

ลักษณะเฉพาะของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับสุกร (*Sus domesticus*)

Characterization of Pig (*Sus domesticus*) Liver α -L-Fucosidase

กรกมล นพมงคล (Kornkamon Nopmongkol)* สัมภาษณ์ คุณสุข (Sumpars Khunsook)**

บทคัดย่อ

เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α -L-fucosidase, EC 3.2.1.51) เป็นเอนไซม์ที่พบอย่างแพร่หลายในสิ่งมีชีวิต ซึ่งเอนไซม์นี้มีหน้าที่ตัดน้ำตาลแอล-ฟูโคสออกจากสารชีวโมเลกุล การขาดเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะทำให้เกิดโรค fucosidosis ซึ่งส่งผลให้เกิดอาการผิดปกติหลายประการ การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาแบบแผนโปรตีนและขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกร (*Sus domesticus*) ในสภาพธรรมชาติ (Native form) โดยวิธี Gel filtration และเมื่อทำการศึกษาต่อโดยวิธี Western Blot พบว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ได้มีขนาดเล็กกว่าในสภาพธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมของ Johnson and Alhadeff (1991) นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western Blot พบว่ามีขนาดเท่ากับ 52.11 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส จากตับมนุษย์ (Alhadeff et al., 1975) อีกทั้งยังถูกจดจำได้ด้วยแอนติบอดีที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับมนุษย์เป็นแอนติเจน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงด้านโครงสร้างของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส จากตับสุกร และตับมนุษย์

ABSTRACT

α -L-fucosidase (EC 3.2.1.51) is a ubiquitous enzyme found in several species. It functions in the degradation of L-fucose containing molecules. Deficiency of this enzyme can cause the disease called "fucosidosis" which makes the patients have several clinical symptoms. In this study, proteins pattern and molecular weight of α -L-fucosidase from pig liver (*Sus domesticus*) in native form were determined by Gel filtration and native α -L-fucosidases were further studied by Western Blot. The results revealed that molecular weights determined by Western Blot are smaller than those of native forms from Gel filtration. This corresponded to the research of mammalian α -L-fucosidase by Johnson and Alhadeff (1991). In addition, proteins pattern and molecular weight of pig liver α -L-fucosidase were discovered by SDS-PAGE and Western Blot. The Western blot results showed that molecular weight of pig liver α -L-fucosidase is 52.11 kDa which resembled to the molecular weight of human liver α -L-fucosidase (Alhadeff et al., 1975). Furthermore, pig liver α -L-fucosidase was recognized by antibody produced from human liver α -L-fucosidase antigen. Accordingly, all of these results portrayed the structural resemblance of α -L-fucosidase from pig and human liver.

คำสำคัญ : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส สุกร (*Sus domesticus*)

Key Words : α -L-Fucosidase, Pig (*Sus domesticus*)

* นักศึกษาระดับมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α -L-fucosidase, EC 3.2. 1.51) เป็นเอนไซม์ lysosomal glycosidase ที่พบอย่างแพร่หลาย โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสลายสารประกอบชนิดที่มีน้ำตาลฟูโคส (fucose) เป็นส่วนประกอบ (fucoglycoconjugate) หลายชนิด เช่น oligosaccharides, glycopeptides, glycoproteins และ glycolipids (Alhadeff, 1998) โดยที่น้ำตาลฟูโคสในสารเหล่านี้จำเป็นต้องถูกตัดพันธะ (hydrolyze) โดยเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสทั้งสิ้น โดยพบว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ทำหน้าที่ตัดพันธะของน้ำตาลฟูโคสในโมเลกุลเหล่านี้

ความสำคัญของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในกระบวนการ metabolism ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถบ่งชี้ได้ชัดเจนจากภาวะการขาดเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ซึ่งจะทำให้เกิดโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโครโมโซมร่างกายผ่านทางยีนด้อย (autosomal recessive) ชื่อว่า fucosidosis (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 230000) ซึ่งเป็นโรคพันธุกรรมที่หายากซึ่งเกิดจากการขาดหรือการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในเนื้อเยื่อทุกชนิด ส่งผลให้เกิดการสะสมของสารประกอบชนิดที่มีน้ำตาลฟูโคสเป็นส่วนประกอบในสมองและกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งการสะสมของสารประกอบเหล่านี้มากผิดปกติ จะส่งผลให้เกิดอาการผิดปกติหลายประการ ได้แก่ การลดลงของสติปัญญา และการเจริญเติบโต การแสดงออกทางใบหน้าผิดปกติ การติดเชื้อซ้ำซ้อน และ กระดูกผิดปกติ เป็นต้น ซึ่งวิธีการรักษาโรค fucosidosis ที่ได้ผลนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

