ไม่จำเพาะ)	เมื่อ $-P_1-P_{1'}-$ เป็น Lys , Arg , ไม่จำเพาะ	$-P_1-P_{1'}-$ เมื่อ P_1 ไม่จำเพาะแต่ต้องเป็นสาร Aromatic หรือถ้าเป็นสาร Hydrophobic จะดีโดยเฉพาะ Phe, Leu, แต่ทั้ง $-P_1-P_{1'}-$ ต้องไม่เป็น Val, Ala, Gly
บริเวณที่พบ	Bovine Pancreas; Boehringer, Sigma, Fluka , Calbiochem	Bovine Pancreas; Boehringer, Sigma, Fluka	Porcine Gastric Mucosa; Boehringer, Sigma, Fluka
มักทำ assay กับ	BTEE หรือ ATEE substrate 25 °C , pH 7.8	Insulin ที่ผ่านการออกซิไดซ์ โดยจะย่อยบริเวณตำแหน่งโซ่ β (HPLC); BAEE, pH 7.6, 25 °C	Haemoglobin ที่เสียสภาพแล้ว
ความสามารถในการทำปฏิกิริยา	40-90 U/mg เอนไซม์ 1 U จะhydrolyze BTEE 1 μmol/นาที	1,000-13,000 U/ mg. เมื่อใช้ BAEE เป็นสับสเตรท	2,500-3,800 U/mg Protein เมื่อมี Tyr พอจะเพิ่มค่า Absorbance ของสารละลาย TCA 0.001/ min., 280 nm.
สภาพสเถียร/การเก็บ	เสถียรที่ 4 °C	เสถียรที่ 4 °C ในรูป Lyophilized	เสถียรที่ 4°C
สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา	pH 7.5 – 8.5 และมี Ca^{2+} ที่ Active	pH 8.5-8.8 และมี Ca^{2+} ใน ปริมาณคงที่ๆ 20 mM	pH 2-4
สารยับยั้ง	DFP, PMSF, TPCK, Aprotinin, α-Antitrypsin, α_2- Macroglobin	TLCK, DFP, PMSF, Leupeptin, Apronin, PMSF, Soybean Trypsin Inhibitor, α_2-Macroglobulin, α_1- Anti Trypsin	Pepstatin A, Diazoketones, Phenylacyl Bromide; pH ที่สูงกว่า6, Aliphatic Alcohol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

	Carboxypeptidase A	Carboxypeptidase B	Lipase
ความจำเพาะเจาะจง	$-P_1-P_{1'}-$ (P_1 ไม่ใช่ Arg, Lys, Pro)	$-P_1-P_{1'}-$ เมื่อ P_1 เป็นกรดอะมิโนอย่างง่าย เช่น Lys, Arg, Ornitine อุณหภูมิไม่จำเพาะ	เข้าทำปฏิกิริยาที่ Primary Ester Group, มีความจำเพาะต่อ Side Chain ได้หลายประเภท
บริเวณที่พบ	Bovine Pancreas	Porcine Pancreas	Pancreas, Hepatic
มักทำ assay กับ	Hippuryl-L-Arg, 25 °C, pH 7.5	Hippuryl-L-Arg, pH 7.5 , 25 °C	1 unit จะสร้างกรดไขมัน 1 μmol/ นาที ในการทำปฏิกิริยากับน้ำมันมะกอกที่ 25 °C., pH 8.0
ความสามารถในการทำปฏิกิริยา	35-50 U/mg Protein	150 U/mg Protein	NA
สภาพสเถียร/การเก็บ	เสถียรที่ 4 °C	เก็บที่ 4 °C	เมื่ออยู่ในสภาวะที่บริสุทธิ์สูง อาจเก็บได้ถึง 1 ปี ในที่เย็นและแห้ง รวมทั้งการแช่แข็งจะช่วยยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้
สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา	pH 7.0 – 8.0	pH 7-9	pH 4.9-5 ต้องการ Ca^{2+} ในการทำปฏิกิริยา (Sr^{2+}, Mg^{2+} มีประสิทธิภาพในการเร่งต่ำกว่า)
สารยับยั้ง	EDTA $^{Zn2+}$Chelator 2-B_2-Mercaptopropionic Acid, Cu^{2+}, Pb^{2+},Fe^{3+}, Citate P_1 > Citrare, Oxalate Ion	EDTA , Zn^{2+} Chelator , Heavy Metal	Versine , Zn^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Iodine , PCMP แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย DFP

Burapha University มหาวิทยาลัยบูรพา

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ในปัจจุบันสามารถทำได้หลายอย่าง แต่โดยทั่วไปแล้วข้อมูลที่สำคัญในเบื้องต้น เพื่อใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารนั้นควรจะต้องทราบถึง กิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของสัตว์นั้น หรือก็คือความสามารถในการเปลี่ยนสารสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ที่สามารถตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปในหนึ่งหน่วยเวลา โดยแต่ละเอนไซม์อาจมีไอโซไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งศึกษาได้จากค่ามวลโมเลกุลที่แตกต่างกันของแต่ละไอโซไซม์ เมื่อทำการแยกวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี่แล้วนำมาทดสอบกับสับสเตรทที่จำเพาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ หรืออาจทำพร้อมกับการศึกษามวลโมเลกุลของสารโดยใช้วิธีอิเล็คโตรโฟริซิส นอกจากจะใช้ในการวิเคราะห์ไอโซไซม์แล้ว ค่ามวลโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลก็ยังมีประโยชน์ในแง่การศึกษาโครงสร้างของสารนั้น ๆ อีกด้วย

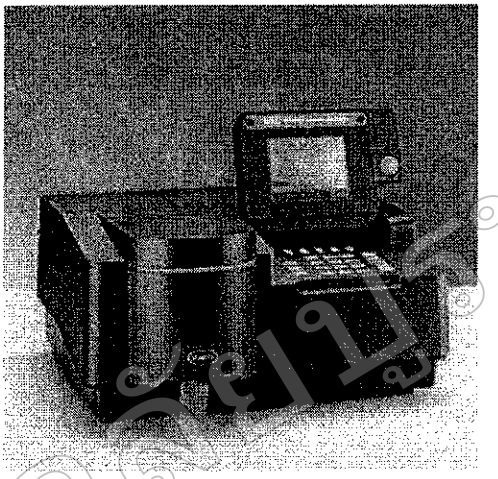
นอกจากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าวแล้ว ชนิดของกรดอะมิโนที่สัตว์สามารถดูดซึมได้ ซึ่งพิจารณาจากปริมาณกรดอะมิโนอิสระในกระแสเลือดหลังการกินอาหาร และองค์ประกอบของสารอาหารทดแทนในสูตรอาหารที่เหมาะสม ในกรณีที่ทราบถึงสารอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของสัตว์นั้น ๆ แล้ว และต้องการหาวัตถุดิบอาหารเพื่อทดแทนในส่วนที่มีราคาสูง โดยมีคุณค่าทางอาหารเท่าเทียมหรือใกล้เคียงกันก็เป็นสิ่งที่ควรทำการศึกษาในลำดับต่อไป

การศึกษาด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง (Photometric Assay)

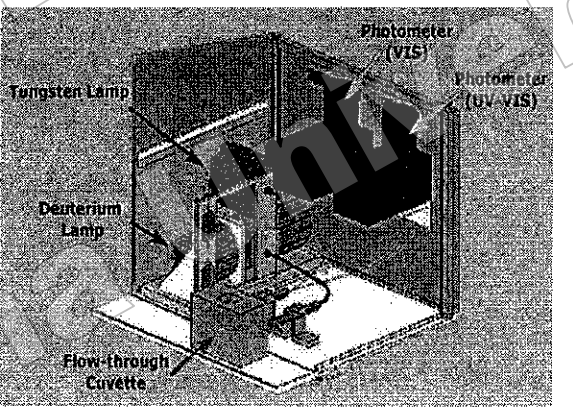
1. Photometric Assays การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงนั้นเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพราะเป็นวิธีที่สะดวก ให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และสามารถนำผลที่ได้มาประมวลใช้กับตัวอย่างจำนวนมากได้ โดยเป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นเมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรทเป็นสารผลิตภัณฑ์ โดยสีที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากสารผลิตภัณฑ์โดยตรงหรือบางครั้งอาจต้องมีการเติมสารเคมีบางชนิดเพื่อทำปฏิกิริยากับสารผลิตภัณฑ์เปลี่ยนเป็นสีที่สามารถสังเกตได้ การวิเคราะห์กิจกรรมด้วยวิธีนี้ทำได้โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (ภาพที่ 12) โดยอาศัยพื้นฐานจากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่เปลี่ยนไปตามความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปจะมีหน่วยเป็น μl/ mol. mg. Protein.

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นั้นสร้างจากหลักการ คือ คลื่นแสงจากแหล่งกำเนิดจะถูกแยกให้มีเฉพาะแนวคลื่นเดียวโดยผ่านสลิท (Slit) ก่อนที่จะผ่านไปยังภาชนะใสที่บรรจุสารละลาย

ตัวอย่างที่ต้องการศึกษา แล้วจึงเข้าสู่จุดวัดแสงด้านหลัง (ภาพที่ 13) อย่างไรก็ตามผลการวัดที่ได้จะแม่นยำเพียงใดขึ้นอยู่กับอุปกรณ์ภายในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้เป็นอย่างมาก

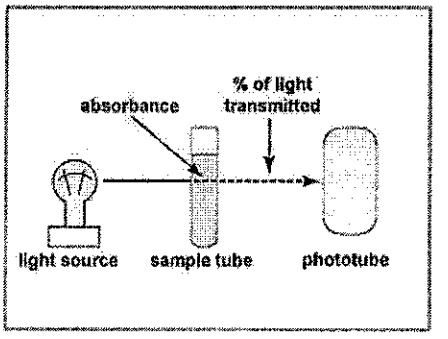


ภาพที่ 12 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (www.hach.com/Spec/SDr4000.htm)



ภาพที่ 13 องค์ประกอบภายในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

(www.estec.esa.nl/spaceflight/ spphm_1.htm)



ภาพที่ 14 หลักการทำงานของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

(www.cat.cc.md.us/courses/bio141/ labmanua/lab4/abstrans.html.)

ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ภาพที่ 13) โดยทั่วไปมีดังนี้

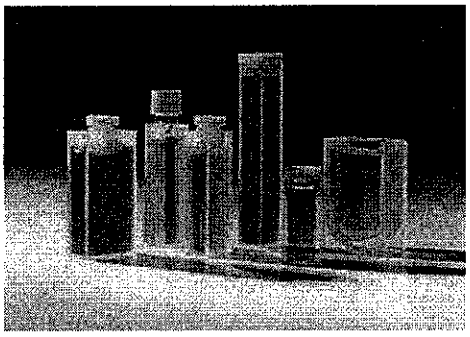
1. แหล่งกำเนิดแสง มีหน้าที่ในการสร้างความยาวคลื่นของแสงที่ต้องการเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ โดยอาจสร้างจากหลอดไฟหุ้มด้วยแก้ว, หลอดทังสเตน-ฮาโลเจน (Tungstein-Halogen) หุ้มด้วยควอทซ์
และหลอดดูทิเรียม (Duterium) หากต้องการให้แสงที่ออกมานั้นมีความยาวคลื่นครอบคลุมทั้งแสง UV และ แสงที่เห็นได้ (Visible Light) คือมีความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร จะต้องใช้ทั้งหลอดดูทิเรียม และหลอดควอทซ์ฮาโลเจน ส่วนหลอดไฟหุ้มด้วยแก้วนั้นจะใช้วัดเฉพาะแสงในช่วงคลื่นที่สามารถเห็นได้
(400-750 นาโนเมตร) และยังมีข้อจำกัดในการใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์อีกด้วย

2. ส่วนคัดเลือกความยาวคลื่น ระบบที่ใช้ในการจำกัดความยาวคลื่นของแสงที่ต้องการนั้นมีความจำเป็นต่อการแสดงออกของสารสีในสารตัวอย่าง และเป็นส่วนที่สำคัญในการตัดสินประสิทธิภาพของการวัด ในปัจจุบันเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะใช้ Halographic Grating ในการกระจายแสงจากแหล่งกำเนิดให้เป็นสเปกตรัม (Spectrum) ก่อนจะผ่านเข้าสู่สลิท ความเที่ยงตรงและความแม่นยำของแสงนั้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ Bandwidth สูง เพราะจะทำให้ลำแสงมีพลังงานมากขึ้น

