รายงานวิจัย ปี 2548

การสำรวจเลคตินในฟองน้ำทะเลและการยับยั้งแบคทีเรีย

Survey of Lectins in Marine Sponges and Antibacterial Activity

ภายใต้โครงการ

การศึกษาโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพจากแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำ

A Study of Antimicrobial Proteins of Marine Bacterial Isolate from Some Sponges

ภายใต้แผนงานวิจัยเรื่อง

สารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์

สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2548

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพาประจำปี 2548 ซึ่งคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่มีส่วนช่วยทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาเลคตินในสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำจำนวน 48 ชนิด พบว่าสิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนและสัตว์เกาะกลุ่มได้จำนวน 33 ชนิด จากตัวอย่าง 33 ชนิด ได้เลือกสิ่งสกัดจากฟองน้ำที่ให้ค่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงคนในสภาพปกติและสภาพที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือป่าเป่นแล้วเกาะกลุ่มระหว่าง 8 – 16,384 ไตเตอร์ ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และโปรตีนเสียสภาพการทำงานเมื่อได้รับความร้อน พบว่าฟองน้ำที่ให้ค่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในระดับสูงและมีปริมาณของฟองน้ำจากธรรมชาติมากเพียงพอสำหรับการใช้สกัดโปรตีนเพื่อแยกเลคตินให้บริสุทธิ์และศึกษาการยับยั้งจุลชีพต่อไป ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Spheciospongia congenera* (LANT 05), *Haliclona (Reniera)*sp.(LKRK 05), *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02) ,*Hyrtios erecta* (LNOL 07) และ *Chondrilla australiensis* (SICA 04)

จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเลคตินจากฟองน้ำ LANT 05, LNOL 07, LSAB 02, และ SICA 04 พบมีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนมิวซินชนิด porcine stomach mucin และ bovine submaxiilary mucin และเฟตูอิน มากกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมเลกุลคู่ เลคตินจากฟองน้ำ LNOL 07 ต้องการแมกเนเซียมไอออนเพื่อช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ดีขึ้น ส่วน LSAB 02 และ SICA 04 ไม่ต้องการโลหะไอออนเพื่อช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม นอกจากนี้เลคตินจากฟองน้ำ LNOL 07 และ SICA 04 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส LSAB 02 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส

การตรวจหาเลคตินจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ LKRK 05, LANT 05, LNOL 07 และ LSAB 02 นำน้ำเลี้ยงทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงคนในสภาพปกติ พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทุกชนิดดังกล่าวไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่มได้

การทดสอบการมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำกลุ่มวิบริโอ ได้แก่ *Vibrio alginolyticus, V. cholerae, V. fluvialis, V. harveyi, V. mimicus, V. parahaemolyticus* พบว่าสิ่งสกัดจากฟองน้ำที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ดี 3 อันดับแรก ได้แก่ LANT 05, LKRK 05 และ LSAB 02 การทดสอบการมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *Staphylococus aureus Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าฟองน้ำ *Spheciospongia congenera, Haliclona (Reniera)*sp., และ *Callyspongia (Euplacella) joubini* สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococus aureus* ได้ดีที่สุดร้อยละ 35-83

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

รายการอักษรย่อ

1. บทนำ 1

วัตถุประสงค์การวิจัย 2

สมมติฐานการวิจัย 2

ขอบเขตการวิจัย 3

สถานที่ทำการวิจัย 3

ระยะเวลาทำการวิจัย 3

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

ชีววิทยาทั่วไปของฟองน้ำ 4

เลคติน 8

- ความหมายของเลคติน 8
- คุณสมบัติของเลคติน 8
- การตรวจหาเลคติน 9
- ประโยชน์ของเลคติน 10

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12

การศึกษาเลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในประเทศไทย 13

การศึกษาสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ 14

3. วิธีการดำเนินการวิจัย 16

ฟองน้ำที่ใช้ศึกษา 16

วิธีสกัดเลคติน 19

การต้มสิ่งสกัด 19

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford 19

การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยคาร์โบไฮเดรต	22
การทดสอบความต้องการโลหะไอออนของเลคตินจากฟองน้ำ	23
การทดสอบผลของความร้อนต่อเสถียรภาพของเลคติน	24
การทดสอบสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียใช้วิธีการนับจำนวนโคโลนี	24
4. ผลและอภิปรายผลการทดลอง	25
การตรวจพบเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ	25
เสถียรภาพของเลคตินที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส	31
ความจำเพาะต่อหมู่เลือดของเลคติน	31
เลคตินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์	32
ความจำเพาะต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรต	35
ผลของโลหะไอออนต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคติน	37
เสถียรภาพของเลคตินที่อุณหภูมิต่างๆ	38
ความสามารถของสิ่งสกัดโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม	39
ความสามารถของสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	40
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	42
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	เลคตินที่มีความจำเพาะต่อหมู่เลือด	11
3-1	รายชื่อฟองน้ำที่ทำการศึกษา	18
3-2	วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	20
4-1	ความสามารถของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ(อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารลายโซเดียมคลอไรด์ 1: 1) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ปาเปนและทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม	26
4-2	ความสามารถของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ(อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารลายโซเดียมคลอไรด์ 1: 10) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงสัตว์เกาะกลุ่ม	30
4-3	เสถียรภาพของเลคตินจากฟองน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส	33
4-4	ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ	33
4-5	ความสามารถของเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารลายโซเดียมคลอไรด์ 1: 10) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ปาเปนและทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม	34
4-6	ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินจากฟองน้ำ	36
4-7	ผลของโลหะไอออนต่อความสามารถของเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ เพื่อช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม	37
4-8	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:1) ที่อุณหภูมิต่างๆกัน	38
4-9	ความสามารถของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่ม	39
4-10	ผลการทดสอบฟองน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	โครงสร้างของฟองน้ำ	6
2-2	ภาพโครงสร้างของฟองน้ำแบบตัดขวาง	6
2-3	ลักษณะการจับกันของเซลล์เมื่อมีเลคติน	8
2-4	การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว	9
3-1	ฟองน้ำที่ใช้ในงานวิจัย	16
3-3	ผลการทดสอบความสามารถของสิ่งสกัดจากฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม	22

รายการอักษรย่อ

มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
AU	Absorbent unit
BSA	Bovine serum albumin
M	Molar
mg	Miligram
ml	Milliliter
mM	Millimolar
TBS	Tris-HCl buffer saline
TSB	Tryptic soy broth

บทที่ 1
บทนำ

ยาปฏิชีวินะ (antibiotic) หมายถึงยาที่ประกอบด้วยสารเคมีที่มีแหล่งกำเนิดผลิตเดิมจากสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ พืช หรือสัตว์ เป็นต้น ซึ่งภายหลังจะมีการสังเคราะห์ หรือกึ่งสังเคราะห์ขึ้นก็ได้ ในปริมาณที่พอเหมาะสามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อ ตัวอย่างเช่น penicillin G หรือ tetracycline เป็นต้น ดังนั้นยาปฏิชีวนะจึงเป็นเภสัชภัณฑ์ที่มีความสำคัญมากที่สุด ทั้งทางด้านกิจการค้าและวงการแพทย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ โดยพบว่ามูลค่าการใช้ยาประเภทนี้มากกว่ายาประเภทอื่นที่ได้จากจุลินทรีย์หลายเท่าตัว และเมื่อเปรียบเทียบกับยาประเภทอื่นๆ อัตราการใช้ยาปฏิชีวนะติดอันดับหนึ่งเสมอในหลายประเทศ(มาลิน จุลศิริ, 2540) ในปัจจุบันยาปฏิชีวนะนอกจากได้จากสิ่งมีชีวิตแล้ว โดยอาศัยโมเลกุลที่เป็นโครงสร้างเดิมจากธรรมชาติ อาศัยวิธีการกึ่งสังเคราะห์โมเลกุลใหม่ๆออก มามีแนวโน้มเป็นที่นิยมมากขึ้น เพราะมีวิธีการไม่ยุ่งยาก และสามารถสร้างโมเลกุลที่ให้คุณสมบัติต่างๆ กันได้ นอกจากวิธีดังกล่าวแล้วยังมีวิธีการผลิตยาสมัยใหม่ โดยอาศัยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม ให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์โมเลกุลยาที่ต้องการโดยสอดใส่ยีนที่จะสร้างโมเลกุลยาเข้าไปในเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม (ยุพิน และคณะ, 2543) สำหรับสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ แต่ยังไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์หรือผลิตเป็นยาจะใช้คำว่า สารปฏิชีวนะ แทนยาปฏิชีวนะ

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจในการค้นคว้าสารสกัดเคมีต่างๆ จากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ฟองน้ำ ปะการัง เพรียงหัวหอม เป็นต้น ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียในทะเลที่สร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตอื่นได้ เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ สามารถสร้างสาร diketopiperrazines และ สารปฏิชีวนะพวก phenazine alkaloid 2 ชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก (Jayatilake และคณะ, 1996) และยังพบว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับหอยงาช้างญี่ปุ่น สามารถผลิตสาร surugatoxin ได้ แบคทีเรียที่อยู่กับปลาปักเป้าสามารถสร้างสาร tetrodotoxin ได้ (Stierle และคณะ , 1988)

จากประโยชน์ของสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพชนิดอื่น และการดื้อยาของแบคทีเรียบางชนิดซึ่งมีลักษณะการดื้อยาได้ตั้งแต่กำเนิด หรือเกิดการดื้อยาขึ้นภายหลังที่เชื้อเคยไวต่อยาแล้วเปลี่ยนเป็นดื้อขึ้น ทำให้การรักษาที่เคยได้ผลกลับขาด

ประสิทธิภาพไป โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาสารปฏิชีวนะที่เป็นโปรตีน ไกลคอโปรตีน หรือเพปไทด์ จากจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในประเทศไทย เพื่อให้ได้สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่อาจจะมีคุณสมบัติเพียงพอที่จะผลิตเป็นยาปฏิชีวนะรักษาโรคในคนหรือสัตว์ทะเล หรือใช้เป็นเครื่องมือทางการแพทย์ รวมทั้งใช้ในงานวิจัย

จากการศึกษาสารปฏิชีวนะในประเทศไทยส่วนใหญ่ที่ผ่านมาเป็นการศึกษาสารในกลุ่มผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีเป็นส่วนน้อยที่ศึกษาสารกลุ่มชีวโมเลกุลที่เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากฟองน้ำและแยกแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ นำมาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม แล้วนำสารสกัดจากฟองน้ำและน้ำเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบหาเลคตินและความสามารถในการยับยั้งจุลชีพ ซึ่งเลคตินเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มได้ และในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังเลคตินทำหน้าที่คล้ายแอนติบอดี้ เลคตินถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ เช่นการตรวจหมู่เลือด วิทยาภูมิคุ้มกัน การวิจัยมะเร็ง ชีววิทยาของเซลล์ และการวิเคราะห์ทางชีวเคมีเป็นต้น สำหรับโปรตีนจากฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำที่สามารถยับยั้งจุลชีพได้นั้นจะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาเลคตินจากสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ โดยทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโปรตีนจากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมาตรฐานและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ

สมมติฐานการวิจัย

ฟองน้ำในธรรมชาติมีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่รอดจากการรบกวนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในระบบนิเวศ เช่น จุลินทรีย์ที่ให้โทษ อาจเป็นไปได้ว่าฟองน้ำมีวิธีการป้องกันตนเองทางชีวภาพ โดยการสร้างสารชีวโมเลกุลประโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่เรียกว่าเลคตินซึ่งทำหน้าที่คล้ายแอนติบอดีในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสกัดโปรตีนจากฟองน้ำแล้วตรวจหาเลคติน รวมทั้งความสามารถของสารสกัดโปรตีนในการยับยั้งจุลชีพ

ขอบเขตการวิจัย

1.ฟองน้ำที่นำมาศึกษาได้แก่ ฟองน้ำที่นำมาจากบริเวณเกาะล้าน เกาะครก เกาะสาก และเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

2.เซลล์เม็ดเลือดแดงที่นำมาใช้ทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเอบี นำมาจากโรงพยาบาล มหาวิทยาลัยบูรพา

3. เซลล์เม็ดเลือดแดงสัตว์ ได้แก่ หนู หนูเมาส์ หนูตะเภา กระต่าย ห่าน และแกะ นำมาจากสำนักสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล เม็ดเลือดแดงหมูและม้าได้จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

สถานที่ทำการวิจัย

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ระยะเวลาทำการวิจัย

10 เดือน เริ่มวันที่ 1 เมษายน 2548 ถึงวันที่ 31 มกราคม 2549

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาทั่วไปของฟองน้ำ

ลักษณะทั่วไปของฟองน้ำ (บพิธ และนันทพร,2545)

ฟองน้ำจัดเป็นสัตว์หลายเซลล์ที่โบราณที่สุด ซึ่งจัดอยู่ในระดับการรวมตัวของโพรโทพลาสซึม (protoplasmic grade) ไม่มีเนื้อเยื่อที่แท้จริง ไม่มีอวัยวะ การประสานงานน้อยมาก สถานะในสายวิวัฒนาการสูงกว่าโพรโทซัวที่เป็นโคโลนี แต่ยังไม่ได้เป็นเมทาซัวที่แท้จริง

ฟองน้ำเป็นสัตว์กลุ่มเดียวที่มีการเรียงจัดตัวของเซลล์ล้อมรอบระบบรู (pore system) ช่องทางผ่านของน้ำและโพรงภายในหรือแชมเบอร์ (chamber) ทำให้น้ำไหลผ่านเข้าและออกจากตัวอย่างต่อเนื่อง รูที่มีอยู่มากมายกระจายไปทั่วตัวเป็นที่มาของชื่อไพ่ลัม ขนาดของรูเล็กมากต้องดูจากกล้องจุลทรรศน์ และมีจำนวนมากเป็นพัน ๆ รู ช่องทางที่น้ำออกจากตัวจะเป็นรูที่มีขนาดใหญ่เห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า ออสคูลัม (osculum)

เซลล์ทุกเซลล์ของฟองน้ำเป็นอิสระต่อกันในการรับออกซิเจน คายคาร์บอนไดออกไซด์และขับถ่ายของเสียไนโตรเจนโดยการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ชั้นเซลล์ที่ห่อหุ้มอยู่ด้านนอกของฟองน้ำมีการเรียงตัวคล้ายเนื้อเยื่อ แต่ไม่มีการสร้างเยื่อฐาน (basal lamina) ดังที่พบในเมทาซัว และพบว่ามีการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ (intercellularjunction) อยู่เพียงไม่กี่แห่ง ดังนั้นชั้นของเซลล์ทั้งสองชั้นจึงยังไม่เป็นเนื้อเยื่อที่แท้จริง แต่เซลล์ของฟองน้ำมีลักษณะเด่นที่มีแนวโน้มเป็นเซลล์ประเภทโททิโพเทนต์ (totipotent) คือ เป็นเซลล์ที่สามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น และสามารถเคลื่อนที่ได้ดี

รูปร่างแบบพื้นฐานของฟองน้ำมีลักษณะเป็นท่อ หรือคล้ายโอ่ง หรือรูปร่างแบบแจกันดูเหมือนกับจะเป็นสมมาตรรัศมี แต่ตำแหน่งของรูและทางผ่านของน้ำทำให้ไม่เป็นสมมาตรรัศมีอย่างสมบูรณ์ และฟองน้ำส่วนใหญ่เจริญแผ่ออกปกคลุมวัตถุที่เกาะ หรืออาจเป็นปุ่มปมบนที่เกาะหรือเป็นก้อน หรือแตกแขนง จึงไม่สมมาตร (asymmetry) แม้ว่าฟองน้ำแต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะตัว แต่การเติบโตไม่มีรูปแบบที่แน่นอน การเติบโตแผ่ขยายออกไปอย่างต่อเนื่องได้รับอิทธิพลจากวัตถุที่ยึดเกาะและกระแสน้ำที่ผ่านตัวฟองน้ำ ดังนั้นฟองน้ำชนิดเดียวกันแต่เกาะกับวัตถุที่ต่างกันและอยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน จึงมีรูปร่างที่ต่างกันมาก ฟองน้ำทะเลพบได้ทุกระดับความลึก บริเวณชายฝั่งที่สะอาดพบฟองน้ำได้มากชนิด ฟองน้ำส่วนใหญ่เติบโตปกคลุมอยู่ตามวัตถุแข็งโดยเฉพาะก้อนหิน และเปลือกหอย ฟองน้ำตามชายฝั่งเป็นฟองน้ำที่แผ่ไปกับวัตถุไม่เป็น

2. เลคติน

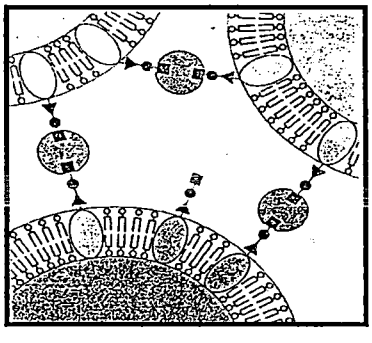
2.1 ความหมายของเลคติน

เลคตินคือโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนซึ่งไม่ได้สร้างจากระบบภูมิคุ้มกัน มีความสามารถในการทำให้เซลล์เกาะกลุ่มและ/หรือตกตะกอนโมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ เพราะโมเลกุลของเลคตินมีบริเวณจับคาร์โบไฮเดรตอย่างน้อยที่สุด 2 บริเวณ จึงสามารถเชื่อมเซลล์กับเซลล์ไว้ด้วยกันโดยการจับกับน้ำตาลที่ผิวเซลล์ (Goldstein, 1980, Kocorek, 1981) และการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยเลคตินสามารถยับยั้งได้โดยน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยและมีความจำเพาะกับเลคติน (Liener และคณะ, 1986)

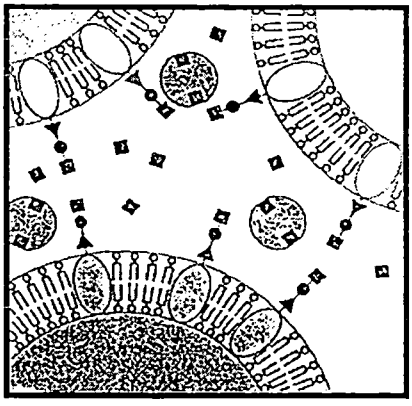
2.2 คุณสมบัติของเลคติน

การเกาะกลุ่มของเซลล์และการจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตของเลคติน

การเกาะกลุ่มของเซลล์เกิดขึ้นได้เมื่อการจับของเลคตินกับเซลล์ทำให้เกิดสะพานเชื่อมระหว่างเซลล์หลายๆ สะพานอย่างเหมาะสม ดังแสดงในภาพที่ 2 ดังนั้นการเกาะกลุ่มของเซลล์จึงเป็นกระบวนการที่ยุ่งยากพอสมควร เพราะไม่ได้ต้องการแค่การจับของเลคตินกับเซลล์เท่านั้น แต่ยังต้องการปัจจัยอีกหลายอย่างทั้งของเลคติน และของเซลล์ด้วย เช่น ขนาดโมเลกุลของเลคติน จำนวนบริเวณจับน้ำตาลในโมเลกุลของเลคติน จำนวนบริเวณจับเลคตินบนผิวเซลล์ นอกจากนี้การเกาะกลุ่มยังขึ้นกับสภาวะแวดล้อมอีกด้วย เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเซลล์ เป็นต้น เมื่อเลคตินทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม และการเกาะกลุ่มนั้นสามารถยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลที่เหมาะสม ดังภาพที่ 3 แสดงว่าคาร์โบไฮเดรตที่ผิวเซลล์มีโครงสร้างที่จำเพาะต่อเลคติน ดังนั้นการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยเลคติน จึงสามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตที่ผิวเซลล์



ภาพที่ 2-3 ลักษณะการจับกันของเซลล์เลคตินเมื่อมีเลคติน (วงกลมสีเทา) เป็นตัวเชื่อมจับจำเพาะกับน้ำตาล(▲ ■ ●) ที่ผิวเซลล์ของแต่ละเซลล์เข้าด้วยกัน (Sharon, 1977)



ภาพที่ 2-4 การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว(■) (Sharon, 1977)

2.3 การตรวจหาเลคติน

การตรวจหาเลคตินนั้น อาศัยความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Hemagglutination) (Singh และคณะ, 1999) การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของเลคติน เวลา อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างในขณะที่เลคตินจับกับเม็ดเลือดแดง การวิเคราะห์การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงมักทำในหลุมของแผ่นไมโครไตเตอร์ โดยใช้ 2% เม็ดเลือดแดงผสมกับเลคตินที่เจือจางเพิ่มขึ้นหลุมละสองเท่าด้วยบัฟเฟอร์ เม็ดเลือดแดงในสารแขวนลอยจะค่อย ๆ เกิดการเกาะกลุ่มและตกตะกอนลงสู่ก้นหลุม ถ้าเม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะมองเห็นเป็นแผ่นสีแดงคล้ายพรมคลุมอยู่เต็มก้นหลุม แต่ถ้าไม่มีการเกาะกลุ่มจะมองเห็นเม็ดเลือดแดงกองรวมกันเป็นกลุ่มกลมๆ ก้นหลุม ตรวจดูจุดยุติหรือไตเตอร์ของการเกาะกลุ่ม ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของเลคตินที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (สัมฤทธิ์, 2532)

เลคตินพบในสิ่งมีชีวิตทุกประเภท ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ส่วนของพืชที่พบเลคตินมากที่สุดคือ ส่วนที่ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหาร สัตว์มีกระดูกสันหลังพบเลคตินในส่วนของสารน้ำ และส่วนของเยื่อเซลล์ โดยในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังยังพบเลคตินส่วนมากอยู่ในของฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) และอวัยวะเพศ และในจุลินทรีย์พบมากที่ผิวเซลล์ (Lis และ Sharon, 1973)

2.4 ประโยชน์ของเลคติน

เลคตินได้รับการประยุกต์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในงานวิจัย และการแพทย์ เลคตินมีหลายชนิด และแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตต่างกัน รวมทั้งเลคตินมีเสถียรภาพสูง การจับของเลคตินกับคาร์โบไฮเดรต หรือเซลล์ผันกลับได้โดยแซคคาไรด์โมเลกุลเล็กและสารชีวโมเลกุลที่จับจำเพาะ เลคตินต้องมีส่วนคาร์โบไฮเดรตอยู่ในโมเลกุล ดังนั้นการจับของเลคตินจึงใช้เป็นหลักฐานแสดงว่าตัวต้อนรับที่ผิวเซลล์สำหรับฮอร์โมน สารเร่งการเจริญเติบโต สารสัญญาณประสาท หรือสารพิษ เป็นโมเลกุลที่มีส่วนคาร์โบไฮเดรตเชื่อมอยู่โดยการประยุกต์ใช้มีในด้านต่างๆ ดังนี้ (Sharon และ Lis, 1972, Lis และ Sharon, 1973)

การแยกเซลล์

กลุ่มของเซลล์โดยทั่วไปไม่ว่าเซลล์สัตว์ เซลล์พืช หรือเซลล์จุลินทรีย์ สามารถแบ่งเป็นเซลล์กลุ่มย่อยโดยเลคตินได้ เมื่อเซลล์เหล่านั้นมีความแตกต่างของน้ำตาลที่ผิวเซลล์ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่ไม่จับเลคตินออกจากเซลล์ที่จับเลคติน และเนื่องจากการจับของเลคตินกับเซลล์ผันกลับได้เมื่อเติมน้ำตาลจำเพาะลงไป ทำให้นำเซลล์ที่จับเลคตินกลับคืนมาได้ในสภาพที่มีชีวิตสมบูรณ์ และไม่ถูกทำลาย

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

เลคตินทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มได้จึงถูกใช้ในการบ่งชี้คุณลักษณะจำเพาะของเชื้อนั้นได้ ตัวอย่างเช่น *Bacillus antracis* เป็นแบคทีเรียที่ตรวจสอบได้ยากในคลีนิคแต่สามารถบ่งชี้ได้ง่าย เมื่อเกิดการเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากถั่วเหลืองและไม่เกาะกลุ่มโดยเลคตินจากหอยทาก ในปัจจุบัน เลคตินใช้บ่งชี้คุณลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียได้หลายสกุล เช่น *Bacillus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* และ *Lagionella* เป็นต้น