นอกจากโรค fucosidosis ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการขาดเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส โดยตรงแล้ว ยังพบว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรค Cystic fibrosis (CF) ซึ่งเป็นโรคที่

ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ทำให้ต่อมที่หลังสารคัดหลั่ง มีการหลังสารผิดปกติ โดยพบว่าในผู้ป่วยโรค Cystic fibrosis จะมีกิจกรรมและโครงสร้างของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ผิวหนัง (skin fibroblast) ชีวรั่ว และ ตับผิดปกติ

ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงมีความสำคัญเพื่อเป็นแนวทางในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับโรค fucosidosis และ cystic fibrosis ในระดับโมเลกุล อีกทั้งยังสามารถหาวิธีในการบำบัดรักษาผู้ป่วยโรคดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสยังเป็นเครื่องมือสำคัญเพื่อไขความกระจ่างของโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน และระบุหน้าที่ของน้ำตาลฟูโคสในกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ (Kobata, 1979)

จากการศึกษาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสมองของลิงและในตับสุกรพบว่าเอนไซม์จากทั้งสองแหล่งมีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) เป็นส่วนประกอบสำคัญของกระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เช่นเดียวกันกับเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับมนุษย์ (Grove and Serif, 1981) ดังนั้นเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับสุกรและตับมนุษย์อาจมีกระบวนการในการเร่งปฏิกิริยาในลักษณะเดียวกัน และเนื่องจากโรค fucosidosis ในมนุษย์เป็นโรคที่มีอุบัติการณ์ของโรคต่ำ การศึกษาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสุกรจึงอาจเป็นแนวทางในการใช้สุกรเป็นต้นแบบในการศึกษาการดำเนินไปของโรค เพื่อหาวิธีบำบัดรักษาที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อตรวจสอบขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α -L-fucosidase) จากตับสุกรในสภาพธรรมชาติ
- 2) เพื่อตรวจสอบแบบแผนโปรตีนของสารสกัดโปรตีนจากตับสุกร และ วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α -L-fucosidase) ในตับสุกร

3) เพื่อศึกษาลักษณะบางประการของเอนไซม์-แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α -L-fucosidase) ในตับสุกร เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบกับเอนไซม์-แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α -L-fucosidase) ในตับมนุษย์

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

สุกร (*Sus domestica*) พันธุ์แลนด์เรซ (Landrace) โดยทำการเก็บชิ้นส่วนตับ ณ โรคฆ่าสัตว์ขอนแก่น อำเภอมือเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยชิ้นส่วนตับที่ได้นั้นจะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ 0°C ในระหว่างนำมายังห้องปฏิบัติการ

การสกัดโปรตีนจากตับสุกร

นำตับสุกรบดผสมกับสารละลาย Triton X 114 0.1 % จากนั้นนำสารละลายตับสุกรที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง โดยของเหลวใสด้านบน (Supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงคือ สารสกัดโปรตีนที่ได้จากตับสุกร

การทำ Dialysis ของสารสกัดโปรตีนจากตับสุกร

ทำการ Dialysis สารสกัดโปรตีนจากตับสุกรที่สกัดได้โดยใช้ Spectra/Por 2 Regenerated Cellulose (RC) Dialysis membranes ในสารละลาย 10 mM Sodium phosphate pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำสารละลายโปรตีนในถุง Dialysis ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอน และนำส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน (supernatant) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

ตรวจสอบแบบแผนโปรตีน และขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรในสภาพธรรมชาติ (Native form) โดยวิธี Gel filtration