3. อุปกรณ์ตรวจวัดการดูดกลืนของสเปกตรัม เป็นส่วนที่สำคัญที่สุดภายในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยจะต้องสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้อย่างสมบูรณ์ และรวดเร็ว เพราะ
ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์นั้นจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาที่ผ่านไป

4. ส่วนรับภาชนะใส่ตัวอย่าง ในการตรวจวัดกิจกรรมอย่างต่อเนื่องนั้น บางครั้งจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิของส่วนรับภาชะใส่ตัวอย่าง ซึ่งได้แก่ คิวเวท (Cuvett) (ภาพที่ 15) และไมโครเพลท (Microplate) ให้มีความเหมาะสมกิจกรรมของสารตัวอย่าง โดยในสเปกโตรโฟโตมิเตอร์บางเครื่องจะมีส่วนควบคุมอุณหภูมิดังกล่าว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 15 คิวเวทแบบต่าง ๆ (Cuvett) (www.spectronic.co.uk/ consume.htm)

อิเล็คโตรโฟริซิส (Electrophoresis)

อิเล็คโตรโฟริซิส (Electrophoresis) เป็นวิธีที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งเพื่อใช้วิเคราะห์สารประกอบชีวภาพหลายชนิดที่รวมกันอยู่ นอกจากนั้น ยังใช้ศึกษาคุณสมบัติและพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสารแมคโครโมเลกุลต่าง ๆ เช่น โปรตีน รวมถึงสารไมโครโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอ และกรดอะมิโน การแยกและเตรียมสารแมคโครโมเลกุลที่มีประจุภายในสนามไฟฟ้าให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี อิเล็คโตรโฟริซิส จะอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันของสารในสนามไฟฟ้า

ปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของสาร ได้แก่

1. ประจุของสารประกอบที่นำมาแยก สารที่มีประจุจะแยกจากกันสู่ขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม (สารที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วลบ สารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก) สารที่มีค่าประจุมากกว่าจะเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่าสารที่มีประจุน้อย โดยอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ (Electrophoretic Mobility-F) จะสอดคล้องกับสมการ

$$F = (E/ d) \times q$$

เมื่อ E = ความต่างศักย์ (Potential Difference) ระหว่างขั้วไฟฟ้า

d = ระยะห่างระหว่างขั้วไฟฟ้าทั้งสอง

q = ค่าประจุสุทธิของโมเลกุล

2. ผลของขนาดรูพรุน ในตัวกลางค้ำจุนที่เป็นเจล จะเตรียมขึ้นผ่านกระบวนการโพลิเมอร์ไรเซชั่น ทำให้มีรูพรุนขนาดแตกต่างกันตามอัตราส่วนของสารโพลิเมอร์ เมื่อนำมาทำการแยกสารประกอบที่มีอนุภาคขนาดต่าง ๆ แล้ว การเคลื่อนที่ของอนุภาคจะถูกขัดขวางโดยโครงสร้างของเจล ทำให้สารที่มีขนาดเล็กกว่าจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางได้เร็วกว่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. รูปร่างของโมเลกุลที่ทำการแยก รูปร่างของโมเลกุลมีความสำคัญต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารแตกต่างจากขนาดของโมเลกุล โดยสารที่มีรูปร่างเป็นก้อนจะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าสารที่มีกิ่งก้าน

4. ความต่างศักย์ในสนามไฟฟ้า การเคลื่อนที่ของสารจะเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มความต่างศักย์ (โวลต์) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความต่างศักย์สูงขึ้น จะมีผลให้ความร้อนในแผ่นเจลสูงขึ้นด้วย

