

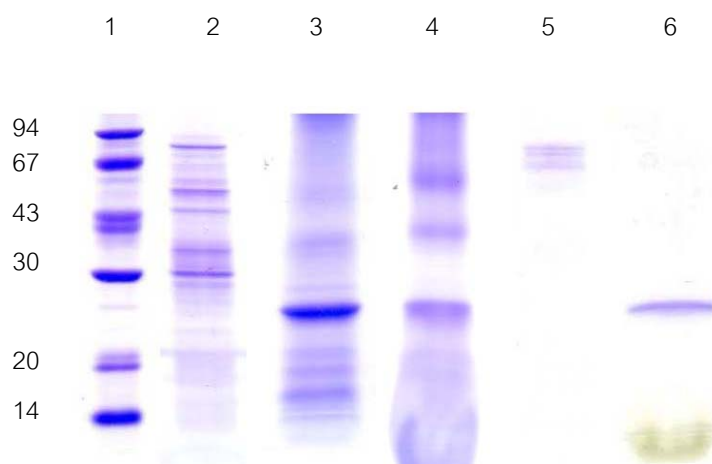
3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีนโพลิเปปไทด์จากถั่วฝักยาว

เมื่อใช้ถั่วฝักยาวสด 1 กิโลกรัม พบว่าหลังการนำผงถั่วฝักยาวอบแห้งไปสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) สารสกัดที่ได้จัดเป็นพวกโปรตีนโพลิเปปไทด์ ซึ่งสามารถแยกส่วนไปหาแอกติวิตีของเลคติน สารสกัดโปรตีนโพลิเปปไทด์จากชั้น fluff มีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 25.6 titer/g และเมื่อนำ fluff ไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่ 0-20%, 20-40%, 40-60% และ 60-80% ค่าแอกติวิตีเท่ากับ 10,240, 10,240, 20,480 และ 640 titer ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 และคิดเป็นค่าแอกติวิตีต่อกรัมของน้ำหนักสดเท่ากับ 10.24, 10.24, 20.48 และ 0.64 titer/g ตามลำดับ ส่วนโปรตีนจากชั้นเมทานอลไม่มีค่าแอกติวิตี และจากการเตรียมโปรตีนโพลิเปปไทด์จากชั้นโปรตีนของคลอโรฟอร์ม พบว่าสารสกัดโปรตีนโพลิเปปไทด์เลคตินมีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 1,433.6 titer/g และสารสกัดโปรตีนโพลิเปปไทด์เลคตินจากชั้น fluff ของถั่วฝักยาวสดมีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 3.2 titer/g หลังจากนำสารสกัดโปรตีนโพลิเปปไทด์เลคตินไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังรูปที่ 3 ในแถวที่ 3 ซึ่งแสดงแถบโปรตีนโพลิเปปไทด์เลคตินจากชั้น fluff ของถั่วฝักยาว พบว่ามีแถบโปรตีนหลายแถบแต่มีแถบหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน และโปรตีนโพลิเปปไทด์เลคตินจากชั้นโปรตีนจากชั้น fluff ของถั่วฝักยาวสด พบว่ามีแถบโปรตีนหลักที่มีน้ำหนัก 25,000 ดาลตัน (แถวที่ 4) ในแถวที่ 5 แสดงแถบโปรตีนที่อยู่ในชั้นเมทานอลจะพบแถบโปรตีนส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 67,000 ดาลตัน และแถวที่ 6 แสดงแถบโปรตีนเพียง 1 แถบที่อยู่ในชั้นคลอโรฟอร์มและมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 25,000 ดาลตัน ดังนั้นวิธีการสกัดโปรตีนโพลิเปปไทด์เลคตินจากชั้นคลอโรฟอร์มจึงมีความเหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรตีนโพลิเปปไทด์บริสุทธิ์

หลังจากเตรียมโปรตีนโพลิเปปไทด์บริสุทธิ์จากชั้นคลอโรฟอร์ม พบว่าโปรตีนโพลิเปปไทด์เลคตินมีค่าแอกติวิตีของเลคตินเท่ากับ 1,433,600 titer และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 41.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13 เท่าของสารสกัดโปรตีนเริ่มต้น (แสดงในตารางที่ 3) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีนเพียง 1 แถบ แต่ยังพบแถบสีเขียวด้านล่างที่ต่ำกว่าโปรตีนมาตรฐาน 14,000 ดาลตัน จึงนำสารสกัดโปรตีนโพลิเปปไทด์เลคตินไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังการตกตะกอนด้วยอะซิโตน พบว่าแถบโปรตีนในช่วงความเข้มข้น 0-20% สามารถกำจัดแถบสีเขียวด้านล่างออกได้ (รูปที่ 4) แถวที่ 1 ส่วนในแถวที่ 2 และ 3 ยังคงพบแถบสีเขียวด้านล่างแสดงดังรูป และเมื่อนำตะกอนในช่วงอะซิโตนต่าง ๆ ไปหาค่าแอกติวิตีของเลคติน พบว่าที่ความเข้มข้นของอะซิโตน 0-20%, 20-40%, 40-60%

และ 60-80% มีค่า 40,960, 20,480, 20,480 และ 0 unit ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 3 เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโอลิปีดเลคตินบรีสุทซ์จากถั่วฝักยาว โดยเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า Relative mobility ของโปรตีนมาตรฐาน กับค่า Log MW (รูปที่ 5) พบว่าโปรตีนโอลิปีดเลคตินบรีสุทซ์มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน



รูปที่ 3 แถบโปรตีนบน SDS-PAGE ของสารสกัดโปรตีนที่เตรียมจากวิธีโปรตีนโอลิปีด

แถวที่ 1 = โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 = สารละลายโปรตีนจากถั่วฝักยาวใน 0.2% Triton X-100

แถวที่ 3 = โปรตีนที่อยู่ในชั้นโปรตีนโอลิปีด (fluff)

แถวที่ 4 = โปรตีนที่อยู่ในชั้นโปรตีนโอลิปีด (fluff) ของถั่วสด

แถวที่ 5 = โปรตีนที่อยู่ในชั้นเมทานอล

แถวที่ 6 = โปรตีนที่อยู่ในชั้นคลอโรฟอร์ม

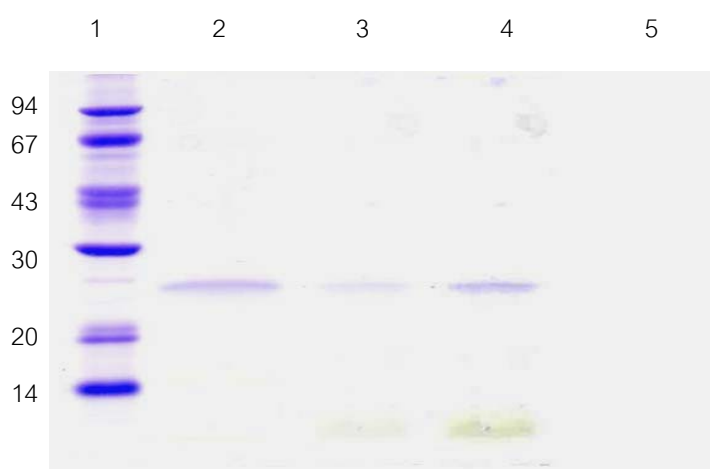
ตารางที่ 3 ผลการสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีนโพลิปิดเลคตินจากถั่วฝักยาว (VSA)

Sample*	Total H.A. activity (Unit)	Total protein (μg)	Specific activity (unit/ μg)	Purification fold	Yield
Crude dry powder	2,867,200	1.074×10^3	2,669	1	100
โปรตีนโพลิปิดชั้น Chloroform	1,433,600	41.2	34,796	13	50
โปรตีนโพลิปิดชั้น fluff	25,600	55.6	460	5.8	1
โปรตีนชั้น Methanol	0	-	-	-	-

* จากถั่วฝักยาวสด 1000 กรัม

ตารางที่ 4 แอคติวิตีของ fluff ที่ช่วงความอืดตัวของอะซีโตนต่าง ๆ กัน

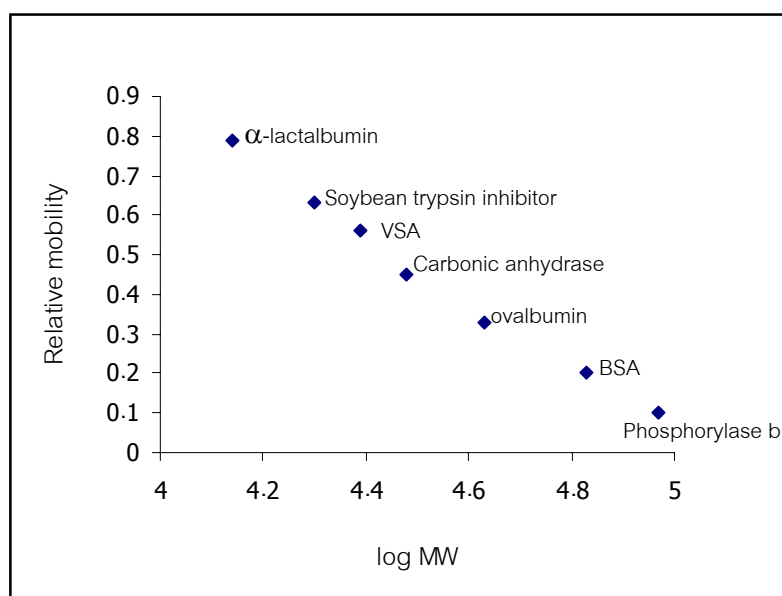
ช่วงความอืดตัวของอะซีโตน	Total Hemagglutination unit
สารละลายก่อนตกตะกอนด้วยอะซีโตน	10240
0-20%	10240
20-40%	10240
40-60%	20480
60-80%	640



รูปที่ 4 แถบโปรตีนบน SDS-PAGE ของสารสกัดโปรตีนโพลีฟอสเฟตที่อยู่ที่
 ในชั้นคลอโรฟอร์มโดย ทำการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
 แถวที่ 1 = โปรตีนมาตรฐาน
 แถวที่ 2 = VSA ชั้นคลอโรฟอร์มตกตะกอนที่ความเข้มข้น 0-20%
 แถวที่ 3 = VSA ชั้นคลอโรฟอร์มตกตะกอนที่ความเข้มข้น 20-40%
 แถวที่ 4 = VSA ชั้นคลอโรฟอร์มตกตะกอนที่ความเข้มข้น 40-60%
 แถวที่ 5 = VSA ชั้นคลอโรฟอร์มตกตะกอนที่ความเข้มข้น 60-80%

ตารางที่ 5 แอคติวิตีของ VSA ชั้นคลอโรฟอร์มหลังการตกตะกอนด้วยอะซิโตน

ช่วงความอิมตัวของอะซิโตน	H.A. (Unit)
0-20%	40,960
20-40%	20,480
40-60%	20,480
60-80%	0



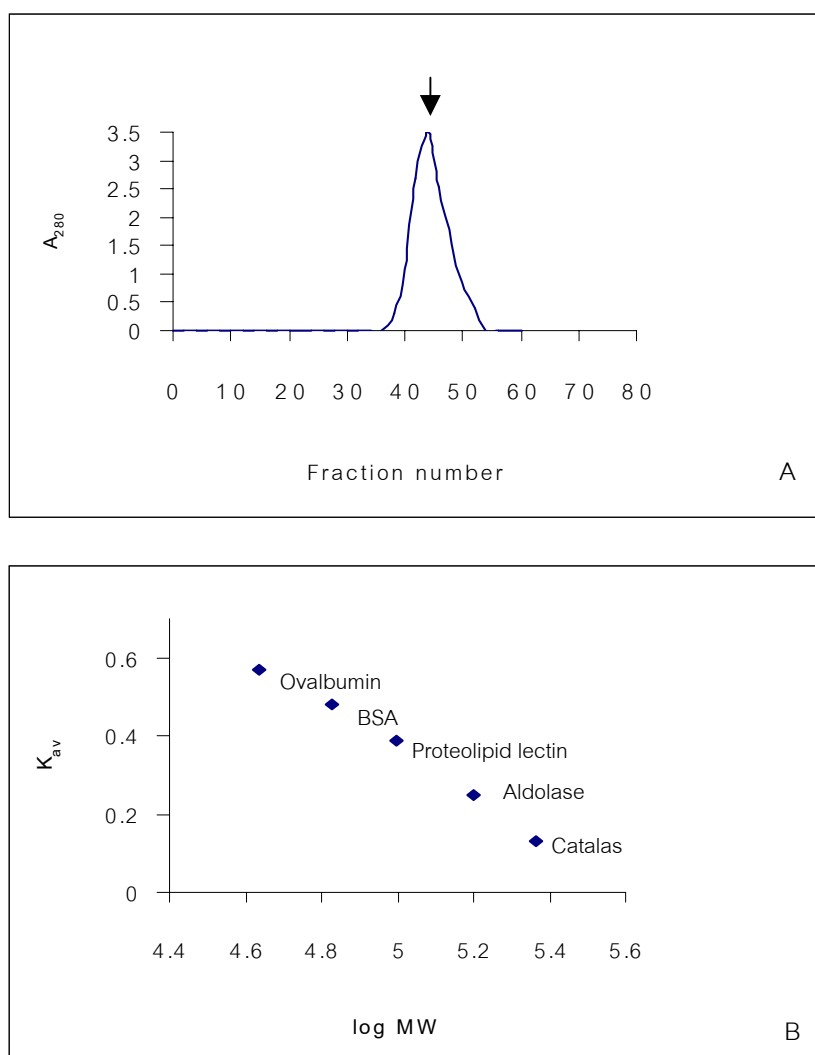
รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของ VSA โดย SDS-PAGE
 กราฟมาตรฐานพล็อตระหว่างค่า Relative mobility ของโปรตีนมาตรฐาน
 กับ Log MW ของโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนมาตรฐานได้แก่ α -lactalbumin
 (14 kD), Soybean trypsin inhibitor (20 kD), Carbonic anhydrase (30
 kD), ovalbumin (43 kD), BSA (67 kD), Phosphorylase b (94 kD)

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของ VSA

หลังจากสามารถสกัด VSA บริสุทธิ์จากถั่วฝักยาวได้แล้ว จึงทำการศึกษาคุณสมบัติของ โปรตีนโอลิโกเปปไทด์ติน ได้แก่ การหาน้ำหนักรวมของ VSA ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ความจำเพาะต่อน้ำตาลและไกลโคโปรตีน อิทธิพลของเอนไซม์ต่อ VSA อิทธิพลของ pH อิทธิพลของอุณหภูมิ และอิทธิพลของไดวาเลนต์แคตไอออน (Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+}) และ EDTA ต่อแอคติวิตี VSA

3.2.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ VSA บริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

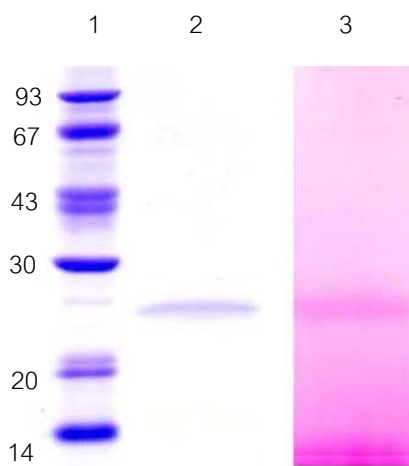
นำสารสกัด VSA บริสุทธิ์มาทำการหาน้ำหนักโมเลกุล โดยทำโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ที่ปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.4-0.2% Triton X-100 หลังจากผ่าน VSA ลงในคอลัมน์แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน จากนั้นนำแต่ละหลอดไปหาค่าแอคติวิตีของเลคตินที่ออกมาจากคอลัมน์ พบว่า แอคติวิตีของ VSA บริสุทธิ์ถูกชะออกมาเพียง 1 พีค หลังจากนั้นทำการผ่านโปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิดลงในคอลัมน์ เพื่อให้เป็นตัวมาตรฐานในการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของ VSA บริสุทธิ์ จากการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของ VSA บริสุทธิ์ โดยทำการ plot กราฟระหว่างค่า K_{av} กับค่า $\log MW$ พบว่า VSA บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 100,000 ดาลตัน แสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200
 รูป A แสดงจำนวนหลอดของโปรตีนโพลิไพดเลคติน และโปรตีนมาตรฐานที่ถูกชะ
 ออกจากคอลัมน์ Sephadex G-200 โดย 1 = Blue dextrane, 2 = Catalase,
 3 = Aldolase, 4 = proteolipid lectin 5 = BSA, 6 = Ovalbumin, 7 = $K_2Cr_2O_7$
 รูป B แสดงกราฟมาตรฐานที่ plot ระหว่างค่า K_{av} กับ ค่า $\log MW$ ของโปรตีน
 มาตรฐาน Catalase (232 kD), Aldolase (158 kD), BSA (67 kD), Ovalbumin
 (43 kD) น้ำหนักโมเลกุลของ VSA ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานมีค่าเท่ากับ
 100,000 ดาลตัน

3.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นไกลโคโปรตีนของ VSA

วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นไกลโคโปรตีน สามารถทำโดยใช้วิธีการย้อมติดสีของแถบไกลโคโปรตีน ซึ่งการย้อมไกลโคโปรตีนหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป จะใช้การย้อมติดสีชนิด PAS ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งในการย้อมสีชนิด PAS โดยอาศัยปฏิกิริยา oxidation ของไกลโคโปรตีนกับ periodate พบว่ามีการติดสีของโปรตีนเกิดขึ้นที่แถบโปรตีนที่มีขนาด 25,000 ดาลตัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า VSA เป็นไกลโคโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 SDS-PAGE ย้อมแถบไกลโคโปรตีน

แถวที่ 1 = โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 = VSA บริสุทธิ์ย้อม Coomassie brilliant blue

แถวที่ 3 = VSA บริสุทธิ์ย้อมไกลโคโปรตีน

3.2.2 ความจำเพาะของ VSA ต่อเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ น้ำตาล และไกลโคโปรตีนชนิดต่างๆ

เม็ดเลือดแดงแต่ละชนิดมีความสามารถในการจับจำเพาะต่อน้ำตาลบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงได้แตกต่างกัน และแอนติบอดีของเม็ดเลือดแดงยังได้ด้วยน้ำตาลหรือไกลโคโปรตีนชนิดต่างๆ กัน ดังนั้นในการทดสอบความจำเพาะของเม็ดเลือดแดงต่อน้ำตาลบนผิวเม็ดเลือดแดง น้ำตาลหรือไกลโคโปรตีน สามารถทำการทดสอบได้หลายวิธีเช่น ทำการทดสอบความจำเพาะของเม็ดเลือดแดงต่อน้ำตาลบนผิวของเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ สามารถทดสอบได้โดยการทำ hemagglutination กับเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ หรือทดสอบการยับยั้งแอนติบอดีของเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำตาล หรือไกลโคโปรตีนชนิดต่างๆ โดยทำ hemagglutination inhibition ซึ่งในการหาความจำเพาะของ VSA บริสุทธิ์ที่สกัดได้ในครั้งนี้จะทำการทดสอบความสามารถของ VSA ในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ และความสามารถในการยับยั้งแอนติบอดีของ VSA ด้วยน้ำตาล และไกลโคโปรตีนชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบอิทธิพลของเอนไซม์ทริปซินต่อน้ำตาลบนผิวเม็ดเลือดแดง

ความสามารถของ VSA ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ

ในการทดสอบความสามารถของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ โดยใช้เม็ดเลือดแดงของคน (A, B, O และ AB) เม็ดเลือดแดงของกระต่าย และเม็ดเลือดแดงของหนู พบว่าสารละลาย VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่าย และเม็ดเลือดแดงของหนูได้จึงมีความจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงของสัตว์ฟันแทะ แต่เม็ดเลือดแดงของหนูไม่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคนได้ (A, B, O และ AB) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า VSA มีความจำเพาะต่อน้ำตาลบนผิวเม็ดเลือดแดงของสัตว์ฟันแทะเท่านั้น แต่ไม่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลบนผิวเม็ดเลือดแดงของคน (A, B, O และ AB) และจากการทดสอบอิทธิพลของเอนไซม์ต่อเม็ดเลือดแดง โดยการนำ VSA ไปทดสอบความสามารถของการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้วเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าหลัง จากเม็ดเลือดแดงถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน แอนติบอดีของ VSA เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังนั้นเม็ดเลือดแดงที่ใช้ทำการทดสอบครั้งต่อไปจึงใช้เม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความสามารถของ VSA ต่อการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ

RBC.	H.A.
คน :	
Group A	0
Group B	0
Group O	0
Group AB	0
หนู	+
กระต่าย	+
กระต่าย (trypsinized)	+

ผลการยับยั้งแอกติวิตีของ VSA ด้วยน้ำตาล และไกลโคโปรตีนชนิดต่าง ๆ

จากการทดสอบความสามารถของการยับยั้งแอกติวิตีของ VSA ด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นในช่วง 0-200 mM (glucose, mannose, ribose, maltose, sucrose, galactose, N-acetylglucosamine) จากผลการทดลองพบว่าไม่มีน้ำตาลชนิดใดสามารถยับยั้งแอกติวิตีของ VSA ได้ นอกจากน้ำตาลเอนอะซีติลกลูโคซามีนที่ความเข้มข้น 200 mM ที่สามารถยับยั้งแอกติวิตีของ VSA ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังตารางที่ 7

จากการทดสอบความสามารถของการยับยั้งแอกติวิตีของ VSA ด้วยไกลโคโปรตีนชนิดต่าง ๆ พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนโอลิโกปีดเลคตินที่เตรียมได้จากถั่วฝักยาวสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุด ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งแอกติวิตีของ VSA ได้คือ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ mucin ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 2.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไกลโคโปรตีนจากน้ำยางพารา (CS-HLLBP) และ asialo fetuin ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ fetuin ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ผลการยับยั้งของน้ำตาลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่าย

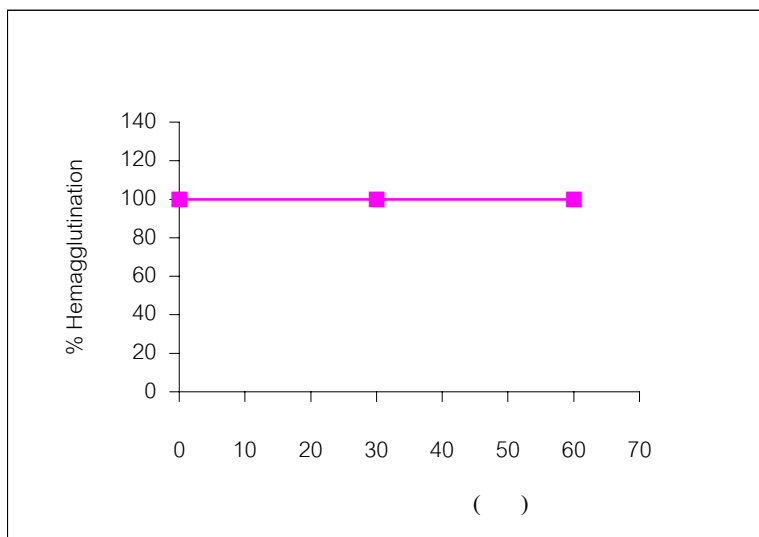
Sugars	Minimum concentration for 100% inhibition (0-200 mM)
glucose	N.I.
mannose	N.I.
ribose	N.I.
maltose	N.I.
sucrose	N.I.
galactose	N.I.
N-acetylglucosamine	200 mM (only slightly)

ตารางที่ 8 ปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง
ของกระต่ายที่เหนียวน้ำโดย VSA

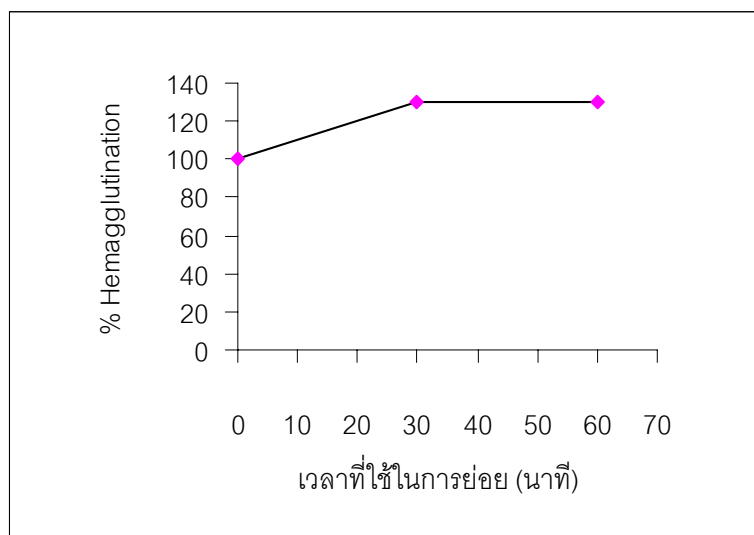
Glycoprotein	100% Hemagglutination inhibition ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Vigna sequipedalis</i> (aqueous phase)	0.1
Mucin	2.4
CS-HLLBP	20
Asialo fetuin	20
Fetuin	40

3.2.3 ผลของการย่อย VSA ด้วยเอนไซม์ทริปซิน และโปรเนส

นำ VSA บริสุทธิ์ไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน โปรเนส เป็นเวลานาน 30 และ 60 นาที จากนั้นทำการหยุดการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทดสอบความสามารถของ VSA ต่อการเหนียวน้ำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่าย โดยทำการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับ VSA ที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์มาก่อน ซึ่งหลังจากการทำ hemagglutination พบว่าเมื่อใช้เวลาย่อยนาน 30 และ 60 นาที VSA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และโปรเนส มีแอกติวิตีเปลี่ยนไปเป็น 100% และ 125% ตามลำดับ รูปที่ 8 (เอนไซม์ทริปซิน), และรูปที่ 9 (เอนไซม์โปรเนส) ตามลำดับ



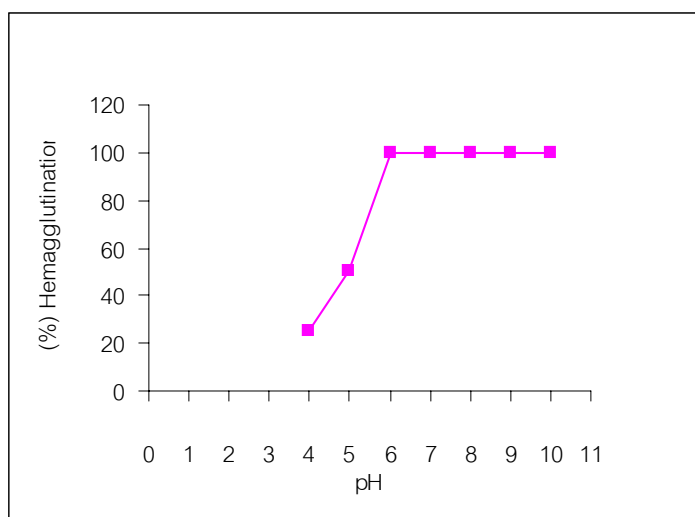
รูปที่ 8 อิทธิพลของเอนไซม์ทริปซินต่อแอกติวิตีของ VSA



รูปที่ 9 อิทธิพลของเอนไซม์โปรเนสต่อแอกติวิตีของ VSA

3.2.4 อิทธิพลของ pH ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่เหนี่ยวนำโดย VSA

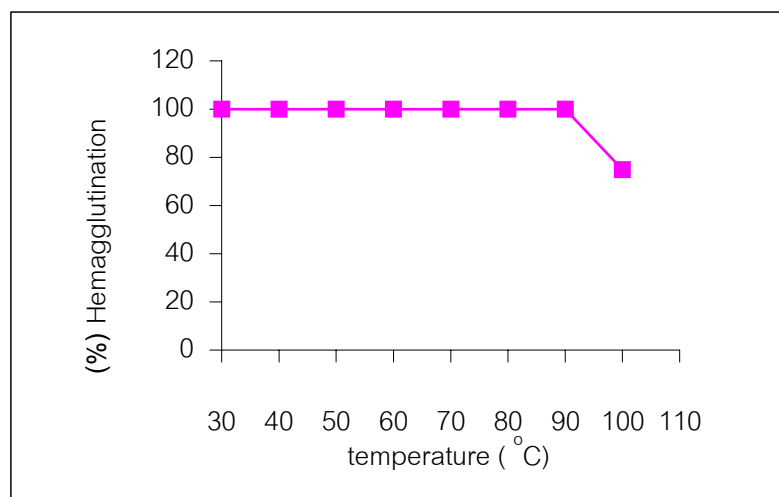
ในการทดสอบความสามารถของ VSA บริสุทธิ์ต่อ pH ต่างๆ ในช่วง pH 4-10 โดยปรับที่ pH ต่าง ๆ กัน ตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้นหลังจากครบเวลา 2 ชั่วโมงแล้วทำการปรับ pH กลับมาเป็น pH 7.4 ในทุก pH ที่ทำการทดสอบแล้วหาแอกติวิตีของ VSA โดยทำ hemagglutination พบว่า VSA ไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดได้ แต่ทนต่อสภาพกรดอ่อนและเบสในช่วงกว้างได้ดี ในช่วง pH 6-10 ที่ทำการทดสอบ ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 อิทธิพลของ pH ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่เหนี่ยวนำโดย VSA

3.2.5 ผลของอุณหภูมิต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่เหนียวนำโดย VSA

โดยส่วนมากอุณหภูมิมักจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และแอกติวิตีของโปรตีน จึงได้ทำการทดสอบความเสถียรของ VSA ต่ออุณหภูมิ โดยทำการบ่มเลือดติดังกล่าวที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยเร็วแล้วนำ VSA ดังกล่าวมาหาแอกติวิตีของเลือดโดยทำ hemagglutination จากการทดลองพบว่า VSA สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ดีที่อุณหภูมิลอยู่ในช่วง 30-90 °ซ และที่อุณหภูมิ 100 °ซ เลือดติดังกล่าวมีแอกติวิตีลดลงเหลือ 75% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่อุณหภูมิลห้อง ดังรูปที่ 11



รูป 11 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่เหนียวนำโดย VSA

3.2.6 อิทธิพลของไดวาเลนท์แคทไอออน (Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+}) และ EDTA

เลคตินส่วนใหญ่ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนช่วยในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบอิทธิพลของไดวาเลนท์แคทไอออน (Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+}) และ EDTA ที่ความเข้มข้น 0-200 mM ต่อแอกติวิตีของ VSA โดยบ่ม VSA ดังกล่าวกับไดวาเลนท์แคทไอออน (Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+}) และ EDTA ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จากนั้นทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลแอกติวิตีของ VSA กับชุดควบคุมที่ใช้บัฟเฟอร์ TBS แทน พบว่าไดวาเลนท์แคทไอออน (Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+}) และ EDTA ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่เหนียว นำโดย VSA ตารางที่ 9

ตารางที่ 9 อิทธิพลของไดวาเลนท์แคทไอออน (Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+}) และ EDTA ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่เหนียว นำโดย VSA

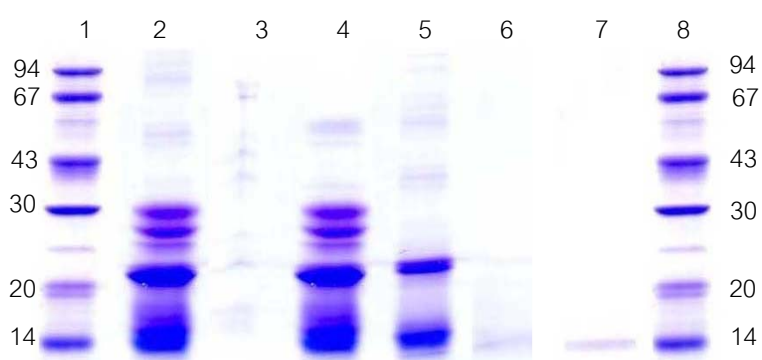
Chemical agent	Concentration (mM)	Hemagglutination (%)
Ca^{2+}	0-200	100
Mg^{2+}	0-200	100
Mn^{2+}	0-200	100
EDTA	0-200	100

3.3 ผลการสกัดและการทำบริสุทธิ์ด้วยยับยั้งการทำงานของ VSA จากถั่วฝักยาว

ผลจากการนำสารละลายไปสกัดด้วย คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) จากนั้นเก็บส่วนของ (aqueous phase) ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ไปทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่เหนียวนำโดย VSA โดยการทำ Hemagglutination inhibition พบว่าช่วงความเข้มข้นของอะซิโตนที่ 0-20%, 20-40%, 40-60% และ 60-80% มีค่าความสามารถในการยับยั้งแอกติวิตีเป็น 640, 10,240, 81,920 และ 1,280 titer ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 จากนั้นนำสารละลายตะกอนโปรตีนในแต่ละช่วงทำ SDS-PAGE แสดงดังรูปที่ 12 ในแถวที่ 2 แสดงแถบสารละลายโปรตีนก่อนตกตะกอนด้วยอะซิโตน พบแถบโปรตีนหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน ในแถวที่ 3 แสดงแถบของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วงความเข้มข้น 0-20% เห็นแถบไม่ชัดเจน แถวที่ 4 แสดงแถบของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วงความเข้มข้น 20-40% แถบโปรตีนหลักมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14,000-30,000 ดาลตัน แถวที่ 5 แสดงแถบของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วงความเข้มข้น 40-60% พบแถบโปรตีนหลักมีขนาด 14,000 และ 24,000 ดาลตัน แถวที่ 6 แสดงแถบของสารละลายตะกอนโปรตีนในช่วงความเข้มข้น 60-80% พบแถบโปรตีนหลักมีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดาลตัน จากนั้นนำสารละลายนำตะกอนโปรตีนในช่วง 40-60% ซึ่งมีความสามารถยับยั้งการทำงานของเลคตินได้ดีที่สุดไปทำให้บริสุทธิ์ โดย load สารละลายด้วยยับยั้งการทำงานของเลคติน โดยใช้คอลัมน์ ไคตินที่ตรึงด้วยเลคตินดังวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น หลังชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ออกมาที่ความเข้มข้นเกลือ 0.5 M NaCl (รูปที่ 13) และเมื่อวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการยับยั้งแอกติวิตีของ VSA พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA มีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 1,280 titer/ml มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.1 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 11 และเมื่อทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของเลคตินมีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดาลตัน แสดงในรูปที่ 12 แถวที่ 7

ตารางที่ 10 แอคติวิตีของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ที่ช่วงความเข้มข้นของ
อะซีไตนต่างๆกัน

ช่วงความเข้มข้นของอะซีไตน	Total inhibition Hemagglutination (unit)
สารละลายก่อนตกตะกอนด้วยอะซีไตน	0
0-20%	640
20-40%	10,240
40-60%	81,920
60-80%	1,280



รูปที่ 12 SDS-PAGE ของสารละลายตะกอนโปรตีนตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ที่ช่วงความอิมของอะซิโตนต่างๆกัน

1,8 = โปรตีนมาตรฐาน

2 = สารสกัดโปรตีนชั้น aqueous phase

3 = สารสกัดโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ช่วงความอิมตัว 0-20%

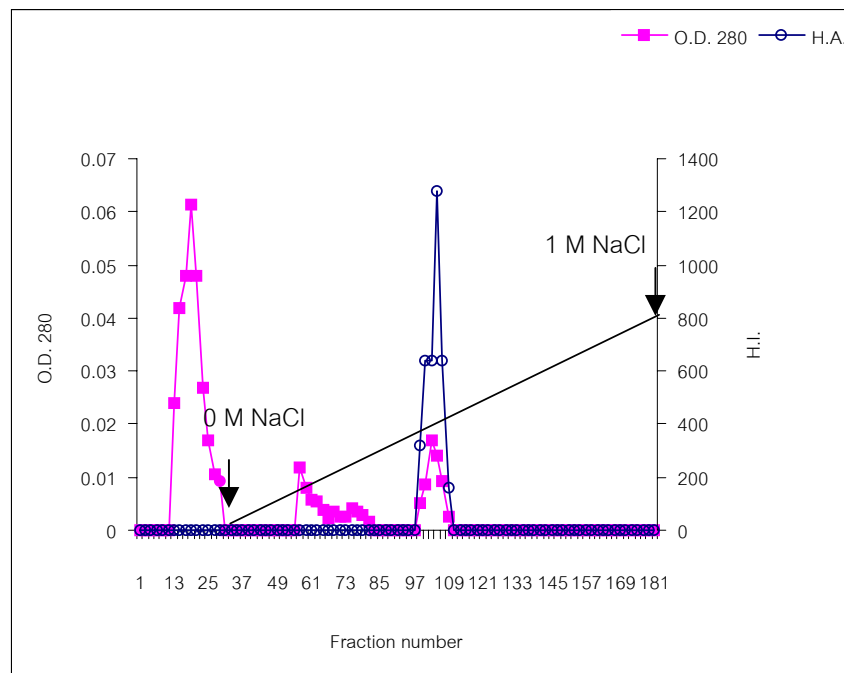
4 = สารสกัดโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ช่วงความอิมตัว 20-40%

5 = สารสกัดโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ช่วงความอิมตัว 40-60%

6 = สารสกัดโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ช่วงความอิมตัว 60-80%

7 = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA จากคอลัมน์ไอโคนที่ตรึงด้วยโปรตีนโอ

ลิปิดเลคตินโดยใช้สารสกัดจาก 5



รูปที่ 13 โครมาโทแกรมแสดงการทำด้วยบัฟเฟอร์แอคติวิตีของ VSA ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์
โคตินที่ตรึงด้วยเลคติน

ตารางที่ 11 ผลการทำบริสุทธิ์ด้วยบั๊ย้งการทำงานของ VSA

Sample	Total H.I. (Unit)	Total protein mg	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield %
crude extract (aqueous phase)	0	-	-	-	-
สารละลายตะกอนโปรตีน ช่วงความอิมิตัว40-60%	20,480	0.2763	74,122	1	100
Affinity column	1,280	0.0157	81,528	1.1	6.25

3.3.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวยับยั้งแอกติวิตีของ VSA บริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

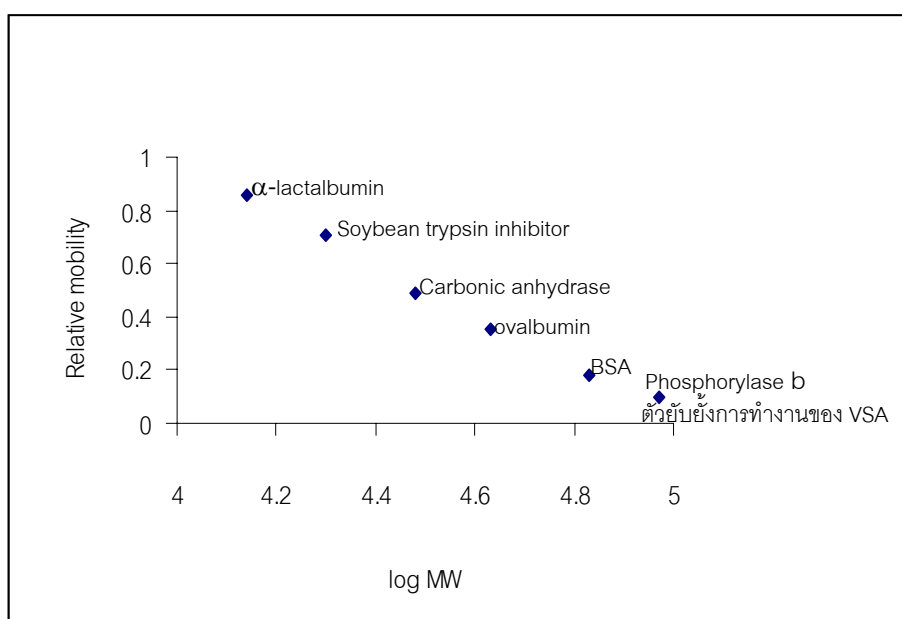
หลังจากสามารถทำบริสุทธิ์ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ด้วยคอลัมน์ไคตินที่ตรึงด้วยเลคตินได้แล้วต่อไปจึงนำสารละลายไปหาคุณสมบัติของโปรตีน ได้แก่ หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 ที่ปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 แล้ว load ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA บริสุทธิ์ลงในคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน จากนั้นนำแต่ะหลอดไปหาค่าการยับยั้งแอกติวิตีของเลคติน พบว่าโปรตีนตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ถูกชะออกมาเพียง 1 พีค รูป 14 (โครมาโทแกรม) หลังจากนั้นทำการผ่านโปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิดลงไปคอลัมน์ เพื่อใช้เป็นตัวมาตรฐานในการคำนวณหาน้ำหนักตัวยับยั้งการทำงานของ VSA จากการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยทำการพล็อตกราฟระหว่างค่า K_{av} กับค่า $\log MW$ พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 54,000 ดาลตัน และจากการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า Relative mobility และ $\log MW$ พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 14,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 15 แสดงว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน

รูปที่ 14 แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA โดยคอลัมน์ Sephadex G-100

รูป A แสดงจำนวนหลอดของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA และโปรตีนมาตรฐานที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ Sephadex G-100 โดย 1 = Blue dextrane, 2 = Aldolase, 3 = BSA, 4 = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA, 5 = chymotrypsin, 6 = $K_2Cr_2O_7$

รูป B แสดงกราฟมาตรฐานที่ plot ระหว่างค่า K_{av} กับ ค่า $\log MW$ ของโปรตีนมาตรฐาน Aldolase (158 kD), BSA (67 kD), Ovabumin (43 kD) chymotrypsin (25 kD)

น้ำหนัก โมเลกุลของตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 54,000 ดาลตัน



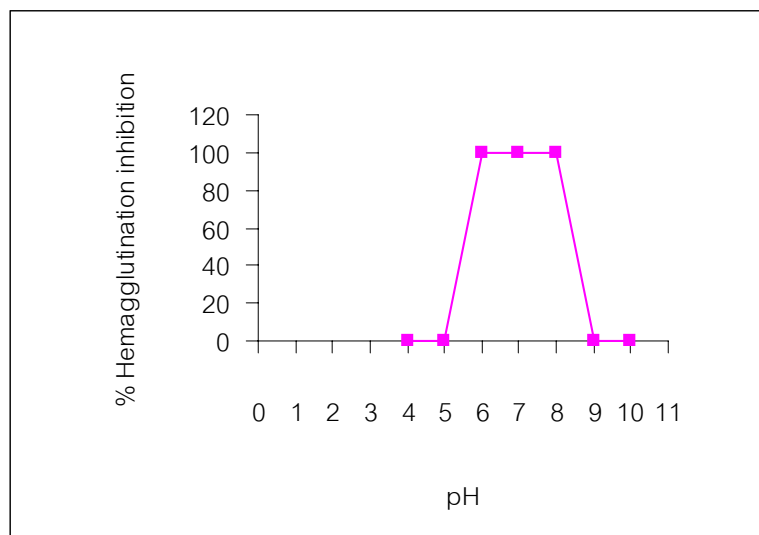
รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

โดย SDS-PAGE

กราฟมาตรฐานพล็อตระหว่างค่า Relative mobility ของโปรตีนมาตรฐาน กับ Logarithm MW ของโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนมาตรฐานได้แก่ α -lactalbumin (14 kD), Soybean trypsin inhibitor (20 kD), Carbonic anhydrase (30 kD), ovalbumin (43 kD), BSA (67 kD), Phosphorylase b (94 kD)

3.3.2 ผลของ pH ต่อตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

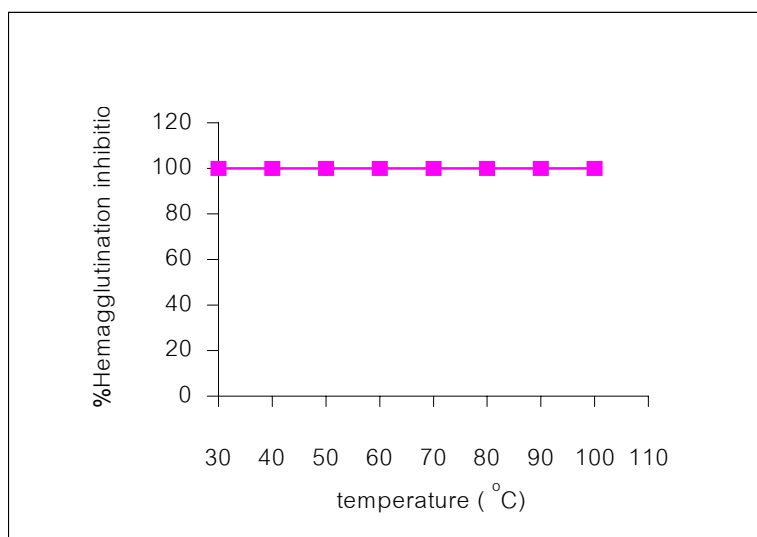
ในการทดสอบความเสถียรของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ต่อ pH ในช่วง pH 4-10 โดยบ่มที่ pH ต่างๆกัน ตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น หลังจากครบเวลา 2 ชั่วโมง ทำการปรับ pH กลับมาเป็น pH 7.0 ในทุก pH ที่ทำการทดสอบ แล้วนำไปหา แอคติวิตีโดยการทำ hemagglutination inhibition พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ไม่สามารถทนต่อสภาวะเป็นกรดแก่และเบสแก่ได้ แต่ทนต่อสภาวะกรดอ่อนและเบสอ่อนได้ดีในช่วง pH 6-8 แสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 อิทธิพลของ pH ต่อตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

3.3.3 ผลของอุณหภูมิต่อตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

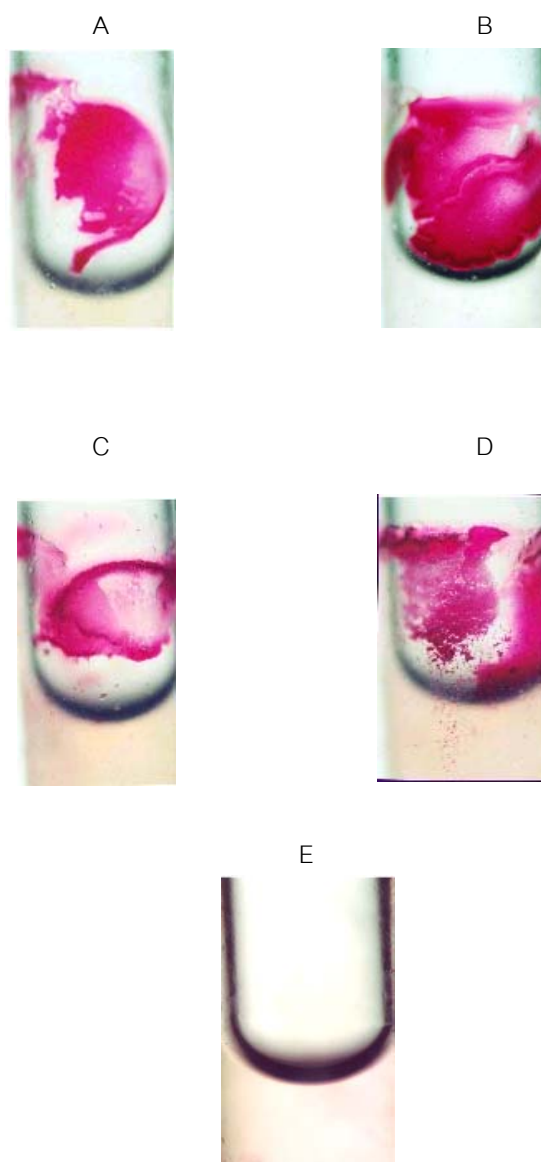
เนื่องจากอุณหภูมิมักจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและแอกติวิตีของโปรตีน จึงได้ทำการทดสอบความเสถียรของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ต่ออุณหภูมิ โดยป้อนตัวยับยั้งการทำงานของเลคตินที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยเร็วแล้วนำตัวยับยั้งการทำงานของเลคตินดังกล่าวมาหาแอกติวิตีโดยทำhemagglutination inhibition จากการทดลองพบว่าทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ (30-100°C) ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA แสดงดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

3.3.4 ผลการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนียวนำโดย VSA เมื่อเปรียบเทียบกับ HLL

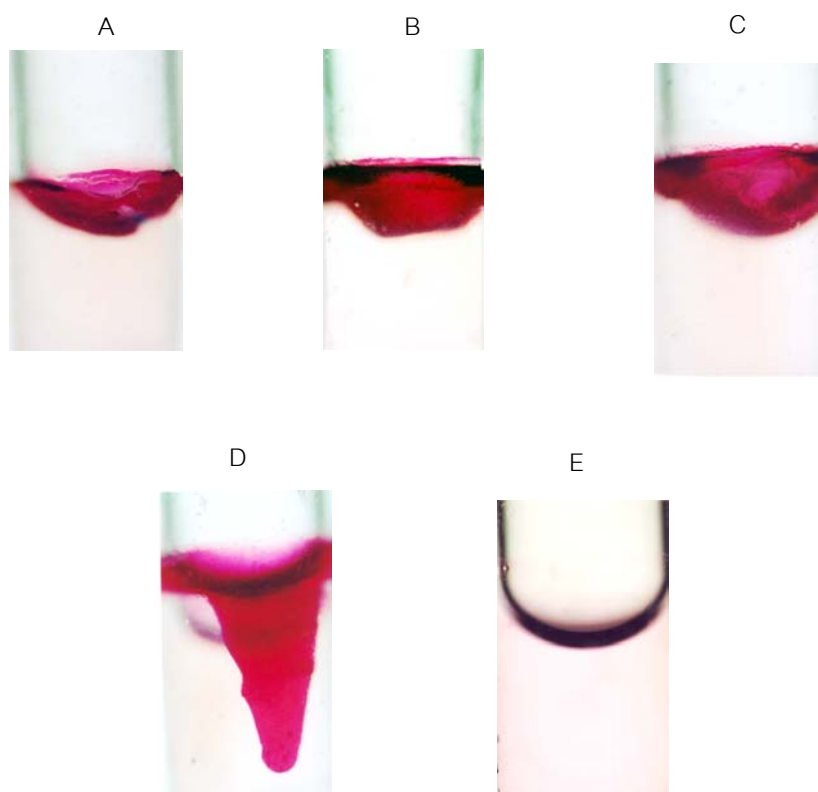
จากการใช้ VSA ที่มีค่า titer ต่อการเหนียวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่แตกต่างกัน ไปบ่มกับอนุภาคยางตามรายละเอียดของวิธีการการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง โดยดูผลการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า พบว่าเมื่อใช้ VSA ปริมาตร 20 μl ที่มีค่า 320 titer/ml บ่มกับอนุภาคยางปริมาตร 20 μl (18A) จะเห็นการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางน้อยกว่าที่ใช้ VSA ปริมาตร 20 μl ที่มีค่า 2560 titer/ml บ่มกับอนุภาคยางปริมาตร 20 μl (18B) และเมื่อใช้ HLL ปริมาตร 20 μl ที่มีค่า 320 titer/ml และ 2560 titer/ml ไปบ่มกับอนุภาคยาง พบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางเช่นเดียวกับการใช้ VSA คือ เมื่อใช้ HLL ที่มีค่า 320 titer/ml ปริมาตร 20 μl บ่มกับอนุภาคยางปริมาตร 20 μl (18C) จะเห็นการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางน้อยกว่าที่ใช้ HLL ที่มีค่า titer 2560 titer/ml ปริมาตร 20 μl บ่มกับอนุภาคยางปริมาตร 20 μl (18D) และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (18E) ซึ่งเป็นสารละลายอนุภาคยางอย่างเดียวจะไม่พบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง ดังนั้น VSA สามารถเหนียวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้ เนื่องจากมีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนบนอนุภาคยาง และเมื่อใช้ค่า titer มากขึ้นก็พบว่ามีเกาะกลุ่มมากขึ้นตามไปด้วย ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 ผลการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำโดย VSA
 A = VSA ที่มีค่า 320 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยางปริมาตร 20 μ l
 B = VSA ที่มีค่า 2,560 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยางปริมาตร 20 μ l
 C = HLL ที่มีค่า 320 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยางปริมาตร 20 μ l
 D = HLL ที่มีค่า 2,560 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยางปริมาตร 20 μ l
 E = สารละลายอนุภาคยางอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

3.3.5 อิทธิพลของเวลาที่มีต่อการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางโดย VSA

ทำการทดสอบโดยบ่ม VSA กับอนุภาคยางที่ระยะเวลา ต่างๆกัน คือ ที่ 10, 20, 30 และ 40 นาที จากนั้นทำการข้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ แล้วทำตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แล้วดูผลการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่าพบว่าที่เวลา 10 นาที จะพบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางน้อยที่สุด (รูป 19A) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เวลา 20, 30 และ 40 นาที ซึ่งที่เวลา 40 นาที จะพบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางมากที่สุด รองลงมาคือ ที่เวลา 20 และ 30 นาที ตามลำดับ แสดงดังรูป 19D, 19C และ 19B ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มโปรตีนโพลีอิลิปิดเคลือบกับอนุภาคยางนานขึ้น ส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางมากขึ้นตามไปด้วย



รูปที่ 19 ผลของ VSA ต่อการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่บ่มเวลา ต่าง ๆ กัน

A = VSA ที่มีค่า 2,560 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง, 20 μ l

โดยมีปริมาตรรวม 45 μ l และบ่มเป็นเวลานาน 10 นาที

B = VSA ที่มีค่า 2,560 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง, 20 μ l

โดยมีปริมาตรรวม 45 μ l และบ่มเป็นเวลานาน 20 นาที

C = VSA ที่มีค่า 2,560 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง, 20 μ l

โดยมีปริมาตรรวม 45 μ l และบ่มเป็นเวลานาน 30 นาที

D = VSA ที่มีค่า 2,560 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง, 20 μ l

โดยมีปริมาตรรวม 45 μ l และ บ่มเป็นเวลานาน 40 นาที

E = สารละลายอนุภาคยางอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

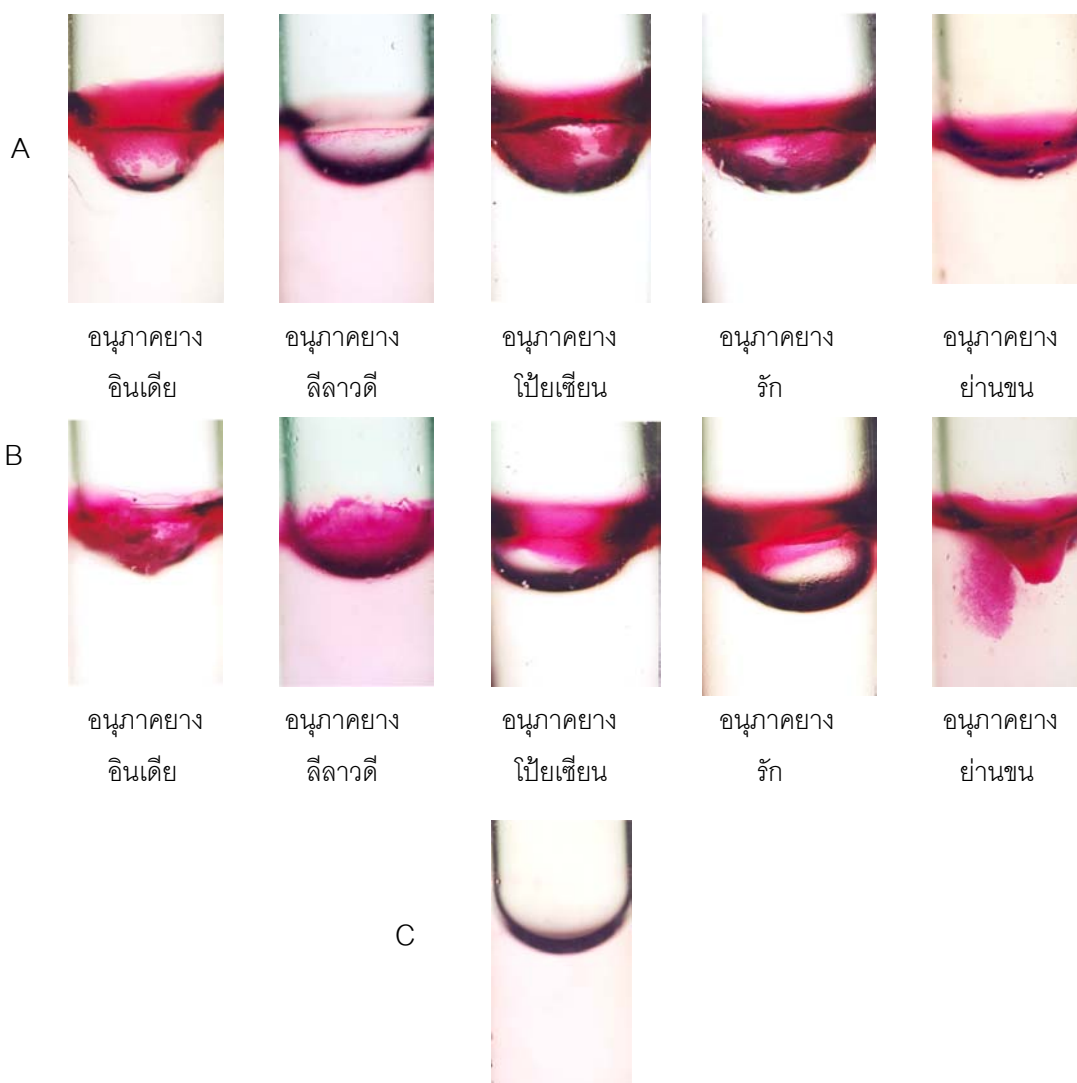
3.3.6 ผลของโปรตีนโพลิปิดเลคติน (VSA และ HLL) ต่อการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางจากพืชชนิดอื่น

ผลของ VSA และ HLL ต่อการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางชนิดอื่น (ยางอินเดียน รัก ลีลาวดี ไบ๊ยะเซียน และย่านขน) ทำการทดสอบโดยนำอนุภาคยางของพืชแต่ละชนิดมาบ่มกับ VSA และ HLL เป็นเวลานาน 20 นาที ตามรายละเอียดในหัวข้อวิธีการ เมื่อดูการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า พบว่า VSA และ HLL สามารถเหนี่ยวนำอนุภาคยางของยางอินเดียน ลีลาวดี ไบ๊ยะเซียน รัก และย่านขนให้เกิดการเกาะกลุ่มได้ แสดงว่า VSA และ HLL น่าจะมีความจำเพาะต่อไกลโคโปรตีนบนอนุภาคยางของพืชสร้างน้ำยางโดยทั่วไป และพบว่าโปรตีนโพลิปิดเลคตินแต่ละชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้แตกต่างกัน แสดงว่าโปรตีนโพลิปิดเลคตินมีความจำเพาะมากน้อยแตกต่างกัน

เมื่อทำการทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำโดยโปรตีนโพลิปิดเลคติน (VSA และ HLL) โดยรูปที่ 20A แสดงการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำโดย VSA และรูปที่ 20B แสดงการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางจากการเหนี่ยวนำโดย HLL และ 20C แสดงสารละลายอนุภาคยางอย่างเดี่ยว (ชุดควบคุม) เมื่อดูการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า พบว่าที่ปริมาณ titer เท่ากัน HLL สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางอินเดียนได้ดีกว่า VSA และผลของความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มอนุภาคยางของลีลาวดีโดย VSA เปรียบเทียบกับ HLL จะพบว่าที่ปริมาณ titer เท่ากัน VSA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้มากกว่า HLL แสดงว่า VSA มีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนบนอนุภาคยางลีลาวดีมากกว่า HLL และเมื่อทำการทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางไบ๊ยะเซียนโดยใช้ปริมาณ titer เท่ากัน พบว่า VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้น้อยกว่าเมื่อใช้ HLL ดังนั้น HLL มีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนบนอนุภาคยางไบ๊ยะเซียนมากกว่า VSA

VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางรักและย่านขนได้น้อยกว่าการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มโดย HLL แสดงว่า HLL มีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนบนอนุภาคยางรักและย่านขนมากกว่า VSA เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางระหว่าง VSA และ HLL พบว่า VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางอินเดียน ไบ๊ยะเซียน และรัก ได้ดีกว่า HLL โดย HLL สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของ

อนุภาคยางจากย่านขนได้ดีที่สุดรองลงมาคือ อนุภาคยางจาก ลีลาวดี ยางอินเดีย รัก และโป๊ยเซียน ตามลำดับ ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 ผลการเหนี่ยวนำเกาะกลุ่มของอนุภาคยางชนิดต่างๆโดยโปรตีนโอลิปิดเลคติน

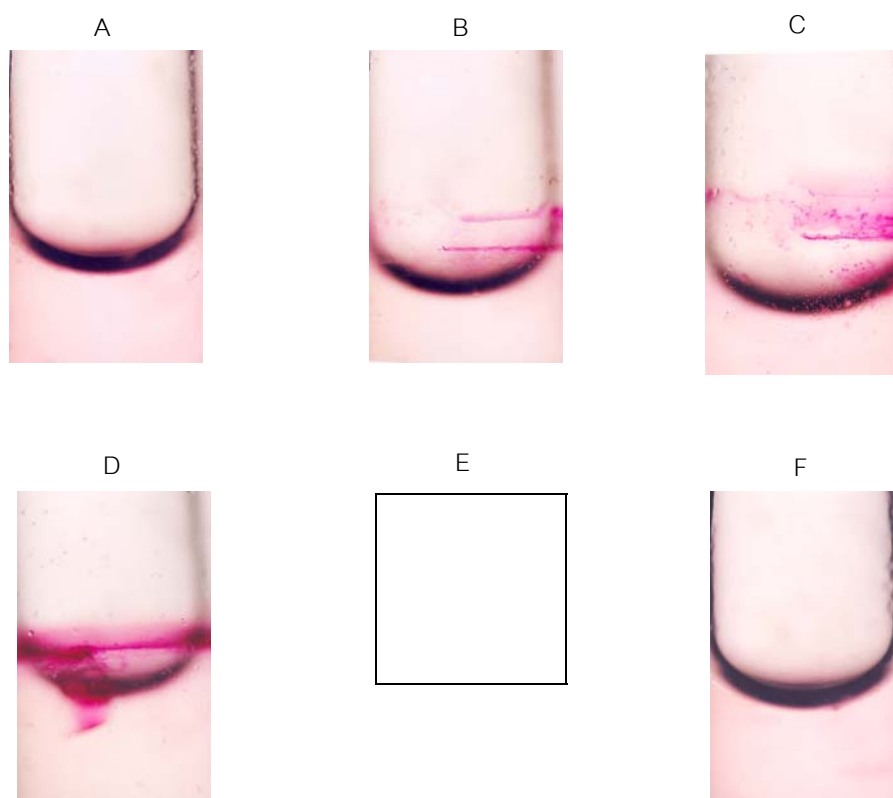
A = VSA ที่มีค่า 2,560 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง 20 μ l โดยมีปริมาตรรวม 45 μ l

B = HLL ที่มีค่า 2,560 titer/ml, 20 μ l +อนุภาคยาง20 μ l โดยมีปริมาตรรวม 45 μ l

C = สารละลายอนุภาคยางอย่างเดียว, ชุดควบคุม

3.6 ศึกษาผลของตัวยับยั้งต่อการยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนียวนำโดย VSA

จากการทำ Hemagglutination inhibition ด้วยน้ำตาล และไกลโคโปรตีนชนิดต่าง ๆ พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ที่ได้จาก aqueous phaseสามารถยับยั้งการทำงานของ VSA ได้ดีที่สุด และเนื่องจาก VSA สามารถเหนียวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้ จึงได้นำตัวยับยั้งการทำงานของ VSA มาทำการทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง โดยนำสารละลายตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน บ่มกับ VSA แล้วทำตามรายละเอียดในหัวข้อวิธีการ เมื่อดูการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า พบว่าเมื่อใช้ปริมาณโปรตีนของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA 25 ไมโครกรัม จะไม่เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง แสดงดังรูป (21 A) แต่เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนของตัวยับยั้งน้อยลง คือที่ 12.8, 5.4, 2.6 และ 0 ไมโครกรัม จะพบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 21B 21C, 21D และ 21E ตามลำดับ นอกจากนี้ยังใช้ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ไปทำการทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนียวนำ HLL พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA สามารถยับยั้งการทำงานของ HLL ได้เช่นเดียวกัน คือ เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA 0 ไมโครกรัม จะเกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางมากที่สุด แสดงดังรูป (22A) แต่เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนของตัวยับยั้งมากขึ้นคือที่ 25, 12.8, 5.4 และ 2.6 ไมโครกรัม จะพบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางลดลง ดังแสดงในรูปที่ 22D, 22C และ 22B ตามลำดับ และ 22F แสดงสารละลายอนุภาคยางอย่างเดียว (ชุดควบคุม)



รูปที่ 21 ผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนียวนำด้วย VSA โดย
ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

A = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (25 ไมโครกรัม), 20 μ l + VSA

ที่มีค่า 128 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง 20 μ l โดยมีปริมาตรรวม 65 μ l

B = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (12.8 ไมโครกรัม) , 20 μ l + VSA

ที่มีค่า 128 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง 20 μ l โดยมีปริมาตรรวม 65 μ l

C = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (5.4 ไมโครกรัม) , 20 μ l + VSA

ที่มีค่า 128 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง 20 μ l โดยมีปริมาตรรวม 65 μ l

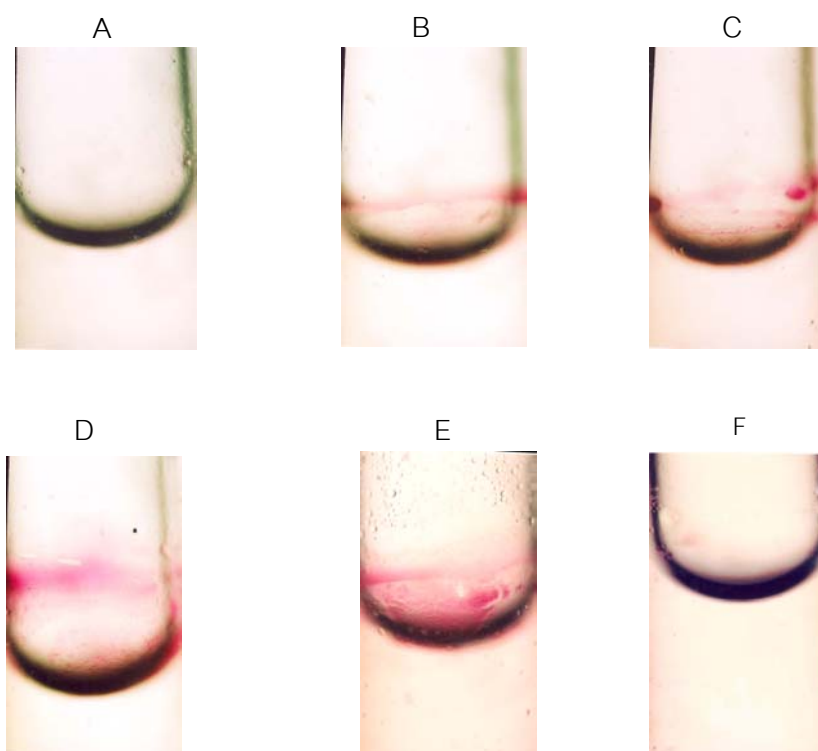
D = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (2.6 ไมโครกรัม) , 20 μ l + VSA

ที่มีค่า 128 titer/ml, 20 μ l + อนุภาคยาง 20 μ l โดยมีปริมาตรรวม 65 μ l

E = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (0 ไมโครกรัม) , 20µl + VSA

ที่มีค่า 128 titer/ml, 20µl + อนุภาคยาง 20µl โดยมีปริมาตรรวม 65 µl

F = สารละลายอนุภาคยางอย่างเดียว, ชุดควบคุม



รูปที่ 22 ผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนียวนำด้วย HLL โดยตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

A = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (25 ไมโครกรัม) + HLL ที่มีค่า 128 titer/ml, 20µl + อนุภาคยาง 20µl โดยมีปริมาตรรวม 65 µl

B = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (12.8 ไมโครกรัม) + HLL ที่มีค่า 128 titer/ml, 20µl + อนุภาคยาง 20µl โดยมีปริมาตรรวม 65 µl

C = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (5.4 ไมโครกรัม) + HLL ที่มีค่า 128 titer/ml, 20µl + อนุภาคยาง 20µl โดยมีปริมาตรรวม 65 µl

D = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (2.6 ไมโครกรัม) + HLL ที่มีค่า 128 titer/ml, 20µl + อนุภาคยาง 20µl โดยมีปริมาตรรวม 65 µl

E = ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA (0 ไมโครกรัม) + HLL ที่มีค่า 128