นำสารสกัดโปรตีนที่ได้จากตับสุกรและผ่านการ Dialysis แล้วมาทำการแยกโดยใช้คอลัมน์ (Column) HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High resolution (บริษัท GE Healthcare) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15 M NaCl และ 0.02% NaN_3 pH 7.0 จะผ่านคอลัมน์ด้วยความเร็ว 0.5 มิลลิลิตร ต่อนาทีเป็นจำนวนสองเท่าของปริมาตรคอลัมน์ซึ่งเท่ากับ 240 มิลลิลิตร ที่ความดัน 0.35 เมกะพาสกาล (MPa)

อุณหภูมิ 25°C ซึ่งโปรตีนที่ถูกแยกตามขนาดนี้จะถูกวิเคราะห์โดยค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (nm) ผ่านระบบปฏิบัติการของเครื่อง AKTAprius plus (บริษัท GE Healthcare) จากนั้นทำการทดสอบหาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยวิธี Dot Blot

การทดสอบหาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจาก fraction ที่ได้จาก Gel filtration โดยวิธี Dot Blot

ทำการหยดโปรตีนจาก Fraction ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละฟิสิกโปรตีนที่ได้จากการทำ Gel filtration ลงบน Polyvinylidene difluoride membrane (PVDF membrane) จากนั้นบ่มด้วย แอนติบอดีปฐภูมิ (Goat anti human liver α -L-fucosidase polyclonal antibody ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก Prof Jack Alhadeff แห่ง Lehigh University, USA) ในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 50,000 (ใน 2% advance ECL blocking) และ แอนติบอดีทุติยภูมิ (Rabbit anti goat HRP conjugated) ในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 250,000 (ใน 2% advance ECL blocking) จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วไปตรวจสอบหาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยใช้แผ่นฟิล์มเอกซเรย์ โดย fraction ที่เป็นตัวแทนของฟิสิกที่มีเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส จะสามารถสังเกตเห็นจุดดำบนฟิล์มได้ เนื่องจากเกิดการเรืองแสงของ HRP ที่ติดอยู่กับแอนติบอดีทุติยภูมิ โดยสามารถคำนวณหาขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสได้โดยอาศัยกราฟโปรตีนมาตรฐานที่ได้มาจากการทำ Gel filtration ในสภาวะเดียวกัน

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาโปรตีนในฟิล์มที่ตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยวิธี SDS-PAGE และ Western Blot เพื่อตรวจสอบการจับกันของโปรตีนในสภาพธรรมชาติโดยใช้แอนติบอดีปฐภูมิ (Goat anti human liver α -L-fucosidase polyclonal antibody) ในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 50,000 และ แอนติบอดีทุติยภูมิ (Rabbit anti goat HRP conjugated) ในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 250,000 แล้วตรวจสอบสัญญาณของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยฟิล์มเอกซเรย์เช่นเดียวกัน (โดยใช้สภาวะเดียวกันกับการศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกร ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดในลำดับต่อไป)

การศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรด้วยวิธี SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) และ Western Blot

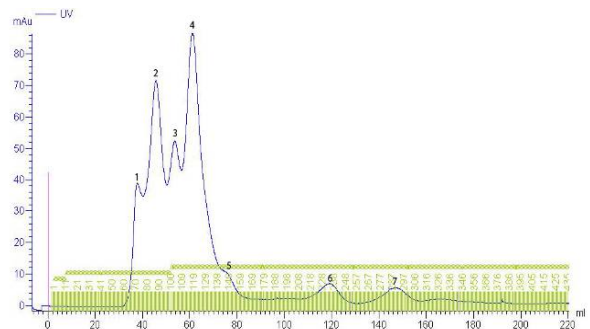
ใช้ชุดรีนเจด mini-protean@ tetra system ของบริษัท BIO-RAD ซึ่งมีขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร หนา 0.75 มิลลิเมตร โดยเจลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะได้แก่ Polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 4% Stacking gel และ 10% Separating gel ซึ่งมีองค์ประกอบของ 0.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) โปรตีนจากตับสุกรที่ต้องการศึกษาแบบแผนโปรตีน และ โปรตีนมาตรฐานจะถูกละลายใน Sample buffer ที่มี 1% SDS และ 5% β -mercaptoethanol จากนั้นจึงทำการใส่ลงในช่องสำหรับใส่ตัวอย่างและนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 75 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับ 4% Stacking gel จากนั้นจึงเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที สำหรับ 10% Separating gel ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำแผ่นเจลชุดหนึ่งไปทำการย้อมด้วย 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 จนสามารถเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เพื่อกำหนดตำแหน่งที่ได้มาวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนในลำดับต่อไป ส่วนเจลอีกชุดหนึ่งจะนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Western analysis โดยย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบนแผ่นเมมเบรน Polyvinylidene difluoride (PVDF) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 155 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นตัดแผ่นเมมเบรนที่เป็นโปรตีนมาตรฐานมาข้อมด้วยสี Coomassie blue แล้วนำแผ่นเมมเบรนที่เหลือมาข้อมด้วยแอนติบอดีปฐุมภูมิ (Goat anti human liver α -L-fucosidase polyclonal antibody) ในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 50,000 (ใน 2% advance ECL blocking) และ แอนติบอดีทุติยภูมิ (Rabbit anti goat HRP conjugated) ในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 250,000 (ใน 2% advance ECL blocking) จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ข้อมด้วยแอนติบอดีแล้วไปตรวจสอบหา

เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยใช้แผ่นฟิล์มเอกซเรย์ เช่นเดียวกับวิธี Dot Blot

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

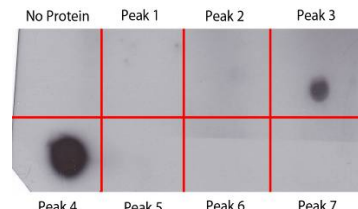
แบบแผนโปรตีน และขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรในสภาพธรรมชาติ (Native form) โดยวิธี Gel filtration และ Dot Blot

เมื่อนำสารสกัดโปรตีนที่ได้จากตับสุกรและผ่านการ Dialysis แล้วมาทำการแยกโดยใช้คอลัมน์ (Column) Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 High resolution ผ่านระบบปฏิบัติการของเครื่อง ÄKTAprime plus ซึ่งโปรตีนที่ถูกแยกตามขนาดนี้จะถูกวิเคราะห์โดยค่าดูดกลืนแสง (mAu) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโน-เมตร (nm) จะได้แบบแผนโปรตีนดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงแบบแผนโปรตีนจากตับสุกรในสภาพธรรมชาติที่ได้จากวิธี Gel filtration

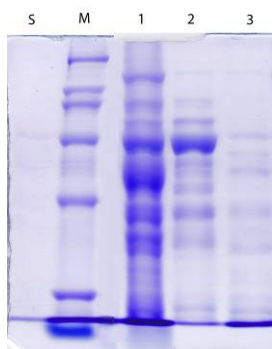
จากแบบแผนโปรตีนที่ได้จะพบว่าโปรตีนจากตับสุกรในสภาพธรรมชาติจะประกอบด้วยโปรตีนทั้งสิ้น 7 พิก (Peak) (ดังภาพที่ 1) และเมื่อทำการตรวจสอบหาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติโดยวิธี Dot Blot จะได้ผลการทดลองเป็นดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ที่ได้จากการตรวจสอบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากฟิสิกของโปรตีนจากตับสุกร โดยวิธี Dot Blot

จากผลการทดลองที่ได้จะพบว่าฟิสิกของโปรตีนที่มีสัญญาณ (ปรากฏสีดำบนแผ่นฟิล์ม) ได้แก่ ฟิสิกที่ 3 และ 4 ซึ่งเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากกราฟแบบแผนโปรตีนจากตับสุกรในสภาพธรรมชาติมาเทียบกับข้อมูลจากกราฟโปรตีนมาตรฐานที่ทำการทดลองในสภาวะเดียวกันจะพบว่าฟิสิกของโปรตีนที่มีการปรากฏของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจะมีขนาดเท่ากับ 72.52 kDa และ 26.96 kDa ตามลำดับ

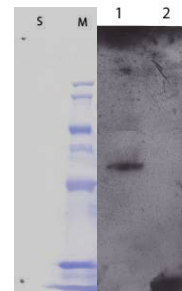
และเมื่อนำโปรตีนในฟิสิกที่ตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมาทำการทดลองต่อโดยวิธี SDS-PAGE จะได้แบบแผนโปรตีนของโปรตีนฟิสิกที่ 3 และ 4 เทียบกับโปรตีนจากตับสุกรดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงแบบแผนโปรตีนของฟิสิกที่ตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (S: Sample buffer, M: Marker, 1: โปรตีนจากตับสุกร, 2: โปรตีนฟิสิกที่ 3 และ 3: โปรตีนฟิสิกที่ 4)

จากแบบแผนโปรตีนจะพบว่าโปรตีนในฟิสิกที่ตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (ฟิสิกที่ 3 และ 4) ซึ่งได้จากวิธี Gel filtration จะประกอบด้วยโปรตีนมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธี Gel filtration โดยใช้คอลัมน์ (Column) Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 High resolution เพียงอย่างเดียวยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะทำบริสุทธิ์ (Purify) เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรได้

จากนั้นเมื่อนำเมื่อนำโปรตีนในฟิสิกที่ตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (ฟิสิกที่ 3 และ 4) มาทำการศึกษาต่อโดยวิธี Western Blot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4

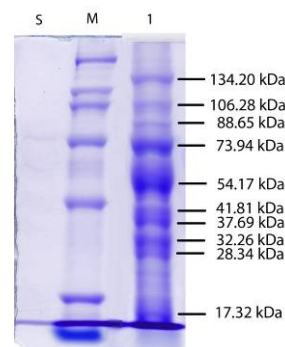


ภาพที่ 4 แสดงแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์ที่ได้จากการตรวจสอบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากโปรตีนฟิสิกที่ 3 และ 4 โดยวิธี Western Blot (S: Sample buffer, M: Marker, 1: โปรตีนฟิสิกที่ 3 และ 2: โปรตีนฟิสิกที่ 4)

ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแถบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์พบว่าขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ได้จากโปรตีนฟิสิกที่ 3 มีขนาดเท่ากับ 48.95 kDa และขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ได้จากโปรตีนฟิสิกที่ 4 มีขนาดเท่ากับ 13.94 kDa ตามลำดับ

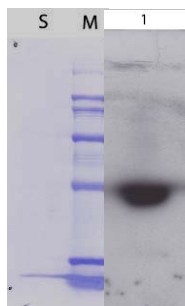
แบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western Blot

เมื่อนำสารสกัดโปรตีนจากตับสุกรมาทำการศึกษาระบบแบบแผนโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีแบบแผนโปรตีนดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงแบบแผนโปรตีนของโปรตีนจากตับสุกรโดยวิธี SDS-PAGE (S: Sample buffer, M: Marker, 1: โปรตีนจากตับสุกร)

จากแบบแผนโปรตีนจากตับสุกรพบว่าโปรตีนจากตับสุกรจะประกอบด้วยแถบโปรตีนหลักทั้งสิ้น 10 แถบ ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 134.20 kDa, 106.28 kDa, 88.65 kDa, 73.94 kDa, 54.17 kDa, 41.81 kDa, 37.69 kDa, 32.26 kDa, 28.34 kDa และ 17.32 kDa ตามลำดับและเมื่อทำการตรวจสอบหาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับสุกรพบว่าได้ผลการทดลองเป็นดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ที่ได้จากการตรวจสอบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรโดยวิธี Western Blot (S: Sample buffer, M: Marker, 1: โปรตีนจากตับสุกร)

จากผลการทดลองจะพบว่าแถบโปรตีนที่มีสัญญาณของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีทั้งสิ้น 1 แถบซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ตรวจพบนี้โดยเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานพบว่ามีความยาวเท่ากับ 52.11 kDa

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนจากตับสุกร (*Sus domestica*) ในสภาพธรรมชาติโดยวิธี Gel filtration พบว่าเมื่อนำสารสกัดโปรตีนที่ได้จากตับสุกรและผ่านการ Dialysis เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนและกรองกำจัดโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 10 kDa แล้วมาทำการแยกโดยใช้คอลัมน์ (Column) HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High resolution ผ่านระบบปฏิบัติการของเครื่อง ÄKTAprime plus ซึ่งโปรตีนที่ถูกแยกตามขนาดจะถูกวิเคราะห์โดยค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (nm) พบว่าโปรตีนจากตับสุกรในสภาพธรรมชาติจะประกอบด้วยโปรตีนทั้งสิ้น 7 พิก

หรือ 7 กลุ่มของโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกันนั่นเอง และเมื่อทำการทดสอบหาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากฟิลาของโปรตีนที่ได้โดยวิธี Dot Blot ซึ่งใช้แอนติบอดีที่ผลิตจากแอนติเจนของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับมนุษย์ (แอนติบอดีปฐมนุญมิ คือ Goat anti human liver α -L-fucosidase polyclonal antibody และ แอนติบอดีฟุคิยภูมิ คือ Rabbit anti goat HRP conjugated) พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตจากเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับมนุษย์สามารถจดจำเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Johnson and Alhadeff (1991) ซึ่งพบว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน และสามารถถูกจดจำได้โดยแอนติบอดีชนิดเดียวกัน และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shoarinejad et al. (1993) และ Shoarinejad and Alhadeff (1993) ซึ่งพบว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับหนู (*Mus musculus*) และหนูแฮมสเตอร์ (*Mesocricetus auratus*) สามารถถูกจดจำได้ด้วยโพลิโคลนอล แอนติบอดี (Polyclonal antibodies) ที่เตรียมจากตับมนุษย์ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรในสภาพธรรมชาติจะมีความยาวเท่ากับ 72.52 kDa และ 26.96 kDa ตามลำดับ

เมื่อนำโปรตีนในฟิลาที่ตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากวิธี Gel filtration มาทำการศึกษาแบบแผนโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยโปรตีนมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธี Gel filtration โดยใช้คอลัมน์ (Column) HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High resolution เพียงอย่างเดียวยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะทำบริสุทธิ์ (Purify) เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สราวุธ แก้วศรี (2549) ซึ่งได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือป่า (*Bubalus bubalis*) โดยวิธี Gel filtration พบว่าการทำ Gel filtration โดยใช้คอลัมน์ HiPrep 16/60 Sephacryl S-200

High resolution เพียงอย่างเดียวยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะทำบริสุทธิ์(Purify) เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้เมื่อนำโปรตีนในฟิสิกที่ตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส มาทำการศึกษาต่อโดยวิธี Western Blot พบว่าขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ได้จากโปรตีนในสภาพธรรมชาติที่มีขนาดเท่ากับ 72.52 kDa และ 26.96 kDa จะมีขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่สามารถตรวจพบโดยวิธี Western Blot เท่ากับ 48.95 kDa และ 13.94 kDa ตามลำดับซึ่งจะพบว่ามีความเล็กกว่าในสภาพธรรมชาติผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alhadeff et al. (1975) ซึ่งพบว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับมนุษย์ในสภาพธรรมชาติจะมีขนาดประมาณ 175 kDa แต่เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่สามารถตรวจพบโดยวิธี Western Blot จะมีขนาดประมาณ 50 kDa ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าในสภาพธรรมชาติเช่นกันจึงสามารถคาดคะเนได้ว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสภาพธรรมชาติจะต้องมีการจับเป็นกลุ่มของโปรตีนเพื่อให้อยู่ในรูปทรงที่เสถียรและเหมาะสมแก่การทำงาน ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Johnson and Alhadeff (1991) ที่ระบุว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในสภาพธรรมชาตินั้นมีขนาดใหญ่และมีหลายหน่วยย่อย

เมื่อทำการศึกษาแบบแผนโปรตีนจากตับสุกรและวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western Blot พบว่าแบบแผนโปรตีนจากตับสุกรจะประกอบด้วยแถบโปรตีนหลักทั้งสิ้น 10 แถบซึ่งมีขนาดเท่ากับ 134.20 kDa, 106.28 kDa, 88.65 kDa, 73.94 kDa, 54.17 kDa, 41.81 kDa, 37.69 kDa, 32.26 kDa, 28.34 kDa และ 17.32 kDa และเมื่อทำการตรวจสอบหาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับสุกรโดยวิธี Western Blot พบว่าขนาดเท่ากับ 52.11 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับแถบโปรตีนแถบที่ 5 จากการศึกษาแบบ

แผนโปรตีนจากตับสุกร และขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากฟิสิกของโปรตีนที่ได้จากการทำ Gel filtration นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งสามารถตรวจพบขนาดของเอนไซม์ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในขนาดใกล้เคียงกันในระดับของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ งานวิจัยของ Alhadeff et al. (1975) ซึ่งตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสขนาดประมาณ 50 kDa จากตับมนุษย์ งานวิจัยของ Shoarinejad et al. (1993) ซึ่งตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสขนาดเท่ากับ 57 และ 62 kDa จากตับของหนู (*Mus musculus*) และงานวิจัยของ Shoarinejad and Alhadeff (1993) ซึ่งตรวจพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสขนาดเท่ากับ 56 และ 60 kDa จากตับของหนูแฮมสเตอร์ (*Mesocricetus auratus*) ซึ่งขนาดที่ใกล้เคียงกันนี้เองจึงเป็นข้อยืนยันอีกประการหนึ่งว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีความคล้ายคลึงกันและมีการอนุรักษ์อย่างมากในสิ่งมีชีวิต

การพบเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรเพียงขนาดเดียว (51.74 ± 2.63 kDa) ในการทดสอบหาขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยวิธี Western Blot แต่พบฟิสิกของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสถึงสองฟิสิกในการทดสอบหาขนาดของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสภาพธรรมชาติโดยวิธี Gel filtration และ Dot Blot นั้น อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) บางชนิดที่อยู่ในตัวอย่างที่นำมาศึกษา ซึ่งทำการย่อยโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสทำให้มีการปรากฏของโปรตีนขนาดเล็กซึ่งถูกจดจำได้ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้ล้วนเป็นข้อบ่งชี้ว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรมีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับมนุษย์ (Alhadeff et al., 1975) หนู (*Mus musculus*) (Shoarinejad et al., 1993) และหนูแฮมสเตอร์ (*Mesocricetus auratus*) (Shoarinejad and Alhadeff,

1993) อีกทั้งยังถูกจดจำได้ด้วยแอนติบอดีที่ผลิตโดยแอนติเจนจากตับมนุษย์ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงด้านโครงสร้างของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกร และมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงน่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของแนวทางการประยุกต์ใช้สุกรเป็นต้นแบบในการศึกษาโรค fucosidosis ในมนุษย์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรต่อไปในอนาคต ควรลงใตสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (Protease inhibitor) ก่อนการศึกษาขนาดของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติ (Native form) และควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับจำนวนไอโซฟอร์ม (Isoform) ความเสถียรของเอนไซม์และค่าพีเอชที่เหมาะสมแก่การทำงานของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกร รวมถึงเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับมนุษย์ อีกทั้งควรศึกษาวิธีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกร ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สุกรเป็นต้นแบบในการศึกษาการดำเนินไปของโรค fucosidosis เพื่อหาวิธีบำบัดรักษาที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาและการทำวิจัยในครั้งนี้ และ Prof Jack Alhadeff แห่ง Lehigh University, USA ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์แอนติบอดีปฐภูมิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยมาโดยตลอด

เอกสารอ้างอิง

- สราวุธ แก้วศรี. 2549. ลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Alhadeff, JA. 1998. Structure and function of mammalian α -L-fucosidase. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 4: 105 – 118.
- Alhadeff, JA. and Johnson, SW. 1991. Mammalian α -L-fucosidase. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 99B(3): 479-488.
- Alhadeff, JA., Miller, AL., Wenaas, H., Vedvick, T., and O'Brien, JS. 1975. Human liver α -L-fucosidase: Purification, characterization and immunochemical studies. *The Journal of Biological Chemistry*. 18(250): 7106-7113.
- Johnson, SW. and Alhadeff, JA. 1991. Mammalian α -L-fucosidases. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 99B: 479-488.
- Kobata, A. 1979. Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates. *Analytical Biochemistry*. 100: 1-14.
- Grove, DS. and Serif, GS. 1981. Porcine thyroid fucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 662(2): 246-255.
- Shoarinejad, F. and Alhadeff, JA. 1993. Rodent tissue α -L-fucosidase: Analysis of brain and spleen isoforms and characterization of the purified hamster liver enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105B: 523-528.
- Shoarinejad, F., Johnson, SW., and Alhadeff, JA. 1993. Analysis of the subunits, isoforms and substrate specificity of mouse liver α -L-fucosidase. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105B: 129-137.