เมื่อรวมปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่แล้ว จะสอดคล้องกับสมการ

$$F = 6\pi r \eta v$$

เมื่อ F = แรงเสียดทานที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลที่มีรูปร่างกลม

r = รัศมีของโมเลกุล

η = ความหนืดของสารละลาย

v = ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุล

ในสารละลายจะได้แรงจากสนามไฟฟ้า ดังนั้นแรงเสียดทานจึงมีค่า

$$(E/d) \times q = 6\pi r \eta v$$

ดังนั้น

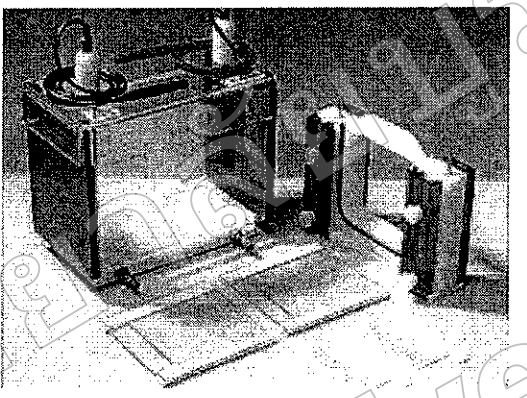
$$v = Eq/d\,6\pi r \eta$$

การแยกสารด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิสอย่างง่ายนั้นสามารถทำได้ทั้งแนวตั้งและแนวนอน ในแบบแนวตั้ง (ภาพที่ 16, 17) สารละลายบัฟเฟอร์จะเป็นตัวนำที่ที่ให้กระแสไฟฟ้าจากขั้วทั้งสองมาบรรจบกันผ่านตัวกลาง ส่วนแบบแนวนอนกระแสไฟฟ้าจะบรรจบกันผ่านกระดาษ (Wick) ที่วางอยู่ระหว่างตัวกลางและซับสารบัฟเฟอร์จากแอ่งบัฟเฟอร์ ซึ่งส่วนมากจะมีส่วนที่กั้นเพื่อกันการซึมเข้าหากัน (แต่ไม่เป็นฉนวนไฟฟ้า) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง pH ที่เกิดขึ้นในแต่ละจุดบริเวณขั้วไฟจะไม่ย้ายเข้าสู่ตัวกลางหรือสารตัวอย่าง อุปกรณ์จ่ายไฟฟ้าของอิเล็คโตรโฟริซิสส่วนมากจะถูกสร้างให้รับกระแสไฟฟ้าได้ประมาณ 500 โวลต์ และประมาณ 100 มิลลิแอมแปร์ เมื่อจ่ายกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางในบัฟเฟอร์ที่บรรจุตัวอย่างไว้แล้ว โมเลกุลของสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่เป็นแนวเข้าสู่ตัวกลางในอัตราที่แตกต่างกัน หลังทำการแยกแล้วจะต้องทำการตรึงโมเลกุลในตัวกลางเพื่อป้องกันการแพร่กระจาย สารที่ใช้เช่น Trichloroacetic Acid (TCA)

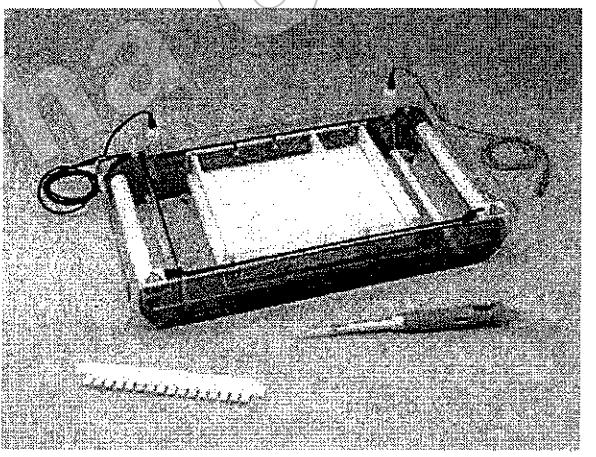
ความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำอิเล็คโตรโฟริซิสจะทำให้แถบของสารที่แยกได้กระจายเป็นแนวกว้าง เนื่องจากจะไปเพิ่มอัตราการกระจายของสารประกอบตัวอย่างและอิออนใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บัฟเฟอร์ ความร้อนที่เกิดขึ้นยังอาจทำให้โปรตีนในตัวอย่างเสียสภาพ ทำให้คุณสมบัติของสารดังกล่าวเสียไป เช่น เอนไซม์ต่าง ๆ นอกจากนั้นความร้อนยังลดความเร็วในการเคลื่อนที่ของบัฟเฟอร์อีกด้วย การทำอิเล็คโตรโฟริซิสในกระแสไฟฟ้าที่คงที่ความต้านทานจะลดลงและส่งผลให้ค่ากระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความร้อนมากขึ้นอีก แต่เนื่องจากการทำอิเล็คโตรโฟริซิสนั้นต้องอยู่ในสภาวะที่มีการจ่ายกระแสไฟฟ้าคงที่ ชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรโฟริซิสส่วนมาก จึงมีส่วนทำความเย็นประกอบอยู่ด้วย หรือใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอุณหภูมิต่ำในการทำอิเล็คโตรโฟริซิส



ภาพที่ 16 อิเล็คโตรโฟริซิสแบบแนวตั้ง (www.topac.com/vertical_electrophoresis.html)



ภาพที่ 17 อิเล็คโตรโฟริซิสแบบแนวนอน
(www.webscientific.co.uk/acatalog/Online_Catalogue_Subm.)

ชนิดของตัวกลางที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรโฟริซิส ตัวกลางที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ส่วนมากเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีรูพรุนภายใน สามารถเตรียมได้ผ่านกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน เช่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

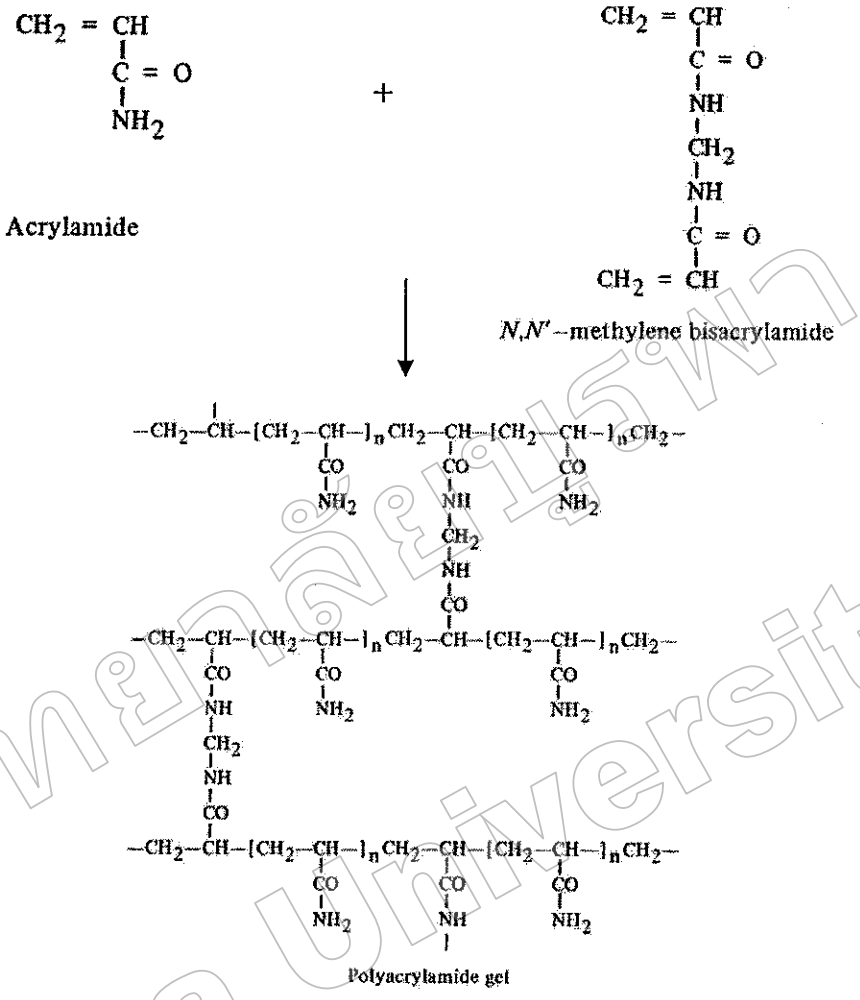
1. Cellulose Acetate นิยมใช้กับการแยกพลาสมาโปรตีน การแยกสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว (ประมาณ 45 นาที) ลักษณะของแถบ (Band) ที่ได้จะใช้บ่งบอกถึงความแตกต่างของชนิดโปรตีนได้แบบหยาบ ๆ เพราะรูปแบบโครงสร้างของตัวกลางตัวกลางนั้นมีขนาดใหญ่ มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ จึงไม่สามารถจำกัดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลสารตัวอย่างได้ทั้งหมด ยกเว้นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่

2. Agarose เป็น Polysaccharide สายตรง มีคุณสมบัติเป็นกลาง โดยปกติในการเตรียมจะให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5-3.0% w/ v ขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลที่ต้องทำการแยก เมื่อเตรียมที่ความเข้มข้นต่ำ รูพรุนในตัวกลางจะมีขนาดใหญ่ การเคลื่อนที่ของโมเลกุลสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับค่าประจุสุทธิของสารเท่านั้น จึงเหมาะที่ใช้กับเทคนิค เช่น อิมมูโนอิเล็คโตรโฟริซิส (Immunoelectrophoresis) หรือ ไอโซอิเล็คทริค โฟกัสซิง (Isoelectric Focusing)

3. Polyacrylamide เป็นสารตัวกลางที่นิยมใช้ในการทำอิเล็คโตรโฟริซิส เจลนั้นจะเตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันระหว่าง Polyacrylamide Monomer กับ Bis (*N, N'*-Methylene-Bisacrylamide) (ภาพที่ 18) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม โดยปกติแล้วการพอลิเมอร์ไรเซชันจะเริ่มจากการเกิดอนุมูลอิสระของ Ammonium Persulphate ใน TEMED (*N, N, N, N'*-Tetramethylethylenediamine) ความสามารถในการแยกสารของพอลิอะคริลาไมด์เจลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นทั้งหมดของโมโนเมอร์ (%T) จึงสามารถปรับเปลี่ยนขนาดของรูพรุนได้โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบโพลิเมอร์ให้เหมาะสมกับสารชีวโมเลกุลที่ต้องการแยก เช่น ในการเตรียมตัวกลางที่เป็นโพลิอะคริลาไมด์ ถ้าใช้สัดส่วนของบิสคงที่ขนาดของรูพรุนจะเปลี่ยนแปลงกลับ กับ %T หรือรูพรุนมีขนาดเล็กลงเมื่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์มาก เมื่อสัดส่วนของบิสเพิ่มมากขึ้นขนาดของรูพรุนจะเล็กลง โดยจะมีขนาดเล็กที่สุดเมื่อ %C = 5 ไม่ว่า %T จะมีค่าเท่าใดก็ตาม ยกเว้นเมื่อใช้ %T สูง (15%) ค่า %C ที่ทำให้ได้ขนาดรูพรุนเล็กที่สุดจะขึ้นอยู่กับค่า %T (ตารางที่ 3) นอกจากนั้นแล้วยังสามารถปรับเปลี่ยนวิธีที่ใช้ในการแยกได้อีกด้วย

ตารางที่ 3 แสดงค่า %T ที่เหมาะสมกับช่วงโมเลกุลของสาร (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537 ข)

%T	ช่วงโมเลกุลที่เหมาะสม
3-5	สูงกว่า 100,000
5-12	20,000-150,000
10-15	10,000-80,000
15+	ต่ำกว่า 15,000



ภาพที่ 18 แสดงการเกิดโครงสร้างร่างแหของโพลิอะคริลาไมด์ เจล (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537 ข)

หลังจากทำการแยกสารด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิสแล้วโปรตีนชนิดต่าง ๆ จะแยกออกจากกันเป็นแถบตามประจุและลักษณะอื่น ๆ ของสาร ซึ่งสามารถสังเกตได้โดยการย้อมสีที่มีคุณสมบัติสามารถจับกับโปรตีนได้ เช่น Coomassie Brillant Blue, Bromphenol Blue, Amidoblack, Bromphenol Green และ Ponceau-S ความเข้มของสีที่ติดกับโปรตีนจะทำให้ทราบถึงปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดได้ โดยนำไปบันทึกความเข้มของสีและวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดความทึบแสง (Densitometer) การดูแบบ (Pattern) ของโปรตีนที่ประกอบด้วยแถบต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารที่บริสุทธิ์ออกได้โดยตัดส่วนที่มีสารนี้ออกแล้วผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ไล่สารที่ต้องการออกจากตัวกลางขนาดของอนุภาคสารที่ทำการแยกผ่านตัวกลาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อิเล็คโตรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Electrophoresis)

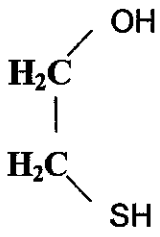
การทำอิเล็คโตรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE (Sodium Dodecsyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis) เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการแยกสารโปรตีน โดยอาศัยสารซักฟอกมีประจุ ที่นิยมใช้ได้แก่ Sodium Dodecsyl Sulfate ซึ่งมีประจุลบ จะทำให้สารโปรตีนเสียสภาพ โดยการแยกออกเป็นสับยูนิตและทำให้เกิดค่าประจุที่จำเพาะตลอดสายพอลิเปปไทด์ โดยความยาวของสายที่จับอยู่กับ SDS จะเป็นสัดส่วนกับมวลโมเลกุลของพอลิเปปไทด์และมีประจุลบเนื่องจากประจุของ SDS มีอัตราส่วนของประจุต่อมวลหรือมีความหนาแน่นของประจุคงที่เท่ากัน และมีรูปร่างเหมือนกัน จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสายพอลิเปปไทด์ภายในสนามไฟฟ้าขึ้นอยู่กับมวลโมกุลและทุกหน่วยของสารประกอบพอลิเปปไทด์-SDS จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกัน คือ เข้าหาขั้วบวก เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลก็จะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของพอลิเปปไทด์ที่สารที่ทำการศึกษา และจากการย้อมสีจะทำให้ทราบถึงจำนวนหน่วยย่อยหรือจำนวนสายพอลิเปปไทด์

SDS-PAGE เป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และต้องการสารตัวอย่างเพียงเล็กน้อย (μg) มีประโยชน์ในการศึกษาเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย โปรตีนส่วนมากที่ทำปฏิกิริยากับ SDS แล้วจะสามารถคืนสภาพได้ยกเว้นเอนไซม์ทริปซิน นอกจากนั้น ยังสามารถนำแถบที่ได้จากการแยกกันภายในเจลแล้วชะกำจัด SDS ออกไปเพื่อใช้วิเคราะห์คุณสมบัติอื่น ๆ ของพอลิเปปไทด์ต่อได้ เช่น การวิเคราะห์กรดอะมิโน, การทำแผนที่เปปไทด์ , การหาปลายไนโตรเจนหรือคาร์บอน เป็นต้น ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติของสารชีวโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE อาจจำแนกได้ ดังนี้

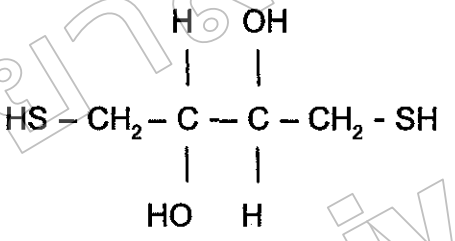
1. ใช้บ่งชี้ถึงสารโปรตีนชีวภาพที่ยังสมบูรณ์ในส่วนผสมของสารหลายชนิดได้
2. ใช้ประเมินมวลโมเลกุลของเอนไซม์
3. สามารถบอกปริมาณของไอโซไซม์ (Isozyme) จำเพาะที่ต้องการศึกษาได้
4. การเคลื่อนที่ของสารโปรตีนภายในสนามไฟฟ้าจะบ่งชี้ถึงค่า Isoelectric Point ของสารชนิดนั้น ๆ ได้
5. สามารถประยุกต์ใช้กับโปรตีนได้หลายชนิด รวมทั้งโปรตีนที่ได้จาก Membrane ด้วย

นอกจาก SDS แล้วการแยกสารด้วยวิธีนี้ยังจำเป็นจะต้องมีสารจำพวกไธออล (Thiol Reagent) ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์สลายพันธะไดซัลไฟด์ ที่นิยมใช้ คือ เมอร์แคปโตเอธานอล หรือ β-เมอร์แคปโตเอธานอล (2-Mercaptoethanol ภาพที่ 19) และไดไธโอไทรออล (Dithiothreitol หรือ

DTT ภาพที่ 20) ซึ่งมีข้อดี คือไม่มีกลิ่นและให้ผลในการรีดิวซ์ในระดับเดียวกับ 2-เมอร์แคปโตเอธานอล



ภาพที่ 19 2-เมอร์แคปโตเอธานอล (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537 ข)



ภาพที่ 20 ไดไธโอไทรออล (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537 ข)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University