การตรวจหมู่เลือด

การประยุกต์เลคตินในคลินิกเป็นครั้งแรกคือ เพื่อระบุความแตกต่างของเม็ดเลือดแดงต่างหมู่เลือด และถึงแม้ในปัจจุบันได้มีแอนติบอดีโคลนเดี่ยวจำเพาะต่อหมู่เลือดเข้ามาแทนที่ เลคตินหลายชนิดยังคงใช้ประจำในธนาคารเลือด เพื่อการตรวจหมู่เลือด ดังแสดงใน ตารางที่ 2-1 เป็นเลคตินจาก *Ulex europaeus* ใช้ตรวจเลือดหมู่โอ โดยสาเหตุส่วนใหญ่เนื่องจากไม่มีแอนติบอดีต่อเลือดหมู่โอ หรือ anti-O(H) ในธรรมชาติ ให้ใช้เลคตินจาก *Dolichos biflorus* ใช้บอกความแตกต่างระหว่างเลือดเอหมู่ย่อยคือ A1 และ A2 โดยเลคตินจะจับกับเม็ดเลือดหมู่ A1 เท่านั้นเนื่องจากมีปริมาณตัวกำหนดหมู่เลือดเอมากกว่า (ธนากร, 2535)

ตารางที่ 2-1 เลคตินที่มีความจำเพาะต่อหมู่เลือด

ความจำเพาะ	แหล่งของเลคติน
Anti-A	*Griffonia simplicifolia* IA_4
	Helix pomatia (garden snail)
	Phaseolus lunatus (lima bean)
	Vicia cracca (common verch)
Anti-A_1	*Dolichos biflorus** (horse gram)
Anti-B	*Griffonia simplicifolia* IB_4
Anti-O(H)	*Anguila anguilla* (eel)
	Lotus tetragonolobus (asparagus pea)
	*Ulex europeus** (grose)
Anti-A + N	*Moluccella laevis* (Irish Bell)
Anti-N	*Vicia graminea**
Anti-T	*Aracbis hypogaea** (peanut)
Anti-Tn	*Salvia sclarea*

*เลคตินที่ใช้ประจำในธนาคารเลือด

การทำไกลโคโปรตีนให้บริสุทธิ์

เลคตินสามารถจับจำเพาะกับส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของไกลโคโปรตีน ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำเลคตินมาใช้เป็นลิแกนด์ ในการแยกไกลโคโปรตีนโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีสัมพรรคภาพ เช่น การใช้ Con A ตรึงกับเม็ดวุ้นในการแยก Peroxidase จากหัวแรดิช การใช้เลคตินจาก *Artocarpus altilis* ในการแยก IgA จากซีรัม เป็นต้น

การวินิจฉัยโรค

ได้มีการใช้เลคตินในการวินิจฉัยโรค โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ไกลโคโปรตีนจากร่างกาย เช่น สตรีมีครรภ์ที่มีสภาพของเด็กในครรภ์ผิดปกติ ความเข้มข้นของไกลโคโปรตีนที่ไม่จับ Con A แต่จับกับ lentil lectin จะลดลง เลคตินบางชนิดสามารถจับกับเซลล์มะเร็งได้โดยไม่จับกับเซลล์ปกติ จึงแยกเซลล์ทั้งสองชนิดออกจากกันและใช้วินิจฉัยโรคมะเร็งได้

2.5 **เลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง**

เลคตินตรวจพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทุกประเภททั้ง ปู กุ้งก้ามกราม หอย ฟองน้ำ ปะการังอ่อน และแมลง ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของของเหลวในร่างกายหรือน้ำเมือกของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง(Olafsen, 1988) ข้อมูลของเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาไว้อย่างละเอียดแล้วได้แก่เลคตินจากหอยทาก(*Helix pomatia*) และเลคตินจากแมดาทะเล (*Limulus polyphemus*) เป็นต้น

หน้าที่ทางชีวภาพของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

เลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีมากในน้ำเหลืองเลือด เนื่องจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไม่มีแอนติบอดีจึงอาจเป็นไปได้ว่าเลคตินในน้ำเหลืองเลือดอาจทำหน้าที่เหมือนแอนติบอดีในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมผ่านทางสารน้ำและเซลล์ นอกจากหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแล้วเลคตินยังมีบทบาททางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหารการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตแบบซิมไบโอซิส การลงเกาะของตัวอ่อน และการสืบพันธุ์ เป็นต้น (Maki and Mitchell, 1986 and Vasta, 1991)

3. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเริ่มศึกษาจากแมงดาทะเลในสกุล *Limulus* (Singh และคณะ, 1999)

ในปี ค.ศ.1986 Kamiya และคณะ ได้ทำการศึกษาและทำการแยกเลคตินจากฟองน้ำ *Phyllospongia foliascens* ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี คอลัมน์ acid-treated เชื่อมกับ Sepharose 4B พบว่า สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนและกระต่ายเกาะกลุ่มได้ และการเกาะกลุ่ม จะถูกยับยั้งด้วยน้ำตาล Lactose, N-acetyl-D-galactosamine, D-galacturonic acid และ N-acetyl-neuraminic acid

ในปี ค.ศ. 2002 Pajic และคณะ ได้ทำการสกัดเลคตินจากฟองน้ำ *Haliclona eratera* โดยวิธีการแลกปลี่ยนไอออน และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน พบว่าเลคตินมีมวลโมเลกุล 29 kDa และเลคตินสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคน หมู่เอ บี โอ เอบี และเม็ดเลือดแดงแกะที่ไม่มีการปรับปรุงด้วยเอนไซม์เกาะกลุ่มได้ และเลคตินนี้ไม่ต้องการโลหะไอออนเพื่อช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

Xiong และคณะ (2005) ได้ศึกษาเลคตินจากฟองน้ำ *Craniella australiensis* เลคตินเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มพบว่าทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอและบีทั้งในสภาพปกติ และที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม เมื่อนำไป

ทดสอบกับเม็ดเลือดแดงสัตว์พบว่า ทำให้เม็ดเลือดแดงหนูเมาท์ แกะ กระต่าย และไก่ในสภาพปกติเกิดการเกาะกลุ่ม และเม็ดเลือดแดงแกะและกระต่ายที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม โดยความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มนี้ถูกยับยั้งได้ด้วย (Porcine stomach mucin,PSM) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน และเลคตินจากฟองน้ำทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 20 – 70 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 – 8 โดยไม่ต้องการโลหะไอออนช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

ในปี ค.ศ. 2002 Rajagopalan และคณะได้ทำการแยกเลคตินจากน้ำเลือดกุ้งขาว โดยใช้เทคนิคแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี คอลัมน์ N-acetylglucosamine-Sepharose 6B และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันด้วยเครื่อง HPLC และอิเล็คโตรโฟรีซีส พบว่าเลคตินมีมวลโมเลกุล 200 kDa ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยๆที่เหมือนกันมีขนาด 27 kDa และเลคตินนี้ไม่ต้องการโลหะไอออนเพื่อช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

ในปี ค.ศ.2004 Alexander และคณะ ได้ทำการศึกษาและแยกเลคตินจากหอยสองฝา *Ruditapes philippinarum* โดยใช้วิธีแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟีที่มีมิวซิน เชื่อมกับ Sepharose พบว่าเลคตินมีมวลโมเลกุล 138 kDa และจากการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาด 74 34 และ 30 kDa ซึ่งในการทำงานของเลคตินจากหอยสองฝาไม่สามารถยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่สามารถยับยั้งได้โดย N-acetyl-D-galactosamine และ α-l-acid glycoprotein

การศึกษาเลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในประเทศไทย

อู่แก้ว ประกอบไวทยกิจ บีเวอร์ (2534) ได้มีการศึกษาเลคตินในหอยน้ำจืด 4 ชนิด และหอยทะเล 1 ชนิด และได้มีการทดสอบเลคตินจากแต่ละส่วนของหอยเซอรี่ หรือ *Ampullarius canaliculata* (Larmarck) ได้แก่ เนื้อเยื่อทั้งตัว ไข่ และน้ำเมือกผสมปนกับ haemolymph พบว่าเลคตินจากสองส่วนหลังมีความจำเพาะต่อน้ำตาล raffinose และmucin

เทียมจิตร ไชยชนะ (2543) ได้ศึกษาเลคตินในปะการังอ่อนจากชายฝั่งทะเล ภาคตะวันออกของประเทศไทย จากปะการังอ่อนที่นำมาตรตรวจหาเลคติน 9 ชนิด พบว่าโปรตีนในสิ่งสกัดจากปะการังอ่อน 6 ชนิด สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหรือสัตว์เกาะกลุ่มได้ในช่วง $2\text{-}2^7$ ไตเตอร์ โดยที่สิ่งสกัดจากปะการังอ่อน *Sinularia* sp. ทำให้เม็ดเลือดแดงหนูตะเภาเกาะกลุ่มได้มากที่สุด 2^7 ไตเตอร์ และยังสามารถทำให้จุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เกาะกลุ่มได้

งามจิตร วังศรี (2547) ได้ศึกษาสมบัติบางประการของเลคตินจากปะการังอ่อน พบว่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเลคตินที่สกัดจากปะการังอ่อน (*Sinularia erecta*) โดยศึกษาการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่ามิวคัสสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่เอ บี เอบี และโอ เกาะกลุ่มได้ 2^7, 2^9 ,2^8 และ2^7 ไตเตอร์ตามลำดับ และการทดสอบกับเม็ดเลือดแดงสัตว์ได้แก่ หนู แรท หนูขาว หนูตะเภา ไก่ ห่าน ม้า หมู พบว่าสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ 2^3, 2^5, 2^7, 2^8, 2^6, 2^8 และ 2^4 ไตเตอร์ตามลำดับ และการเกาะกลุ่มนี้ถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลโมเลกุลเล็ก และไกลโคโปรตีน ได้แก่ N-Acetyl-D-Galactosamine, Raffinose, D-Galactose, Melibiose และ Mucin (PSM) และจากการศึกษาบทบาทของเลคตินจากมิวคัสของปะการังอ่อนในการเกาะกลุ่มของเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการสเมียร์ พบว่าสามารถทำให้เซลล์ของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC25923 กับ *Vibrio harveyi* เกาะกลุ่มและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 85.71% และ 31.25% ณ เวลา 1 ชั่วโมง

การศึกษาสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ

Bernan และคณะ (1993) ได้ศึกษากลไกการทำงานของ sceptrin ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพที่แยกได้จากฟองน้ำ *Agelas mauritiana* บริเวณมหาสมุทรแปซิกตอนใต้ สาร sceptrin สามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ จากทดสอบกับ *Escherichia coli* พบว่าการออกฤทธิ์ของ sceptrin เป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่าออกฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อ การศึกษาการปล่อยโพแทสเซียมไอออนจาก *E. coli* และการสลายของเม็ดเลือดแดงแสดงให้เห็นว่า sceptrin ทำลายเซลล์แมมเบรนของเซลล์โปรคาริโอตและเซลล์ยูคาริโอต ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการสร้าง spheroplasts อาจมีผลกระทบกับผนังเซลล์และการที่เซลล์แมมแบรนถูกทำลาย

ในปี ค.ศ. 1994 Oclarit และคณะ ได้ศึกษาสารสกัดจากฟองน้ำทะเลที่เก็บแถบชายฝั่งของ Oshima Island ของประเทศญี่ปุ่น เพื่อทดสอบสารสกัดที่ได้นั้นผลิตมาจากฟองน้ำทะเลหรือแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำ โดยคัดแยกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลของแต่ละสายพันธุ์ เลี้ยงใน marine medium และศึกษาคุณสมบัตินการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี filter-paper disc diffusion technique พบว่า M22-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ *Hyatella* sp. นั้นมีคุณสมบัติในการต้าน *Bacillus subtilis* และเมื่อนำสารนั้นมาทดสอบทางเคมี พบว่าเป็นสารประเภท peptide antibiotic คือ andimide เป็นสารชนิดเดียวกับที่ฟองน้ำนั้นหลั่งออกมา เมื่อนำแบคทีเรียไปจัดจำแนกชนิดทางชีวเคมี ปรากฏว่าเป็นเชื้อ *Vibrio* sp. จึงสันนิษฐาน

ว่าสารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟองน้ำทะเลที่หลั่งออกมานั้น อาจสร้างขึ้นมาจากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำ

ชุติวรรณ และคณะ (2544) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำบางชนิดในจังหวัดชลบุรี แบคทีเรีย 194 สายพันธุ์ แยกได้จากฟองน้ำ 34 ตัวอย่าง ที่เก็บจากบริเวณเกาะสาก เกาะครก เกาะล้าน เกาะแสมสาร เกาะขาม เกาะริ้น จังหวัดชลบุรี โดยการเกลี่ยกระจายบนอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (ORI medium) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยใช้วิธี Agar Disc Diffusion Assay พบว่ามี 9 สายพันธุ์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีต่อ *Stapphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, และ/หรือ *Vibrio anguilrum* คือ IMS 233-7 , IMS 234-2 , IMS 238-3 , IMS 238-4 , IMS 242-2 , IMS 245-2 , IMS 261-3 , IMS 267-2 , และ IMS 267-4 เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปท่อน แต่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน เมื่อเลือกสายพันธุ์ IMS 233-7 ที่มีประสิทธิภาพดี และคงที่มาเพาะเลี้ยง และทำการสกัดส่วนเซลล์ด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (1:2) ทำการแยกด้วยเอธิลอะซิเตตและน้ำ ส่วนอาหารที่เลี้ยงสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบว่า สารสกัดส่วนของเซลล์และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* ได้ดีตั้งแต่ระดับ 50 ไมโครกรัมต่อดิสก์

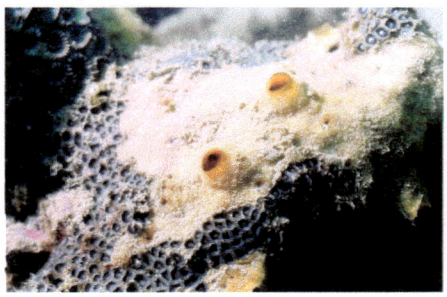
เนื้อทิพย์ (2541) ได้ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเมือกหอยทากยักษ์ (*Achatina fulica* Bowdich 1822) โดยการแยกส่วนที่เป็นเมือก (mucus) จากหอยทากยักษ์ด้วย DEAE – Cellulose ion exchange สามารถแยกสารออกได้เป็น 5 ส่วน โดยที่ส่วนที่สองมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Stapphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด และเมื่อนำส่วนที่สองทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Gel filtration ใช้ Sephadex G-150 ได้พีคของโปรตีน 5 พีค และมีเพียง 1 พีคเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ และพบว่าเป็นสารไกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 130,000 ดาลตัน เมื่อใช้ SDS-PAGE ได้แถบของโปรตีน 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 64,000 ดาลตัน แสดงว่าสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มี 2 หน่วยย่อย มีสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถฆ่าเชื้อ *Stapphylococcus aureus* ค่า MIC ของสารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีค่า 4 ไมโครกรัม/มล. นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนของเมือกมีโปรตีเอสแต่ไม่ย่อยสารปฏิชีวนะ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ฟองน้ำที่ใช้ศึกษา

ฟองน้ำที่ใช้ศึกษานำมาจากอ่าวหาดนวล เกาะล้าน เมืองพัทยา จ.ชลบุรี โดยการเก็บตัวอย่างฟองน้ำใช้อุปกรณ์ดำน้ำ (scuba) เก็บฟองน้ำใส่ถุงพลาสติกซิบปิดปากถุงให้แน่น ระหว่างขนส่งใส่น้ำแข็งไว้ก้นภาชนะ วางถุงที่มีตัวอย่างฟองน้ำไว้ชั้นบนให้ได้รับไอเย็นจากน้ำแข็ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการล้างทำความสะอาดฟองน้ำด้วยน้ำทะเล โดยแยกฟองน้ำเป็นสองส่วน เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส อีกส่วนแช่ในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ไว้สำหรับแยกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากดร.Leen van Ofwegen จาก National Museum of Natural History ประเทศเนเธอร์แลนด์

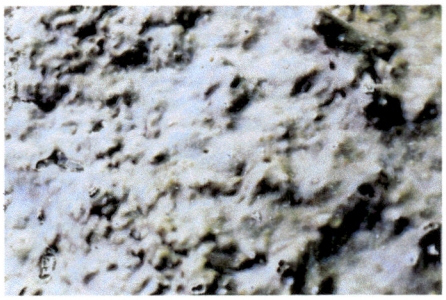
Halisarca ectofibrosa (LANT 04) เกาะล้าน



Spheciospongia congenera (LANT 05) เกาะล้าน

Spirastrellla solida (LANY 03) เกาะล้าน

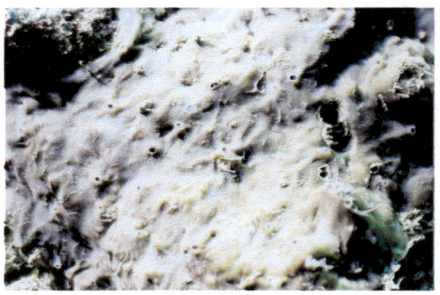
Haliciona (Reniera) sp. (LKRK-05) เกาะล้าน



Chondrilla australiensis (LKRK 14) เกาะครก

Hyrtios erecta (LNOL 07) เกาะล้าน

Suberea praetensa (LSAB 03) เกาะสาก



Chondrilla australiensis (SICA 04) เกาะสีชัง

ภาพที่ 3-1 ฟองน้ำที่ใช้ในงานวิจัย

(ภาพถ่ายโดย คุณ สุเมตต์ ปุจฉาการ)

ตาราง 3-1 รายชื่อฟองน้ำที่ทำการศึกษา

Field code	Common name	Order	Family	species	สถานที่เก็บตัวอย่าง
LANT-04	ฟองน้ำลายเส้นสีขาว	Halisarca	Halisarcidae	*Halisarca ectofibrosa*	เกาะล้าน เมืองพัทยา
LANT-05	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	Hadromerida	Clionaidae	*Spheciospongia congenera*	เกาะล้าน เมืองพัทยา
LANY-03	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	Hadromerida	Spirastrellidae	*Spirastrellla solida*	เกาะล้าน เมืองพัทยา
LKRK-05	ฟองน้ำเมือกสีขาว	Haplosclerida	Chalinidae	*Haliciona (Reniera) sp.*	เกาะล้าน เมืองพัทยา
LKRK-14	ฟองน้ำหนังสีน้ำตาล	Chondrosida	Chondrillidae	*Chondrilla australiensis*	เกาะครก เมืองพัทยา
LKRK-19	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	Hadromerida	Clionaidae	*Spheciospongia congenera*	เกาะครก เมืองพัทยา
LNOL-07	ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ	Dictyoceratida	Thorectidae	*Hyrtios erecta*	เกาะล้าน เมืองพัทยา
LSAB-02	ฟองน้ำรังบวบ	Haplosclerida	Callyspongiidae	*Callyspongia (Euplacella) joubini*	เกาะสาก เมืองพัทยา
LSAB-03	ฟองน้ำแขนงสีม่วง	Verongida	Aplysinellidae	*Suberea praetensa*	เกาะสาก เมืองพัทยา
SICA-04	ฟองน้ำหนังสีน้ำตาลม่วง	Chondrosida	Chondrillidae	*Chondrilla australiensis*	เกาะสีชัง ชลบุรี

2. **วิธีสกัดเลคติน**

สกัดโปรตีนจากฟองน้ำสดโดยใช้ 0.85% NaCl อัตราส่วนฟองน้ำ (กรัม) ต่อสารละลาย(มล.) เป็น 1: 1 และ 1 : 10 บดให้ละเอียดด้วยครก นำส่วนสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนออกเพื่อใช้ตรวจหาสารโปรตีนเลคตินและทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลชีพ

3. **การต้มสิ่งสกัด**

นำสิ่งสกัดจากฟองน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที และทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาเป็นสิ่งสกัดที่ผ่านการต้ม

4. **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี** Bradford (Bradford, 1976)

การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.02% BSA ชั่ง Bovine serum albumin หนัก 0.2500 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนแล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตร 25.00 มิลลิลิตรเป็นสารละลาย1.0% BSA จากนั้นปิเปต 1.0% BSA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม TBS จนได้ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย Coomassie ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 หนัก 0.025 กรัม ละลายใน 95% เอธานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม 85% กรดฟอสฟอริก 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร สารละลาย Coomassie ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0.02% BSA ปริมาตรต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 เติม 0.01 โมลาร์ TBS จนได้สารละลายโปรตีนปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำมาเขียนกราฟกับปริมาณโปรตีนที่เติมลงไป จะได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

ปิเปตสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปอ่านปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง ตัวอย่างเช่น สารตัวอย่างที่เจือ

จาง 10 เท่า เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.203 นำไปอ่านปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานได้ 34.636 ไมโครกรัม เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างเป็น 34.636 x 10 ไมโครกรัม ใน 500 ไมโครลิตร หรือ 0.693 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร

ตารางที่ 3-2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

หลอด	0.02% BSA (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลาย Coomassie (มล.)	การดูดกลืนแสง ที่ 595 นาโนเมตร	ปริมาณ โปรตีน (ไมโครกรัม)
blank	0	500	5.0	0.000	0
1	50	450	5.0	0.072	10
2	100	400	5.0	0.146	20
3	150	350	5.0	0.212	30
4	200	300	5.0	0.277	40
5	250	250	5.0	0.328	50
6	300	200	5.0	0.377	60
7	350	150	5.0	0.447	70
8	400	100	5.0	0.585	80
9	450	50	5.0	0.585	90
สิ่งสกัด	500	-	5.0	0.598	34.636

5. **การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ**

5.1 การเตรียม 4% เม็ดเลือดแดง

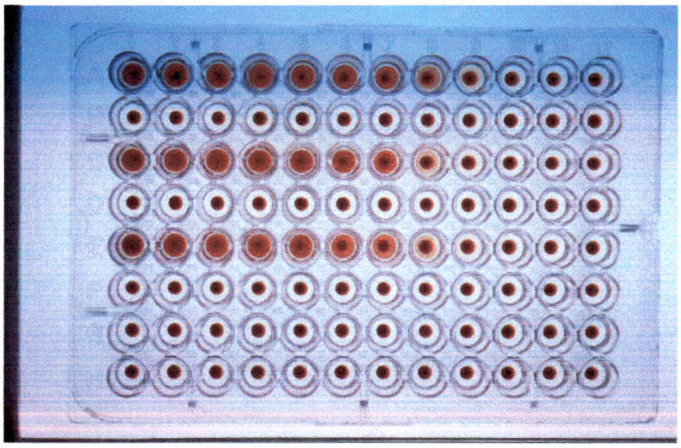
นำเลือดสัตว์ใส่ลงในหลอดเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ประมาณ 4 มิลลิลิตร เติม 0.85% NaCl จนได้ปริมาตรประมาณ 35 มิลลิลิตร ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำเลือดส่วนบนทิ้ง ล้างเม็ดเลือดโดยเติม 0.85% NaCl ให้ได้ปริมาตรประมาณ 35 มิลลิลิตร ลงในตะกอน ผสมเบา ๆ และหมุนเหวี่ยงเหมือนเดิม ล้างเม็ดเลือดแดงดังนี้อีก 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายอ่านปริมาตรของเม็ดเลือดแดงที่ได้ทั้งหมด จากนั้นเติม 0.85% NaCl เพื่อปรับให้ได้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 4% ตัวอย่างเช่น ปริมาตรนอนก้นของเม็ดเลือดแดง 1 มิลลิลิตร ต้องเติม 0.85% NaCl จนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 25 มิลลิลิตร เป็นต้น

การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน

ชั่งเอนไซม์ทริปซินหรือปาเปนหนัก 0.1 กรัม เติมสารละลาย 0.05 M TBS pH 7.4 จนได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ผสมกับเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้ว 9 มิลลิลิตร คนเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นหนีศูนย์เหวี่ยง 3000 รอบต่อนาที ทำเหมือนขั้นตอนการล้างเม็ดเลือด

5.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

การวิเคราะห์ทำในแผ่นไมโครไตเตอร์ (microtiter plate) ชนิด 8X12 หลุม ลักษณะก้นหลุมเป็นรูปตัวยู มีความจุหลุมละ 300 ไมโครลิตร ตามขั้นตอนดังนี้ โดยเติมสารละลาย 0.85% NaCl ลงไปทุกหลุมหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วปิเปตสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่หนึ่งปิเปตสารละลายจากหลุมที่หนึ่งมา 50 ไมโครลิตร ผสมในหลุมที่สอง ปิเปตสารละลายในหลุมที่สองขึ้นมา 50 ไมโครลิตร ผสมในหลุมที่สาม ทำดังนี้เป็นลำดับตั้งแต่หลุมบนซ้ายไปขวา (A1 ถึง B12) และจากบนลงล่างสรุปขณะนี้ทุกหลุมมีเลคตินที่เจือจางต่างกันในปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 24 หลุม จากนั้นเติม 4% เม็ดเลือดแดงลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ทำการทดสอบดังนี้ 3 ชุด แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงสังเกตการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและบันทึกผล หลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงแผ่กระจายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ที่ก้นหลุม ส่วนหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงกองรวมเป็นจุดเล็ก ๆ อยู่กลางก้นหลุม และนับจำนวนหลุมทั้งหมดที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน



ภาพที่ 3-3 ผลการทดสอบความสามารถของสิ่งสกัดจากฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

6. การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยคาร์โบไฮเดรต

6.1 การเตรียมสิ่งสกัดจากฟองน้ำ

นำสิ่งสกัดจากฟองน้ำ ที่ตรวจพบเลคตินทั้งก่อนและหลังการทำไดอะไลซ์ มาวิเคราะห์ความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มในแผ่นไมโครไตเตอร์เพื่อหาค่าไตเตอร์ ของเลคตินที่อยู่ในสิ่งสกัดตามวิธีในข้อ 8.2 ยกเว้นเพิ่มเติมปริมาตรหลังการเจือจางเลคตินเรียบร้อยแล้วโดยเติม TBS ลงในแต่ละหลุมอีก 50 ไมโครลิตร ก่อนเติม 4 % เม็ดเลือดแดงลงไปดังนั้นปริมาตรสุดท้ายของการทดสอบจึงเป็น 150 ไมโครลิตร คำนวนค่าไตเตอร์ของเลคตินบริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำเลคตินบริสุทธิ์มาเจือจางด้วย TBS คิดเป็นจำนวนเท่าเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่าไตเตอร์ที่คำนวนได้ ดังนั้นเลคตินที่ใช้ทดสอบการยับยั้งโดยคาร์โบไฮเดรตจึงมีปริมาตรเท่ากับปริมาณเลคตินที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มในหลุมรองสุดท้าย

6.2 การเตรียมสารละลายน้ำตาล

สารละลายน้ำตาลที่นำมาทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดเตรียมที่ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ได้แก่ N-acetyl-D-galactosamine, L-arabinose, D-fructose, L-fucose, D-galactosamine, D-galactose, D-glucosamine, D-glucose, D-maltose, D-mannose,

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

α-lactose, D-cellobiose และ D-raffinose ตามลำดับ ไกลโคโปรตีนมิวซิน (mucin, type II from porcine stomach (PSM), bovine submaxillary mucin (BSM) และเฟตูอิน (fetuin from fetal calf serum) เตรียมที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์

6.3 การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยคาร์โบไฮเดรต

ปิเปตสารละลาย TBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมแผ่นไมโครไตเตอร์ทุกหลุม จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้ลงในหลุมที่ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และปิเปตสารละลายจากหลุมที่ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่ 3 ทำการเจือจางสิ่งสกัดดังนี้เรื่อยไป แล้วเติมสิ่งสกัดจากฟองน้ำที่เตรียมให้มีค่าไตเตอร์เป็นครึ่งเท่าจากการวิเคราะห์ในข้อ 3.5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม เขย่าแผ่นไมโครไตเตอร์ให้สารละลายผสมกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม 4% เม็ดเลือดแดง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมของแผ่นไมโครไตเตอร์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงอ่านผล ทำดังนี้ 3 ชุด

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ยับยั้งเลคติน ถ้าสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ เมื่อเติมลงในหลุมแรกปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลในหลุมแรกเป็น 0.6 โมลาร์ ดังนั้นเมื่อเติมสารสกัดโปรตีนจากฟองน้ำที่เจือจางปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 4% เม็ดเลือดแดงปริมาตร 50 ไมโครลิตร น้ำตาลมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 มิลลิโมลาร์ หลุมที่ 2, 3, 4,5,..... มีความเข้มข้นของน้ำตาลสุดท้ายเป็น 100, 50, 25, 12.5, ... มิลลิโมลาร์

7. การทดสอบความต้องการโลหะไอออนของเลคตินจากฟองน้ำ

นำสิ่งสกัดจากฟองน้ำปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในถุงไอออะไลซ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือก 13,000 แช่ใน 0.01 M EDTA-Na_2 ใน0.01 M Tris-HCl ที่มี 0.15 M NaCl pH 7.5 (TBS) ปริมาตร 2.5 ลิตร นาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี EDTA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้ทดสอบความต้องการโลหะไอออนของเลคติน โดยทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ชุดทดสอบเติม TBS ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ แมงกานีสคลอไรด์ หรือแมกเนเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นของโลหะไอออนขณะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็น 10 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของเลคตินในชุดทดสอบ ถ้ามากกว่าชุดควบคุมซึ่งมีเฉพาะบัฟเฟอร์แสดงว่าเลคตินต้องการโลหะไอออนดังกล่าวในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Goto และคณะ, 1992)

572.69
ว 752 ก
379184

8. **การทดสอบผลของความร้อนต่อเสถียรภาพของเลคติน**

นำสิ่งสกัดจากฟองน้ำปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวขนาด 1.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 25, 35, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที เมื่อครบกำหนดนำตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

9. **การทดสอบสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียใช้วิธี** colony count

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต

Micrococcus luteus TIRTR No. 884	แกรมบวก
Staphylococus aureus TISTR No.517	แกรมบวก
Pseudomonas aeruginosa TISTR No.1447	แกรมลบ
Vibrio จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา	แกรมลบ

9.1 การทดสอบสารสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

ศึกษาโปรตีนในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเลในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานและแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ ใช้สิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทะเลได้แก่ ฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* (LANT 05), ฟองน้ำ *Haliclona (Reniera)* sp. (LKRK 05), ฟองน้ำ *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02), ฟองน้ำ *Hyrtios erecta* (LNOL 07) และฟองน้ำ*Chondrilla australiensis* (LKRK-14)

การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* โดยสิ่งสกัดโปรตีนเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ 10^6-10^7 CFU/ ml ทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียโดยนำสิ่งสกัดโปรตีนปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์แบคทีเรีย 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชุดควบคุมใช้ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เมื่อครบกำหนดทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรม 10 เท่า แล้วปิเปตตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) เกลี่ยกระจาย บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีใน ชุดทดสอบเปรียบ เทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำเกลือแทนสิ่งสกัด คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{No of colonies (control} - \text{test)} \times 100}{\text{No. of colonies control}}$$

$$\text{Attractive unit} = \frac{\text{No. of colonies control}}{\text{No. of colonies sample}}$$

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

1. การตรวจพบเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ

จากการตรวจหาเลคตินในสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำจำนวน 48 ชนิด โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักฟองน้ำ (กรัม) ต่อสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เป็น 1 : 1 แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเอบี ทั้งในสภาพปกติและที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปนเกาะกลุ่ม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-1 พบว่าสิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่มได้จำนวน 33 ชนิด จากตัวอย่าง 33 ชนิด ได้เลือกสิ่งสกัดจากฟองน้ำที่ให้ค่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงคนในสภาพปกติและสภาพที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือปาเปนแล้วเกาะกลุ่ม และไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ระหว่าง 8-16,384 ไตเตอร์ ได้จำนวน 31 ตัวอย่าง ได้แก่ LANT 04, LANT 05, LANY 03, LNOL 07, LKRK 05,LKRK 09, LKRK 10, LKRK 14, LKRK 18, LKRK 19, LSAB 01, LSAB 02, LSAB 03, LSAB 04, LSAB 06, LSAK 01, LSAK 02, LSAK 03, LSAK 04, LSAK 06, PHIA 07, PKNG 09, PLUM 11, SICA 04, SICA 09, SICA 10, SICA 12, SICB 01, SICB 05 และ SICB 06 (ชื่อวิทยาศาสตร์รวบรวมอยู่ในภาคผนวก)

การทดสอบความสามารถของสิ่งสกัดจากฟองน้ำ LANT 04, LANT 05,LANY 03, LNOL 07, LKRK 05, LSAB 02, LSAK 02, LSAK 03, PHIA 05, PHIA 07, PKNG 09, PKNG 10, PLUM 02, PLUM 11, SICA 04 และ SICA 09 ในการทำให้เม็ดเลือดแดงสัตว์เกาะกลุ่ม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-2 ฟองน้ำ LANT 04, LANT 05 และ LANY 03 สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงสัตว์ทุกชนิดที่ใช้ทดสอบเกาะกลุ่มได้ ฟองน้ำ LNOL 07 ทำให้เม็ดเลือดแดงหมูเกาะกลุ่มได้มากที่สุด 1024 ไตเตอร์ ฟองน้ำ LSAB 02 ทำให้เม็ดเลือดแดงม้าเกาะกลุ่มได้มากที่สุด 4096 ไตเตอร์

ตารางที่ 4- 1 ความสามารถของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารละลายโซเดียมคลอ ไรด์ 1:1) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงปกติ และเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ปาเปนและทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม

ตัวอย่างฟองน้ำ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)											
	A_{normal}	$A_{Trypsin}$	A_{Papain}	B_{normal}	$B_{Trypsin}$	B_{Papain}	O_{normal}	$O_{Trypsin}$	O_{Papain}	AB_{normal}	$AB_{Trypsin}$	AB_{Papain}
LANT 04	512	131072	16384	512	262144	524288	16	128	1024	32	1024	4096
LANT 05	64	128	128	64	2048	32768	16	128	512	16	256	1024
LANT 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LANY 01	0	0	0	2	0	32	0	0	16	0	0	0
LANY 03	16	32	64	32	256	256	64	256	64	32	256	256
LANY 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LNOL 02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LNOL 02	θ	128	2048	512	16384	4096	64	512	4096	2048	32768	66536
LNOL 11	0	2	0	2	2	4	2	0	2	0	0	0
LKRK 01	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys
LKRK 01	0	θ	4	θ	16	θ	128	θ	32	θ	θ	64
LKRK 07	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4
LKRK 09	0	0	0	2	32	64	0	0	0	0	0	0
LKRK 10	32	64	64	16	32	32	8	32	64	2	16	128

ตารางที่ 4-1(ต่อ) ความสามารถของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:1) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงปกติ และเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ปาเปนและทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม

ตัวอย่างฟองน้ำ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)											
	A_{normal}	$A_{Trypsin}$	A_{Papain}	B_{normal}	$B_{Trypsin}$	B_{Papain}	O_{normal}	$O_{Trypsin}$	O_{Papain}	AB_{normal}	$AB_{Trypsin}$	AB_{Papain}
LKRK 14	32	128	512	64	512	512	512	1024	2048	64	128	4096
LKRK 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LKRK 17	lys	Lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys
LKRK 18	0	16	θ	θ	32	128	θ	16	16	θ	128	16
LKRK 19	1024	1024	4096	256	4096	32768	1024	1024	1024	1024	64	4096
LSAB 01	0	0	4	θ	θ	θ	0	4	256	0	2	256
LSAB 02	8	128	256	8	256	1024	128	256	2048	16	512	4096
LSAB 01	32	128	256	32	32	32	32	128	2048	32	128	θ
LSAB 01	16	128	128	16	16384	8192	4	256	4096	128	4096	65536
LSAB 02	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys
LSAB 06	θ	θ	8	16	16	16	16	8	16	θ	16	256
LSAB 07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LSAK 01	2	4	4	32	32	16	32	64	32	16	8	32
LSAK 02	2	64	64	256	256	256	256	256	256	256	256	64

ตารางที่ 4-1(ต่อ) ความสามารถของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:1) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงปกติ และเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ปาเปนและทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม

ตัวอย่างฟองน้ำ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)											
	A_{normal}	$A_{Trypsin}$	A_{Papain}	B_{normal}	B_{Papain}	B_{Papain}	O_{normal}	$O_{Trypsin}$	O_{Papain}	AB_{normal}	$AB_{Trypsin}$	AB_{Papain}
LSAK 03	256	256	256	2048	2048	4096	2048	2048	4096	2048	65536	131072
LSAK 04	0	0	0	4	8	32	8	4	32	2048	16	128
LSAK 05	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys
LSAK 06	32	32	32	32	64	64	2	64	32	128	32	128
PHIA 05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHIA 07	8	32	32	4	64	64	2	16	64	4	16	32
PKNG09	32	64	8	32	128	128	16	64	64	4	16	32
PKNG10	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys	lys
PLUM02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLUM11	64	64	4096	32	4096	32	16	32	512	32	32	4096
SICA 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SICA 04	256	32	256	32	32	64	16	32	64	8	32	64
SICA 07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SICA 09	16	64	128	64	256	128	32	128	128	32	32	32
SICA 10	8	4	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16

ตารางที่ 4-1(ต่อ) ความสามารถของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:1) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงปกติ และเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ป่าเปนและทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม

ตัวอย่างฟองน้ำ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)											
	A_{normal}	$A_{Trypsin}$	A_{Papain}	A_{normal}	$A_{Trypsin}$	B_{Papain}	O_{normal}	$O_{Trypsin}$	O_{Papain}	AB_{normal}	$AB_{Trypsin}$	AB_{Papain}
SICA 12	0	0	0	0	4	16	0	0	0	0	8	8
SICB 01	2	0	16	4	16	32	2	4	16	16	8	16
SICB 03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SICB 05	2	0	0	0	0	4	4	8	8	4	8	0
SICB 06	2	8	8	2	0	8	2	8	8	2	8	8

ตารางที่ 4-2 ความสามารถของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:10) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงสัตว์เกาะกลุ่ม

ตัวอย่างฟองน้ำ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)									
	rat	mouse	chicken	goose	rabbit	sheep	pig	dog	horse	guinea pig
LANT 04	32	32	8	64	32	32	128	8	128	16
LANT 04	2	4	2	4	8	16	8	4	256	2
LANY03	16	32	8	4	4	8	8	4	8	16
LNOL 07	128	8	0	0	8	2	1024	8	256	0
LSAB 02	0	0	0	2	16	0	32	8	4096	8
LSAK 02	0	0	0	0	4	0	64	0	2	0
LSAK 03	8	4	64	32	16	16	32	16	128	0
PLUM02	8	0	0	0	0	0	0	0	4	0
PLUM11	64	16	0	0	16	0	4	0	0	2
PHIA 05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHIA 05	0	0	2	64	8	8	0	0	0	0
PKNG 09	16	0	0	0	8	0	0	0	0	0
PKNG10	lys	0	lys	lys	0	lys	0	0	0	lys
SICA 09	0	0	0	0	16	2	0	0	4	0

2. **เสถียรภาพของเลคตินที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส**

เมื่อนำสิ่งสกัดฟองน้ำที่ตรวจพบเลคตินแล้วไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-3 พบว่าสิ่งสกัดจากฟองน้ำหลายชนิดยังคงทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ ยกเว้นสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 10 ชนิด ได้แก่LANY 03, LKRK 10, LNOL 07, LSAB 02, LSAB 03,LSAB 04, LSAB 06, LSAK 05, LSAK 06 และ SICA 04 ที่โปรตีนถูกทำให้เสียสภาพจึงไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ สำหรับ LANT 05 และ LSAK 03 สิ่งสกัดที่ต้มแล้วสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ 4 ไตเตอร์ ส่วน LANT 04, LKRK 14 และ LKRK 19 ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มก่อนต้มมีค่าไตเตอร์สูง เมื่อผ่านการต้มแล้วสิ่งสกัดยังคงทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ ดังนั้นจากสิ่งสกัดฟองน้ำ 48 ตัวอย่าง ทำการคัดเลือกฟองน้ำที่ให้ค่าไตเตอร์สูงและมีปริมาณฟองน้ำในธรรมชาติมากเพียงพอสำหรับการสกัดโปรตีนเพื่อศึกษาการยับยั้งจุลชีพและการทำให้เลคตินบริสุทธิ์ต่อไป ได้ 8 ชนิด 10 ตัวอย่าง ได้แก่ *Halisarca ectofibrosa* (LANT 04), *Spheciospongia congenera* (LANT 05), *Spirastrellla solida* (LANY 03), *Haliclona (Reniera) sp.*(LKRK 05), *Chondrilla australiensis* (LKRK 14), *Spheciospongia congenera* (LKRK 19), *Hyrtios erecta* (LNOL 07), *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02), *Suberea praetensa* (LSAB 03) และ *Chondrilla australiensis* (SICA 04)

การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินจากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* (LNOL 07), *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02) และ *Chondrilla australiensis* (SICA 04) โดยใช้ค่า Specific activity มีค่าเป็น1965,1932 และ12049 ไตเตอร์/มก.โปรตีน แสดงว่าสิ่งสกัดจาก *H. erecta* (LNOL 07) มีปริมาณเลคตินมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4-4

3. **ความจำเพาะต่อหมู่เลือดของเลคติน**

จากการนำสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 10 ตัวอย่างที่ตรวจพบเลคติน ได้แก่ *Halisarca ectofibrosa* (LANT 04), *Spheciospongia congenera* (LANT 05), *Spirastrellla solida* (LANY 03), *Haliclona (Reniera) sp.*(LKRK 05), *Chondrilla australiensis* (LKRK 14), *Spheciospongia congenera* (LKRK 19), *Hyrtios erecta* (LNOL 07), *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02), *Suberea praetensa* (LSAB 03) และ *Chondrilla australiensis* (SICA 04) เปรียบเทียบความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่ เอ บี โอ และเอบีในสภาพธรรมชาติเกาะกลุ่ม พบว่าเลคตินจากฟองน้ำเกือบทุกชนิดทำให้เม็ดเลือดแดงทั้ง 3 หมู่เกาะกลุ่มได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน แสดงว่าเลคตินจากฟองน้ำดังกล่าวไม่มี

ความจำเพาะต่อหมู่เลือด ดังแสดงในตารางที่ 4-5 เช่นเดียวกันการทดลองของ Miaron and Fresno(2000) ที่ศึกษาฟองน้ำ 22 ชนิด 12 วงศ์ พบว่ามีสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 5 ชนิด ทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่มแบบไม่จำเพาะเจาะจง

4. เลคตินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์

จากการนำสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 10 ตัวอย่างทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเอบีที่ปรับปรุงด้วยทริปซินและปาเปน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-5 สิ่งสกัดส่วนใหญ่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์แล้วเกาะกลุ่มได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดในสภาพธรรมชาติ ฟองน้ำ *S. congenera* (LKRK19) ทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอในสภาพปกติเกาะกลุ่มมากที่สุดคือ 1024 ไตเตอร์ ฟองน้ำ *H. ectofibrosa* (LANT 04) ทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปนแล้วเกาะกลุ่มมากที่สุด คือ 131,072 และ 16,384 ไตเตอร์ รวมทั้งเม็ดเลือดแดงคนหมู่บีในสภาพที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปนแล้วเกาะกลุ่มมากที่สุด คือ 262144 และ 524288 ไตเตอร์ และฟองน้ำ *H. erecta* (LNOL 07) ทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอบีในสภาพที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปนแล้วเกาะกลุ่มมากที่สุด คือ 32768 และ66536 ไตเตอร์

ตารางที่ 4-3 เสถียรภาพของเลคตินจากฟองน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างฟองน้ำ	ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ปาเปนแล้วเกาะกลุ่ม(ไตเตอร์)	
	ก่อนต้ม	ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที
Halisarca ectofibrosa (LANT 04)	16384	32
Spheciospongia congenera (LANT 05)	128	4
Spirastrella solida (LANY 03)	64	[illegible]
Haliclona (Reniera) sp.(LKRK 05)	4	0
Chondrilla australiensis (LKRK 14)	512	32
Spheciospongia congenera (LKRK19)	4096	128
Hyrtios erecta (LNOL 07)	2048	0
Callyspongia (Euplacella) joubini (LSAB 02)	256	0
Suberea praetensa (LSAB 03)	256	[illegible]
Chondrilla australiensis (SICA 04)	256	0

ตารางที่ 4-4 ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ

ตัวอย่างฟองน้ำ	ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม			ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	Specific activity (ไตเตอร์/มก.)
	หลุม	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.		
Hyrtios erecta (LNOL 07)	6	64	1280	0.6511	1965
Callyspongia (Euplacella) joubini (LSAB 02)	3	8	160	0.0828	1932
Chondrilla australiensis (SICA 04)	8	256	5120	0.4249	12049

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ไตเตอร์/มล.)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)}}$$

ตารางที่ 4-5 ความสามารถของเลคตินในสิ่งสกัดฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:10) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนในสภาพปกติและเม็ดเลือดแดงคนในสภาพที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ปาเปน และทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม

ตัวอย่างฟองน้ำ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)											
	A_n	A_T	A_P	B_n	B_T	B_P	O_n	O_T	O_P	AB_n	AB_T	AB_P
Halisarca ectofibrosa (LANT 04)	512	131072	16384	512	262144	524288	16	128	1024	32	1024	4096
Spheciospongia congenera (LANT 05)	64	128	128	64	2048	32768	16	128	512	16	256	1024
Spirastrellla solida (LANY 03)	16	32	64	32	256	256	64	256	64	32	256	256
Chondrilla australiensis (LKRK 14)	32	128	512	64	512	512	512	1024	2048	64	128	4096
Spheciospongia congenera (LKRK19)	1024	1024	4096	256	4096	32768	1024	1024	1024	1024	64	4096
Hyrtios erecta (LNOL 07)	8	128	2048	512	16384	4096	64	512	4096	2048	32768	66536
Callyspongia (Euplacella) joubini (LSAB 02)	8	128	256	8	256	1024	128	256	2048	16	512	4096
Suberea praetensa (LSAB 03)	32	128	256	32	32	32	32	128	2048	32	128	8
Chondrilla australiensis (SICA 04)	256	32	256	32	32	64	16	32	64	8	32	64

n คือ เม็ดเลือดแดงธรรมชาติ t คือ เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้ว p คือ เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ปาเปนแล้ว

5. ความจำเพาะต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรต

ในการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่จับจำเพาะกับเลคตินจะทดสอบโดยความสามารถในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยเลคติน (Hemagglutiniation inhibition) เนื่องจากเลคตินและคาร์โบไฮเดรตจับกันด้วยแรงอย่างอ่อนและการจับนั้นสามารถผันกลับได้ จึงเหมือนการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดีหรือการจับของเอนไซม์กับตัวยับยั้ง ดังนั้นคาร์โบไฮเดรตที่ยับยั้งการทำงานของเลคตินได้โดยใช้ความเข้มข้นต่ำสุดจะมีความจำเพาะต่อเลคตินสูงที่สุดจึงน่าจะเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดเดียวกับที่อยู่ในบริเวณจับของเลคติน โดยในการทดสอบความจำเพาะต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรตจะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดียว โมเลกุลคู่ และไกลโคโปรตีน ประมาณ 25 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-6 พบว่าความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคตินจากฟองน้ำ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S. congenera* (LANT 05), *H. erecta* (LNOL 07), *C. (Euplacella) joubini* (LSAB 02) และ *C. australiensis* (SICA 04) ถูกยับยั้งได้ด้วย PSM, fetuin และ BSM ซึ่งทั้งหมดเป็นไกลโคโปรตีน จากตารางจะพบว่า ฟองน้ำ *S. congenera* (LANT 05) ถูกยับยั้งด้วย BSM มากที่สุดที่ความเข้มข้น 6.35×10^{-7} mg/ml ฟองน้ำ *H. erecta* (LNOL 07) ยับยั้งได้ด้วย PSM มากที่สุดคือ 1.01×10^{-5}(mg/ml) ฟองน้ำ *C. (Euplacella) joubini* (LSAB 02) ยับยั้งได้ด้วย BSM, PSM มากที่สุดคือ 4.06×10^{-5} (mg/ml) และฟองน้ำ *C. australiensis* (SICA 04) ยับยังได้ด้วย PSM มากที่สุดคือ 2.54×10^{-6} (mg/ml)

ตารางที่ 4-6 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินจากฟองน้ำ

	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม (mM)			
Sugar and glycoprotein	LANT 05	LNOL 07	LSAB 02	SICA 04
Sugar				
1.2 M D-fructose	0	0	0	0
1.2 M D-Ribose	0	0	0	0
1.2 M D-Xylose	0	0	0	0
1.2 M L-Arabinose	0	200	0	0
1.2 M D-Galactose	0	0	0	0
1.2 M D-Glucose	200	0	0	0
1.2 M D-Mannose	0	0	100	0
1.2 M D-Rhamnose	0	0	0	0
1.2 M L-Fucose	0.006	200	0	100
1.2 M D-Sorbitol	0	0	0	0
1.2 M D-Galactosamine	0	50	0	0
1.2 M D-Glucosamine	0.006	50	0	200
1.2 M N-Acetyl-D-galactosamine	0.006	0	0	0
0.8 M N-Acetyl-D-glucosamine	0	0	0	0
1.2 M α-Methyl-D-mannopyranoside	25	0	0	100
0.33 M D-Cellobiose	0	0	0	0
0.5 M α-Lactose	200	0	0	2.6
1.2 M D-Maltose	0	100	0	0
1.2 M D-Melibiose	0	50	0	200
1.2 M Sucrose	0	0	0	0
0.21 M D-Raffinose	0	0	0	0
Glycoproteins (mg/ml)				
0.25% PSM (Mucin type II from porcine stomach)	1.62×10^{-4}	1.01×10^{-5}	4.06×10^{-5}	2.54×10^{-6}
0.25% Fetuin (from fetal calf serum)	2.03×10^{-5}	0.0625	8.12×10^{-5}	8.12×10^{-5}
0.125% BSM (Bovine submaxillary mucin)	6.35×10^{-7}	8.125×10^{-5}	4.06×10^{-5}	8.12×10^{-5}

6. ผลของโลหะไอออนต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคติน

เนื่องจากเลคตินที่ได้มีการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลแล้ว พบว่ามีโลหะไอออนเป็นส่วนประกอบของโมเลกุล โลหะไอออนเหล่านี้ทำหน้าที่สำคัญในการจับของเลคตินกับคาร์โบไฮเดรต และช่วยรักษาโครงสร้างตติยภูมิของเลคตินให้คงรูปอยู่เสมอ โลหะไอออนเหล่านี้ได้แก่ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} และ Cu^{2+} ตัวอย่างของเลคตินที่ต้องการโลหะไอออนได้แก่เลคตินจากถั่วแจ็ค ซึ่งในหนึ่งหน่วยย่อยมี Ca^{2+} และ Mn^{2+} อยู่อย่างละ 1 ไอออน เลคตินจากฟองน้ำ *Halichondria panicea* ต้องการ Ca^{2+} เพื่อช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ดีขึ้น (Kamiya, 1990) ดังนั้นการเติมโลหะไอออนลงในสิ่งสกัดจากฟองน้ำอาจช่วยเพิ่มความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ดีขึ้น

การเติมโลหะไอออน 3 ชนิด คือ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ลงในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 3 ชนิด แสดงในตารางที่ 4-7 พบว่าฟองน้ำ *Hyrtios erecta* (LNOL 07) ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มมากขึ้น เมื่อมีโลหะแมกนีเซียม สำหรับฟองน้ำ *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02) และ *Chondrilla australiensis* (SICA 04) ไม่ต้องการโลหะไอออนช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ซึ่งในการทดลองของ Pajic และคณะ (2002) พบว่าเลคตินจากฟองน้ำ *Haliclona cratera* ไม่ต้องการโลหะไอออนช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

ตารางที่ 4-7 ผลของโลหะไอออนต่อความสามารถของเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ เพื่อช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

สิ่งสกัดจากฟองน้ำ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)			
	ชุดควบคุม	$MnCl_2$	$CaCl_2$	$MgCl_2$
Hyrtios erecta (LNOL 07)	64	128	128	512
Callyspongia (Euplacella) joubini (LSAB 02)	64	64	64	64
Chondrilla australiensis (SICA 04)	256	256	256	256

7. เสถียรภาพของเลคตินที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การนำสิ่งสกัดจากฟองน้ำ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25 35 50 60 70 80 90 และ100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-8 พบว่าเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ *Hyrtios erecta*, สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส การทำงานเริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ฟองน้ำ*Callyspongia (Euplacella)* joubini สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส การทำงานเริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ *Chondrilla australiensis* สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ดีที่อุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส การทำงานเริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยในการทดลองของ Xiong และคณะ (2005) พบว่าเลคตินจากฟองน้ำ *Craniella australiensis* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4-8 ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเลคตินจากสิ่งสกัดฟองน้ำ (อัตราส่วนฟองน้ำ : สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:1) ที่อุณหภูมิต่างๆกัน บันทึกผลเป็นไตเตอร์

สิ่งสกัดจากฟองน้ำ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)							
	25	35	50	60	70	80	90	100
Hyrtios erecta (LNOL 07)	64	64	64	32	0	0	0	0
Callyspongia (Euplacella) joubini (LSAB 02)	256	256	0	2	2	0	0	0
Chondrilla australiensis (SICA 04)	256	512	256	128	128	4	2	0

8. **ความสามารถของสิ่งสกัดโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่ม**

ในการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม โดยทดสอบกับเม็ดเลือดแดงคนหมู่ เอ บี โอ และเอบี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4-9 พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทุกชนิดไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่มได้

ตารางที่ 4-9 ความสามารถของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่ม

ตัวอย่าง	ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ไตเตอร์)			
	A	B	O	AB
ฟองน้ำLKRK-05	0	4	128	2
เชื้อLKRK05-1	0	0	0	0
เชื้อLKRK05-2	0	0	0	0
ฟองน้ำLANT-05	64	64	16	16
เชื้อLANT05-2	0	0	0	0
เชื้อLANT05-3	0	0	0	0
เชื้อLANT05-4	0	0	0	0
เชื้อLANT05-5	0	0	0	0
ฟองน้ำLNOL-07	8	512	32	2048
เชื้อLNOL07-2	0	0	0	0
เชื้อLNOL07-3	0	0	0	0
เชื้อLNOL07-7	0	0	0	0
ฟองน้ำLSAB-02	8	8	128	16
เชื้อLSAB02-1	0	0	0	0
เชื้อLSAB02-4	0	0	0	0

9. ความสามารถของสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

จากการศึกษาความสามารถของโปรตีนในสิ่งสกัดจากฟองน้ำต่อการมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococus aureus* , *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Vibrio alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. mimicus*,*V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* จากนั้นนับจำนวนโคโลนีมาคำนวณค่า Attractive unit และค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (% inhibition) ได้ผลการทดลองดังดังตารางที่ 4-10

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทั้ง 5 ชนิด พบว่า

ฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* (LANT 05) สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 3-91และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 9-69

ฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. (LKRK 05) สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 16-99 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 42-83

ฟองน้ำ *Collyspongia* (*Euplacella*) *joubini* (LSAB 02) สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 52-77 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 34-38

ฟองน้ำ *Hyrtios erecta* (LNOL 07) สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 29-76 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 26-43

ฟองน้ำ *Chondrilla australiensis* (SICA 04` สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 0-68 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 41-80

ฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. สามรถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 16-99 ซึ่ง

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* (LANT 05) และ *Collyspongia* (*Euplacella*) *joubini* (LSAB 02) สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4-10 ผลการทดสอบฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

ฟองน้ำ / แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	% Inhibition				
	Spheciospongia congenera	*Haliclona* (*Reniera*) sp.	*Callyspongia* (*Euplacella*) *joubini*	*Hyrtios erecta*	*Chondrilla australiensis*
V. alginolyticus	85	98	77	59	66
V. cholerae	3	41	54	76	55
V. fluvialis	91	16	76	71	52
V. harveyi	75	81	50	53	68
V. mimicus	58	32	49	29	0
V. parahaemolyticus	56	99	52	57	57
P. aeruginosa	9	42	34	43	46
M. luteus	65	82	38	26	41
S. aureus	69	83	35	43	80
ปริมาณโปรตีนที่ใช้ทดสอบ (ไมโครกรัม)	12.78	24.39	6.62	52.09	33.99

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

1. จากการตรวจหาเลคตินในสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำจำนวน 48 ชนิด โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักฟองน้ำ (กรัม) ต่อสารละลาย0.85% โซเดียมคลอไรด์ เป็น 1 : 1 พบว่าสิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนและสัตว์เกาะกลุ่มได้จำนวน 33 ชนิด จากตัวอย่าง 33 ชนิด ได้เลือกสิ่งสกัดจากฟองน้ำที่ให้ค่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงคนในสภาพปกติและสภาพที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือปาเปนแล้วเกาะกลุ่มระหว่าง 8 – 16,384 ไตเตอร์ และไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เมื่อนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสิ่งสกัดจากฟองน้ำหลายชนิดยังคงทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ ยกเว้นสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 10 ชนิด ได้แก่ LANY 03, LKRK 10, LNOL 07, LSAB 02, LSAB 03,LSAB 04, LSAB 06, LSAK 05, LSAK 06 และ SICA 04 ที่โปรตีนถูกทำให้เสียสภาพจึงไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ สำหรับ LANT 05 และ LSAK 03 สิ่งสกัดที่ต้มแล้วสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ 4 ไตเตอร์ ดังนั้นจากฟองน้ำ 10 ชนิด ดังกล่าวจึงคัดเลือกฟองน้ำที่ให้ค่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในระดับสูงและมีปริมาณของฟองน้ำจากธรรมชาติมากเพียงพอสำหรับการใช้สกัดโปรตีนเพื่อแยกเลคตินให้บริสุทธิ์และศึกษาการยับยั้งจุลชีพต่อไป ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Spheciospongia congenera* (LANT 05), *Haliclona (Reniera)*sp.(LKRK 05), *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02) ,*Hyrtios erecta* (LNOL 07) และ *Chondrilla australiensis* (SICA 04)

2. การวิเคราะห์ชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่จับจำเพาะกับเลคตินที่สกัดจากฟองน้ำใช้มอนอแซคคาร์ไรด์ ออลิโกแซคคาร์ไรด์ และไกลโคโปรตีน พบว่าเลคตินจากฟองน้ำ LANT 05, LNOL 07, LSAB 02, และ SICA 04 มีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนมิวซินชนิด porcine stomach mucin และ bovine submaxiilary mucin และเฟตูอิน มากกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมเลกุลคู่

3. เลคตินจากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* (LNOL 07) ต้องการแมกเนเซียมไอออนเพื่อช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ดีขึ้น ส่วน *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02) และ *Chondrilla australiensis* (SICA 04) ไม่ต้องการโลหะไอออนเพื่อช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

4. เลคตินจากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* (LNOL 07) และ *Chondrilla australiensis* (SICA 04) สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มลดลงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วน *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02) สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มลดลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5. การตรวจหาเลคตินจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ LKRK 05, LANT 05, LNOL 07 และ LSAB 02 โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ 5 สายพันธุ์เลี้ยงในอาหารเหลว marine medium แล้วแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำน้ำเลี้ยงทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงคนในสภาพปกติ พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทุกชนิดดังกล่าวไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่มได้

6. การทดสอบการมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำกลุ่มวิบริโอ ได้แก่ *Vibrio alginolyticus, V. cholerae, V. fluvialis, V. harveyi, V. mimicus, V. parahaemolyticus* และเชื้อมาตรฐาน *Micrococus luteus, Staphylococus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าสิ่งสกัดจากฟองน้ำที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ดี 3 อันดับแรกได้แก่ *Spheciospongia congenera* (LANT 05) สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 3-85 เมื่อใช้ปริมาณโปรตีน 12.78 ไมโครกรัม *Haliclona (Reniera)*sp.(LKRK 05) สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 16-99 เมื่อใช้ปริมาณโปรตีน 24.39 ไมโครกรัม *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB 02) สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 49-77 เมื่อใช้ปริมาณโปรตีน 6.62 ไมโครกรัม

7. การทดสอบการมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *Staphylococus aureus Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าฟองน้ำ *Spheciospongia congenera, Haliclona (Reniera)*sp., และ *Callyspongia (Euplacella) joubini* สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococus aureus* ได้ดีที่สุดร้อยละ 35-83

ข้อเสนอแนะ

1. จากการสำรวจหาโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพจากสิ่งสกัดฟองน้ำได้เลือกตรวจหาเลคติน พบว่าฟองน้ำหลายชนิดมีเลคตินในปริมาณสูงมาก และโปรตีนในสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำและในคน ดังนั้นจะได้ทำการแยกเลคตินจากฟองน้ำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของเลคตินในการยับยั้งแบคทีเรีย

จากคุณสมบัติของเลคตินที่พบในฟองน้ำที่มีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีน ดังนั้นการแยกเลคตินให้บริสุทธิ์เลือกใช้วิธีโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ

2. การตรวจหาเลคตินจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำไม่พบเลคติน การศึกษาในเบื้องต้นนี้ไม่ได้ทดสอบกับเม็ดเลือดแดงคนที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ เนื่องจากตรวจหาเลคตินที่ต้องใช้เม็ดเลือดที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ มีความสิ้นเปลืองเอนไซม์และใช้เวลาในการเตรียมเม็ดเลือดมากขึ้น การพยายามแยกเลคตินจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำจึงยังไม่น่าสนใจในขณะนี้ นอกจากจะพบว่าโปรตีนบริสุทธิ์จากแบคทีเรียมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในระดับที่มากพอและต้องการทราบว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นเลคตินหรือไม่

ดังนั้นสำหรับแบคที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำที่ตรวจพบว่าโปรตีนมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำและในคน จะแยกโปรตีนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และเจลฟิลเตรชัน จากนั้นจึงนำโปรตีนที่แยกได้ทดสอบการมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

3. เนื่องจากการเก็บฟองน้ำเพื่อตรวจหาเลคตินไม่ได้เก็บฟองน้ำมาในปริมาณมาก ฟองน้ำบางชนิดเป็นฟองน้ำเคลือบหิน การตรวจสอบคุณสมบัติบางอย่างของเลคตินจากฟองน้ำบางชนิดจึงไม่สมบูรณ์ เมื่อทำการคัดเลือกฟองน้ำที่น่าสนใจเพื่อศึกษาต่อจะได้ตรวจสอบคุณสมบัติที่สำคัญของเลคตินอีกครั้ง

บรรณานุกรม

งามจิต วังศรี. (2547). *สมบัติบางประการของเลคตินปะการังอ่อน*. ชลบุรี: สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สิรินุช จินตสุนทรจุไร และสุเมตต์ ปุจฉาการ. (2544). บทคัดย่อ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิดในจังหวัดชลบุรี การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27 หน้า 464.

เทียมจิต ไชยชนะ. (2543). *การศึกษาเลคตินในปะการังอ่อนจากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย*. ชลบุรี: สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ธนากร บุญโพธิ์ทอง (2535) การปรับปรุงกระบวนการทำเลคตินจากเมล็ดคำบูชา (*Crotalaria juncia*)ให้บริสุทธิ์และการใช้เลคติน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 92 หน้า.

เนื้อทิพย์ ดำรงไชย (2541) การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเมือกหอยทากยักษ์, *Achatina fulica* Bowdich 1822 วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น 81 หน้า.

มาลิน จุลศิริ (2540) ยาต้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐาน และการประยุกต์ โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน กรุงเทพฯ, 209 หน้า.

ยุพิน สังวรินทะ และคณะ (2543) เภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ, 719 หน้า.

บพิธ จารุพันธุ์ และนันทาพร จารุพันธุ์. (2545). *สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง II โพรโทซัว ถึง ทาร์ดิกราดา*. กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สัมฤทธิ์ ภู่รุ่งเรือง.(2532). การศึกษาเลคตินในพืชบางชนิดในภาคเหนือของประเทศไทย.การค้นคว้าแบบอิสระเชิงวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.108 หน้า

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. (2532). *สัตว์ชายฝั่งทะเลไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: แพร่พิทยา.

อู่แก้ว ประกอบไวทยกิจ บีเวอร์. (2534). บทคัดย่อ เลคตินในหอยบางชนิด การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17 หน้า 506.

Alexander, A.B., Bulgakov, A.A., Kyung-Il, P., Kwang-Sik, C., Hee-Kyoung, L., and Moonjae C. (2004). Purification and characterization of a lectin isolate from Manila clam *Ruditapes philippinarum* in. Korea. *Fish & Shllfish Immunology*. 16: 487-489.

Bernan, V.S., Roll, D.M., Iveland, C.M., Greenstein, M., Maiese, W.M., and steinberg, D.A. (1993). A study on the mechanism of action of sceptrin, an antimicrobial agent isolated from the south pacific sponge *Agelas mauritiana J. Antimicrob. Chemother*. 32 : 539 - 550.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitivemethod for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal.Biochem*. 72: 248-254.

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Momsigny, M., Osawa,T. and Sharon, N. (1980). What should be call a lectin. *Nature*. 285: 66.

Goto, R., K. Muramoto, M. Yamazaki and H. Kamiya. 1992. Purification and characterization of an agglutination of the soft coral *Sinularia* species. *Dev. Comp. Immunol*. 16: 9-17.

Kamiya, H., Koji, M., Takaharu, H., Masatoshi, Y., and Uday., R. (1986). A haemagglutinin in Sponge *Phyllospongia foliascens*:Isolation and Characterization. 52:12.

Lis, H. and Sharon, N. (1973) The Biochemistry of Plant Lectins (Phytohemagglutinins), *Ann. Rev. Biochem*. 42, 541-574.

Pajic, I., Zoran, K., Nikola, D., Dusan, S., Zorica, J., and Miroslav, J.G. (2002). A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comp. Biochem. Physiol* . 132:213-221.

Jayatilake, G.,S., Thornton, M.P., Leonard, A.C., Grim wade, J.E. and Baker, B.J. (1996) Metabolites from an Antartic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Natural Product*. 59 : 293 - 296.

Kocourek, J. and Herejsi, V. (1981). Defining a lectin. *Nature*. 290: 188.

Liener, J.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J. (1986). The lectin: Properties, function and applications in biology and medicine, Academic press, *Oriando*. 35-360.

Maki, J.S. and Mitchell, R. (1986). The function of lectin in interactions among marine bacteria, invertebrates, and algae. In Mirelman, D. ed. *Microbial lectins and agglutinins.* John Wiley and Sons, Inc. U. S. A.

Oclarit, M.J., Ohta, S., Kamimura, K., Yamacka, Y. and Ikegami, S. (1994) Production of an antibacterial agent, O-Aminophenol, by bacterium isolated from the marine sponges *Adosia* sp. *Fisheries Science.* 60 : 559 - 562.

Olafsen, J. A. 1988. Role of lectin in invertebrate humoral defense. *Am. Fish.Soc. Spec. Publ.* 18: 189-205.

Rajagopalan, M., Periasamy, M. and Manusamy, A. (2002). Isolation and Characterization of an acetyl group-recognizing agglutinin from the serum of the Indian White shrimp Fenneropenaeus indicus. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 402(2002). 65-67.

Sharon, N. and Lis, H. (1972) Lectin-Cell Agglutinating and Sugar Specificic Protein, *Science* 177, 949-959.

Sharon, N. (1977). Lectins . *American Scientist.* 236: 108-119.

Singh, R.S., Tiwary, A.K. and Kenedy, I.F. (1999). Lectin : sources , activities and application. *Critical Reviews In Biotechnology.* 19(2) : 145-178.

Stierle, A.c., Cardellina, J.H. and Singleton, F.L. (1988) A marine Micrococcus produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis* Experimentia. 44 : 1021.

Vasta, G. R. 1991. The multiple biological roles of invertrbrate lectins: Their participation in nonself recognition mechanisms, pp. 73-101. *In* warr, G. W. and Cohen, N. eds. The phylogenesis of immune functions. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Xiong. C., Wei Li., Han Liu., Wei Zhang., Jiangli Dou., Xuefang Bai., Yuguang Du and Xiaojun Ma.(2006). A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis . Comp. Biochem. Physiol Part C Toxicol Phamacol.* 143 (1) : 9-16.

http://gened.emc.maricopa.edu/bio/BIO181/BIOBK/BioBookDiversity_7.html, วันที่ค้นข้อมูล 25 มกราคม 2549.

www. Enchantedlearning. Com,วันที่ค้นข้อมูล 25 มกราคม 2549.

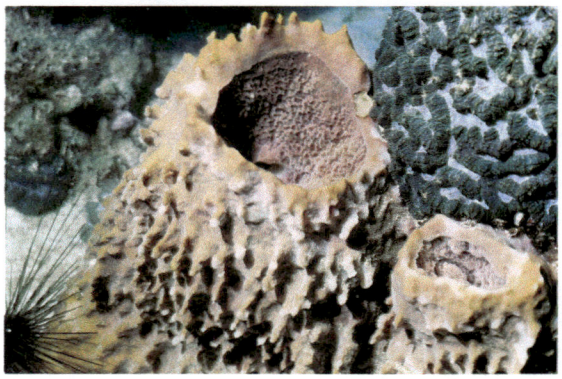
ภาคผนวก

รายชื่อฟองน้ำที่ใช้ในงานวิจัย (เพิ่มเติม)

รายชื่อตัวอย่างฟองน้ำในชุดโครงการสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทย

Field code	BIMScode	Common name	Class	Order	Family	Genus	species
SICA-07		ฟองน้ำเชือก	Demospongiae	Poecilosclerida	Microcionidae	Clathria (Thalysias)	reinwardti Vosmer, 1880
SICA-09		ฟองน้ำเคลือบแข็งสีฟ้า	Demospongiae	Haplosclerida	Niphatidae	Gelliodes	petrosioides Dendy, 1905
LANT-15		ฟองน้ำเชือก	Demospongiae	Poecilosclerida	Microcionidae	Clathria (Thalysias)	reinwardti Vosmer, 1880
LANY-01		ฟองน้ำท่อสีน้ำเงินลาย	Demospongiae	Poecilosclerida	Mycalidae	Mycale	sp.
LANY-14		ฟองน้ำครก	Demospongiae	Haplosclerida	Petrosiidae	Xestospongia	testudinaria (Lamarck, 1814)
LNOL-02		ฟองน้ำครก	Demospongiae	Haplosclerida	Petrosiidae	Xestospongia	testudinaria (Lamarck, 1814)
LNOL-11		ฟองน้ำเคลือบบางสีน้ำเงิน	Demospongiae	Hadromerida	Suberitidae	Terpios	granulosa Bergquist, 1967
LSAB-07		ฟองน้ำสีชมพู	Demospongiae	Poecilosclerida	Mycalidae	Mycale (Carmia)	sp.
LSAK-04		ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง	Demospongiae	Haplosclerida	Petrosiidae	Xestpspongia	sp. new
LSAK-05		ฟองน้ำฝังตัวสีแดง	Demospongiae	Poecilosclerida	Mycalidae	Mycale (Aegogropila)	grandis Gray, 1867
PHIA-05		ฟองน้ำครก	Demospongiae	Haplosclerida	Petrosiidae	Xestospongia	testudinaria (Lamarck, 1814)
PHIA-07		ฟองน้ำฝังตัวสีน้ำตาล	Demospongiae	Poecilosclerida	Desmacellidae	Biemna	fortis (Topsent, 1897)
PKNG-09		ฟองน้ำถูตัวสีดำ	Demospongiae	Dictyoceratida	Spongiidae	Spongia	sp.
PKNG-11		ฟองน้ำเคลือบบางใส	Demospongiae	Poecilosclerida	Hymedesmiidae	Phobas	arborescens (Ridley, 1884)
PLUM-11		ฟองน้ำสีขาว	Demospongiae	Halichondrida	Halichondriidae	Amorphenopsis	siamensis (Topsent, 1925)

ฟองน้ำท่อสีน้ำเงินลาย LANY 01

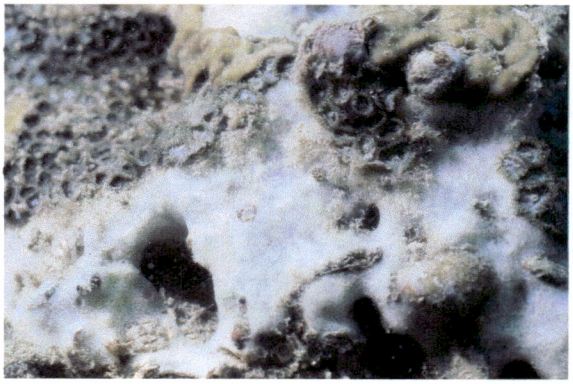


ฟองน้ำครก LNOL 02

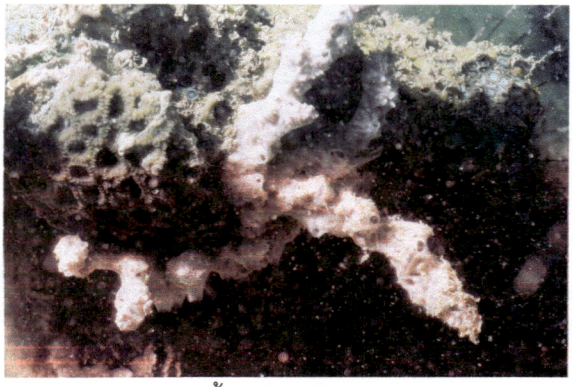
ฟองน้ำเคลือบบางสีน้ำเงิน LNOL 11

ฟองน้ำครก PHIA 05

ฟองน้ำถูตัวสีดำ PKNG 09



ฟองน้ำเคลือบสีขาว PLUM11



ฟองน้ำเชือก SICA 07

ฟองน้ำเคลือบแข็งสีฟ้า SICA 09

การเตรียมอาหาร Tryptic Soy Broth

Bacto-Torptone	17 กรัม
Bacto-Soytone	3 กรัม
Glucose	2.5 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม
Dipotassium phosphate	2 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น7.3± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหาร Tryptic Soy Agar

Bacto-Torptone	15 กรัม
Bacto-Soytone	5 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม
Bacto-Agar	15 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น7.3± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหาร Modified Zobell

Proteose peptone	1 กรัม
Yeast extract	1 กรัม
Phytone(BBL)	0.5 กรัม
Sod Thiosulfate	0.2 กรัม
Sod Sulfite	0.05 กรัม
Fe-citrate 2%	1 มิลลิลิตร
Agar	15 กรัม
Sea water	900 มิลลิลิตร
Distilled water	100 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น7.5-7.6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส