3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การศึกษาสมบัติของซีรัมเลคติน

3.1.1 ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

จากการทดสอบความสามารถของซีรัมเลคตินต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคนและของกระต่าย พบว่า ซีรัมเลคตินสามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่สุด (71.8 หน่วย/มก.โปรตีน) ที่ความเข้มข้นโปรตีนต่ำสุดคือ 0.55 มก./มล. ดีกว่าเม็ดเลือดแดงของคนหมู่เลือด A, B, AB และ O ซึ่งเกาะกลุ่มได้เท่ากัน 35.9 หน่วย/มก. โปรตีน ที่ความเข้มข้นโปรตีนต่ำสุดคือ 1.10 มก./มล. ดังแสดงผลในตารางที่ 2 ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้เลือกใช้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็นเซลล์ตัวอย่างในการวัดความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์ของเลคติน

เมื่อเปรียบเทียบกับเลคตินจากซีรัมของกุ้งก้ามกรามพบว่าทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายและหนูเกาะกลุ่มได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A,B และ O เลคตินจากซีรัมของกุ้ง *P. indicus* ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่เกาะกลุ่มได้เท่ากับของหนูและกระต่าย (Jayasree, 2001) และของกุ้งกุลาดำเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคนหมู่ O ได้ดีกว่าหมู่ A, B และของกระต่าย (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) เลคตินจาก

ตารางที่ 2 ความสามารถของซีรัมเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

Red Blood Cell		Hemagglutination (unit/mg protein)	Mimimum concentration required (mg/ml)
Human	group A	35.9	1.10
	group B	35.9	1.10
	group AB	35.9	1.10
	group O	35.9	1.10
Rabbit		71.8	0.55

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

สัตว์ต่าง ๆ ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ ได้แก่ของปูม้า (Mercy and Ravindranath, 1994) แมงดาทะเล *Carcinoscorpius rotunda* (Mohan *et al.*, 1982) และของปลิงทะเล *C. echinata* (Hatakeyama *et al.*, 1995) การที่เลคตินจากซีรัมของครัสเตเซียนเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งจับของเลคตินและโครงสร้างน้ำตาลบนผิวเซลล์ (Sharon, 1977; Sharon and Lis,1990)

3.1.2 ผลการยับยั้งโดยน้ำตาลและไกลโคโปรตีน

เมื่อทดสอบผลของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยซีรัมเลคติน พบว่ากรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคยับยั้งการเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 100% ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1.56 mM รองลงมาได้แก่ เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน, เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน และเอ็น-อะซิติลแมนโนซามีน ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 6.25, 6.25 และ 12.50 mM มาตามลำดับ น้ำตาลกลูโคส, กาแลคโตส และแมนโนสไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ที่ความเข้มข้น 200 mM ในขณะที่ ไกลโคโปรตีนได้แก่ ฟีทูอิน (fetuin) และมิวซินสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ 100% ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1.50 และ 0.50 มก./มล. ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 3

ซีรัมเลคตินของกุ้งแชบ๊วยมีความจำเพาะต่อชนิดน้ำตาลและไกลโคโปรตีนคล้ายกับเลคตินซึ่งจำเพาะต่อน้ำตาลเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีนและเอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีนของครัสเตเซียนชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 1) เช่น *P. monodon*, *P. paulensis*, *P. schmitti* และ *P. indicus* รวมทั้ง *P. longilostris* ที่จำเพาะต่อไกลโคโปรตีนคือโบวีนซีรัมมิวซินและฟีทูอิน (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; Marques and Barracco, 2000) ส่วนเลคตินจากซีรัมกุ้งก้ามกรามที่เป็นกุ้งน้ำจืดจำเพาะต่อน้ำตาลเอ็น-อะซิติลแลคโตซามีนมากที่สุด และรองลงมาคือ เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีนและเอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีนที่ยับยั้งได้ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ในขณะที่กรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคมีผลยับยั้งน้อยที่สุด ไกลโคโปรตีนที่มีผลยับยั้ง ได้แก่มิวซินชนิด BSM (bovine submaxillary mucin) แต่ฟีทูอินมีผลยับยั้งน้อยกว่ามิวซิน (Vazquez *et al.*, 1993) จะเห็นว่าเลคตินจากซีรัมของกุ้งส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลที่มีหมู่เอ็น-อะซิติล เช่น

เดียวกับเลคตินของครัสเตเชียนอื่น ๆ เช่น ปู และแมงดาทะเล (Armstrong *et al.*, 1996; Mercy and Ravindanath, 1994)

จากการที่ซีรัมเลคตินของกุ้งแชบ๊วยมีความจำเพาะต่อฟีทูอิน จึงใช้สมบัติข้อนี้ในการแยกเลคตินจากซีรัมด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose

ตารางที่ 3 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลและไกลโคโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยซีรัมเลคตินได้ 100%

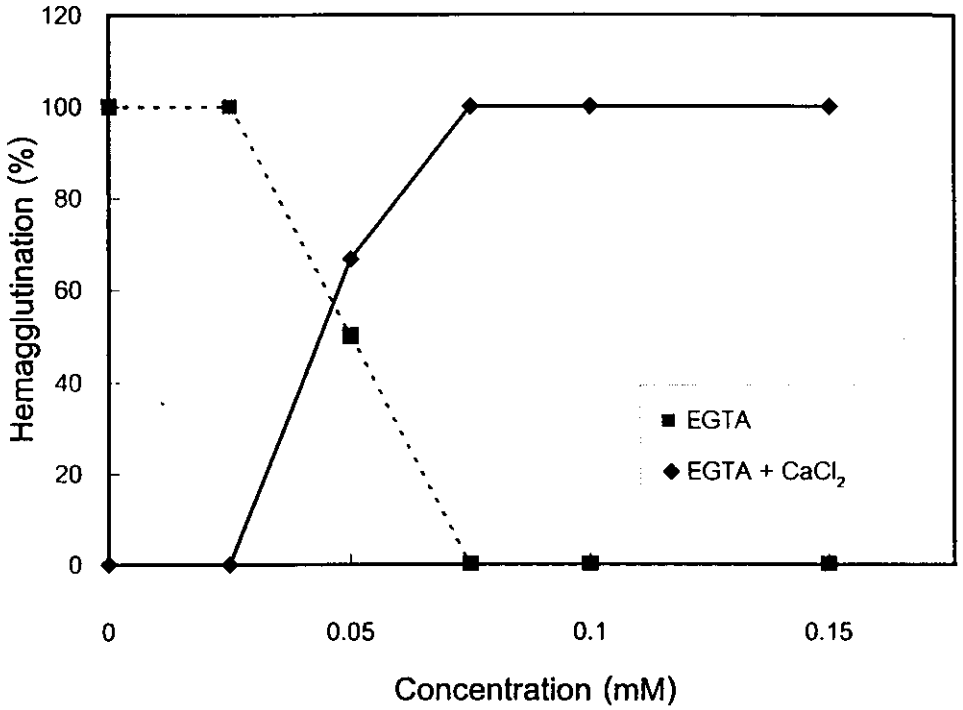
		Minimum concentration
Sugar :	Glucose	No inhibition at 200 mM
	Galactose	No inhibition at 200 mM
	Mannose	No inhibition at 200 mM
	N-Acetyl glucosamine	6.25 mM
	N-Acetyl galactosamine	6.25 mM
	N-Acetyl mannosamine	12.50 mM
	N-Acetyl neuraminic acid	1.56 mM
Glycoprotein :	Mucin	0.50 mg/ml
	Fetuin	1.50 mg/ml

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ตัวอย่าง ทดลองตัวอย่างละ 2 ครั้ง

3.1.3 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออน และ EGTA

จากการไดแอไลซ์ซีรัมด้วยน้ำปลอดไอออนและ TBS พบว่าซีรัมเลคตินก่อนและหลังการไดแอไลซ์มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้เท่ากัน และเมื่อทำการทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายในภาวะที่มี 0.075 mM Ca^{2+} ก็มีค่าแอคทิวิทีคงเดิมเมื่อเทียบกับไม่มี Ca^{2+}

เมื่อศึกษาผลของ EGTA เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทน EGTA พบว่า EGTA สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของซีรัมเลคตินได้สมบูรณ์ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.075 mM ดังแสดงผลในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลความเข้มข้นของ EGTA หรือ Ca^{2+} ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยซีรัมเลคติน

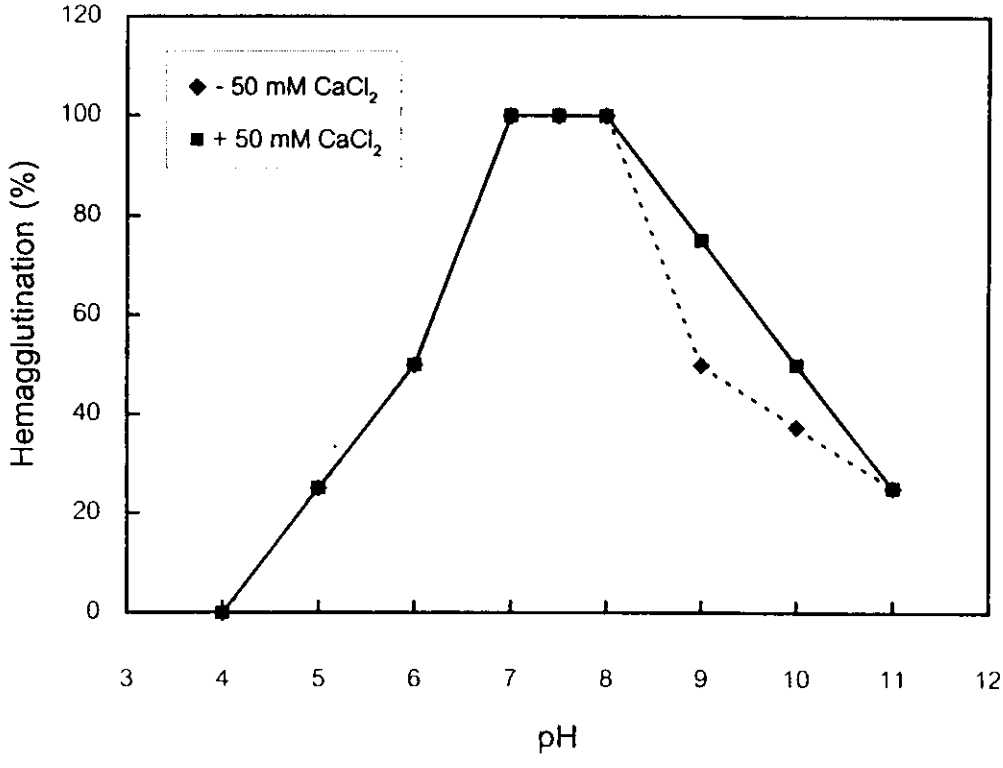
จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่ Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของซีรัมเลคตินในภาวะที่มี 0.075 mM EGTA พบว่า Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.075 mM ทำให้ซีรัมเลคตินเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ 66.6 และ 100% ตามลำดับ (รูปที่ 4) ในขณะที่ Mg^{2+} ในช่วงความเข้มข้น 0.1 mM - 0.2 M ไม่มีผลทำให้ซีรัมเลคตินสามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้เมื่อมี 0.075 mM EGTA

จากผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าซีรัมเลคตินไม่ได้ต้องการไอออนในฮีโมลิมฟ์เพื่อการเกาะกลุ่มเซลล์เพราะมีแอคทิวิทีเท่ากันก่อนและหลังการไดแอไลซ์ รวมทั้งในภาวะที่มี 0.075 mM Ca^{2+} ในการทดสอบ แต่ต้องการ Ca^{2+} ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลเพื่อการเกาะกลุ่มเซลล์เพราะแอคทิวิทีถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ได้ด้วย EGTA ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.075 mM แต่เมื่อเติม Ca^{2+} กลับในภาวะที่มี 0.075 mM EGTA พบว่า Ca^{2+} สามารถทำให้ซีรัมเลคตินเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ 100% อีกครั้ง (รูปที่ 4) ในขณะที่ Mg^{2+} ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของซีรัมเลคตินในภาวะเดียวกัน

3.1.4 ผลของ pH

ในการทดสอบความสามารถของซีรัมเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4 -11 พบว่าที่ pH 4 เม็ดเลือดแตกไม่สามารถวัดการเกาะกลุ่มได้ ซีรัมเลคตินสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุดในช่วง pH 7 - 8 และเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 50% ที่ pH 6 และ 9, 37.5% ที่ pH 10, 25% ที่ pH 5 และ 11 ตามลำดับ (รูปที่ 5) ด้วยเหตุนี้การวัดแอคทิวิทีของเลคตินในงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงทำในบัฟเฟอร์ที่ pH 7.5

ความสามารถของซีรัมเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเมื่อมี 50 mM $CaCl_2$ ที่ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4 –11 ให้ผลทำนองเดียวกัน แต่ที่ pH 9 และ 10 จะเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 75 และ 50% ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่า Ca^{2+} ช่วยทำให้ซีรัมเลคตินเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีขึ้นที่ pH ค่อนข้างสูง

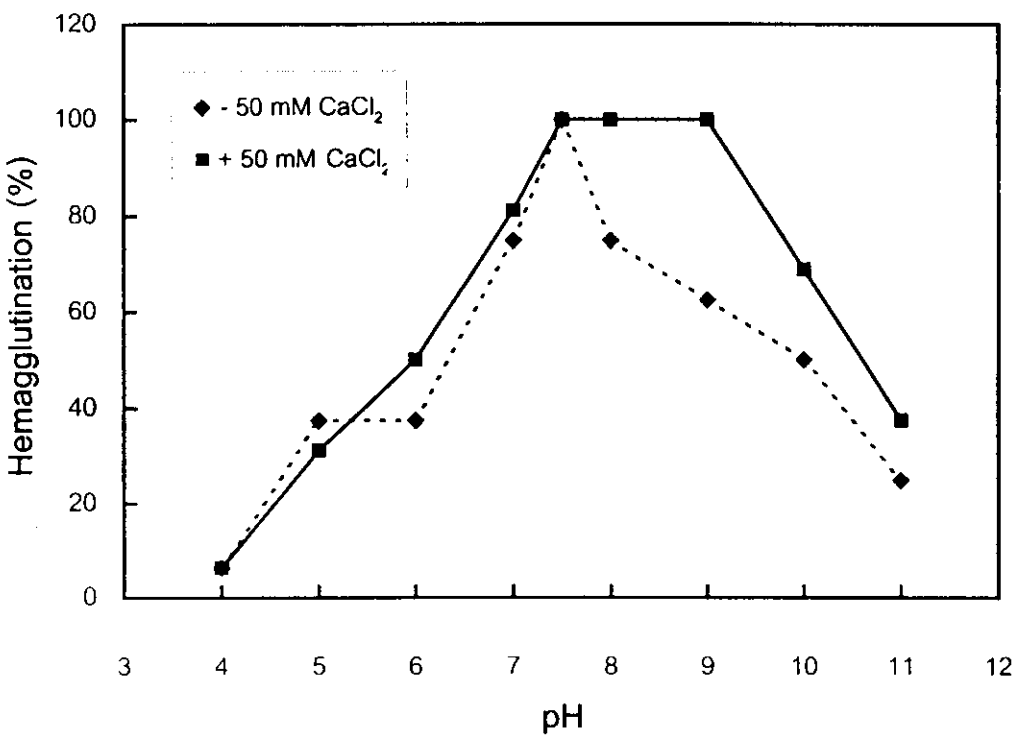


รูปที่ 5 ผลของ pH ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยซีรัมเลคติน

3.1.5 ความเสถียรต่อ pH

จากการทดสอบความเสถียรของซีรัมเลคตินต่อ pH โดยการผสมซีรัมกับบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4-11 แล้วหาแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ pH 7.5 พบว่าซีรัมเลคตินมีความเสถียรสูงสุดในช่วง pH 7.5 ความเสถียรของซีรัมเลคตินลดลงเหลือ 75% ที่ pH 7 และ 8, 62.5% ที่ pH 9, 50% ที่ pH 10 และลดลงเหลือ 37.5% และ 25% ที่ pH 5-6 และ 11 ตามลำดับ (รูปที่ 6)

ความเสถียรของซีรัมเลคตินเมื่อมี 50 mM $CaCl_2$ อยู่ด้วยต่อ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4 –11 พบว่า ซีรัมเลคตินมีความเสถียรสูงสุดในช่วง pH 7.5 - 9 แล้วลดลงเหลือ 68.5% และ 37.5% ที่ pH 10 และ 11 ตามลำดับ (รูปที่ 6) บ่งชี้ว่า Ca^{2+} ช่วยรักษาโครงร่างของโปรตีนทำให้ซีรัมเลคตินมีความเสถียรต่อ pH มากขึ้น

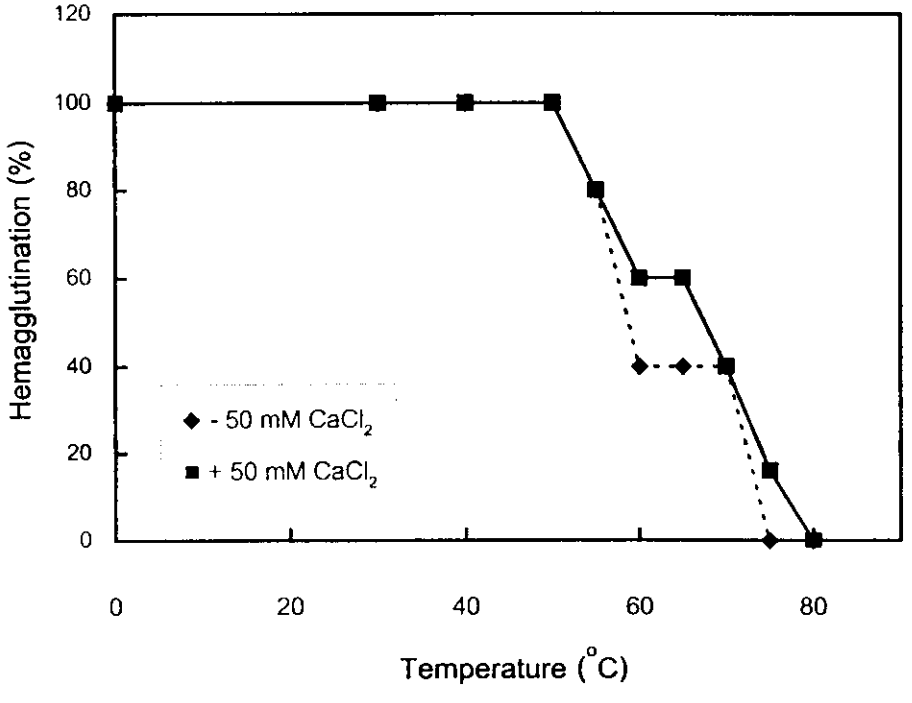


รูปที่ 6 ความเสถียรต่อ pH ของซีรัมเลคติน

3.1.6 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

จากการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินในซีรัมโดยการอุ่นซีรัมที่อุณหภูมิ 30 - 80 °ซ เป็นเวลา 20 นาที พบว่าซีรัมเลคตินทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ค่าคงเดิม เมื่ออุ่นที่ 30 - 50 °ซ แล้วลดลงเหลือ 80 และ 40% เมื่ออุ่นที่อุณหภูมิ 55 และ 60-70 °ซ ตามลำดับ และสูญเสียแอคทิวิทีอย่างสมบูรณ์เมื่ออุ่นเลคตินที่อุณหภูมิ 75 °ซ (รูปที่ 7) เนื่องจากซีรัมเลคตินมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 30-50 °ซ ดังนั้นในการวัดแอคทิวิทีของเลคตินจึงทำที่อุณหภูมิห้องได้

การอุ่นซีรัมในภาวะที่มี 50 mM $CaCl_2$ จะทำให้ซีรัมเลคตินทนต่อการแปลงสภาพโดยอุณหภูมิดีกว่าเมื่อไม่มี Ca^{2+} กล่าวคือเมื่ออุ่นที่อุณหภูมิ 60-65 °ซ ซีรัมเลคตินยังทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ 60% และอุ่นที่ 75 °ซ ยังเหลือแอคทิวิทีอีก 16% โดยสูญเสียแอคทิวิทีอย่างสมบูรณ์เมื่ออุ่นเลคตินที่อุณหภูมิ 80 °ซ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของซีรัมเลคติน

3.2 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้งแชบ๊วย

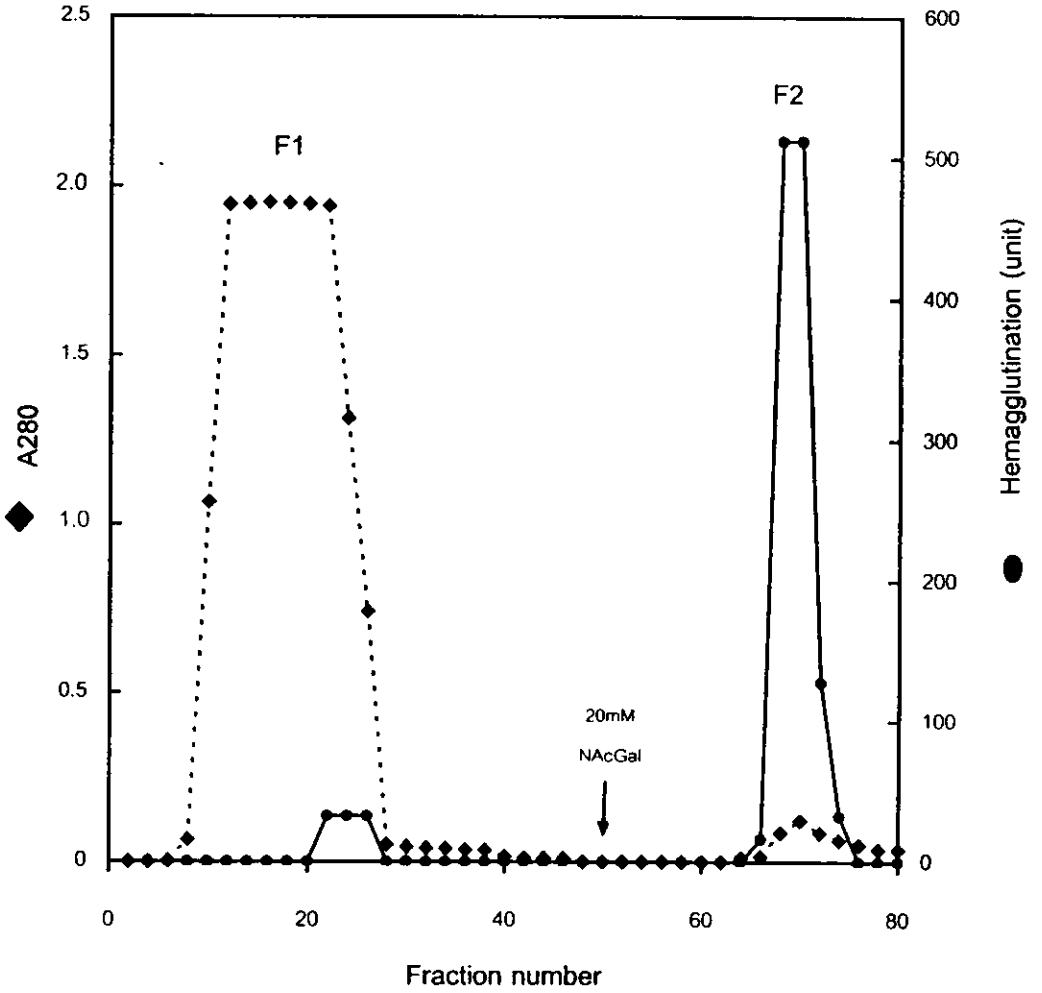
3.2.1 การใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose

จากการผ่านซีรัมปริมาตร 6 มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีน 472.14 มิลลิกรัม ลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris - HCl, pH 7.5-0.3 M NaCl - 0.1 M $CaCl_2$ พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค คือพีค F1 ที่มีแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายน้อยมาก ดังแสดงผลในรูปที่ 8 เมื่อล้างคอลัมน์ต่อด้วย 20 mM เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีนในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาอีก 1 พีค คือ พีค F2 เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ 65-66 ที่มีแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นและไดแอไลซ์ใน TBS พบว่าสารละลายโปรตีนพีค F2 มีปริมาณโปรตีน 0.17 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.036% ของซีรัมเลคตินเริ่มต้น และมีแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 27,102 หน่วย และ 159,423 หน่วย/มก.โปรตีนคิดเป็น 61.00% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1,696 เท่าของซีรัมเลคตินเริ่มต้นตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 4 และรูปที่ 8

เมื่อนำสารละลายโปรตีนพีค F2 ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าสารละลายโปรตีนพีค F2 ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียว (รูปที่ 9 แถวที่ 3)

3.2.2 การใช้คอลัมน์ Superdex 200

ในการนำสารละลายโปรตีนพีค F2 ปริมาณ 0.17 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR10/30 ซึ่งทำให้คอลัมน์สมดุลก่อนด้วย TBS ที่มี 20 mM เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน เมื่อทำการล้างคอลัมน์ Superdex 200 ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาเพียง 1 พีค คือ พีค S1 (รูปที่ 10) เมื่อรวมสารละลายโปรตีนของพีค S1 เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นไดแอไลซ์ใน TBS พบว่าเลคตินที่แยกได้มีโปรตีนถูกชะออกมา 0.005 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.001% ของซีรัมเลคตินเริ่มต้น มีแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 512 หน่วย และ 102,400 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 1.15% และมีความบริสุทธิ์เป็น 1,089 เท่า ของซีรัมเลคตินเริ่มต้น ดังแสดงผลในตารางที่ 4



รูปที่ 8 การแยกเลคตินจากซีรัมโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose

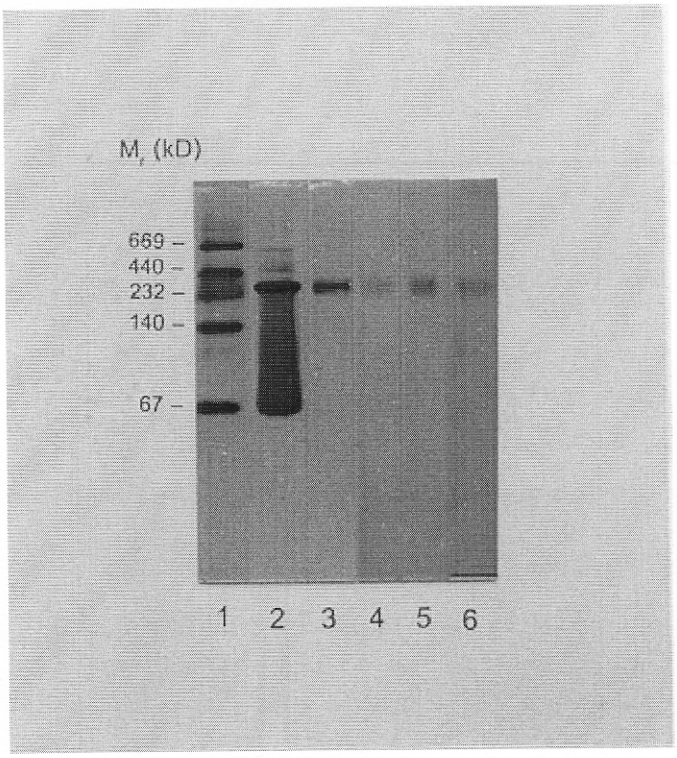
ผ่านซีรัมปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose (1.2 x 18 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.3 M NaCl -0.1 M $CaCl_2$ ด้วยอัตราไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะต่อด้วย 20 mM เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัม

Sample	Volume	Protein		Hemagglutination			Purification
	ml	mg	%	unit	%	unit/mg protein	fold
Serum	6.0	472.140	100	44,430	100	94	1
Fetuin-agarose eluate peak F2	2.0	0.170	0.036	27,102	61.00	159,423	1,696
* Superdex 200 eluate	0.2	0.005	0.001	512	1.15	102,400	1,089

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

* ทำการทดลองต่อจากคอลัมน์ Fetuin-agarose



รูปที่ 9 **แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพของเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Fetuin-agarose และ Superdex 200 HR 10/30**

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 ซีรัม

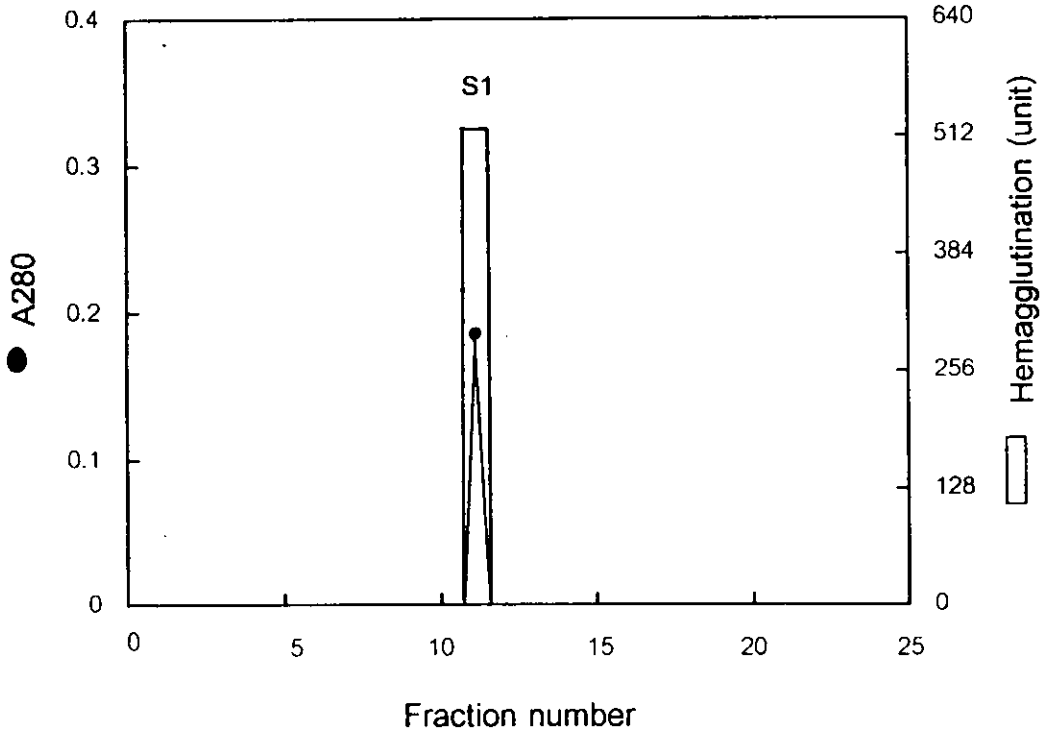
แถวที่ 3-5 เลคตินบริสุทธิ์จากคอลัมน์ Fetuin-agarose

แถวที่ 6 เลคตินบริสุทธิ์จากคอลัมน์ Superdex 200

แถวที่ 1-2 ใช้โปรตีนแถวละ 15 ไมโครกรัม ย้อมสีคูมาซีบลู

แถวที่ 3 ใช้โปรตีน 3 ไมโครกรัม ย้อมสีคูมาซีบลู

แถวที่ 4-6 ใช้โปรตีนแถวละ 0.2 ไมโครกรัม ย้อมแบบซิลเวอร์



รูปที่ 10 การแยกเลคตินจากสารละลายโปรตีนพืค F2 ของคอลัมน์ Fetuin-agarose ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30

นำสารละลายโปรตีนพืค F2 ของคอลัมน์ Fetuin-agarose ปริมาณ 0.17 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 ชะคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.15 M NaCl ที่มี 20 mM เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน ด้วยอัตราไหล 24 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ เก็บละลายหลอดละ 0.9 มิลลิลิตร

จากการนำสารละลายโปรตีนพีค S1 ของคอลัมน์ Superdex 200 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียว ดังแสดงผลในรูปที่ 9 แถวที่ 6 บ่งชี้ว่าเป็นเลคตินบริสุทธิ์

เนื่องจากเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยมีความจำเพาะต่อไกลโคโปรตีนฟีทูอิน (ผลการทดลองจากข้อ 3.1.2) ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์ และผลการแยกซีรัมโดยคอลัมน์นี้สามารถแยกได้เลคตินบริสุทธิ์ (สารละลายโปรตีนพีค F2) ซึ่งปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ทั้งการย้อมด้วยสีคูมาซีบลูและแบบซิลเวอร์ (รูปที่ 9 แถวที่ 3, 4) ในทำนองเดียวกับการแยกสารละลายโปรตีนพีค F2 ต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 แสดงให้เห็นว่าการใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose เพียงขั้นตอนเดียวก็เพียงพอในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยได้ แต่ไม่ควรใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้ง ในการแยกเลคตินจากซีรัมโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ที่ผ่านการใช้มาแล้ว 3-4 ครั้ง สารละลายโปรตีนพีค F2 ที่แยกได้ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ จากการย้อมด้วยสีคูมาซีบลู ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ แต่บางครั้งปรากฏแถบโปรตีนจาง ๆ เพิ่มอีก 1 แถบ เมื่อย้อมแบบซิลเวอร์ (รูปที่ 9 แถวที่ 5) ซึ่งแถบโปรตีนจางนี้อยู่ในตำแหน่งล่างจากแถบเข้มของเลคติน แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ Fetuin-agarose ที่ผ่านการใช้แล้วหลายครั้งไม่สามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกจากเลคตินได้หมด ยังคงมีโปรตีนอื่นปริมาณเล็กน้อยที่ปนเปื้อนอยู่บ้าง ซึ่งตรวจพบได้จากการย้อมแบบซิลเวอร์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะฟีทูอินบางส่วนของคอลัมน์ที่ใช้จับกับเลคตินเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการชะล้างคอลัมน์หลายครั้ง ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง สำหรับคอลัมน์ Superdex 200 มีประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนปนเปื้อนที่พบนี้ (รูปที่ 9 แถวที่ 5) ออกไปได้เป็นอย่างดี แต่มีข้อเสียคือเลคตินส่วนมากซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนสามารถจับได้ดีกับ dextran ของคอลัมน์ทำให้สูญเสียแอคทิวิทีของเลคตินไปจำนวนมาก (ตารางที่ 4) จึงควรเปลี่ยนไปใช้คอลัมน์เจลฟิลเทรชันชนิดอื่นแทน ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกใช้เลคตินบริสุทธิ์ที่แยกโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose และแสดงแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ทั้งจากการย้อมด้วยสีคูมาซีบลูและแบบซิลเวอร์ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ เพื่อศึกษา

สมบัติในข้อต่อ ๆ ไป

สำหรับการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากแหล่งอื่น ๆ อาจผ่านขั้นตอนเดียวหรือหลายขั้นตอนขึ้นกับสมบัติของเลคตินนั้น ๆ เช่น การแยกเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งก้ามกราม โดยคอลัมน์ erythrocyte stroma-Sephadex G-25 (Vazquez *et al.*, 1993) และการแยกเลคตินจากผิวคางคกโดยคอลัมน์ Lactosyl-agarose (Elola and Fink, 1996) หรือ การแยกเลคตินจากเยื่อบุผิวในปาก (oral epithelium) ของหมูที่ใช้เพียงคอลัมน์ Lactosyl-Sepharose (Chiu *et al.*, 1994) อย่างเดียวก็แยกได้เลคตินบริสุทธิ์ แต่การแยกเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งกุลาดำอาศัยคอลัมน์ Fetuin-agarose, Superose 12 และ Mono-Q ตามลำดับ จึงจะแยกได้เลคตินบริสุทธิ์ (Ratanpo and Chulavatnatol, 1992) ส่วนการแยกเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของเพรียงหัวหอม (ascidian) ต้องใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephacryl S-200, Sephacryl S-300 และ Sepharose 4B ตามลำดับ จึงจะแยกได้เลคตินบริสุทธิ์ (Schluter and Ey, 1989)

3.3 การศึกษาสมบัติของเลคตินบริสุทธิ์

3.3.1 แบบแผนโปรตีนของเลคตินในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้งแชบ๊วย โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินที่เตรียมได้โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าซีรัมเริ่มต้นที่นำมาศึกษาปรากฏแถบโปรตีนที่ติดสีย้อมคูมาซีบลูเข้มมาก 2 แถบ และมีแถบโปรตีนที่ติดสีย้อมเข้มรองลงมาอีก 2-3 แถบ (รูปที่ 9 แถวที่ 2) เมื่อแยกเลคตินจากซีรัมโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose สารละลายโปรตีนพีค F2 ที่ได้จากคอลัมน์นี้ ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ เมื่อย้อมด้วยสีคูมาซี บลู (รูปที่ 9 แถวที่ 3) หรือแบบซิลเวอร์ (รูปที่ 9 แถวที่ 4) แสดงให้เห็นว่าเลคตินที่แยกได้จากคอลัมน์นี้เป็นเลคตินบริสุทธิ์ที่ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ และเมื่อนำสารละลายโปรตีนพีค F2 ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 พบว่าสารละลายโปรตีนพีค S1 ที่แยกได้ก็ปรากฏ

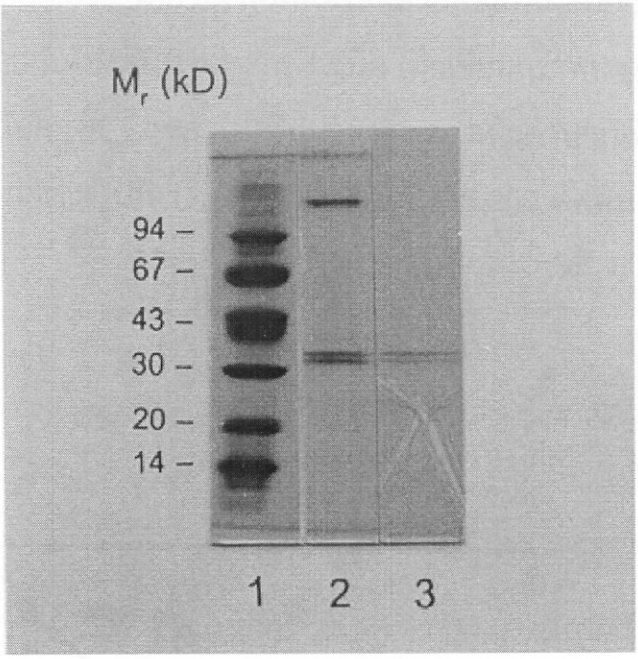
แถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพเช่นกัน (รูปที่ 9 แถวที่ 6)

แบบแผนโปรตีนของเลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมกุ้งแชบ๊วยที่แยกได้นี้คล้ายกับแบบแผนโปรตีนของเลคตินที่แยกได้จากสัตว์ชนิดอื่นซึ่งปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ อาทิเช่น เลคตินจากไข่คางคก (Ahmed *et al.*, 1996) จากเพรียง (*Styela clava*) (Kelly *et al.*, 1992) จากพลาสมาปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) (อุไรวรรณ ไพชำนาญ, 2542) และจากต่อมพิษของงูหางกระดิ่ง (Tropical rattlesnake) (Polgur *et al.*, 1997)

3.3.2 แบบแผนโปรตีนของเลคตินในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

จากการนำเลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ เมื่อเตรียมตัวอย่างเพื่อทำอิเล็กโทรฟอรีซิสโดยไม่ผ่านการต้ม ดังแสดงผลในรูปที่ 11 แถวที่ 2 แต่ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ เมื่อเตรียมตัวอย่างเพื่อทำอิเล็กโทรฟอรีซิสโดยการต้ม 5 นาที (รูปที่ 11 แถวที่ 3) บ่งชี้ว่าการต้มเลคตินบริสุทธิ์ในภาวะที่มีเอสดีเอสทำให้โปรตีนของเลคตินแปลงสภาพ (denature) และแตกออกเป็นหน่วยย่อยจึงปรากฏแถบโปรตีนเหลือเพียง 2 แถบ ในทำนองเดียวกัน เลคตินบริสุทธิ์แสดงแถบโปรตีน 2 แถบ ณ ตำแหน่งเดียวกันกับรูปที่ 11 แถวที่ 3 ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ทั้งที่มีและไม่มีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (ไม่ได้แสดงผลไว้) แสดงให้เห็นว่าไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ยึดอยู่ระหว่างสายเปปไทด์ของเลคติน

เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสของเลคตินอื่น ๆ พบว่า เลคตินที่มีแบบแผนเป็นโปรตีน 2 แถบ เช่นกันได้แก่เลคตินจากหอยทาก (*Helix pomatia*) (Theopold *et al.*, 1996) และจากไข่ปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) (Bildfell *et al.*, 1992) ส่วนเลคตินจากกุ้งกุลาดำ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) และจากพลาสมาปลากะรัง (อุไรวรรณ ไพชำนาญ, 2542) ปรากฏโปรตีนเพียง 1 แถบ



รูปที่ 11 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอสของเลคตินบริสุทธิ์

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน 15 ไมโครกรัม

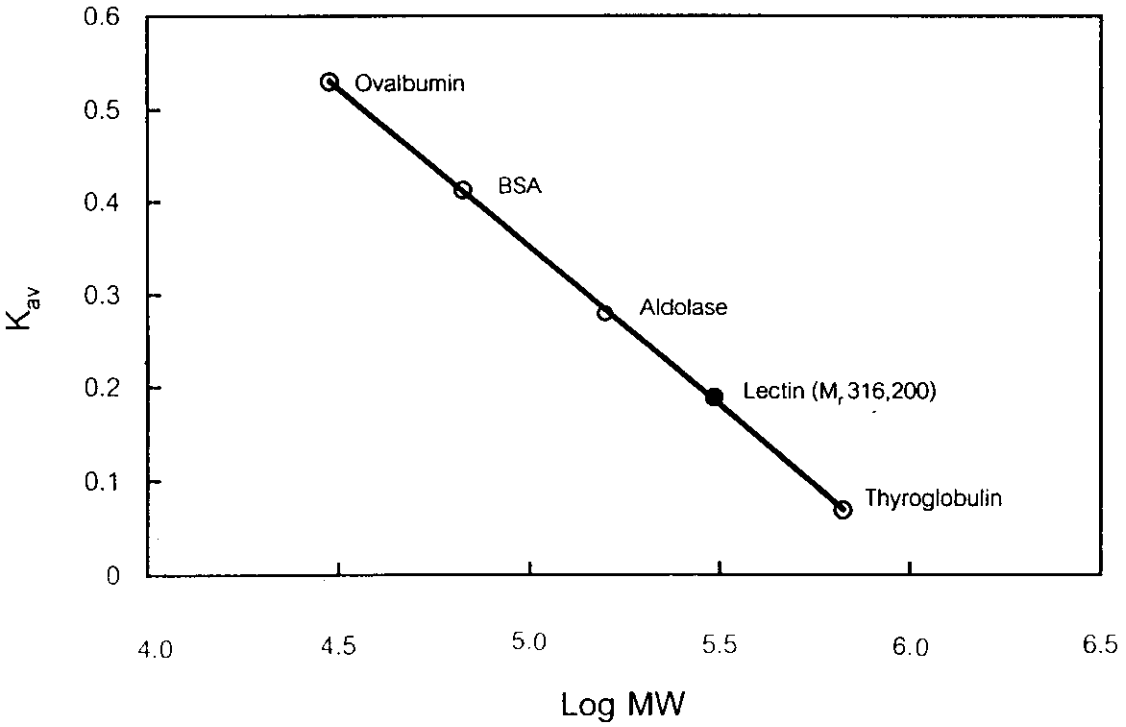
แถวที่ 2 เลคตินบริสุทธิ์จากคอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ไมโครกรัม (ไม่ต้ม)

แถวที่ 3 เลคตินบริสุทธิ์จากคอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ไมโครกรัม (ต้ม 5 นาที)

3.3.3 น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์

3.3.3.1 การหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

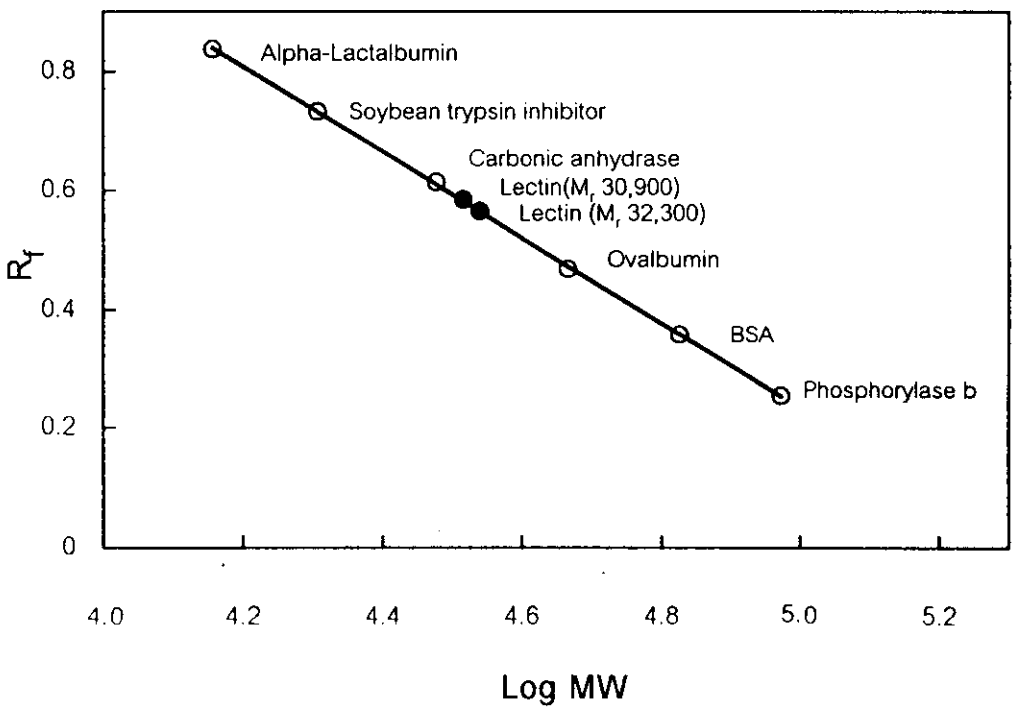
จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ (พีค F2) ที่แยกได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose โดยวิธีเจลฟิลเทรชันด้วยคอลัมน์ Superdex 200 จากข้อ 3.2.2 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิด เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่า log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์จากกราฟรูปที่ 12 พบว่ามีค่าเป็น 316,200 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 12



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Superdex 200

3.3.3.2 การหาโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

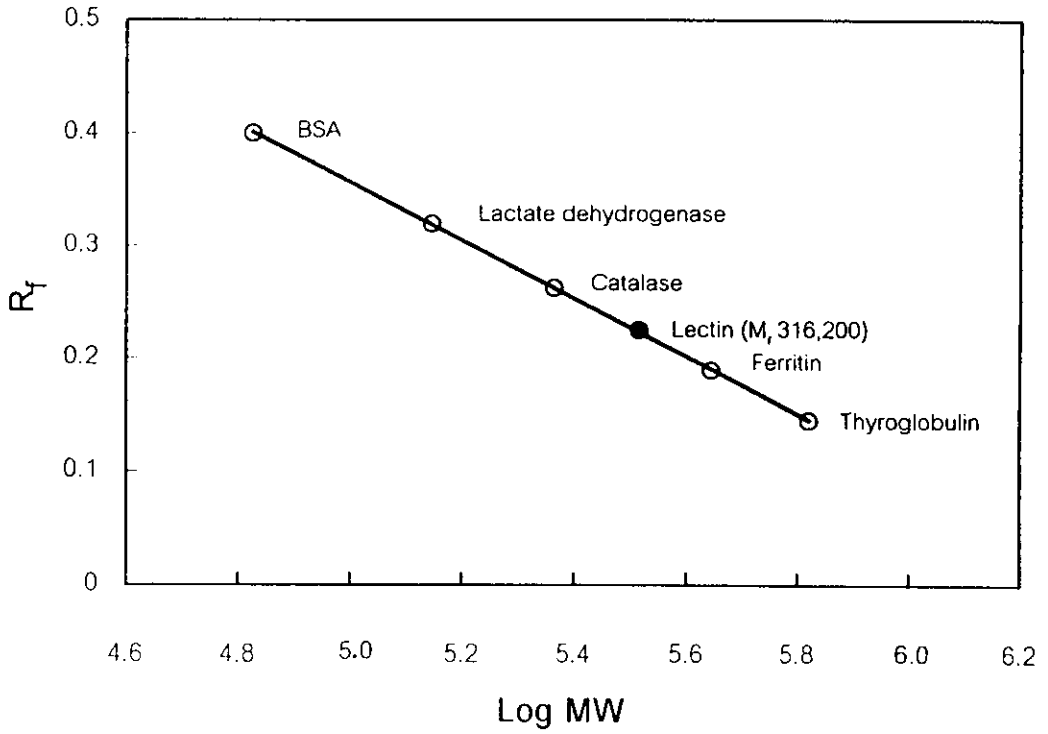
ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินบริสุทธิ์ โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ด้วยการเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเลคตินบริสุทธิ์กับของโปรตีนมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานรูปที่ 13 พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 32,300 และ 30,900 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 13 และรูปที่ 11 แถวที่ 3



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

3.3.3.3 การหาโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

เมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินบริสุทธิ์ (พีค F2) ที่ได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ด้วยการเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเลคตินบริสุทธิ์กับของโปรตีนมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานรูปที่ 14 พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 316,200 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 14 และรูปที่ 9 แถวที่ 3



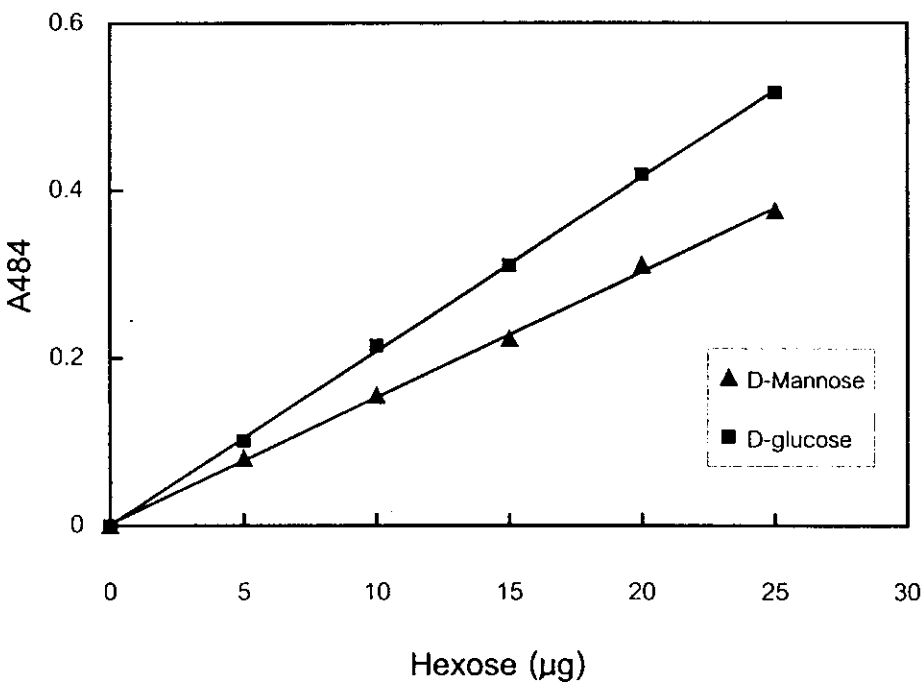
รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโดยคอลัมน์ Superdex 200 และวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 316,200 ดัลตัน และเมื่อหาโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วยโปรตีน 2 แถบ ซึ่งคือหน่วยย่อย 2 ขนาด ที่มีน้ำหนัก 30,900 และ 32,300 ดัลตัน (รูปที่ 11 แถวที่ 3) เนื่องจากโปรตีนทั้ง 2 แถบติดสีย้อมด้วยความเข้มเท่า ๆ กัน จึงเป็นไปได้ที่เลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนัก 30,900 และ 32,300 ดัลตัน อย่างละ 5 หน่วยย่อย ซึ่งเมื่อรวมน้ำหนักทั้งหมดได้เป็น 316,000 ดัลตัน ที่ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่หาได้จาก 2 วิธีข้างต้น และหน่วยย่อยเหล่านี้ของเลคตินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยไม่ได้ยึดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เช่นเดียวกับเลคตินบริสุทธิ์ของปลากะรัง (อุไรวรรณ ไพชำนาญ, 2542) เลคตินของกุ้งสกุล *Penaeus* ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาดที่ต่างกัน ได้แก่เลคตินของ *P. indicus* (Maheswari *et al.*, 1997) และของ *P. schmitti* (Marques and Barracco, 2000) แต่เลคตินของกุ้งสกุล *Penaeus* ชนิดอื่น ๆ ที่แสดงในตารางที่ 1 ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาดเดียวเท่ากัน

3.3.4 องค์ประกอบน้ำตาลของเลคตินบริสุทธิ์

จากการหาปริมาณน้ำตาลของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีฟีนอลกรดซัลฟุริคที่ใช้กลูโคสและแมนโนสเป็นน้ำตาลมาตรฐานพบว่าเลคตินบริสุทธิ์มีค่าเฉลี่ยของกลูโคสเป็น 180 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน และมีค่าเฉลี่ยของแมนโนสเป็น 260 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน ซึ่งได้จากการหาปริมาณน้ำตาลของเลคตินบริสุทธิ์ 2 การทดลอง และจากกราฟมาตรฐานรูปที่ 15

เมื่อเปรียบเทียบกับเลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมกุ้งก้ามกรามพบว่าประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 7% มีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบคือ กรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคกาแลคโตส แมนโนส เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน และเอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน (Vazquez *et al.*, 1993) เลคตินโมโนดินจากซีรัมกุ้งกุลาดำมีน้ำตาลเป็นกลาง (neutral sugar) เป็นองค์ประกอบ 3.89% ของโปรตีนโดยน้ำหนัก (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990)



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของกลูโคสและแมนโนส

3.3.5 ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

จากการทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด (159,000 หน่วย/มก.โปรตีน) ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.25 ไมโครกรัม/มล. รองลงมาคือเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่เลือดระบบ ABO ได้เท่ากัน (79,500 หน่วย/มก.โปรตีน) ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.50 ไมโครกรัม/มล. (ตารางที่ 5) ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลคติน บริสุทธิ์ก็เป็นเช่นเดียวกับซีรัมเลคติน แต่มีแอคทิวิทีจำเพาะสูงกว่า เพราะได้กำจัดโปรตีนปนเปื้อนอื่น ๆ ออกไปแล้วจากการทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 5 ความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

Red Blood Cell		Hemagglutination (unit/mg protein)	Mimimum concentration required (μg/ml)
Human	group A	79,500	0.50
	group B	79,500	0.50
	group AB	79,500	0.50
	group O	79,500	0.50
Rabbit		159,000	0.25

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

3.3.6 ผลการยับยั้งของน้ำตาลและไกลโคโปรตีนต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

เมื่อทดสอบผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ด้วยไกลโคโปรตีนหรือน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นในช่วงต่าง ๆ พบว่าไกลโคโปรตีนที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ 100% ได้แก่ ฟีทูอินและมิวซินที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1.5 และ 1.0 มก./มล. ตามลำดับ อะไซอะโลฟีทูอินซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้กำจัดกรดไซอะลิคหรือกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคออกไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้นในช่วง 0 - 5 มก./มล. ได้ บ่งชี้ว่าเลคตินบริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อไกลโคโปรตีนที่มีกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคเป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับที่กรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ 100% ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1.56 mM ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน, เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีนและเอ็น-อะซิติลแมนโนซามีน ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 6.25, 6.25 และ 25 mM ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ในขณะที่น้ำตาลกลูโคส, กาแลคโตส และแมนโนส ที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 mM ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ (ตารางที่ 6) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของเลคตินบริสุทธิ์ต่อหมู่เอ็น-อะซิติลในน้ำตาล

ความจำเพาะของเลคตินบริสุทธิ์ต่อชนิดน้ำตาลและไกลโคโปรตีนที่มีหมู่เอ็น-อะซิติลเป็นองค์ประกอบ คล้ายกับของเลคตินบริสุทธิ์จากกุ้งกุลาดำ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) หรือกุ้งในสกุล *Penaeus* อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 และยังคล้ายกับเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรัง (อุไรวรรณ ไพชำนาญ, 2542)

ตารางที่ 6 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลและไกลโคโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ได้ 100%

		Minimum concentration
Sugar :	Glucose	No inhibition at 200 mM
	Galactose	No inhibition at 200 mM
	Mannose	No inhibition at 200 mM
	N-Acetyl glucosamine	6.25 mM
	N-Acetyl galactosamine	6.25 mM
	N-Acetyl mannosamine	25.00 mM
	N-Acetyl neuraminic acid	1.56 mM
Glycoprotein :	Mucin	1.00 mg/ml
	Fetuin	1.50 mg/ml
	Asialofetuin	No inhibition at 5 mg/ml

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

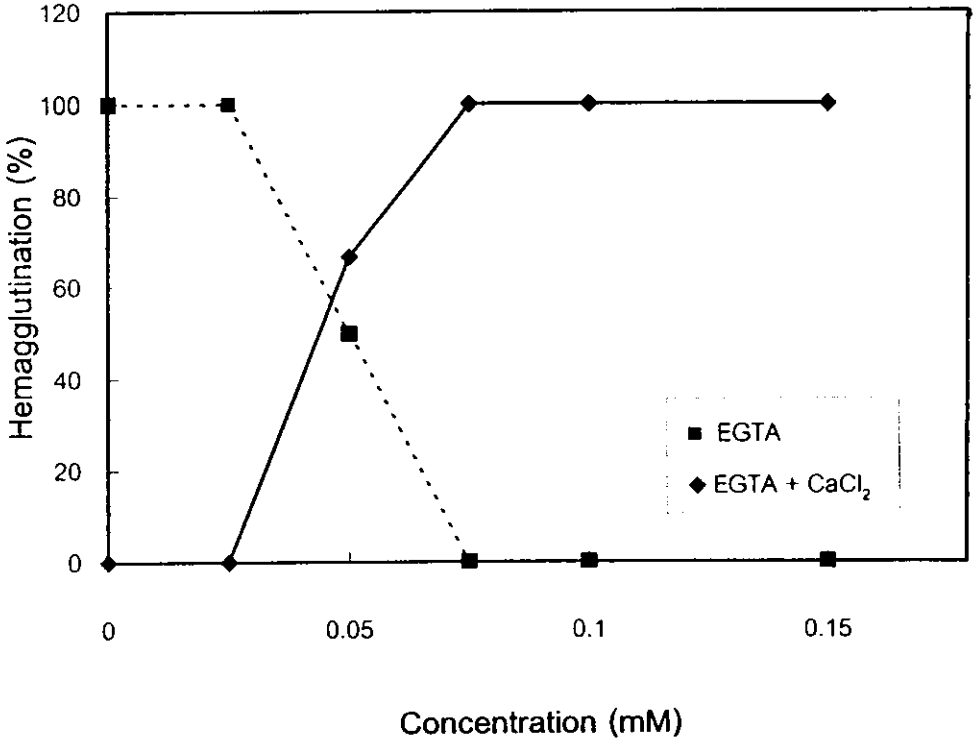
3.3.7 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออน และ EGTA

เมื่อนำเลคตินบริสุทธิ์ไปไดแอไลซ์ด้วยน้ำปลอดไอออนและ TBS พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ก่อนและหลังการไดแอไลซ์มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้เท่ากันเป็นเพราะบัฟเฟอร์ของเลคตินบริสุทธิ์ก่อนและหลังการไดแอไลซ์ไม่มี Ca^{2+} อยู่ เมื่อทำการทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายในภาวะที่มี 0.075 mM Ca^{2+} เลคตินบริสุทธิ์มีค่าแอคทิวิที (477,000 หน่วย/มก.โปรตีน) เพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อเทียบกับการทดสอบในภาวะที่ไม่มี Ca^{2+} (159,000 หน่วย/มก.โปรตีน) บ่งชี้ว่าเลคตินบริสุทธิ์ต้องการ Ca^{2+} ช่วยในเกาะกลุ่มเซลล์

จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} หรือ EGTA เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทนไดวาเลนท์แคทไอออนหรือ EGTA พบว่า EGTA สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ได้สมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.075 mM (รูปที่ 16) ในภาวะที่มี EGTA 0.075 mM พบว่า Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.075 mM ทำให้เลคตินบริสุทธิ์เกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ 66.6 และ 100% ตามลำดับ (รูปที่ 16) ในขณะที่ Mg^{2+} ในช่วงความเข้มข้น 0.1 mM-0.2 M ไม่มีผลทำให้เลคตินบริสุทธิ์เกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้

จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากซีรัมมีสมบัติไม่ต่างจากซีรัมเลคติน โดยต้องการ Ca^{2+} ในเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายและถูกยับยั้งได้โดย EGTA ซึ่งคล้ายกับเลคตินของกุ้งกุลาดำ (Ratanpo and Chulavatnatol, 1990) และของกุ้งก้ามกราม (Vazquez *et al.*, 1993) แต่ Mg^{2+} ไม่มีผลต่อแอคทิวิทีของเลคตินจากกุ้งแชบ๊วย ซึ่งกลับกันกับของกุ้งก้ามกราม (Vazquez *et al.*, 1993) เลคตินจากกุ้งทะเลในกลุ่มเดียวกับกุ้งแชบ๊วย ได้แก่ *P. japonicus*, *P. californiensis*, *P. styrostris* และ *P. longirostris* (ตารางที่ 1) รวมทั้งเลคตินจากปลิงทะเล (*C. echinata*) (Hatakeyama *et al.*, 1995) ไข่หอยเม่นทะเล (*Hemicentrotus pulcherrimus*) (Seike *et al.*, 1992) ฟองน้ำทะเล (*Aplysia archeri*, *Aplysia lawnosa* และ *Aplysia cauliformis*) (Miarons and Fresno, 2000) เพรียงหัวหอม (*Botrylloides leachii*) (Schluter and Ey, 1989) และจากแมงดาทะเล (*T. tridentatus*) (Okino *et al.*, 1995) ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนเช่นกัน ในขณะที่

เลคตินจากกุ้ง *P. indicus* และ *P. paulensis* (Marques and Barracco, 2000) และเลคตินจากแมงดาทะเล (*L. polyphemus*) (Tsuboi *et al.*, 1996) ไม่ต้องการไอออนในการเกิดปฏิกิริยา

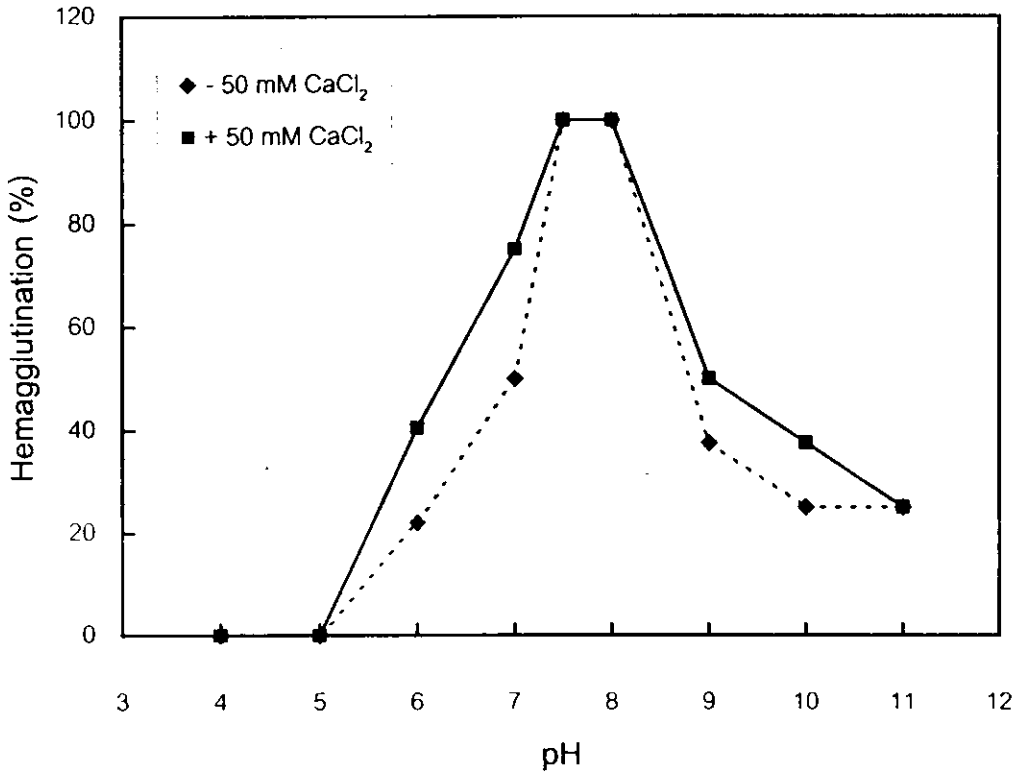


รูปที่ 16 ผลความเข้มข้นของ EGTA หรือ Ca^{2+} ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

3.3.8 ผลของ pH

ในการทดสอบความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4 -11 พบว่าที่ pH 4 เม็ดเลือดแตกไม่สามารถวัดการเกาะกลุ่มได้ เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุดในช่วง pH 7.5 - 8 และเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 50% ที่ pH 7, 37.5% ที่ pH 9, 25% ที่ pH 6 และ 10 - 11 และไม่มีการเกาะกลุ่มเซลล์ที่ pH 5 ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 17

ความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเมื่อมี 50 mM $CaCl_2$ ที่ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4 –11 ให้ผลทำนองคล้ายกัน แต่ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีกว่าเมื่อมี $CaCl_2$ พบว่าที่ pH 7 และ 6 เลคตินจะเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 75 และ 40% ตามลำดับ และที่ pH 9 และ 10 จะเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 50 และ 37.5% ตามลำดับ (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 ผลของ pH ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

pH มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์จากกุ้งแชบ๊วย พบว่าความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเกิดได้ดีที่สุดในช่วง pH 7.5 – 8 ในภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด (pH น้อยกว่า 7.5) หรือเป็นเบส (base, pH มากกว่า 7.5) มีผลกระทบต่อโครงสร้างโปรตีนทำให้เลคตินบริสุทธิ์มีแอคทิวิทีลดลง ซึ่งเหมือนกับเลคตินจากคางคก (Ahmed *et al.*, 1996) และจากปลากะรัง (อุไรวรรณ ไพชำนาญ, 2542) ในทำนองเดียวกันกับซีรัมเลคติน พบว่า Ca^{2+} ช่วยทำให้เลคตินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีขึ้นที่ pH ค่อนข้างเป็นกรดหรือเป็นเบส

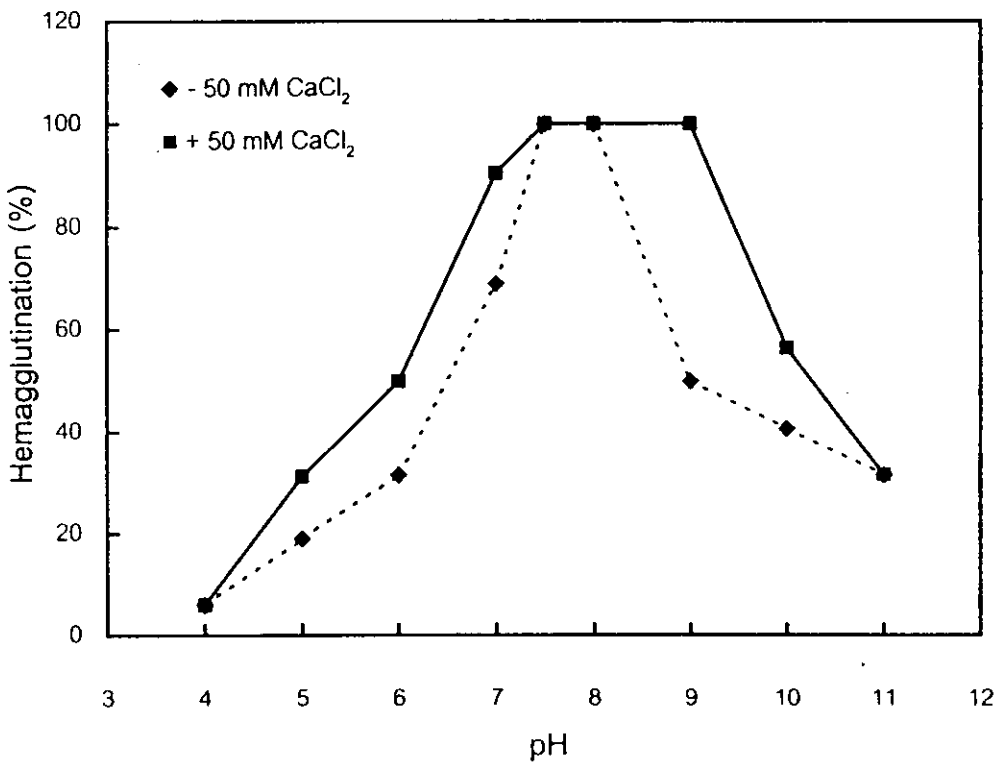
3.3.9 **ความเสถียรต่อ pH**

จากการทดสอบความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ต่อ pH โดยการผสมเลคตินบริสุทธิ์กับบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4-11 แล้วหาแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ pH 7.5 พบว่าเลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรสูงสุดในช่วง pH 7.5 - 8 ความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ลดลงเหลือ 68% ที่ pH 7, 50% ที่ pH 9, 42% ที่ pH 10, 33% ที่ pH 6 และ 11 และลดลงเหลือ 20% และ 4% ที่ pH 5 และ 4 ตามลำดับ (รูปที่ 18)

ความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์เมื่อทดสอบในภาวะที่มี 50 mM $CaCl_2$ ต่อ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4 –11 พบว่าเลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรดีกว่าเมื่อมี $CaCl_2$ โดยเลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรสูงสุดในช่วง pH 7.5-9 ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายลดลงเหลือ 92% ที่ pH 7, 58% ที่ pH 10, 50% ที่ pH 6, 33% ที่ pH 11 และลดลงเหลือ 30% และ 4% ที่ pH 5 และ 4 ตามลำดับ (รูปที่ 18)

ในทำนองคล้ายกับซีรัมเลคติน เลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรต่อ pH ดีที่สุดในช่วง 7.5 – 8 ความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ลดลงที่ pH น้อยกว่าหรือมากกว่าช่วงนี้ ซึ่งคล้ายกับเลคตินบริสุทธิ์ของปลากะรังที่มีความเสถียรดีที่สุดในช่วง pH 7 – 9 (อุไรวรรณ ไพชำนาญ, 2542) แต่ต่างจากเลคตินของปลิงทะเลซึ่งมีความเสถียรดีที่สุดในช่วง pH 5 (Hatakeyama *et al.*, 1995) เลคตินจากฟองน้ำทะเล (*H. okadai*) ชนิด HOL-I เสถียรที่ pH 5.5-10 แต่ชนิด HOL-II เสถียรที่ pH 6.0-10.5 (Kawakishi *et al.*, 1994) เลคตินจากเพรียงทะเล (*B. lanceolatum*) เสถียรที่ pH 5.0-10 ที่ pH 11

และ 4.5 จะเหลือแอคทิวิที 50 และ 25% ตามลำดับ และสูญเสียแอคทิวิทีอย่างสมบูรณ์ที่ pH 3 และ 13 (Mock and Renwrantz, 1991) นอกจากนี้พบว่า Ca^{2+} ยังช่วยรักษาโครงร่างของโปรตีนทำให้เลคตินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยมีความเสถียรต่อ pH มากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 18 ที่พบแอคทิวิทีของเลคตินบริสุทธิ์ ณ pH นอกช่วง 7.5-8 ในภาวะที่มี 50 mM Ca^{2+} สูงกว่าเมื่อไม่มี Ca^{2+}



รูปที่ 18 ความเสถียรต่อ pH ของเลคตินบริสุทธิ์

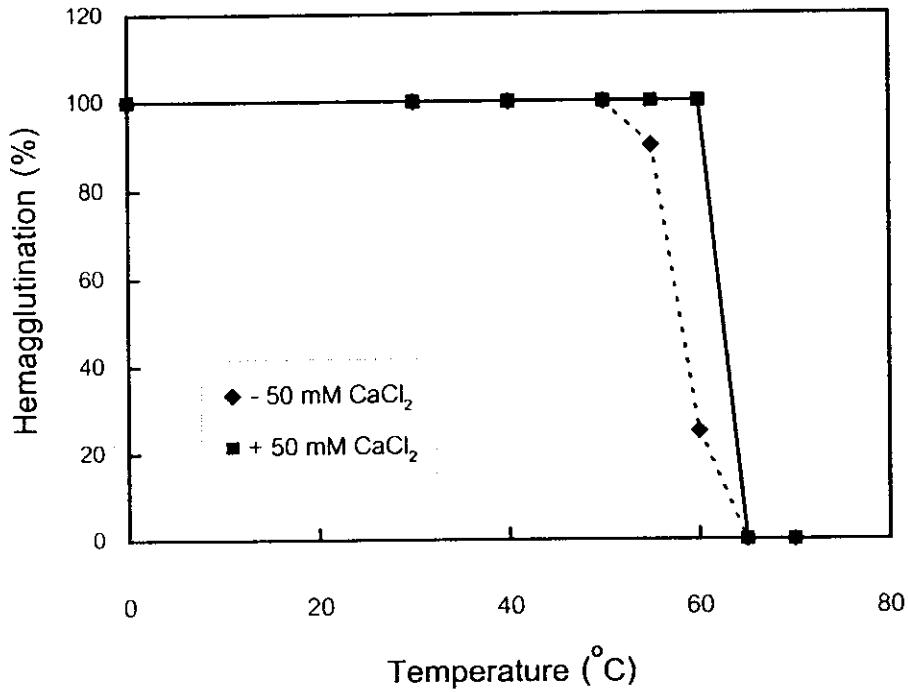
3.3.10 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

จากการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินบริสุทธิ์ โดยการอุ่นเลคตินที่อุณหภูมิ 30 - 70 °ซ เป็นเวลา 20 นาที พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ค่าคงเดิม เมื่ออุ่นที่ 30 - 50 °ซ แล้วลดลงเหลือ 90 และ 25% เมื่ออุ่นที่อุณหภูมิ 55 และ 60 °ซ ตามลำดับ และสูญเสียแอคทิวิทีอย่างสมบูรณ์เมื่ออุ่นเลคตินที่อุณหภูมิ 65 °ซ ดังแสดงผลในรูปที่ 19

การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินบริสุทธิ์ ในภาวะที่มี 50 mM $CaCl_2$ พบว่าที่อุณหภูมิ 55-60 °ซ เลคตินบริสุทธิ์จะเสถียรต่ออุณหภูมิมากขึ้นคือยังมีแอคทิวิที 100% ไม่เปลี่ยนแปลง แต่สูญเสียแอคทิวิทีอย่างสมบูรณ์เมื่ออุ่นเลคตินที่อุณหภูมิ 65 °ซ (รูปที่ 19)

ทั้งซีรัมเลคตินและเลคตินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงไม่เกิน 50 °ซ เท่ากัน ที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินลดลง แสดงให้เห็นว่าการเกาะกลุ่มเซลล์ของเลคตินอาศัยโครงสร้างโมเลกุลส่วนที่เป็นโปรตีนช่วยในการทำงาน (Sharon and Lis, 1995) เมื่อทำให้โครงสร้างโปรตีนของเลคตินแปลงสภาพ โดยการอุ่นที่อุณหภูมิสูง ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินลดลงหรือหมดไป เมื่อเปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิกับเลคตินจากแหล่งอื่น ๆ พบว่าเลคตินจากเพรียง (*B. lanceolatum*) สูญเสียแอคทิวิทีที่อุณหภูมิ 60 °ซ (Mock and Renwrantz, 1991) และทนต่ออุณหภูมิได้น้อยกว่าเลคตินจากหอยมุก (*P. fucata martensii*) ที่แปลงสภาพที่อุณหภูมิ 80 °ซ (Suzuki and Mori, 1989) ส่วนเลคตินจากปลิงทะเลมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 40 °ซ โดยแอคทิวิทีจะลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ จนเสียแอคทิวิทีอย่างสมบูรณ์ที่ 70 °ซ (Hatakeyama *et al.*, 1995)

ในทำนองเดียวกับผลของ pH ในภาวะที่มี 50 mM Ca^{2+} Ca^{2+} ช่วยรักษาโครงสร้างโปรตีนทำให้เลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 50 °ซ มากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 19 ที่พบแอคทิวิทีของเลคตินบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °ซ ในภาวะที่มี 50 mM Ca^{2+} สูงกว่าเมื่อไม่มี Ca^{2+}



รูปที่ 19 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินบริสุทธิ์

3.3.11 ผลของเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลและเอสดีเอส

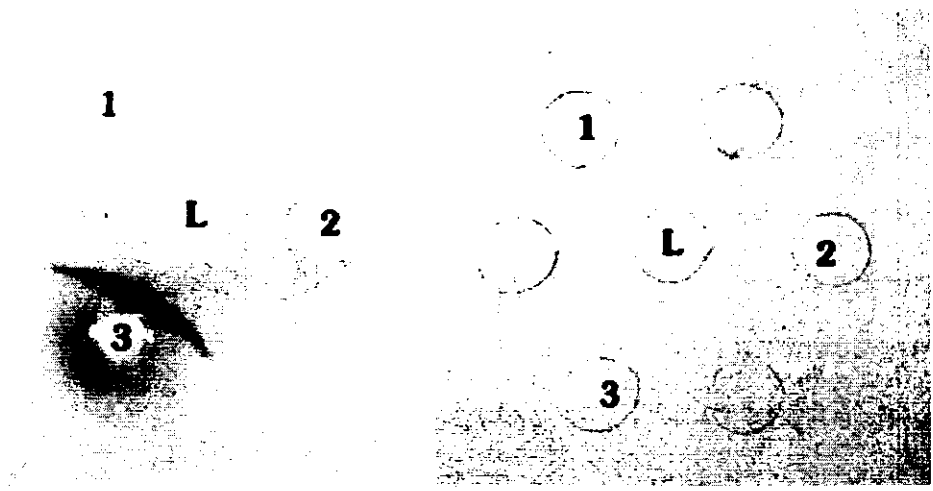
จากการทดสอบผลของเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 0-25 mM ต่อความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ พบว่าเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.39 mM จะยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์ บ่งชี้ว่าเลคตินบริสุทธิ์ต้องการพันธะไดซัลไฟด์ที่อยู่ในโมเลกุลช่วยในการเกาะกลุ่มเซลล์ เพราะเมื่อทำลายพันธะดังกล่าวด้วยเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลทำให้แอคทิวิทีของเลคตินลดลง ซึ่งคล้ายกับเลคตินจากกุ้งก้ามกราม ที่เมื่อเติม 5 mM เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล และ dithiothreitol + iodoacetamide เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล ทำให้เลคตินสูญเสียความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม แต่ในภาวะที่มี Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} อยู่ด้วย เลคตินยังคงมีแอคทิวิทีดีกว่าภาวะที่ไม่มีไอออนเหล่านี้ แสดงว่าพันธะไดซัลไฟด์และไดวาเลท์แคทไอออนเหล่านี้มีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของเลคติน (Vazquez *et al.*, 1993)

เมื่อทดสอบผลของเอสดีเอสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 0-25 mM ในทำนองเดียวกัน พบว่าเอสดีเอสที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.097 mM จะยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกัน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการทำให้โปรตีนในโมเลกุลของเลคตินแปลงสภาพโดยเอสดีเอส มีผลต่อสมบัติการเกาะกลุ่มเซลล์ของเลคติน

3.4 บทบาททางชีวภาพของเลคติน

3.4.1 การเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนของเลคตินบริสุทธิ์กับอิมมูโนโกลบูลิน

จากการทดสอบปฏิกิริยาตกตะกอนระหว่างเลคตินบริสุทธิ์กับอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgA และ IgG ของคนด้วยวิธี Ouchterlony double diffusion พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ไม่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับอิมมูโนโกลบูลินทั้ง 2 ชนิด โดยไม่เห็นแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมที่ใส่เลคตินบริสุทธิ์กับหลุมที่ใส่อิมมูโนโกลบูลิน (รูปที่ 20B) ในขณะที่เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาดะซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับ IgA แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับ IgG ของคน (รูปที่ 20A) เลคตินทั้ง 2 ชนิด ไม่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับโบวีนซีรัมอัลบูมิน (รูปที่ 20A, B หลุมที่ 1)



รูปที่ 20 การทำ Ouchterlony double diffusion ของเลคตินบริสุทธิ์กับอิมมูโนโกลบูลิน

A	หลุม L	เลคตินบริสุทธิ์ของเมล็ดจำปาดะ	15 ไมโครกรัม
B	หลุม L	เลคตินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วย	15 ไมโครกรัม
	หลุม 1	โบวีนซีรัมอัลบูมิน	15 ไมโครกรัม
	หลุม 2	IgG ของคน	15 ไมโครกรัม
	หลุม 3	IgA ของคน	15 ไมโครกรัม

เลคตินจากพืชสกุล *Artocarpus* หลายชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่าง ๆ ได้ต่างกัน เช่น เลคตินจาก *Artocarpus heterophyllus* จับได้อย่างจำเพาะกับ IgA1 และปฏิกิริยานี้ถูกยับยั้งได้โดยเอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน แต่ไม่จับกับ IgA2, IgD, IgG และ IgM (Hashim *et al.*, 1991; Kondoh *et al.*, 1987) เลคตินจากเมล็ดขนุน (*A. heterophyllus*) ทำปฏิกิริยากับ IgA และ IgD แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ IgE, IgG และ IgM (Aucouturier *et al.*, 1987) สำหรับเลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาดะ (*Artocarpus integer*) สามารถทำปฏิกิริยากับ IgA ของคน แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับ IgG ของคนหรือกับโบวีนซีรัมอัลบูมิน (อุบล ตันสม, 2541) ทั้งนี้เพราะเลคตินเหล่านี้สามารถจับจำเพาะกับหน่วยเอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีนซึ่งมีในสาย heavy ของ IgA แต่ไม่มีใน IgG (Aucouturier *et al.*, 1987) ด้วยเหตุนี้เลคตินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยที่จับจำเพาะกับกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคจึงไม่เกิดปฏิกิริยากับ IgA ของคน

3.4.2 ความสามารถในการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของเลคติน

ในการทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย 6 ชนิด พบว่าเลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้ *V. harveyi* และ *V. parahemolyticus* เกาะกลุ่มได้ดีที่สุดเท่ากัน (40,000 หน่วย/มก. โปรตีน) ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1 ไมโครกรัม/มล. รองลงมาคือเกาะกลุ่ม *V. vulnificus* ได้ 10,000 หน่วย/มก.โปรตีน ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 4 ไมโครกรัม/มล. แต่ไม่ทำให้ *V. cholerae*, *S. typhi* และ *E. coli* เกาะกลุ่ม ดังแสดงผลในตารางที่ 7 และรูปที่ 21

เลคตินในซีรัมก็ทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มได้ในทำนองเดียวกัน คือทำให้ *V. harveyi* และ *V. parahemolyticus* เกาะกลุ่มได้ดีที่สุดเท่ากัน (4.48 หน่วย/มก. โปรตีน) ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 8.9 มก./มล. รองลงมาคือเกาะกลุ่ม *V. vulnificus* ได้ 2.24 หน่วย/มก.โปรตีน ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 17.8 มก./มล. แต่ไม่ทำให้ *V. cholerae*, *S. typhi* และ *E. coli* เกาะกลุ่ม (ตารางที่ 7)

จากการศึกษาความสามารถในการเกาะกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคของกุ้งกุลาดำ 3 ชนิด คือ *V. vulnificus*, *V. parahemolyticus* และ *Vibrio anguillarum*

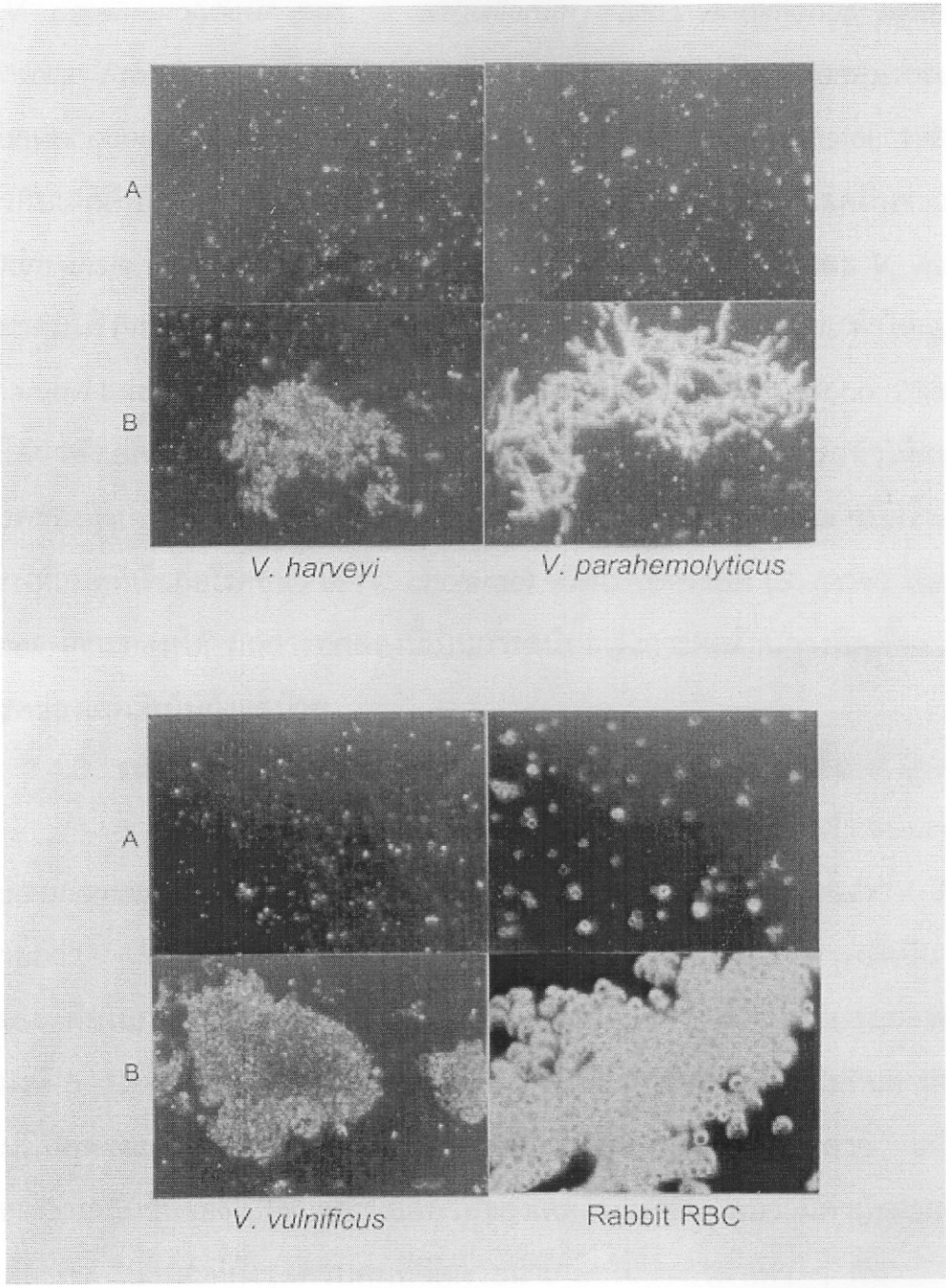
ตารางที่ 7 ความสามารถของเลคตินในการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย

Bacteria	Serum lectin		Purified lectin	
	Agglutination (unit/mg protein)	Mimimum concentration required (mg/ml)	Agglutination (unit/mg protein)	Mimimum concentration required (μg/ml)
Vibrio vulnificus	2.24	17.8	10,000	4.0
Vibrio parahemolyticus	4.48	8.9	40,000	1.0
Vibrio harveyi	4.48	8.9	40,000	1.0
Vibrio cholerae	0	No agglutination	0	No agglutination
Samonella typhi	0	No agglutination	0	No agglutination
Escherichia coli	0	No agglutination	0	No agglutination

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

No agglutination = ไม่เกิดการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้นของซีรัม 71.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

No agglutination = ไม่เกิดการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้นของเลคตินบริสุทธิ์ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 21 การเกาะกลุ่มเซลล์โดยเลคตินบริสุทธิ์ (B) **และชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทนเลคตินบริสุทธิ์** (A) (กำลังขยาย 10X40 เท่า) (เม็ดเลือดแดงกระต่ายใช้ฟิลเตอร์สีเหลือง)

พบว่าเลคตินของกุ้งกุลาดำสามารถทำให้แบคทีเรีย *V. vulnificus* เกาะกลุ่มได้ แต่ไม่ทำให้ *V. parahemolyticus* และ *V. anguillarum* รวมทั้ง *Aeromonas hydrophilla, E. coli, Proteus morganii, S. typhi, Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* เกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) เช่นเดียวกับเลคตินที่จำเพาะต่อกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคอื่น ๆ เช่น เลคตินจากกุ้ง *P. californiensis* ที่ทำให้แบคทีเรีย *V. fischeri, V. parahemolyticus* และ *V. vulnificus* เกาะกลุ่มได้ (Vargas-Albores, 1995) ส่วนเลคตินของกุ้ง *P. paulensis* ทำให้แบคทีเรีย *V. harveyi* และ *Bacillus cereus* เกาะกลุ่มได้ (Marques and Barracco, 2000) จะเห็นได้ว่าทั้งเลคตินบริสุทธิ์และเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคของกุ้งเกาะกลุ่มได้ในทำนองเดียวกันกับเลคตินของกุ้ง *Penaeus* ชนิดอื่น ๆ แต่ไม่ทำให้แบคทีเรียก่อโรคอหิวาต์ (*V. cholerae*) หรือโรคไทฟอยด์ (*S. typhi*) ในคน และ *E. coli* เกาะกลุ่มได้ ผลการทดลองนี้เป็นการสนับสนุนการต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเลคตินในกุ้งแชบ๊วย

3.4.3 **ระดับโปรตีนและเลคตินในซีรัมของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อ** *V. harveyi*

จากผลการทดลองข้อ 3.4.2 ที่พบว่าซีรัมเลคตินทำให้ *V. harveyi* และ *V. parahemolyticus* เกาะกลุ่มได้ดีที่สุดเท่ากัน แต่ติดตามการติดเชื้อของ *V. harveyi* ได้ง่ายกว่า จึงได้ทำการทดลองฉีดเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งเพศผู้ โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือในการทดลองแรก ทำการฉีดเชื้อ สังเกตอาการของกุ้งเป็นระยะ พบว่าในชั่วโมงที่ 5, 12 และ 23 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ กุ้งมีอาการอ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร ว่ายน้ำไม่มีทิศทางและตัวงอ เหมือนกัน จึงเจาะฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่เวลาดังกล่าว แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นของโปรตีนและแอคทิวิทีของเลคตินในซีรัม พบว่ามีค่าผันแปรมากในกุ้งแต่ละตัว ในขณะที่กุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือในช่วงเวลาเท่า ๆ กัน มีลักษณะแข็งแรง ว่ายน้ำและกินอาหารตามปกติ มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนและแอคทิวิทีของเลคตินในซีรัมผันแปรมากในกุ้งแต่ละตัวเช่นเดียวกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 8 เนื่องจากการทดลองนี้ใช้จำนวนกุ้งตัวอย่างแต่ละกลุ่มน้อยเกินไปและมีค่าผันแปรมากในกุ้งแต่ละตัว จนสรุปผลได้ยาก

ตารางที่ 8 ระดับโปรตีนและเลคตินในซีรัมหลังการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลาต่าง ๆ กัน

Time after injection	0.9% NaCl injection			*Vibrio harveyi* injection		
	Protein (mg/ml)	Hemagglutination (unit/mg protein)	Infection	Protein (mg/ml)	Hemagglutination (unit/mg protein)	Infection
5 Hours	110.70	23.12	-	124.20	41.22	+
12 Hours	93.37	13.70	-	103.73	12.34	+
23 Hours	104.85	24.41	-	111.60	22.94	+

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าที่ได้จากการฉีดกุ้งแต่ละตัว ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ครั้ง

Infection = แสดงผลการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ในตับ เมื่อ + = ติดเชื้อ ; - = ไม่ติดเชื้อ

ในการทดลองที่ 2 จึงได้เพิ่มจำนวนกุ้งในแต่ละกลุ่มเป็นกลุ่มละ 7 ตัว (เท่าที่จะหากุ้งได้มากพอ) แล้วทำการฉีดเชื้อ *V. harveyi* หลังการฉีดเชื้อนาน 10 ชั่วโมง เจาะฮีโมลิมฟ์ของกุ้งพร้อมกับสังเกตอาการ พบว่ากุ้งที่ฉีดเชื้อทุกตัวมีอาการเหมือนกับการทดลองแรก เมื่อนำกุ้งเหล่านี้ไปทดสอบตามวิธีการข้อ 2.12.3 พบว่ามีการติดเชื้อทุกตัว ในขณะที่กุ้งชุดควบคุมซึ่งฉีดน้ำเกลือในเวลาเท่ากันมีลักษณะแข็งแรง ว่ายน้ำและกินอาหารตามปกติและไม่มีการติดเชื้อ (ตารางที่ 9) จากการวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีนและแอคทิวิทีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อมีค่าเป็น 111.60 $\pm$ 8.84 มก./มล. และ 47.74 $\pm$ 3.95 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งชุดควบคุมมีค่าเป็น 102.74 $\pm$ 7.46 มก./มล. และ 29.41 $\pm$ 4.35 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 9) จะเห็นว่าความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนของกุ้งที่ฉีดเชื้อเพิ่มสูงกว่าของกุ้งชุดควบคุมเล็กน้อย (1.09 เท่า) อย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.445$) ในขณะที่ระดับของซีรัมเลคตินของกุ้งที่ฉีดเชื้อมีค่าสูงกว่าของกุ้งชุดควบคุม 1.62 เท่า อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.007$) บ่งชี้ว่ากุ้งแชบ๊วยมีระดับของเลคตินในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการพบปริมาณของเลคตินในซีรัมของกุ้งกุลาดำที่เพิ่มขึ้นจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบโดยการทำ immunoblotting (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) ในทำนองเดียวกับการกระตุ้นปริมาณเลคตินในฮีโมลิมฟ์ให้เพิ่มขึ้นในปูม้า *Callinectes sapidus* (Pauley, 1973) และ *S. serrata* (Mercy and Ravindranath, 1994) จากการฉีดด้วยเม็ดเลือดแดงของคนและกระต่าย การเพิ่มของเลคตินในหอยนางรม *C. gigas* โดยแบคทีเรีย *V. anguillarum* (Hardy *et al.*, 1977) หรือในแมลง (fresh fly, *Sarcophaga peregrina*) ที่มีระดับเลคตินในฮีโมลิมฟ์สูงขึ้นสัมพันธ์กับการเกิดบาดแผลของผนังลำตัว (Komano *et al.*, 1980) จากรายงานเหล่านี้ แสดงบทบาทของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อหรือต่อสิ่งแปลกปลอม

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของครัสเตเซียนในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม เกิดจากการตอบสนองของเซลล์และสารน้ำ (cellular and humoral response) ซึ่งกิจกรรมที่เกิดขึ้นมีหลายแบบคือ โปรตีนชนิดต่าง ๆ ในซีรัม เช่น แอกกลูตินิน ฮีโมไลซิน (hemolysin) ไลโซไซม์ (lysozyme) และโปรตีนที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด (cloting

ตารางที่ 9 ระดับโปรตีนและเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* นาน 10 ชั่วโมง

Sample number	0.9% NaCl injection			*Vibrio harveyi* injection		
	Protein (mg/ml)	Hemagglutination (unit/mg protein)	Infection	Protein (mg/ml)	Hemagglutination (unit/mg protein)	Infection
1	132.66	38.58	-	135.30	37.84	+
2	93.37	13.70	-	91.30	56.08	+
3	124.12	31.19	-	81.18	63.07	+
4	101.90	46.33	-	91.30	56.08	+
5	90.23	23.54	-	138.16	37.06	+
6	87.15	24.12	-	116.82	43.82	+
7	89.81	28.44	-	127.16	40.26	+
Mean ± S.E.	102.74 ± 7.46	29.41 ± 4.35		111.60 ± 8.84	47.74 ± 3.95	

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าที่ได้จากการฉีดกุ้งแต่ละตัว ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ครั้ง

Infection = แสดงผลการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ในตับ เมื่อ + = ติดเชื้อ ; - = ไม่ติดเชื้อ

Mean ± S.E. = ค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐาน

protein) เซลล์เม็ดเลือดที่ก่อให้เกิดการยึดติด (adhesion) การฟาโกไซโทซิส การห่อหุ้ม (encapsulation) การสร้างเม็ดสี (melanization) และระบบอื่น ๆ เช่น การแข็งตัวของเลือดและการสมานแผล การทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenol oxidase system) เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมก็คือเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ฟาโกไซท์ที่อยู่กับที่ (fixed phagocyte) ที่กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ และกลไกการรับรู้ของเซลล์เม็ดเลือดในการจำแนกสิ่งแปลกปลอม (non-self recognition) (Smith and Ratcliffe,1980; Johnson,1987; Factor and Beekman, 1990; Martin *et al.*, 1993; Fontaine and Lightner, 1974; Soderhall, 1982; Vargas-Albores, 1995 อ้างโดยกิจการ ศุภมาตย์ และ คณะ, 2543) ความเป็นไปได้ของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งคือเกาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคหรือเซลล์แปลกปลอม แล้วนำไปสู่การทำลายเซลล์แปลกปลอมด้วยกิจกรรมต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมา

3.4.4 ระดับโปรตีนและเลคตินในซีรัมของกุ้งเพศผู้และเพศเมีย

จากการวัดระดับแอคทิวิทีของซีรัมเลคตินของกุ้งเพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 26 ตัว เปรียบเทียบกัน โดยดูความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย พบว่ากุ้งเพศผู้และเพศเมียมีแอคทิวิทีของซีรัมเลคตินเป็น 46.18 $\pm$ 3.92 และ 71.78 $\pm$ 6.07 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.0007$) สำหรับความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนของกุ้งเพศผู้มีค่าเป็น 95.30 $\pm$ 5.27 มก./มล. ในขณะที่ของกุ้งเพศเมียมีค่าเป็น 82.98 $\pm$ 4.81 มก./มล. ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.085$) (ตารางที่ 10)

จากการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนของกุ้งเพศเมียตัวเต็มวัยที่เลี้ยงเป็นพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดิน อายุประมาณ 1 ปี มีค่าใกล้เคียงกับของกุ้งเพศผู้ที่เลี้ยงร่วมกัน ส่วนระดับซีรัมเลคตินของกุ้งเพศเมียสูงกว่าของกุ้งเพศผู้ 1.55 เท่า อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p= 0.0007$) (ตารางที่ 10) กุ้งเพศเมียที่ใช้ศึกษาไม่ได้นำมาทดสอบดูระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าระดับเลคตินที่ต่างกันในกุ้ง 2 เพศนี้สัมพันธ์กับพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ อย่างไรก็ตามพบว่า กุ้งเพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดินสามารถพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่และสืบพันธุ์ได้

ตารางที่ 10 ระดับของโปรตีนและเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งเพศผู้และเพศเมีย

Sample number	Male		Female	
	Protein (mg/ml)	Hemagglutination (unit/mg protein)	Protein (mg/ml)	Hemagglutination (unit/mg protein)
1	91.87	55.73	55.30	92.58
2	61.92	41.34	51.55	99.32
3	94.75	54.16	86.40	59.26
4	71.14	71.96	95.33	26.86
5	56.16	91.16	59.33	86.28
6	82.08	62.36	97.06	52.74
7	55.29	46.30	86.11	118.90
8	81.47	31.42	57.60	88.88
9	75.15	68.12	73.44	69.70
10	119.41	42.86	82.94	61.72
11	77.33	66.20	52.13	98.20
12	89.98	28.44	55.29	92.60
13	93.38	74.82	98.20	52.14
14	116.49	21.96	113.18	45.22
15	100.19	51.10	62.21	82.30
16	87.06	29.40	84.38	60.66
17	107.00	47.84	121.35	42.18
18	92.41	55.40	113.81	44.98
19	76.12	67.26	119.61	42.96
20	90.22	28.37	93.63	54.68
21	110.70	23.12	42.35	120.89
22	93.37	13.70	114.04	44.90
23	104.85	24.41	70.43	72.70
24	132.66	38.59	105.36	48.59
25	164.12	31.19	101.66	50.36
26	152.90	33.48	65.40	156.57
Mean $\pm$ S.E.	95.30 $\pm$ 5.27	46.18 $\pm$ 3.92	82.98 $\pm$ 4.81	71.78 $\pm$ 6.07

Mean $\pm$ S.E. = ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าผิดพลาดมาตรฐาน

เองตามธรรมชาติ โดยสุ่มพบลูกกุ้งวัยอ่อนขนาดต่าง ๆ แต่ละครั้งอยู่เสมอ เป็นไปได้ว่ากุ้งเพศเมียที่ใช้ศึกษาอาจมีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ตามธรรมชาติอยู่ในระดับหนึ่ง จึงทำให้มีระดับเลคตินในฮีโมลิมฟ์สูงกว่าของกุ้งเพศผู้ ดังที่มีการพบระดับเลคตินในน้ำในโพรงลำตัวของเพรียง (*M. rosa*) สูงขึ้นแปรผันตามระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่และพบมีค่าสูงสุดเมื่อไข่แก่ (Muramoto *et al.*, 1991) เช่นเดียวกับในปลากะรังที่พบระดับเลคตินที่จำเพาะต่อกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิคในพลาสมาของปลาเพศเมียเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับระดับของพลาสมาไวเทลโลจีนินที่เป็นโปรตีนตั้งต้นของโปรตีนโยล์คในไข่ ซึ่งระดับของเลคตินและไวเทลโลจีนินนี้ในพลาสมาแปรผันตามระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ และพบมีค่าสูงสุด 1 เดือน ก่อนปลากะรังวางไข่ (อุไรวรรณ ไพชำนาญ, 2542) นอกจากนี้ แอนติบอดีต่อเลคตินของกุ้งกุลาดำยังเกิดปฏิกิริยากับสารสกัดรังไข่ได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) บ่งชี้ว่าเลคตินมีโครงสร้างโปรตีนสัมพันธ์ด้านการเป็นแอนติเจนกับโปรตีนในสารสกัดรังไข่ของกุ้งกุลาดำ ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าเลคตินของกุ้งแชบ๊วยน่าจะเกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ของรังไข่ แต่เป็นเช่นไรนั้นควรต้องมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป