ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัย

การทำเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย (*Gracilaria* spp.) ให้บริสุทธิ์เบื้องต้นและสมบัติบางประการ

Partial Purification of Lectins from *Gracilaria* spp. and Some Properties

โดย

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
ธิดารัตน์ น้อยรักษา
วรรณภา กสิฤกษ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล
ประจำปีงบประมาณ 2544-2545
ISBN 974-616-991-2

AQ 001954
E6 ส.ค. 2546
162778

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2544 และ 2545 เป็นเวลา 2 ปี เพื่อการวิจัยนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้กรุณารับเป็นที่ปรึกษางานวิจัย และอาจารย์ ดร. อนงค์ จีรภัทร์ ที่ได้ช่วยตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย ขอบคุณคุณสุเมตต์ ปุจฉาการ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่ได้ช่วยเก็บและถ่ายรูปสาหร่ายทะเล ขอบคุณหัวหน้าหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ ดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนาที่ช่วยเป็นกำลังใจให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี สุดท้ายนี้ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เลือดคนเพื่อให้ในการวิจัย

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

กันยายน 2545

บทคัดย่อ

จากการนำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลสีแดง 6 ชนิด ได้แก่ *Gracilaria verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) ,*Gracilaria saliconia*, *Gracilaria bangmeiana*, *Gracilaria edulis* และ *Gracilaria lemaneiformis* ตรวจสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหรือสัตว์เกาะกลุ่ม พบว่าสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด ได้แก่ *Gracilaria verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) ,*Gracilaria saliconia* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มได้ 2^7 ไตเตอร์ แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี และ โอเกาะกลุ่มได้ อย่างไรก็ตามสิ่งสกัดจาก *Gracilaria verrucosa* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ และโอที่ปรับปรุงด้วยปาเปนแล้วเกาะกลุ่มได้ ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มนี้ถูกยับยั้งด้วยมิวซินและเฟตูอินซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน น้ำตาลโมเลกุลเล็กไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ นอกจากนี้การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไม่ต้องการไดวาเลนต์แคตไอออน

จากการทดลองทำเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และเจลฟิลเตรชันโดยใช้ Sephacryl S-200 แล้วหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคติน พบว่าเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type), *Gracilaria saliconia* มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณคือ 18,000 26,500 และ 14,500 ดาลตัน ตามลำดับ และจากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินโดย SDS-PAGE พบว่าได้โปรตีนประมาณ 4 แถบ โดยที่แถบเข้มที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24,000 33,000 และ 24,000 ดาลตัน ตามลำดับ

Abstract

The extract of six marine red algae, *Gracilaria verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) ,*Gracilaria saliconia*, *Gracilaria bangmeiana*, *Gracilaria edulis* and *Gracilaria lemaneiformis* were investigated for their hemagglutinating activity against some human and animal erythrocytes. It was found that the proteins extracts from three algae, *Gracilaria verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) ,*Gracilaria saliconia* agglutinates chicken erythrocytes of 2^7 titer but not human ABO erythrocytes. However, the extract from *Gracilaria verrucosa* agglutinated papain treated human A and O erythrocytes. The agglutination was inhibited by glycoprotein, mucin and fetuin but not simple sugar. In addition, the activity was not affected by addition of divalent cation.

Purification of lectins from *Gracilaria* spp. was carried out by protein precipitation using ammonium sulphate and gel filtrationon Sephacryl S-200. The molecular weights of lectin from *Gracilaria verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type), *Gracilaria saliconia* were estimated to be 18,000 26,500 and14,500 daltons. In SDS-PAGE of the purified lectins showed four protein bands with estimated molecular weight to be 24,000 33,000 and 24,000 daltons respectively.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญเรื่อง	(1)
สารบัญตาราง	(5)
สารบัญรูป	(7)
รายการอักษรย่อ	(9)
1 บทนำ	
1.1 ความหมายของเลคติน	1
1.2 สมบัติของเลคติน	1
1.3 การตรวจสอบเลคติน	3
1.4 การประยุกต์ใช้เลคติน	3
1.5 เลคตินจากสาหร่ายทะเล	8
1.6 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	9
2. อุปกรณ์และวิธีทดลอง	
2.1 เครื่องมือ	10
2.2 สารเคมี	11
2.3 สาหร่ายที่ใช้ศึกษาเลคติน	12
2.4 เลือดที่ใช้ทดสอบเลคติน	14
2.5 การสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล	14
2.6 การไดอะไลซ์	14
2.7 การวัดความเป็นกรด-ด่าง และความขุ่น	15
2.8 การต้มสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล	15
2.9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด	15

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.10 การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล โดยทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง	17
2.11 การตกตะกอนสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียโดยแอมโมเนียมซัลเฟต	18
2.12 การทำเลคตินจากสาหร่ายทะเลให้บริสุทธิ์โดยเจลฟิลเตรชัน	19
2.13 การทำ SDS-Polyacrymide gel electrophoresis โดยวิธีของ Laemmli	19
2.14 การทดสอบความต้องการโลหะไอออนของเลคติน	21
2.15 การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยนิวรามินิเดส	21
2.16 การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยทรปซินหรือปาเปน	22
2.17 การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยคาร์โบไฮเดรต	22
2.18 การทดสอบความร้อนต่อเสถียรภาพของเลคติน	23
2.19 การทดสอบความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเลคติน	23
2.20 การทดสอบความสามารถของเลคตินในการทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่ม	23
2.21 การคำนวณความบริสุทธิ์และผลิตผลของเลคตินจากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำให้บริสุทธิ์โดยเจลฟิลเตรชัน	24
3 ผลการทดลอง	
3.1 เลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย	25
3.2 เลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*	28
3.2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*	28
3.2.2 สมบัติทางกายภาพของสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล	29
3.2.3 ปริมาณเลคตินจากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเล	31
3.2.4 เลคตินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน	31

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.2.5 สมบัติบางประการของเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย	32
3.2.6 ความจำเพาะต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรต	35
3.2.7 ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต	37
3.2.8 เลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค SDS-PAGF	38
3.2.9 ความสามารถของเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียในการทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่ม	38
3.3 เลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type)	41
3.3.1 การสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type)	42
3.3.2 การทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเมื่อใช้แผ่นไมโครไตเตอร์ลักษณะต่างกัน	42
3.3.3 ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต	43
3.4 เลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย ซาลิโคเนีย (*Gracilaria saliconia*)	45
3.4.1 สมบัติบางประการของเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย ซาลิโคเนีย	45
3.4.2 ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต	47
3.4.3 การไดอะไลซ์เลคตินที่ตกตะกอนด้วยเกลือ	48
3.5 การเก็บเลคตินที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตไว้ใช้ในงานวิจัย	49
3.6 การทำเลคตินให้บริสุทธิ์โดยใช้เจลฟิลเตรชัน	50
3.6.1 โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*	50

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.6.2 โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp.(fisheri type)	57
3.6.3 โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia*	64
3.7 ความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเลคติน	71
3.7.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดย SDS-PAGE	71
3.7.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยเจลฟิลเตรชัน	75
4. สรุปและวิจารณ์	
4.1 สมบัติของสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล	88
4.2 เลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากสาหร่ายทะเล	90
บรรณานุกรม	92
ภาคผนวก	
ตารางปริมาณการใส่เกลือเพื่อตกตะกอนโปรตีน	
Gel Filtration Calibration Kit Instruction Manual for Protein Molecular Weight Determinations by Gel Filtration	
Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	การทำไกลโคโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยเลคตินตรึง	4
1.2	เลคตินที่ใช้ในการแยกเซลล์	6
1.3	เลคตินที่มีความจำเพาะต่อหมู่เลือดคน	7
2.1	วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	16
2.2	การเตรียม Separating และ staching gel	20
3.1	ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย	27
3.2	ปริมารเลคตินที่ได้จากการสกัด *Gracilaria verrucosa* ด้วยสภาวต่างกัน 7 วิธี	29
3.3	สมบัติทางกายภาพ ปริมาณโปรตีน และปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากสาหร่าย	30
3.4	ความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเม็ดเลือดไก่เกาะกลุ่ม	31
3.5	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเมื่อปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน	32
3.6	ผลการเติม Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ใน TBS ลงในสิ่งสกัดสาหร่ายทะเล และตรวจความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม	32
3.7	ความสามารถของคาร์โบไฮเดรตในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่	36
3.8	ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน(ชุดที่ 1)	37
3.9	ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน(ชุดที่ 2,3 และ4)	37
3.10	จำนวนแถบของโปรตีนจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อใช้เทคนิค SDS-PAGE	38
3.11	การเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์จากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*	40
3.12	ปริมาณเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) ที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน	43

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.13 ปริมาณเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) ที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน	44
3.14 การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของเลคตินที่ผ่านการไดอะไลซ์และไม่ได้ไดอะไลซ์	44
3.15 ความสามารถของคาร์โบไฮเดรตในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่	46
3.16 ปริมาณเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia* ที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน	47
3.17 ปริมาณเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) ที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน	48
3.18 การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของเลคตินที่ผ่านการไดอะไลซ์และไม่ได้ไดอะไลซ์	48
3.19 ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคตินที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วเก็บไว้ 1 ปี	49
3.20 ความบริสุทธิ์และผลิตผลของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa* ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน	56
3.21 ความบริสุทธิ์และผลิตผลของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp.(fisheri type) ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน	63
3.22 ความบริสุทธิ์และผลิตผลของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia* ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน	70
3.23 การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานและเลคตินบริสุทธิ์ใน SDS-PAGE	74
3.24 น้ำหนักโมเลกุลและค่า Kav โดยคอลัมน์ Sephacryl S-200 ของโปรตีนมาตรฐานและเลคตินจากสาหร่ายทะเล	77

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ภาพวาดแสดงการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยเลคติน	1
2.1 สาหร่ายทะเลที่ใช้ศึกษาเลคติน	13
2.2 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	17
2.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม	18
3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเมื่อใช้สิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*	33
3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่าง และการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเมื่อใช้สิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*	34
3.3 SDS-PAGE ของสิ่งสกัดจากกราซิลาเรียที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านการไดอะไลซ์	39
3.4 ความสามารถของเลคตินในการทำให้เซลล์จุลินทรีย์เกาะกลุ่ม	40
3.5 โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*	51
3.6 โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type)	58
3.7 โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia*	65
3.8 SDS-PAGE ของโปรตีนจากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	72
3.9 SDS-PAGE ของโปรตีนจากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านเจลฟิลเตรชัน	73

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
3.10	กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินจากสาหร่ายทะเล	74
3.11	โครมาโทแกรมของโปรตีนมาตรฐานโดยคอลัมน์ Sephacryl S-200	78
3.12	โครมาโทแกรมของโปรตีนมาตรฐานโดยคอลัมน์ Sephacryl S-200	83
3.13	กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน	84
3.14	โครมาโทแกรมของ *Gracilaria verrucosa* โดยคอลัมน์ Sephacryl S-200	85
3.15	โครมาโทแกรมของ *Gracilaria* sp. (fisheri type) โดยคอลัมน์ Sephacryl S-200	86
3.16	โครมาโทแกรมของ *Gracilaria saliconia*โดยคอลัมน์ Sephacryl S-200	87

รายการอักษรย่อ

%	เปอร์เซนต์
°ซ	องศาเซลเซียส
ซม.	เซนติเมตร
น.น.	น้ำหนัก
มก.	มิลลิกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
AU	Absorbance unit
BSA	Bovine serum albumin
M	molar
mM	milimolar
PBS	Phosphate buffer saline
TBS	Tris buffer saline
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacry lamind gel electrophoresis
SPB	Sodium phosphate buffer

บทนำ

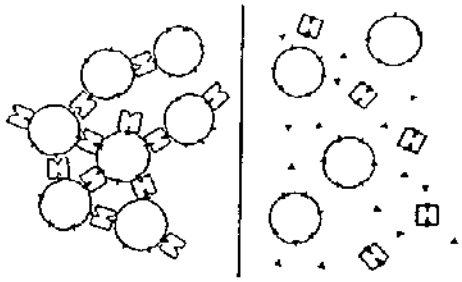
1.1 ความหมายของเลคติน

เลคติน คือ โปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต และต้องไม่ได้สร้างจากระบบภูมิคุ้มกัน หรือเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตที่จับอยู่ เลคตินสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มและ/หรือตกตะกอนโมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบได้ และการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยเลคตินนั้นสามารถยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Goldstein และ คณะ,1980)

1.2 สมบัติของเลคติน

1.2.1 การทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม

เลคตินทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือตกตะกอนคาร์โบไฮเดรตได้ เพราะโมเลกุลของเลคตินมีบริเวณจับคาร์โบไฮเดรตอย่างน้อยที่สุด 2 บริเวณ จึงสามารถเชื่อมเซลล์กับเซลล์ไว้ด้วยกันโดยการจับกับแซคคาไรด์ที่ผิวเซลล์ ดังรูป 1.1 หรือเชื่อมโมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรตไว้ด้วยกันโดยการจับกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลเหล่านั้น ความสามารถในการทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือตกตะกอนสารโมเลกุลใหญ่ของเลคตินหมือนของแอนติบอดี ยิ่งไปกว่านั้นความสามารถเหล่านี้ยังยับยั้งได้โดยแซคคาไรด์สำหรับเลคตินหรือแฮพเทนสำหรับแอนติบอดี



รูป 1.1 ภาพวาดแสดงการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยเลคติน (ซ้าย) และการยับยั้งการเกาะกลุ่มโดยแซคคาไรด์ (ขวา) สัญญลักษณ์ที่ใช้คือ วงกลมแทนเซลล์ สามเหลี่ยมแทนแซคคาไรด์บนผิวเซลล์ และแซคคาไรด์อิสระที่จับจำเพาะเลคติน สี่เหลี่ยมแทนเลคตินที่มีบริเวณจับแซคคาไรด์ 2 บริเวณอยู่ตรงข้ามกัน

1.2.2 การจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต

การจับจำเพาะคาร์โบไฮเดรตของเลคตินเกิดจากแรงชอบน้ำระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์โบไฮเดรตกับแขนงข้างมีขั้วของกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณจับซึ่งมีสมบัติไม่ชอบน้ำของเลคติน ตัวอย่างเช่น การจับจำเพาะออลิโกแซคคาไรด์ที่ปลายเป็นกรดไซยาลิคของเลคตินจากข้าวสาลีงอกมีค่าเอนโทรปีและเอนธัลปีเป็นลบ แสดงว่าแรงส่วนใหญ่ที่ใช้ในการจับอาจเป็นพันธะไฮโดรเจน และแรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างโมเลกุลทั้งสอง

การวิเคราะห์ชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่เลคตินจับจำเพาะ มักนิยมใช้เทคนิคการยับยั้งด้วยแฮพเทน (Hapten inhibition technique) โดยทดสอบความสามารถของคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น มอโนแซคคาไรด์ ออลิโกแซคคาไรด์ และไกลโคเพปไทด์ ในการยับยั้งการตกตะกอนของพอลิแซคคาไรด์หรือตกตะกอนโปรตีนโดยเลคติน เทคนิคการยับยั้งด้วยแซคคาไรด์นี้ใช้กับเลคตินได้ เพราะเลคตินจับคาร์โบไฮเดรตด้วยแรงอย่างอ่อนไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์ และการจับนั้นผันกลับได้ จึงเหมือนการจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีหรือการจับของเอนไซม์กับตัวยับยั้ง ดังนั้นแซคคาไรด์ที่ยับยั้งการทำงานของเลคตินได้โดยใช้ความเข้มข้นต่ำสุด จึงน่าจะเป็นแซคคาไรด์ชนิดเดียวกับที่อยู่ในบริเวณจับของเลคติน

เลคตินสามารถแบ่งกลุ่มตามความจำเพาะต่อน้ำตาลได้ 5 กลุ่ม คือ เลคตินที่จับจำเพาะแมนโนสและกลูโคส เลคตินที่จับจำเพาะ N-acetylglucosamine เลคตินที่จับจำเพาะกรดไซยาลิค (ดารารัตน์, 2536) ตัวอย่างของเลคตินจากสาหร่ายทะเลที่จับจำเพาะกับน้ำตาล เช่น *Gracilaria tikvahiae* จับจำเพาะกับ N-acetylneuraminic acid, lactoferin, fetuin,bovine submaxillary mucin *Gracilaria bursa-pastoris* จับจำเพาะกับ yeast mannan, α-acid Glycoprotein เป็นต้น (Rogers และ Fish,1991)

1.2.3 การกระตุ้นเซลล์ให้แบ่งตัว

เลคตินสามารถกระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้แบ่งตัว การอุ่นเม็ดเลือดขาวกับเลคตินปริมาณน้อยสามารถเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดขาวแบ่งตัว ตัวอย่างเลคตินที่กระตุ้นเม็ดเลือดขาวที่ขึ้นกับต่อมธัยมัส (T-lymphpcyte หรือเซลล์ที) ได้แก่ เลคตินจากถั่วแดงหลวงและเลคตินจากถั่วแจ็คเป็นต้น เลคตินที่กระตุ้นเม็ดเลือดขาวที่ไม่ขึ้นกับต่อมธัยมัส (B-lymphocyte หรือเซลล์บี) ได้แก่ เลคตินจากกุ้ง (*Homarus americanus*) และเลคตินจากรา*เมือก* (*Dictyostelium purpureum*)

เลคตินที่กระตุ้นทั้งเซลล์ทีและเซลล์บี ได้แก่ เลคตินจากข้าวสาลีงอกและเลคตินจากถั่วเลนทิล เป็นต้น สำหรับเลคตินจากสาหร่ายทะเลสีแดง *Carpopeltis flabellata* สามารถกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดขาวจากม้ามหนูชนิดที่ให้แบ่งเซลล์ได้ (Hori และคณะ, 1987)

1.3 การตรวจสอบเลคติน

จากสมบัติของเลคตินในการทำให้เซลล์เกาะกลุ่มและตกตะกอนสารที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ในโมเลกุลทำให้ตรวจสอบเลคตินได้หลายวิธี เช่น วัดความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม การตกตะกอนพอลิแซคคาไรด์ ไกลโคโปรตีน เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีที่นิยมใช้กันมากคือ การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Hemagglutination test) ซึ่งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินนั้นขึ้นกับความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของเลคติน เวลา อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง ในขณะที่เลคตินจับกับเม็ดเลือดแดง และเมื่อตรวจพบแล้วต้องยืนยันด้วยว่าความสามารถนั้นถูกยับยั้งอย่างจำเพาะโดยมอโน- หรือออลิโกแซคคาไรด์ นั่นคือการตรวจหาความจำเพาะต่อน้ำตาล (Sugar specificity test) ของเลคติน

ชนิดของเซลล์ที่นำมาใช้ในการศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยเลคตินมักเป็นเลือดสดจากคนหรือสัตว์ เช่น กระต่าย แกะ ม้า ไก่ เป็นต้น ในกรณีที่ตรวจไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ในสภาพธรรมชาติดังกล่าว ได้มีการปรับปรุงเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยปาเปน ทริปซิน หรือนิวรามินิเดส เป็นต้น เพราะเอนไซม์สามารถเพิ่มความไวในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดโดยเลคตินบางชนิด ตัวอย่างเช่น เลคตินจากสาหร่ายทะเล *Boodlea coacta* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายในสภาพธรรมชาติเกาะกลุ่มได้ 2^{24} ไตเตอร์ ซึ่งมากกว่าเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ปรับปรุงด้วยทริปซิน เลคตินจาก *Sagassum microcanthum* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแกะที่ปรับปรุงด้วยทริปซินและโปรเนสเกาะกลุ่ม ในขณะที่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่าย แกะ ม้า ไก่ หรือคนในสภาพธรรมชาติเกาะกลุ่มได้ (Hori และคณะ,1988)

1.4 การประยุกต์ใช้เลคติน

1.4.1 การแยกและโครงสร้างของส่วนคาร์โบไฮเดรต

โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพกับเลคตินตรึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการทำไกลโคโปรตีนให้บริสุทธิ์ รวมทั้งวิเคราะห์ไกลโครโปรตีนด้วย โดยการผ่านสารที่ต้องการแยกไปในคอลัมน์บรรจุเลคตินเชื่อมติดตัวค้ำจุน ล้างสารไม่จับเลคตินออกจากคอลัมน์ก่อน แล้วจึงชะสารจับจำเพาะ

เลคตินออกโดยสารละลายแซคคาไรด์ที่เลคตินนั้นจับจำเพาะสารที่ได้มักเป็นไกลโคโปรตีนผสม แต่บางกรณีอาจได้ไกลโคโปรตีนบริสุทธิ์ชนิดเดียว ตาราง 1.1 แสดงตัวอย่างการทำไกลโคโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยแลคตินตรึงการวิเคราะห์โครงสร้างของส่วนคาร์โบไฮเดรตในไกลโคโปรตีน เริ่มต้น

ตาราง 1.1 การทำไกลโคโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยแลคตินตรึง (Liner และคณะ, 1986).

Glycoprotein	Source	Lectin used
Asialoglycocalicin	Sialidase-treated human platelets	Peanut
Asialoglycophorin	Sialidase-treated human erythrocytes	Peanut
Band II	Human erythrocytes	Concanavalin A
Carcinoembryonic antigen	Human colon adenocarcinoma	Concanavalin A *Ricinus communis* Wheat germ
Glycophorin	Human erythrocytes	Wheat germ
Human histocompatibility antigen	Lymphoblastoid cells	Lentil
Laminin	Mouse saecom	*Griffonia Simplicifolia* 1
Rhodopsin	Bovine retina	Concanavalin A
Thy-1	Mouse thymus	Concanavalin A
	Human and canine brain	Lentil

จากการย่อยไกลโคโปรตีนบริสุทธิ์โดยเอนไซม์ หรือวิธีทางเคมีได้เป็นสารผสมของไกลโคเพปไทด์ หรือออลิโกแซคคาไรด์หลายชนิด ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ลำดับของโครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพกับเลคตินตรึง

1.4.2 **การศึกษาเยื่อเซลล์**

การศึกษาเคมีของเนื้อเยื่อ และเซลล์ดยใช้สารเคมีสามารถตรวจสอบน้ำตาลทั่วไปได้ แต่การใช้เลคตินสามารถชี้ให้เห็นละเอียดถึงน้ำตาลจำเพาะ และลำดับของน้ำตาลเหล่านั้น รวมทั้งให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้าง และตำแหน่งที่อยู่ของส่วนคาร์โบไฮดรตด้วย ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้เลคตินศึกษาโครงสร้างของเยื่อเซลล์

Ortiz และคณะ, 1992 ได้รายงานเกี่ยวกับโครงสร้างแซคคาไรด์ บริเวณมิวคอซาที่ผนังลำไส้เล็ก โดยให้อาหารที่มีเห็ดกระดุมแห้ง หรือเลคตินบริสุทธิ์แก่หนู แล้วพบว่าน้ำหนักตัวของหนูลดลง และการย่อยโปรตีนลดลง เพราะเลคตินเข้าจับแซคคาไรด์ที่บริเวณผิววิลไล (Villi) ซึ่งมีหน้าที่ดูดซึมอาหารทำให้วิไลเชื่อมติดกัน และมิวคอซาแบนเรียบ ซึ่งแสดงว่ามิวคอซาเกิดความเสียหายเนื่องจากจับของเลคติน และจากการที่เลคตินจากเห็ดกระดุมจับจำเพาะ Gal (β1 → 3) GalNAc โครงสร้างนี้จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการจับของเลคตินกับผิวหนังด้านในของลำไส้เล็ก

1.4.3 **การตรวจสอบเซลล์มะเร็งและการแพร่กระจาย (ดารารัตน์, 2536)**

การศึกษารูปแบบ และปริมาณการจับของเลคตินกับเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของส่วนคาร์โบไฮเดรตที่ผิวเซลล์ในขณะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง รวมทั้งเอกลักษณ์การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการจับของเลคตินจึงอาจใช้เป็นตัวชี้เซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งได้ ตัวอย่างเลคตินที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ได้แก่ เลคตินชนิดที่ 1 จาก *Ulex europaeus* ใช้เป็นตัวชี้เนื้องอกที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุภายในหลอดเลือด เลคตินจากหอยทากใช้เป็นตัวชี้มะเร็งเต้านมได้ทั้งในระยะแพร่กระจาย และระยะเริ่มต้น และอาจใช้ประเมินการไม่กลับมาเป็นอีกของมะเร็งเต้านม รวมถึงทำนายการอยู่รอดของคนไข้ นอกจากนี้เลคตินจากถั่วลิสงอาจใช้ตรวจสอบมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งปอด

1.4.4 **การแยกเซลล์**

กลุ่มของเซลล์โดยทั่วไปไม่ว่าเซลล์สัตว์ เซลล์พืช หรือจุลินทรีย์ สามารถแบ่งเป็นเซลล์กลุ่มย่อยโดยเลคตินได้ เมื่อเซลล์เหล่านั้นมีความแตกต่างของแซคคาไรด์ ที่ผิวเซลล์ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่ไม่จับเลคตินออกจากเซลล์ที่จับเลคติน และเนื่องจากการจับของเลคตินกับเซลล์ผันกลับได้เมื่อเติมแซคคาไรด์จำเพาะลงไป ทำให้นำเซลล์ที่จับเลคตินกลับคืนมาในปริมาณสูงกว่า 80% ในสภาพมีชีวิต และไม่ถูกทำลาย กรณีเช่นนี้เลคตินมีข้อดีเหนือแอนติบอดี้ ซึ่งตรวจสอบองค์ประกอบที่ผิวเซลล์เหมือนกันตรงที่แอนติบอดีแยกออกจากผิวเซลล์ที่จับได้ยากมาก ตัวอย่างเลคตินที่ใช้ในการแยกเซลล์ชนิดต่างๆ แสดงในตาราง 1.2

ตาราง 1.2 เลคตินที่ใช้ในการแยกเซลล์ (Liner และคณะ, 1986)

Source of lectins	Source of cells	Examples of cells separated
Dolichos biflorus	Human	A_1 and O (H) erythrocytes
Griffonia simplicifolia, lectin 1	Murine	Stimulated and resident Macrophages
Helix pomatia	Human	Peripheral B and T lymphocytes[b]
	Murine	B and T splenocytes
	Rat	B and T splenocytes
Limulus polyphemus	Murine	Spleen T-helper cells
Lotus tetragonolobus	Human	Peripheral blood neutrophils, bone marrow hemopoietic progenitor cell
Peanut	Human	Cortical and medullary thymocytes, immature and mature cord blood lymphocytes
	Murine	Cortical and medullary thymocytes, suppressor spleen T cells
	Chicken	Suppressor lymphocytes
Pokeweed	Murine	Granulocyte-macrophage progenitor cells
Soybean	Human	Helper and suppressor lymphoctyes, bone marrow stem cells
	Murine	B and T splenocytes, stem cells from spleen
	Hamster	B and T splenocytes
	Monkey	Bone marrow stem cells
Wheat germ	Murine	B and T splenocytes
Vicia villosa	Murine	Cytotoxic T cells

1.4.5 การตรวจหมู่เลือด

เลคตินสามารถระบุความแตกต่างของเม็ดเลือดแดงต่างหมู่เลือด แม้ว่าในปัจจุบันได้มีแอนติบอดีโคลนเดี่ยวจำเพาะต่อหมู่เลือดเข้ามาแทนที่ เลคตินหลายชนิดยังคงใช้ประจำในธนาคารเลือดเพื่อตรวจหาหมู่เลือดดังตาราง 1.3

ตาราง 1.3 เลคตินที่มีความจำเพาะต่อหมู่เลือด (Liner และคณะ, 1986)

Specificity	Source of lectin
Anti-A	*Griffonia* (Bandeiraca) simplicifolia (A_4)
	Helix pomatia
	Phaseolus lunatus
	Vicia cracca
Anti-A_1	*Dolichos biflorus*
Anti-B	*Griffonia* (*Bandeiraea*) *simplicifolia* I (B_4)
Anti-O(H)	*Anguilla anguilla*
	Lotus tetragonolobus
	Ulex europeus
Anti-A + N	*Molucella laevis*
Anti-N	*Vicia graminea*
Anti-T	*Arachis hypogaea*
Anti-Tn	*Salvia sclarea*

เลคตินจาก *Ulex eurcpaeus* ใช้ตรวจเลือดหมู่โอ โดยสาเหตุส่วนใหญ่เนื่องจากไม่มีแอนติบอดีต่อเลือดหมู่โอ หรือ anti-O(H)

1.5 เลคตินจากสาหร่ายทะเล

การศึกษาเลคตินจากสาหร่ายทะเลมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1966 โดย Boyd ได้สำรวจสาหร่ายทะเลจากเขตร้อน 24 ชนิด แล้วทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม พบว่าสาหร่ายทะเล 11 ชนิด สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ ดังนั้นในช่วงกลางปี ค.ศ. 1970 จึงได้มีการสำรวจเลคตินจากสาหร่ายทะเลอย่างกว้างขวาง มีการสกัดเลคตินในสาหร่ายทะเล จากประเทศอังกฤษ 105 ชนิด สาหร่ายทะเล 18 ชนิด สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มแบบไม่เฉพาะเจาะจง ยกเว้นสาหร่ายทะเลสีแดง *Ptilota plumosa* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเฉพาะหมู่บี เกาะกลุ่ม (Rogers และ Fish, 1991)

Maki และ Mitchell (1986) ได้รวบรวมงานวิจัยของ Schoenberg และคณะ (1980), Kinzic และคณะ (1982) และ Boyd และคณะ (1966) ที่ทำการสำรวจเลคตินจากสาหร่ายทะเล ผลการสำรวจแสดงว่าเลคตินพบในสาหร่ายทะเลทั่วไป แต่เลคตินจากสาหร่ายทะเลส่วนใหญ่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแงดคนเกาะกลุ่มได้ ดังนั้นในการศึกษาเลคตินจากสาหร่ายทะเลจึงมีการใช้ทั้งเลือดคน และเลือดสัตว์ นอกจากนี้ยังพบว่าการแยกเลคติน และศึกษาคุณสมบัติส่วนใหญ่สกัดจากสาหร่ายทะเลสีแดง

Hori และคณะ (1981) ได้สำรวจสาหร่ายทะเลในประเทศญี่ปุ่น 53 ชนิด เป็นสาหร่ายทะเลสีเขียว 6 ชนิด สีแดง 42 ชนิด และสีน้ำตาล 5 ชนิด พบว่าสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล 14 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายทะเลสีเขียว 4 ชนิด สีแดง 9 ชนิด และสีน้ำตาล 1 ชนิด สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้สาหร่ายทะเลสีเขียว *Ulva arasakii* ยังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนเฉพาะหมู่ เอ และ โอ เกาะกลุ่ม สำหรับสาหร่ายทะเลสีเขียว *Bryopsis hypnoides* และสีแดง *Laurencia undulata* มีความจำเพาะต่อเลือดคนหมู่บี เท่านั้น

Fabregas และคณะ (1985) ได้สำรวจเลคตินจากสาหร่ายทะเลสีแดงในประเทศสเปน พบว่าสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล 5 ชนิด ได้แก่ *Schyzimenion dubyi* , *Gelidium cartilagineum* , *Callithamnion tetragonum* , *Chondria tenuisssima* และ *Polysiphonia brodiaei* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้มากที่สุด 4, 194, 304 ไดเตอร์

Benevides และคณะ (2001) ได้ตรวจพบเลคตินในสาหร่ายทะเลสีเขียว *Caulerpa cupressoides* และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้โครมาโทกราฟีสัมพรรคภาพ alpha-lactose-agarose ตามด้วยเจลฟิวเตรชัน ใช้ Bio Gel P-100 เลคตินสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนและสัตว์หลายชนิดที่ถูกปรับปรุงเอนไซม์ทริปซินเกาะกลุ่มได้ แต่ให้ผลการทดสอบดีที่สุดกับเลือดคนหมู่เอ นอกจากนี้เลคตินถูกยับยั้งด้วยเลคโตสและอนุพันธ์ และถูกยับยั้งได้ดีด้วยมิวซินซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเจลฟิวเตรชัน และ SDS-PAGE พบว่าเลคตินมีขนาดโมเลกุล 44,700 และเป็นพวกไดเมอริคโปรตีน จากการทดสอบเสถียรภาพของเลคตินต่อความร้อน พบว่าเลคตินเสียสภาพที่อุณหภูมิตั้งแต่ 80 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป จากข้อมูลการวิเคราะห์กรดอะมิโน พบว่าเลคตินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แสดงสมบัติเป็นกรดเป็นส่วนใหญ่ และมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ 11.05% แสดงว่าเลคตินนี้เป็นไกลโคโปรตีน

1.6 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเลคตินจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด คือ *Gracilaria verrucosa* และ *Gracilaria* sp. (fisheri type) และ *Gracilaria saliconia* โดยวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงคน สัตว์ หรือจุลินทรีย์เกาะกลุ่ม ความจำเพาะกับชนิดน้ำตาล รวมทั้งวิธีการทำเลคตินจากสาหร่ายทะเลให้บริสุทธิ์เบื้องต้น

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

2.1 เครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต
Automatic pipette	Boeco, Germany
Automatic pipette, 12 channels	Brand, Germany
Blender	National, Thailand
Centrifuge refrigerated Model CD-100R	Tomy Seiko, Japan
Dialyzer tubing	Spectrum, U.S.A.
Fraction collector	Advantage, Japan
Freeze dryer	Labconco, U.S.A.
Gel electrophoresis unit Model Mighty Small II SE 260	Hoefer Pharmacia Biotech Inc., U.S.A.
Microtiter plate, V-shape	Brand, Germany
pH meter	Mettler Toledo, Switzerland
Power Supply ISS-250	Integrated Separation Systems, U.S.A.
UV-Visible Spectrophotometer	Unicam, United Kingdom

2.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	
Bovine serum albumin,Fraction V 98%	Sigma Chemical Co., U.S.A
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck Ltd., Germany
สารเคมีใช้ทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	BDH Chemical Ltd; England
Protein standars Calibration Kit	Amersham Phamacia Biotech AB, Uppsala Sweden
สารเคมีใช้ในเจลฟิวเตรชัน	Amersham Phamacia Biotech AB,
Sephacryl S-200, High Resolution	Uppsala Sweden
LMW Gel Filtration, Calibration Kit	
น้ำตาลสำหรับทดสอบการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ได้แก่	Merck Ltd., Germany
- L-arabinose, D-fructose, L-fucose, D-galactose, D-maltose, D-mannose, D-melibiose, L-rhamnose, D-ribose, Sucrose, α-lactose, D-cellobiose และ D-raffinose for biochemistry	
- D-glucose, D-xylose และ D-sorbitol for biochemistry	Fluka, Switzerland
- D-galactosamine, D-glucosamine, methyl-α-D-mannopyranoside N-acetyl-D-glucosamine N-acetyl-D-galactosamine	Sigma Chemical Co; U.S.A.
Fetuin from Fetal calf serum, F-2379	Sigma chemical Co; U.S.A.
Mucin type II : crude from Porcine Stomach, M-2378	Sigma chemical Co; U.S.A.

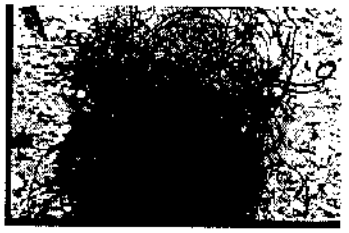
2.2 สารเคมี (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
เอนไซม์สำหรับปรับปรุงเม็ดเลือดแดง	
Neuraminidase Type V (2.5 Unit)	Sigma chemical Co; U.S.A.
Trypsin from Beef Pancreas	BDH Chemical Ltd., England
Papain from Carica papaya	Fluka, Switzerland
อาหารเลี้ยงเชื้อ	Difco, U.S.A.
สารเคมีที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายทะเลใช้ระดับการค้า	
สารเคมีอื่นๆ ใช้ระดับการวิเคราะห์	

2.3 สาหร่ายทะเลที่ใช้ศึกษาเลคติน

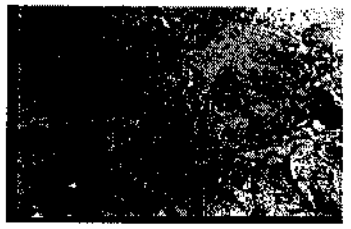
การเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลใช้อุปกรณ์ดำน้ำ(scuba)เก็บสาหร่ายส่วนทัลลัส(Thallus) ระหว่างการขนส่งใส่น้ำแข็งไว้ก้นภาชนะ แล้ววางสาหร่ายไว้ชั้นบนให้ได้รับไอเย็นจากน้ำแข็ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการล้างทำความสะอาดสาหร่ายด้วยน้ำทะเล แล้วนำสาหร่ายใส่ในขวดโหลแก้วที่บรรจุอาหารเหลวสูตร Provasoli's enriched seawater (กาญจนภาชน์, 2527) ให้อากาศตลอดเวลา และเปลี่ยนอาหารอาทิตย์ละ 1 ครั้ง จากนั้นนำมาแยกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน(Andams, 1994, Dawes, 1981, Lewmanomontและ Ogawa, 1995,Taylor, 1979) สาหร่ายทะเลที่นำมาศึกษาเลคตินมี 6 ชนิด คือ*Gracilaria verrucosa* เก็บจากอ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี *Gracilaria* sp. (fisheri type), *G. lemaneiformis* และ *G. edulis* เก็บจากหาดบางแสนและหาดบริเวณอ่างศิลา *G. saliconia* เก็บจากศูนย์พัฒนาการประมงทะเลภาคตะวันออก จังหวัดระยอง ซึ่งได้เลี้ยงสาหร่ายไว้ในบ่อดิน และ *G.bangmeiana* เก็บจากหาดแหลมหมาจอ ต. แสมสาร จังหวัดชลบุรี ดังแสดงในรูป 2.1

Gracilaria verrucosa

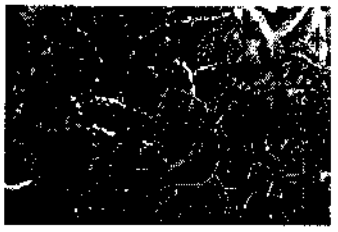


Gracilaria sp. (fisheri type)

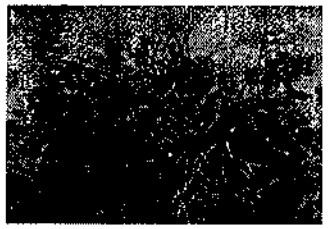
Gracilaria saliconia



Gracilaria. lemaneiformis



Gracilaria. edulis



Gracilaria bangmeiana

รูป 2.1 สาหร่ายทะเลที่ใช้ศึกษาเลคติน

2.4 เลือดที่ใช้ทดสอบเลคติน

เลือดที่นำมาใช้ทดสอบเลคตินเป็นเลือดคนหมู่เอ บี และโอ ที่ได้รับบริจาคจากศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา เลือดที่ได้เป็นเลือดที่หมดอายุไม่นาน มีอายุการใช้งาน 20-30 วัน เลือดสัตว์ที่นำมาใช้ทดสอบเลคตินได้แก่ เลือดม้า เลือดหมู เลือดแกะ เลือดกระต่าย เลือดห่าน เลือดไก่ และเลือดหนู เลือดหมูได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คณะเกษตรศาสตร์ บางพระ จ. ชลบุรี เลือดม้า และกระต่าย ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เซรุ่มบางพระ สภากาชาดไทย เลือดแกะ เลือดห่าน และเลือดหนู ได้จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา เลือดไก่ได้จากฟาร์มเลี้ยงไก่ อ. พนัสนิคม จ. ชลบุรี

2.5 การสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล

การสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล ชั่งสาหร่ายทะเลสดส่วนทัลลัสหนัก 20.00 กรัม เติม 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 มล. นำไปเข้าเครื่องปั่นด้วยความเร็วปานกลาง เป็นเวลา 3 นาที แล้วกรองตะกอนออกด้วยผ้าขาวบางซ้อน 4 ชั้น นำสารละลายที่กรองได้เข้าเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 4°ซ. ด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ได้ส่วนใส วัดปริมาตรแล้วเก็บที่ 4°ซ. เพื่อศึกษาต่อไป

2.6 การไดอะไลซ์ (Dialysis)

การเตรียม 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มี 0.15 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ pH 7.0 (PBS)

การเตรียม 1.5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ หนัก 21.91 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มล.

การเตรียม 0.1 โมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ชั่ง $NaH_2PO_4.H_2O$ หนัก 6.90 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มล.

การเตรียม 0.1 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

ชั่ง $Na_2HPO_4.12H_2O$ หนัก 17.91 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มล.

การเตรียม 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

เติม 0.1 โมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ลงใน 0.1 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีปริมาตร 300 มล. จนได้ pH 7.4

การเตรียม 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.15 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์

ตวง 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 100 มล. และตวง 1.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 มล. ผสมสารละลายทั้งสองแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มล.

การทำไดอะไลซ์

นำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลปริมาตร 3 มล. ใส่ในถุงไดอะไลซ์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.4 มม. และน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือก 12,000 – 14,000 ใช้คลิปปิดก้นและปากถุง นำไปแช่ใน 0.01 โมลาร์ PBS pH 7.4 ปริมาตร 2.5 ลิตร ที่ 4°ซ. คนเบาๆ เพื่อเร่งการกระจายตัวของสารโมเลกุลเล็ก 12 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนสารละลายเป็น PBS ทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 2 ครั้ง นำสิ่งสกัดในถุงไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์ชนิด micro-centrifuge ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปใช้เป็นสิ่งสกัดหลังไดอะไลซิส

2.7 การวัดความเป็นกรด-ด่าง และความขุ่น

การวัดความเป็นกรด-ด่างของสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล นำสิ่งสกัดวัดพีเอชก่อนทำการไดอะไลซ์

การวัดความขุ่นของสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล นำสิ่งที่สกัดได้ก่อนทำการไดอะไลซ์วัดความขุ่น โดยวัดการกระเจิงแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

2.8 การต้มสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล

นำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดพลาสติกกันแหลม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ 0.02% (w/v) Bovine serum albumin (BSA) เตรียมได้โดยชั่ง BSA หนัก 0.2500 กรัม ละลายใน PBS แล้วปรับปริมาตรเป็น 25.00 มล. เป็นสารละลาย 1.0% BSA จากนั้นปิเปต 1.0% BSA ปริมาตร 1.0 มล. เติมน้ำกลั่น หรือ PBS จนได้ปริมาตร 50 มล. เป็นสารละลายมาตรฐาน 0.02% BSA

การเตรียมสารละลาย Coomassie

ชั่ง Coomassie Brillant Blue G-250 หนัก 0.0200 กรัม ละลายใน 95% ethanol 25 มล. เติม 85% phosphoric acid 50 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มล.

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปต 0.02% BSA ปริมาตร 50-500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 0.5 มล. เติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 5.0 มล. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนที่ได้นำมาเขียนกราฟกับปริมาณโปรตีน ได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนดังตัวอย่างที่แสดงในรูป 2.2

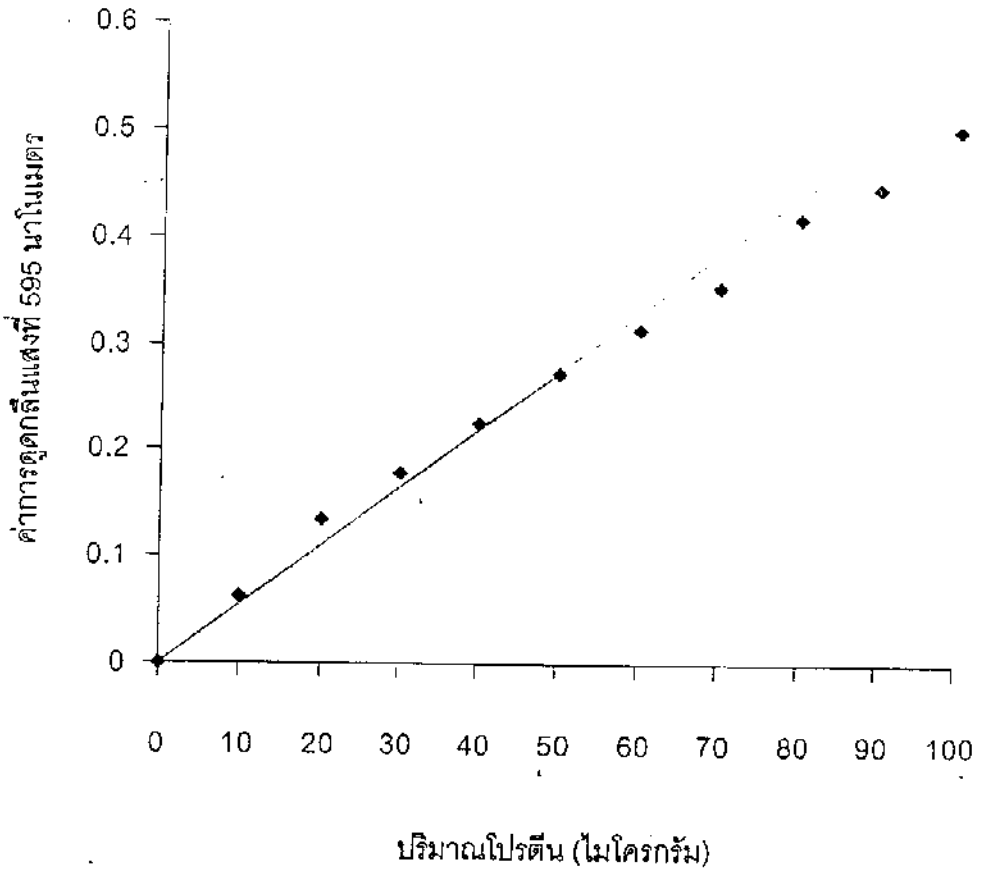
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

ปิเปตสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Coomassie 5.0 มล. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากค่าที่ได้นำไปอ่านปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง (Bradford, 1976)

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 2.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

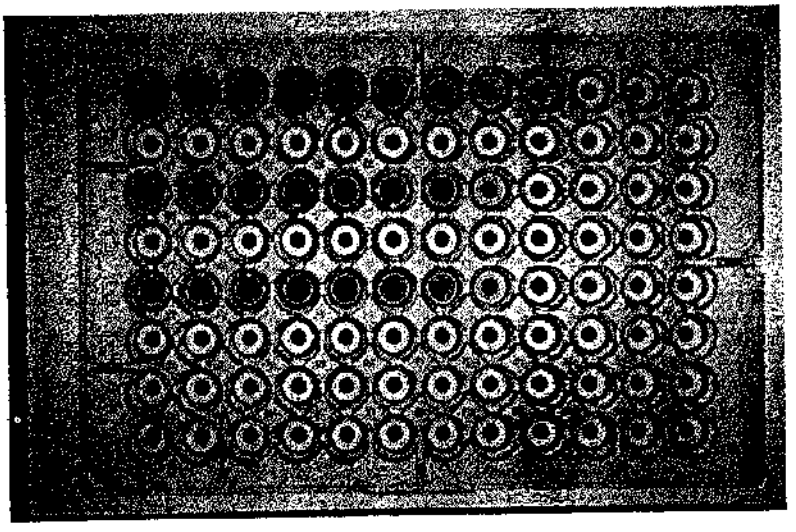
หลอดที่	0.02%BSA ไมโครลิตร	PBS (ไมโครลิตร)	สิ่งสกัด (ไมโครลิตร)	สารละลาย Coomassie (มล.)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)
Blank	-	500	-	5.0	-	0
1	50	450	-	5.0	0.0621	10
2	100	400	-	5.0	0.134	20
3	150	350	-	5.0	0.177	30
4	200	300	-	5.0	0.226	40
5	250	250	-	5.0	0.272	50
6	300	200	-	5.0	0.315	60
7	350	150	-	5.0	0.354	70
8	400	100	-	5.0	0.419	80
9	450	50	-	5.0	0.446	90
10	500	-	-	5.0	0.501	100
sample	-	-	500	5.0	0.216	30.827



รูป 2.2 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินโดยทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

การทดสอบทำในแผ่นไมโครไตเตอร์ (microtiter plate) ชนิด 8 x 12 หลุม ลักษณะก้นหลุมเป็นรูปตัววี ปริมาตรที่บรรจุสารได้หลุมละ 300 ไมโครลิตร ทำการเจือจางสิ่งสกัด ด้วยสารละลายที่ใช้สกัดตั้งแต่ 2 เท่า จนถึง 2^n เท่า เมื่อ n คือ จำนวนหลุม เติม 2% เม็ดเลือดแดงลงในหลุมทำเช่นนี้ 2 ชุด แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลุมที่มีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงคือหลุมที่เห็นสีแดงแผ่กระจายเป็นวงกลมใหญ่ ส่วนหลุมที่ไม่มีการเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงกองรวมกันเป็นจุดเล็กๆที่ก้นหลุม นับจำนวนหลุมทั้งหมดที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ดังแสดงในรูป 2.3 จากผลการทดลองทำให้สามารถหาค่าการเจือจางมากที่สุดที่เลคตินยังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม



รูป 2.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

สารละลายที่ใช้ทดสอบคือสิ่งสกัดจากสาหร่าย *Gracilaria* sp. (fisheri type) การทดลองทำ 3 ชุด ชุดละ 24 หลุม (1A – 12B , 1C – 12D และ 1E - 12F) และชุดควบคุม ได้แก่ 1G – 12H จากการทดสอบพบว่าสิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มได้ทั้งหมด 7 หลุม

2.11 การตกตะกอนสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียโดยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลใส่ในบีกเกอร์ที่แช่ในน้ำแข็ง ค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสิ่งสกัดจนได้ความเข้มข้น 40 % sat. $(NH_4)_2SO_4$ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 22.6 กรัมต่อสิ่งสกัด 100 มล. ใช้เครื่องคนแม่เหล็กกวนให้เกลือละลาย จากนั้นตั้งไว้นิ่งๆ ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา

30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสไว้ตกตะกอนต่อไป ส่วนตะกอนที่ได้ละลายด้วย PBS แล้วนำไปไดอะไลซ์ จากนั้นเก็บแช่แข็งไว้เพื่อใช้งานต่อไป

สารละลายใสจากขั้นตอนที่หนึ่งที่หนึ่งมาค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต จนได้ความเข้มข้น 75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 22.2 กรัมต่อสารละลายใส 100 มล. คนจนละลาย แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเหมือนขั้นตอนที่หนึ่ง เก็บตะกอนได้เป็นส่วนที่สอง 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$

2.12 การทำเลคตินจากสาหร่ายทะเลให้บริสุทธิ์โดยเจลฟิลเตรชัน

ปิเปตสารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการไดอะไลซ์แล้ว 4 มล. ผ่านลงในคอลัมน์ Sephacryl S-200 ขนาด 2.5 X 100 ซม. ชะตัวอย่างด้วย 0.01 โมลาร์ PBS ที่มี 0.02% NaN_3 เก็บตัวอย่างที่ผ่านออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. ในแต่ละหลอดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม หลังจากนั้นรวมหลอดที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มเข้าด้วยกัน วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอีกครั้ง รวมทั้งวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่แยกได้โดยใช้ SDS-PAGE

2.13 การทำ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis โดยวิธีของ Laemmli

การทำ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ได้ปรับปรุงวิธีของ Laemmli (1970) เพื่อใช้งานกับชุด SE 260 Mighty small electrophoresis ความเข้มข้นของ resolving gel ประกอบด้วย 10% T (total acrylamide) และ 2.7% C (crosslinker) ความเข้มข้นของ stacking gel ประกอบด้วย 4% T และ 2.7% C สารละลายที่ใช้ในการทำ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis มีดังนี้

1. สารละลายมอโนเมอร์ที่มี 30% acrylamide 2.7% Bis
2. สารละลายบัฟเฟอร์ 1.5 โมลาร์ Tris-Cl, pH 8.8
3. สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ Tris-Cl, pH 6.8
4. สารละลาย 10% SDS
5. สารละลาย 10% ammonium persulfate (APS)
6. สารละลายใส่หน้าเจล 0.375 โมลาร์ Tris-Cl, pH 8.8, 0.1% SDS
7. สารละลาย Treatment buffer (0.125 โมลาร์ Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)

8. สารละลาย Electrophoresis buffer (0.025 M Tris, pH 8.3, 0.192 M glycine, 0.1% SDS)
9. สารละลาย Stain (0.025% coomassie blue R-250, 40% methanol, 7% acetic acid)
10. สารละลาย Destaining I (40% methanol, 7% acetic acid)
11. สารละลาย Destaining II (5% methanol, 7% acetic acid)

การเตรียม Separating gel และ stacking gel

ปิเปตสารละลายที่ต้องการเตรียม separating gel และ stacking gel ตามตาราง ดังนี้

ตาราง 2.2 การเตรียม separating และ staching gel

สารละลาย	Separating gel	Stacking gel
30% acrylamide ที่มี 2.7% Bis	3.33 มล.	0.67 มล.
1.5 โมลาร์ Tris-Cl, pH 8.8	2.50 มล.	-
0.5 โมลาร์ Tris-Cl, pH 6.8	-	1.25 มล.
10% SDS	0.10 มล.	0.05 มล.
H_2O	4.0 มล.	3.00 มล.
10% APS	50.0 มล.	25.0 ไมโครลิตร
TEMED	5.0 มล.	2.0 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10.0 มล.	5.00 มล.

การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลปริมาตร 10 มล. ทำแห้งแบบแช่แข็งได้ผงสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติม treatment buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งให้เย็น

การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

การทำอิเลคโตรโฟรีซีสใช้ชุด SE 260 etectrophoresis ประกอบแบบทำแผ่นเจลจากกระจก ที่มีความหนาของแผ่นพลาสติก 1.5 มม. รินสารละลาย separating gel ลงในช่องระหว่างกระจก ให้ได้ความสูงของเจลเป็น 6.0 ซม. เติมสารละลายใส่หน้าเจล ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ประมาณ 20 นาที เทสารละลายหน้าเจลทิ้ง แล้วเทสารละลาย stacking gel ลงบนหน้าเจลที่ได้จนเต็มช่องว่างระหว่างกระจก ปิดทับด้วยแผ่นพลาสติกที่มีฟันเพื่อให้เกิดช่องว่างไว้ใส่สารตัวอย่าง ตั้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วดึงแผ่นพลาสติกด้านข้างและพลาสติกมีฟันด้านบนออก ประกอบแบบทำแผ่นเจลเข้ากับ chamber ที่บรรจุ electrophoresis buffer ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ในช่องว่างด้านบนเจล ต่อสายไฟจากเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าตรงเข้ากับ chamber โดยให้ขั้วลบอยู่ที่ chamber บนและขั้วบวกที่ chamber ล่าง ปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านเจล 20 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีน้ำเงินในสารตัวอย่างวิ่งลงมาถึงส่วนล่างสุดของแผ่นเจล ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หยุดจ่ายกระแสไฟ แล้วนำแผ่นเจลแช่ใน staner เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างสีน้ำเงินที่ไม่ติดกับแถบโปรตีนออกด้วยสารละลาย Destaining I และ Destaining II ปริมาณน้อยๆ แต่เปลี่ยน Destaining หลายๆ ครั้ง จนกระทั่งเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน

2.14 การทดสอบความต้องการโลหะไอออนของเลคติน

สกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเลโดยใช้ TBS แล้วนำสิ่งสกัดไปไดอะไลซ์ ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ Na_2-EDTA ใน 0.01 โมลาร์ TBS pH 7.4 จากนั้นนำสิ่งสกัดในถุงไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้สิ่งสกัดสำหรับทดสอบความต้องการโลหะไอออนของเลคติน แล้วทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคติน เมื่อเติมโลหะไอออนเรียกว่าชุดทดสอบ และเมื่อไม่เติมโลหะไอออนเรียกว่าชุดควบคุม ชุดควบคุมเติม TBS ลงในหลุม ใส่สิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลหรือแพลงก์ตอนพืชที่ผ่านการไดอะซิสเจือจางสิ่งสกัดที่ต้องการทดสอบตั้งแต่ 2 เท่า จนถึง 2^n เท่า เมื่อ n คือ จำนวนหลุม แล้วเติม 2% เม็ดเลือดแดงคนหมู่ เอ บี โอ หรือเลือดไก่ ส่วนชุดทดสอบทำเหมือนชุดควบคุมแต่เติม TBS ที่มีความเข้มข้น 4.0 มิลลโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ หรือแมงกานีสคลอไรด์ จากนั้นจึงเจือจางสิ่งสกัดที่ต้องการทดสอบแล้วเติม 2% เม็ดเลือดแดง ดังนั้นความเข้มข้นของโลหะไอออนในขณะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็น 1.0 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของเลคตินในชุดทดสอบมากกว่าชุดควบคุมแสดงว่าเลคตินต้องการโลหะไอออนดังกล่าวในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

2.15 การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยนิวรามินิเดส

ปิเปต 2.5 ยูนิต/มล. นิวรามินิเดส 240 ไมโครลิตร ใส่ใน 2% เม็ดเลือดแดงหมู่เอใน TBS ปริมาตร 30 มล. คนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเหวี่ยงหนีศูนย์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างเม็ดเลือดโดยเติม TBS ปริมาตร 36 มล.

ลงในเม็ดเลือดแดงคนเบาๆ แล้วนำไปเหวี่ยงหนีศูนย์ เทส่วนใสทิ้ง ล้างเม็ดเลือดแดงดังนี้ 3 ครั้ง อ่านปริมาตรนอนก้นของเม็ดเลือดแดงที่ได้ เติม TBS จนได้ 2% เม็ดเลือดแดง โดยปริมาตรต่อปริมาตร

2.16 การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยทริปซินหรือปาเปน

ชั่งทริปซินหรือปาเปนหนัก 0.0375 กรัม ละลายใน TBS ปริมาตร 36.0 มล. ผสมกับเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้ว และมีปริมาตรของเม็ดเลือดแดงนอนก้น 1.5 มล. คนเบาๆ และอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเม็ดเลือดโดยเติม TBS ปริมาตร 30 มล. ลงในเม็ดเลือดแดง คนเบาๆ แล้วนำไปเหวี่ยงหนีศูนย์ เทส่วนใสทิ้งล้างเม็ดเลือดดังนี้ 5 ครั้ง อ่านปริมาตรนอนก้นของเม็ดเลือดแดงที่ได้ เติม TBS จนได้ 2% เม็ดเลือดแดง โดยปริมาตรต่อปริมาตร

2.17 การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยคาร์โบไฮเดรต (Hemagglutinin Inhibition Assays)

การเตรียมสารละลายน้ำตาล

สารละลายน้ำตาลที่นำมาทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่เตรียมที่ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ยกเว้นน้ำตาลที่ละลายน้ำได้น้อย เตรียมที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นของสารละลายอิ่มตัวของน้ำตาลนั้นเล็กน้อย

สารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ได้แก่

N-acetyl-D-galactosamine		L-arabinose	
D-fructose	L-fucose	D-galactosamine	D-galactose
D-glucosamine	D-glucose	D-maltose	
D-mannose	D-melibiose	methyl-α-D-mannopytanoside	
L-rhamnose	D-ribose	D-sorbitol	
Sucrose	D-xylose		

สารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ได้แก่ N-acetyl-D-glucosamine

สารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้แก่ α-lactose

สารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 0.33 โมลาร์ ได้แก่ D-cellobiose

สารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 0.21 โมลาร์ ได้แก่ D-raffinose

สารละลาย fetuin และ mucin เตรียม 0.25%

ศ แสนสข ต.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การเตรียมสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล

นำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลที่ตรวจพบเลคตินทั้งก่อนและหลังการไดอะไลซ์ วิเคราะห์ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มในแผ่นไมโครไตเตอร์ เพื่อหาค่าไตเตอร์ของเลคตินที่อยู่ในสิ่งสกัด จากนั้นจึงนำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลมาเติม TBS จนเลคตินถูกเจือจางลง คิดเป็นจำนวนเท่าเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่าไตเตอร์ แล้วทำการทดสอบโดยปิเปต TBS ลงในแผ่นไมโครไตเตอร์ ทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบตั้งแต่ 2 เท่า จนถึง 2n เท่า เมื่อ n คือจำนวนหลุม เติมสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลซึ่งเจือจางเรียบร้อยแล้วลงในทุกหลุมด้วยปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงเติม 2 % เม็ดเลือดแดงลงในทุกหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดสอบดังนี้ 2 ชุด

2.18 การทดสอบความร้อนต่อเสถียรภาพของเลคติน

แบ่งสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. นำแต่ละหลอดบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 40, 50, 60, 70, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มต่อไป

2.19 การทดสอบความเป็นกรด-ด่างต่อเสถียรภาพของเลคติน

สกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเลโดยใช้ 0.85% NaCl แล้วตวงสิ่งสกัดให้มีปริมาตร 1 มล. นำไปปรับ pH โดยใช้ 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH โดยปรับให้มี pH ดังต่อไปนี้ คือ 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 และ 11 หลังจากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่า pH ก่อนที่จะนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มต่อไป

2.20 การทดสอบความสามารถของเลคตินในการทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่ม

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเลคติน

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเลคตินเป็นจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่แข็ง ได้แก่ *E. coli* (TISTR527), *Pseudomonas aeruginosa* (TISTR 357) และ *Staphylococcus aureus* (TISTR 029)

การเตรียมจุลินทรีย์

การเลี้ยง E.coli *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* .ใช้วิธีเดียวกันคือ เลี้ยงในอาหารเหลว Trypic soy broth ปริมาตร 25 มล. เขย่าที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่ง

162778
547.75
ศ 252ก

น้ำเลี้ยงขุ่นหรือวัดการกระเจิงของแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ 0.6 – 0.8 แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จึงล้างด้วย PBS ปริมาตร 30 มล. จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม PBS ให้มีปริมาตร 25 มล. (ธนากร, 2535)

การทดสอบการเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์

ปิเปตสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ แล้วปิเปตสารแขวนลอยของจุลินทรีย์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที สังเกตการเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์ ถ้าเห็นน้ำใสๆอยู่รอบๆเซลล์ และเซลล์เกาะกันอยู่ตรงกลางแสดงว่าเกิดการเกาะกลุ่ม เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ PBS แทนสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล หลังจากนั้นตรวจสอบผลอีกครั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.21 การคำนวณความบริสุทธิ์และผลผลิตของเลคตินจากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการทำให้บริสุทธิ์โดยเจลฟิลเตรชัน

ค่าที่ใช้ในการคำนวณมีดังนี้

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

$$\text{Purification} = \frac{\text{Specific activity ของเลคตินบริสุทธิ์ (ไตเตอร์/มก.)}}{\text{Specific activity ของเลคตินที่ตกตะกอน (ไตเตอร์/มก.)}}$$

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{ปริมาณเลคตินทั้งหมดในเลคตินบริสุทธิ์(ไตเตอร์)}}{\text{ปริมาณเลคตินทั้งหมดที่ตกตะกอนได้ (ไตเตอร์)}} \times 100\ \%$$

ผลการทดลอง

3.1 เลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย

ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดสาหร่ายทะเล

ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลพิจารณาจากจำนวนหลุมที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม หรือค่าไตเตอร์ซึ่งเท่ากับ 2^n เมื่อ n คือ จำนวนหลุมที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจากการสกัดสาหร่ายทะเลสดด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ในอัตราส่วน 1 : 5 กรัม/มล. แล้วนำสิ่งสกัดทดสอบความสามารถในการทำเม็ดเลือดแดงคน หรือสัตว์เกาะกลุ่มได้ผลดังแสดงในตาราง 3.1 จากการทดสอบสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียจำนวน 6 ชนิด พบว่าสาหร่ายทั้ง 6 ชนิด สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคน หรือสัตว์เกาะกลุ่ม

จากการนำสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ส่วนใสมาทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.1 การทดสอบสิ่งสกัดที่ผ่านการต้มแล้ว พบว่า สิ่งสกัดจากสาหร่าย 3 ชนิด ยังมีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคน หรือสัตว์เกาะกลุ่มได้ แสดงว่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลไม่ได้เกิดจากเลคติน จึงไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติโดยความร้อน

สิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria bangmeiana*, *G. edulis* และ *G. lemaneiformis* เมื่อนำไปต้มแล้วยังคงทำให้เม็ดเลือดแดงคน หรือสัตว์บางชนิดเกาะกลุ่ม และบางชนิดไม่เกาะกลุ่ม ซึ่งสิ่งสกัดที่ผ่านการต้มแล้วมีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มอาจเกิดจากสารอื่นที่ไม่ใช่เลคติน เช่น พอลิฟีนอล แทนนิน ลิปิด หรือแคลเซียมซัลเฟต (ดารารัตน์, 2536) ซัลเฟตเตด พอลิแซคคาไรด์ (Kanoh และคณะ, 1992, Kakita และคณะ, 1999) ดังนั้นสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหรือสัตว์เกาะกลุ่มได้ภายหลังการต้ม จึงไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นเลคติน

สำหรับสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) ก่อนต้มทำให้เม็ดเลือดแดงไก่ กระต่าย หนู และม้าเกาะกลุ่มได้ 2^7, 2^6, 2^8, และ 2^{19} ไตเตอร์ ตามลำดับ แต่ภายหลัง

การต้มเมื่อทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่ กระต่าย และหนู ไม่พบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และเมื่อทดสอบกับเม็ดเลือดแดงม้า พบว่าการเกาะกลุ่มลดลงมากได้ 2^3 ไตเตอร์ ดังนั้นในการสำรวจเลคตินจากสาหร่ายทะเลจึงอาจสรุปได้ว่าพบเลคตินในสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด คือ *Gracilaria* sp. (fisheri type), *G. verrucosa* และ *G. saliconia*

ตารางที่ 3.1 ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย

ชื่อสาหร่ายทะเล	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)											การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงภายหลังการต้ม (ไตเตอร์)										
	A	B	O	mouse	Guinea pig	chicken	goose	Rabbit	sheep	pig	Horse	A	B	O	mouse	Guinea pig	chicken	goose	Rabbit	sheep	pig	Horse
Gracilaria verrucosa	0	0	0	-	-	2^{7}	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	0	-	-	-	-	-
Gracilaria sp. (fished type)*	0	0	0	2^{6}	-	2^{7}	-	2^{6}	-	0	2^{19}	0	0	0	0	-	0	-	2^{6}	-	0	2^{3}
*Gracilaria bangmekana**	0	0	0	2^{5}	-	0	-	2^{6}	-	2^{7}	0	0	0	0	2^{5}	-	0	-	2^{6}	-	2^{7}	0
*Gracilaria edulis**	0	0	0	2^{6}	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2^{3}	-	0	0	0	0	0	0
*Gracilaria lemaneiformis**	0	0	0	2^{7}	-	2^{2}	0	-	2^{2}	0	0	0	0	0	2^{2}	-	2	0	-	0	0	0
*Gracilaria salicornia**	0	0	0	-	-	2^{5}	-	-	2^{9}	2^{15}	2^{13}	0	0	0	-	-	0	-	-	0	0	0

หมายเหตุ สาหร่ายทะเลที่มีเครื่องหมาย * เก็บตัวอย่างในปี 2542

Gracilaria verrucosa เก็บตัวอย่างในปี 2543

-: ไม่ได้ทดสอบ

3.2 เลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*

3.2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verracosa*

จากการสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย (*Gracilaria verrucosa*) ที่สภาวะต่างกัน 7 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:5 แล้วปั่นเป็นเวลา 1 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 2 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:5 แล้วปั่นเป็นเวลา 2 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 3 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:5 แล้วปั่นเป็นเวลา 3 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 4 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:5 แล้วปั่นเป็นเวลา 1 นาที นำส่วนที่ปั่นได้คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 5 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:5 บดด้วย quartz sand กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 6 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:5 บดด้วย quartz sand นำส่วนที่บดได้ คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 7 สกัดสาหร่ายแห้งด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:5 แล้วนำไปคนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากนั้นนำสิ่งสกัดทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่ม พบว่าการสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียด้วยวิธีที่ 4 ได้เลคตินปริมาณมากที่สุด เมื่อพิจารณาจากค่าไตเตอร์ ส่วนวิธีที่ 1 และวิธีที่ 5 ได้เลคตินในปริมาณเท่ากัน ซึ่งมากกว่าวิธีที่ 2, 3, 7, 6 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 3.2 และเมื่อพิจารณาค่าไตเตอร์ของเลคตินต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด ยังคงพบว่าเลคตินจากสิ่งสกัดวิธีที่ 4 มีความบริสุทธิ์สูงที่สุด ดังนั้นการสกัดเลคตินด้วยวิธีที่ 4 จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย

ตาราง 3.2 ปริมาณเลคตินที่ได้จากการสกัด *Gracilaria verrucosa* ด้วยสภาวะต่างกัน 7 วิธี

สกัดด้วย วิธีที่	น้ำหนักสาหร่ายสด (กรัม)	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง		ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/ปริมาณโปรตีน (ไตเตอร์/มก.)
		ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.		
1	10	128	2560	0.3204	71910
2	10	64	1280	0.3708	41423
3	10	64	1280	0.3420	33684
4	10	256	5120	0.3792	162025
5	10	128	2560	0.4704	65306
6	20	32	640	0.1812	21192
7	20	32	640	0.1572	24427

3.2.2 สมบัติทางกายภาพของสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย

ปริมาตร

ในการสกัดสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียด้วย 0.85% NaCl เพื่อนำมาใช้ศึกษาเลคตินนั้น ใช้อัตราส่วนของน้ำหนักสาหร่ายต่อปริมาตร 0.85% NaCl เป็น 1 : 5 กรัม/มล. จากนั้นวัดปริมาตรสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียด้วยวิธีการต่างๆ ดังกล่าว ได้ปริมาตรของสิ่งสกัด ดังแสดงในตาราง 3.3 พบว่า อัตราส่วนของน้ำหนักสาหร่ายต่อปริมาตรสิ่งสกัดที่ได้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ อัตราส่วน 1 : 4 และการสกัดด้วย quartz sand ได้อัตราส่วน 1 : 3 แสดงว่าการสกัดด้วย quartz sand ได้น้ำที่อยู่ในสาหร่ายออกมาน้อยกว่าวิธีอื่น

ความเป็นกรด-ด่าง

ในการสกัดสาหร่ายทะเลด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1 : 5 กรัม/มล. แล้วนำสิ่งสกัดที่ได้ไปวัด pH ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.3 พบว่า สิ่งสกัดทั้งหมดมี pH อยู่ในช่วง 6.2 - 7.3 ในขณะที่ pH ของ 0.85% NaCl ที่ใช้สกัดเป็น 5.75 แสดงว่าสาหร่ายที่นำมาสกัดมีสภาพเป็นกรดอ่อนๆ ถึงสภาพเป็นกลาง

ความขุ่น

การวิเคราะห์ความขุ่นของสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย ทำได้โดยนำสิ่งสกัดที่ได้ไปวัดค่าการกระเจิงแสง ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สารใดมีความขุ่นมากจะวัดค่าการกระเจิงแสงได้สูง และสารใดมีความขุ่นน้อยจะวัดค่าการกระเจิงแสงได้ต่ำ ในการสกัดสาหร่ายทะเลด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1 : 5 กรัม/มล. ด้วยวิธีการต่างๆ ดังกล่าว พบว่า สิ่งสกัดด้วยวิธีที่ 4 มีความขุ่นมากที่สุด คือ 0.832 ในขณะที่สิ่งสกัดด้วยวิธีที่ 7 มีความขุ่นน้อยที่สุด คือ 0.325 โดยส่วนใหญ่สิ่งสกัดมีค่าการกระเจิงแสงอยู่ในช่วง 0.6 - 0.8

ตาราง 3.3 สมบัติทางกายภาพ ปริมาณโปรตีน และปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย

สกัดด้วยวิธีที่	น้ำหนักสาหร่ายสด (กรัม)	ปริมาตรสิ่งสกัด (มล.)	น.น. สาหร่าย : ปริมาตรสิ่งที่สกัดได้	pH ของสิ่งสกัด	การกระเจิงแสงของสิ่งสกัด	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)
1	10	42	1 : 4.2	6.22	0.686	0.3204
2	10	43	1 : 4.3	6.87	0.758	0.3708
3	10	40	1 : 4.0	7.35	0.619	0.3420
4	10	39	1 : 3.9	6.45	0.832	0.3792
5	10	31	1 : 3.1	7.18	0.736	0.4704
6	10	68	1 : 3.4	6.28	0.440	0.1812
7	20	78	1 : 3.9	6.90	0.325	0.1572

ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย

จากการสกัดสาหร่ายทะเลด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1 : 5 กรัม/มล. แล้วนำสิ่งสกัดมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีจับสี Coomassie ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.3 พบว่าสิ่งที่สกัดโดยวิธีต่างๆ มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.1572 - 0.4704 มก./มล.

3.2.3 ปริมาณเลคตินจากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเล

จากการนำสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียมาทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเม็ดเลือดแดงไก่ เกาะกลุ่ม พบว่าสิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกิดการเกาะกลุ่มเท่านั้น จากนั้นนำสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน แล้วนำส่วนใสทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม พบว่า สิ่งสกัดไม่มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่ เอ บี โอ และเม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่ม ดังแสดงในตาราง 3.4 แสดงว่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียเกิดจากเลคติน ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน เมื่อทำลายสภาพธรรมชาติโดยความร้อนสิ่งสกัดจึงไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้

ตาราง 3.4 ความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่ม

สภาวะ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)							
	สภาพปกติ				ต้มสิ่งสกัด			
	A	B	O	ไก่	A	B	O	ไก่
สาหร่ายสด ปั่น 1 นาที	0	0	0	128	0	0	0	0

3.2.4 เลคตินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน

เมื่อทำการปรับปรุงเม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเม็ดเลือดแดงไก่ด้วยเอนไซม์ทริปซิน หรือปาเปนแล้วทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.5 พบว่าการปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทำให้มีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเพิ่มมากขึ้น คือ ในสภาพปกติเม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มเท่ากับ 128 ไตเตอร์ แต่เมื่อปรับปรุงเม็ดเลือดแดงไก่ด้วยทริปซิน หรือปาเปน พบว่า สิ่งสกัดทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ 8192 และ 1024 ไตเตอร์ตามลำดับ หรือทำให้การเกาะกลุ่มเพิ่มขึ้น 64 และ 8 เท่า ในขณะที่การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี และ

โอด้วยปาเปน พบว่า สิ่งสกัดทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ และโอ ในสภาพที่ปรับปรุงเกาะกลุ่มได้ 128 และ 64 ไตเตอร์ ส่วนเม็ดเลือดแดงคนที่ปรับปรุงด้วยทริปซินยังคงไม่สามารถเกาะกลุ่มได้

ตาราง 3.5 การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเมื่อปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินและปาเปน

สภาวะ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไต เตอร์)											
	สภาพปกติ				ปรับปรุงด้วยทริปซิน				ปรับปรุงด้วยปาเปน			
	A	B	O	ไก่	A	B	O	ไก่	A	B	O	ไก่
สาหร่ายสด 0 ปั่น 1 นาที	0	0	0	128	0	0	0	8192	128	0	64	1024

3.2.5 สมบัติบางประการของเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย ความต้องการโลหะไอออนในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

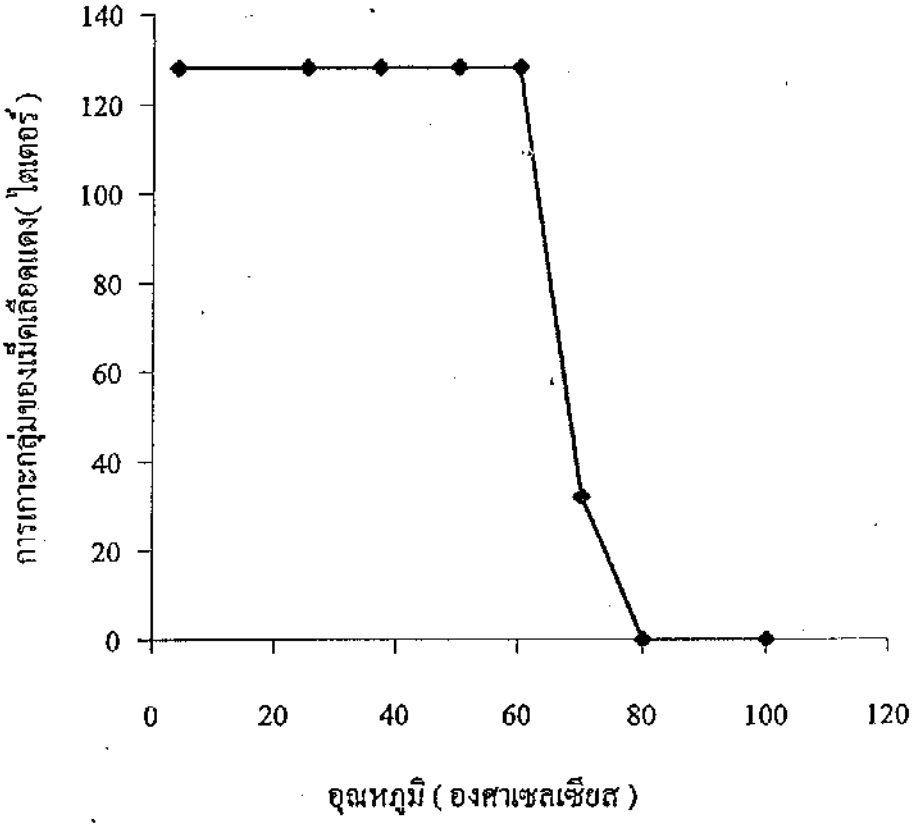
จากการทดสอบความต้องการโลหะไอออนของสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย โดยเติมโลหะไอออน 3 ชนิด คือ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ลงในสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียที่ผ่านการไดอะไลซ์แล้วทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคติน เมื่อเติมโลหะไอออนเรียกว่าชุดทดสอบ และเมื่อไม่เติมโลหะไอออนเรียกว่า ชุดควบคุม พบว่า การเติมโลหะไอออนไม่ได้เพิ่มความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงไก่การเกาะกลุ่ม ดังได้แสดงผลในตาราง 3.6 แสดงว่าเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียไม่ต้องการโลหะไอออนในการทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่ม

ตาราง 3.6 ผลการเติม Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ใน TBS ลงในสิ่งสกัดสาหร่ายทะเล และตรวจสอบด้วยความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่ม

สภาวะที่ใช้ทดสอบ	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไต เตอร์)			
	สิ่งสกัดที่ผ่านการไดอะไลต์			
	ชุดควบคุม	$CaCl_2$ ใน TBS	$MnCl_2$ ใน TBS	$MgCl_2$ ใน TBS
สาหร่ายสด 10 กรัม ใน TBS (0.01 M) 50 มล. ปั่น 1 นาที	64	128	64	64

เสถียรภาพต่อความร้อน

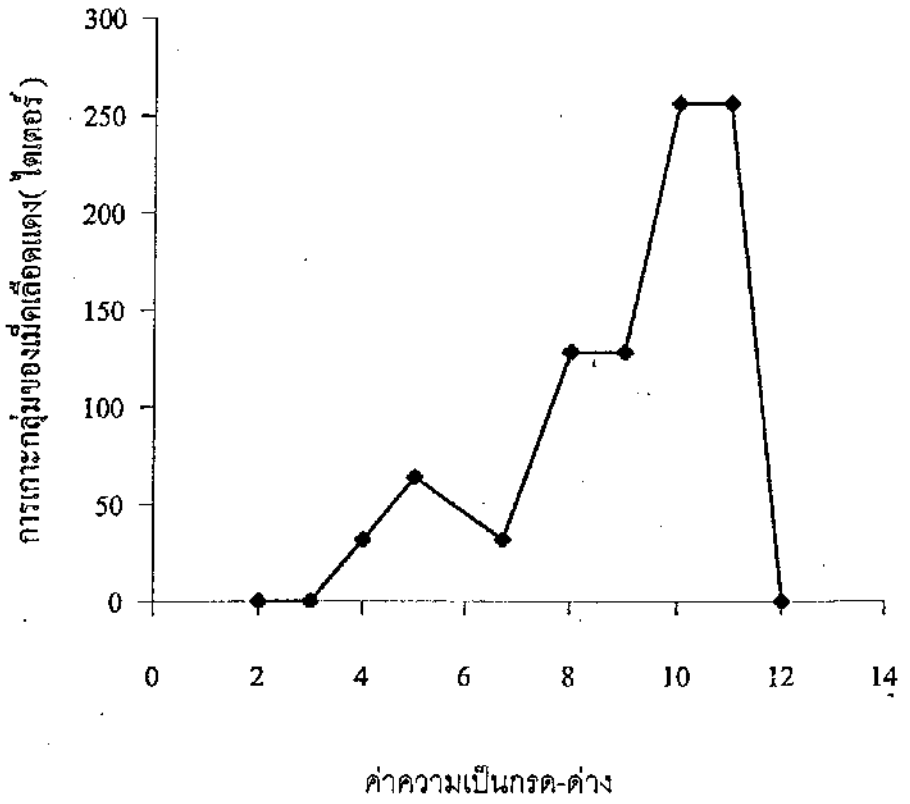
เมื่อนำสิ่งสกัดที่มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 37, 50, 60, 70, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เก็บสิ่งสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้กราฟดังแสดงในรูป 3.1 พบว่าสิ่งสกัดมีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มคงที่ตั้งแต่อุณหภูมิ 4 - 60 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เม็ดเลือดแดงไก่มีการเกาะกลุ่มน้อยลง และอุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส ไม่ปรากฏการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเลย แสดงว่าเลคตินเสียสภาพธรรมชาติอย่างสมบูรณ์เมื่อให้ความร้อนตั้งแต่อุณภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที



รูป 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และการเกาะกลุ่มของเม็ดแดง (ไตเตอร์) เมื่อใช้สิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*

เสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่าง

เมื่อนำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิราเรียไปปรับ pH โดยใช้ 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH โดยปรับให้มี pH ต่างๆ คือ 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 และ 11 หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่ม ได้ผลการทดลองแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง และการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง รูป 3.2 พบว่าสิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มได้ในช่วงค่า pH ระหว่าง 4 - 11 ที่ pH 10 และ pH 11 สิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มได้มากที่สุดถึง 256 ไตเตอร์ แสดงว่าเมื่อสิ่งสกัดอยู่ในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นเบสจะทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้มากกว่าสิ่งสกัดที่อยู่ในสภาวะเป็นกรด



รูป 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง และการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์) เมื่อใช้สิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*

3.2.6 **ความจำเพาะต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรต**

จากการทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยคาร์โบไฮเดรต กับสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียทั้งก่อน และหลังการไดอะไลซ์ โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มในแผ่นไมโครไตเตอร์ เพื่อหาค่าไตเตอร์ของเลคตินที่อยู่ในสิ่งสกัดจากนั้นจึงนำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียมาเติม PBS จนเลคตินถูกเจือจาง คิดเป็นจำนวนเท่าเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่าไตเตอร์ แล้วทำการทดสอบโดยปิเปต PBS ลงในแผ่นไมโครไตเตอร์ ทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบตั้งแต่ 2 เท่า ถึง 2^n เท่า เมื่อ n คือจำนวนหลุม เติมสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียซึ่งเจือจางเรียบร้อยแล้วลงในทุกหลุมด้วยปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติม 4% เม็ดเลือดแดงลงในทุกหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดสอบดังนี้ 2 ชุด การทดสอบกระทำกับสิ่งสกัดได้ทั้งก่อน และหลังการไดอะไลซ์ พบว่า มิวซินสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่ได้ 3 หลุมที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.0625 % ดังแสดงในตาราง 3.7

ตาราง 3.7 ความสามารถของคาร์โบไฮเดรตในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม (หลุม)	
	ก่อนไดอะไลซ์	หลังไดอะไลซ์
0.21 M D-raffinose.5H_2O	0	0
0.33 M D-cellobiose	0	0
0.5 M α-lactose.H_2O	0	0
0.8 M N-acetyl -D-glucosamine	0	0
1.2 M Sucrose	0	0
1.2 M L-fucose	0	0
1.2 M D(+)-glucose	0	0
1.2 M D(+)-mannose	0	0
1.2 M D(+)-galactose	0	0
1.2 M D(+)-glucosamine	0	0
1.2 M D(+)-galactosamine	0	0
1.2 M L(+)-arabinose	0	0
1.2 M L(+)-rhamnose.H_2O	0	0
1.2 M D(-)-fructose	0	0
1.2 M D(-)-ribose	0	0
1.2 M D - maltose.H_2O	0	0
1.2 M D - xylose	0	0
1.2 M D - sorbital	0	0
1.2 M α - D - melibiose.H_2O	0	0
1.2 M Metyl -D-mannopyranoside	0	0
1.2 M N - acetyl -D-glucosamine	0	0
0.25% mucin	-	3

หมายเหตุ - คือ ไม่ได้ทดสอบ

3.2.7 ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต

การทำเลคตินจากสิ่งสกัดหยาบสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 4 ชุด แล้วนำแต่ละส่วนที่ตกตะกอนได้ไปวิเคราะห์ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม และปริมาณโปรตีน

สำหรับการตกตะกอนชุดที่ 1 โดย 0-40 และ 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ พบว่าเลคตินส่วนใหญ่ตกตะกอนที่ 40-75% ดังแสดงในตาราง 3.8 ดังนั้นส่วนของเลคตินที่จะนำไปใช้จึงเป็น 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งมีความบริสุทธิ์เป็น 1.01 เท่า และมีผลผลิต 38%

ตาราง 3.8 ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน (ชุดที่ 1)

Fraction	Volume	Hemagglutination Activity		Protein	Specific Activity	Total Activity	Yield	Purification
		(titer)	(titer/ml)	(mg/ml)	(titer/mg)	(titer)	(%)	
Crude extract	400	64	1280	0.1518	8432	512000	100	1
0-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$	33	64	1280	0.3273	3911	42240	8	0.46
40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$	19	512	10240	1.1976	8550	194560	38	1.01

การตกตะกอนชุดที่ 2, 3 และ 4 โดยตกตะกอนที่ 0–60, 0-70 และ 0-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.9 พบว่าเลคตินตกตะกอนที่ 0-70 และ 0-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ได้มากที่สุด มีค่า Total activity 317440 ไตเตอร์ และผลผลิต 62% เท่ากัน นอกจากนี้ยังมีค่าความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกันคือ 1.2 และ 1.6

ตาราง 3.9 ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน (ชุดที่ 2, 3 และ 4)

ชุดที่	Fraction	Volume	Hemagglutination Activity		Protein	Specific Activity	Total Activity	Yield	Purification
		(ml)	(titer)	(titer/ml)	(mg/ml)	(titer/mg)	(titer)	(%)	
	Crude extract	400	64	1280	0.1518	8432	512000	100	1
2	0-60% sat.	31	256	5120	0.4134	12385	158720	31	1.5
3	0-70% sat.	31	512	10240	0.9675	10584	317440	62	1.2
4	0-75% sat.	31	512	10240	0.7551	13561	317440	62	1.6

3.2.8 เลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค SDS-PAGE

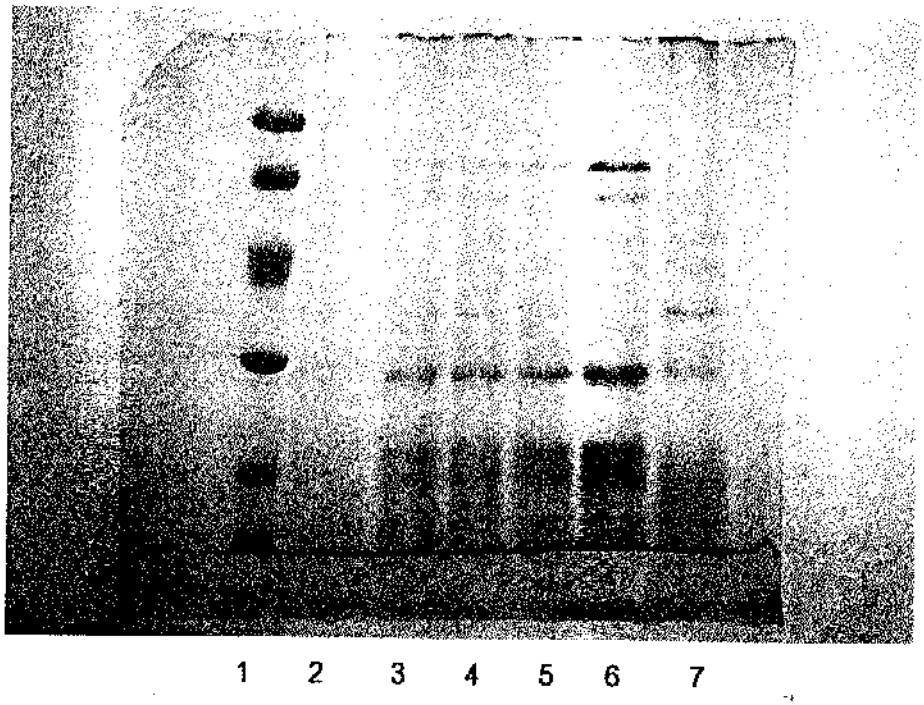
นำสิ่งสกัดจากสาหร่ายที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟตแล้วผ่านการไดอะไลซ์ที่ช่วงอิ่มตัวของแอมโมเนียซัลเฟต คือ 0-40%, 40-75%, 0-60%, 0-70%, 0-75% และสิ่งสกัดหยาบไปทำ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis โดยวิธีของ Laemmli ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.10 และรูป 3.3 พบว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียซัลเฟตที่ 0-40%, 40-75%, 0-60%, 0-70%, 0-75% และสิ่งสกัดหยาบ ได้จำนวนแถบของโปรตีน 3, 4, 6, 6, 7 และ 5 แถบตามลำดับ ซึ่งจากการทำ SDS-PAGE พบว่า โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟตยังไม่บริสุทธิ์

ตาราง 3.10 จำนวนแถบของโปรตีนจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟต เมื่อใช้เทคนิค SDS-PAGE

แอมโมเนียซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตรที่ใช้ในการฟรีซดาย (ไมโครลิตร)	ปริมาตรที่ใส่ลงเจล (ไมโครลิตร)	ปริมาณโปรตีน	จำนวนแถบ
Crude	500	40.0	3.5	3
0 - 40	500	20.0	3.8	4
40 - 75	500	10.2	4.0	6
0 - 60	500	15.8	4.0	6
0 - 70	500	7.7	4.0	7
0 - 75	500	10.6	4.0	5

3.2.9 ความสามารถของเลคตินจากสาหร่ายกราซิลาเรียในการทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่ม

การศึกษาความสามารถในการตกตะกอนจุลินทรีย์ของเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย ทำได้โดยหยดโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟต หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์แล้วสเมียร์เชื้อบนแผ่นสไลด์ วางแผ่นสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเซลล์จุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเป็นแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ผลการทดสอบพบว่าเลคตินจากสาหร่ายทะเลสามารถตกตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบทั้ง 2 ชนิด เมื่อดูด้วยตาเปล่า และจากกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในรูป 3.4



รูป 3.3 SDS-PAGE **ของสิ่งสกัดจากกราซิลาเรียที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียซัลเฟต และผ่านการไดอะไลซ์**

แถบ 1 โปรตีนมาตราฐาน Phosphorylase b (Mr 94,000 Da), Albumin (Mr 67,000 Da), Ovalbumin (Mr 43,000 Da), Carbonic anhydrase (Mr 30,000 Da), Trypsin inhibitor (Mr 20,100 Da), α-lactabumin(Mr 14,400 Da) load 5 ไมโครลิตร

แถบ 2 สิ่งสกัดหยาบ

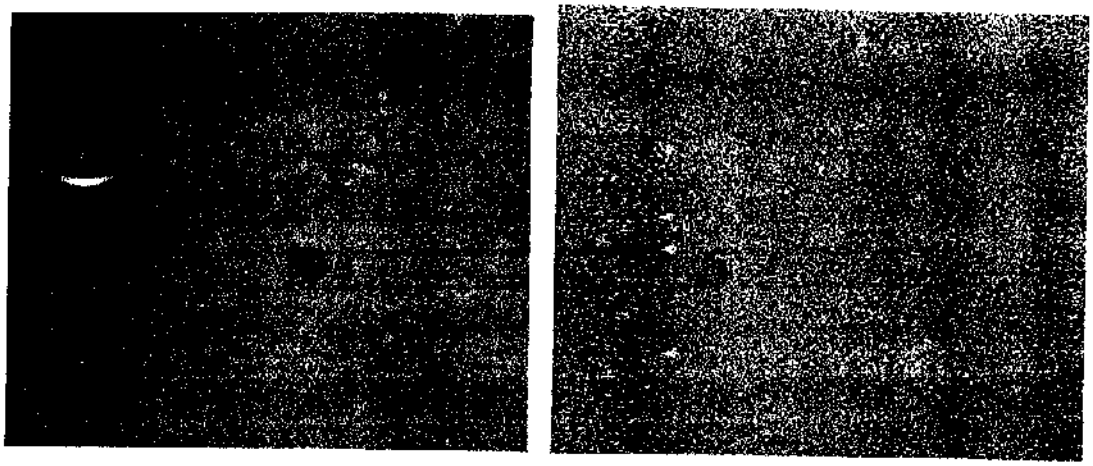
แถบ 3 ตัวอย่างที่ 0 - 75% sat. $(NH_4)_2SO_4$

แถบ 4 ตัวอย่างที่ 0 - 70% sat. $(NH_4)_2SO_4$

แถบ 5 ตัวอย่างที่ 0 - 60% sat. $(NH_4)_2SO_4$

แถบ 6 ตัวอย่างที่ 40 - 75% sat. $(NH_4)_2SO_4$

แถบ 7 ตัวอย่างที่ 0 - 40% sat. $(NH_4)_2SO_4$



ก. ชุดควบคุม ข. เมื่อมีสิ่งสกัด

รูป 3.4 ความสามารถของเลคตินในการทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์เกาะกลุ่ม

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้ทดสอบความสามารถในการจับจุลินทรีย์ของเลคตินจากสิ่งสกัดหยาบ และที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟต และไดอะไลซ์ โดยทำการเจือจางสิ่งสกัดในแผ่นไมโครไตเตอร์แบบอนุกรม แล้วพิจารณาความเข้มข้นของเลคตินที่น้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์เกาะกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ คือ 10^8 เซลล์/มล. ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.11

ตาราง 3.11 การเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์จากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa*

สภาวะ	การเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์ (หลุม)		การเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์ (หลุม)	
	E. coli		*Staphylococcus aureus*	
	สภาพปกติ	ให้ความร้อน	สภาพปกติ	ให้ความร้อน
Crude	0	0	4	2
0 - 40%	2	0	4	0
40 - 75%	2	0	2	0

เลคตินจากสาหร่ายทะเลสามารถทำให้เซลล์ *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* เกาะกลุ่มได้ 2 และ 8 ไตเตอร์ เมื่อใช้เลคตินจากสาหร่ายทะเลที่ตกตะกอนที่ 0 - 40% และจากการนำเลคตินไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาทดสอบการเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์ พบว่าสิ่งสกัดดังกล่าวไม่สามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มได้ แสดงว่าการเกาะกลุ่มของเซลล์เกิดจากเลคติน

3.3 เลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type)

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ และคณะ (2540) ได้ตรวจหาเลคตินในสิ่งสกัดโปรตีนจากสาหร่ายทะเลจำนวน 14 ชนิด โดยวิธีทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหรือเม็ดเลือดแดงสัตว์เกาะกลุ่ม พบว่าสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล 13 ชนิด สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ $2^2 - 2^{19}$ ไตเตอร์ และเมื่อนำสิ่งสกัดดังกล่าวต้มที่อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลา 20 นาที พบว่าสิ่งสกัดยังคงทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ ยกเว้นสิ่งสกัดจากสาหร่ายกราซิลาเรีย (*Gracilaria* sp. (fisheri type)) ดังนั้นจากการสำรวจเลคตินจากสาหร่ายทะเลจึงพบเลคตินในสาหร่ายกราซิลาเรียเพียงชนิดเดียวซึ่งสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่ กระต่าย หนู และม้าเกาะกลุ่มได้ 2^7, 2^6, 2^8 และ 2^{19} ไตเตอร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ศึกษาสมบัติบางประการของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type)ไว้ดังนี้

- สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล พบว่าการสกัดเลคตินด้วยน้ำกลั่น acetate buffer salinepH 7.4 และ Tris-HCl buffer saline pH 7.4 สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มได้ค่าไตเตอร์ใกล้เคียงกัน คือ 256 และ 128 ไตเตอร์

- เสถียรภาพของเลคติน เลคตินที่สกัดด้วยน้ำกลั่น, acetate buffer pH 7.4, phosphate buffer pH 7.4 และ 8.0 รวมทั้ง Tris-HCl buffer pH 7.4 สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้ 12 วัน โดยที่ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มคงเดิม และพบว่าสิ่งสกัดจาก*Gracilaria* sp. (fisheri type) สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 และ –85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 สัปดาห์ โดยที่ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มไม่ลดลง

- ผลของโลหะไอออนต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคติน พบว่าการเกาะกลุ่มนี้ไม่ต้องการแคลเซียม แมกนีเซียม หรือแมงกานีสไอออน

- เลคตินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามินิเดส ทริปซิน หรือปาเปน พบว่าสิ่งสกัดไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอทั้งในสภาพปกติและที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ดังกล่าวเกาะกลุ่ม

- การทดสอบการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยน้ำตาล จากการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะ พบว่าเลคตินจากกราซิลาเรียถูกยับยั้งด้วยกลูโคซามีน และกาแลคโตซามีน

ดังนั้นจะได้มีการทำเลคตินจาก *Gracilaria* sp. (fisheri type) ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นและศึกษาสมบัติอื่น เช่น จำนวนชนิดของเลคตินที่มีในสิ่งสกัด น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการทำให้เซลล์จุลินทรีย์ เซลล์เม็ดเลือดขาว หรือเซลล์แพลงก์ตอนพืชเกาะกลุ่ม เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของเลคตินในสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียชนิดอื่นที่ได้มีการศึกษาแล้ว

3.3.1 การสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type)

การสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย *Gracilaria* sp. (fisheri type) ที่สภาวะต่างกัน 3 วิธี มีดังนี้

วิธีที่ 1 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1:5 แล้วปั่นเป็นเวลา 1 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 2 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.1 ในอัตราส่วน 1:5 แล้วปั่นเป็นเวลา 1 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 3 สกัดสาหร่ายสดด้วย 0.01 M Tris buffer pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:5 แล้วปั่นเป็นเวลา 1 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากการนำสิ่งสกัดทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่ พบว่าการสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเลทั้ง 3 วิธี สิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่ม $2^5 - 2^6$ ไตเตอร์

3.3.2 การทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเมื่อใช้แผ่นไมโครไตเตอร์ลักษณะต่างกัน

เมื่อนำสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่ในแผ่นไมโครไตเตอร์ที่มีลักษณะก้นหลุมเป็นรูปตัววี ตัวยู และก้นแบน ให้ผลการทดสอบมีค่าไตเตอร์เท่ากัน คือ 128 ไตเตอร์ ดังนั้นในการทดสอบจะเลือกใช้แผ่นไมโครไตเตอร์แบบใดก็ได้ แต่ที่นิยมใช้คือรูปตัววีและรูปตัวยู

3.3.3 ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต

การทำเลคตินจากสิ่งสกัดหยาบสาหร่ายทะเลให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วนำแต่ละส่วนที่ตกตะกอนได้ไปวิเคราะห์ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มและปริมาณโปรตีน ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.12

ตาราง 3.12 ปริมาณเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) ที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน

ชุดที่	Fraction	Volume (ml)	Hemagglutination Activity (titer)	Hemagglutination Activity (titer/ml)	Protein (mg/ml)	Specific Activity (titer/mg)	Total Activity (titer)	Yield (%)	Purification
1	Crude extract	300	64	1280	0.20	6400	384000	100	1
2	0-40% sat.AS	25	256	5120	1.76	2909	128000	33.3	0.45
3	40-75% sat.AS	11	512	10240	1.66	6169	112640	29.3	0.96
4	supernatant	373	8	160	0.044	3636	59680	15.5	0.57

เลคตินตกตะกอนที่ 0-40 และ 40-75% sat.$(NH_4)_2SO_4$ ได้เลคตินมากมีค่า Total activity 128,000 และ 112,640 ไตเตอร์ แต่ตะกอนที่ได้จาก 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ มีค่า specific activity และ purification มากกว่า 2 เท่า

เนื่องจากเลคตินตกตะกอนได้มากที่ความเข้มข้นของเกลือ 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ดังนั้นจึงได้ทดลองตกตะกอนโปรตีนที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-60 และ 0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.13 จากค่า specific activity แสดงว่าเลคตินตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$ มากกว่า 0-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$ เมื่อพิจารณาการตกตะกอนเลคตินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน สรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ได้ค่า specific activity มากที่สุด รองลงไปคือการตกตะกอนที่ 0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$ แต่ที่ 0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ได้ผลิตผลมากกว่า 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ 2.5 เท่า ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปจึงเลือกตกตะกอนที่ 0-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$

ตาราง 3.13 ปริมาณเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) ที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน

Fraction	Volume (ml)	Hemagglutination Activity (titer)	Hemagglutination Activity (titer/ml)	Protein (mg/ml)	Specific Activity (titer/mg)	Total Activity (titer)	Yield (%)	Purification
Crude extract	150	64	1280	0.20	6400	192000	100	1
0-60%sat. $(NH_4)_2SO_4$	16	256	5120	1.94	2639	81920	43	0.41
Supernatant	175	16	320	0.198	1616	56000	29	0.25
Crude extract	125	64	1280	0.20	6400	160000	100	1
0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$	12	512	10240	2.49	4112	122880	77	0.64
Supernatant	150	8	160	0.038	4210	24000	15	0.66

3.3.4 การไดอะไลซ์เลคตินที่ตกตะกอนด้วยเกลือ

จากการนำสิ่งสกัดที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ผ่านการไดอะไลซ์ แล้วทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง แสดงในตาราง 3.14 พบว่าการไดอะไลซ์สารละลายเลคตินที่ผ่านการตกตะกอนแล้วยังคงสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ใกล้เคียงกับที่ไม่ได้ไดอะไลซ์

ตาราง 3.14 การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของเลคตินที่ผ่านการไดอะไลซ์และไม่ได้ไดอะไลซ์

ส่วนของตะกอน	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง(ไตเตอร์)	
	ไดอะไลซ์	ไม่ได้ไดอะไลซ์
Crude	64	64
0-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$	128	256
40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$	256	512
0-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$	256	256
0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$	256	256

3.4 เลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย ซาลิโคเนีย (*Gracilaria saliconia*)

3.4.1 สมบัติบางประการของเลคตินจากสาหร่ายทะเลกราซิลา ซาลิโคเนีย

สาหร่ายทะเลกราซิลาเรียซาลิโคเนียที่ใช้ในการตรวจสอบหาเลคตินครั้งนี้เก็บจากศูนย์พัฒนาการประมงทะเลภาคตะวันออก จังหวัดระยอง เป็นสาหร่ายทะเลสีแดง เส้นยาวหนา อวบน้ำ เลคตินจากสาหร่ายทะเล *G. saliconia* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่และห่านเกาะกลุ่มได้ 64 ไตเตอร์เท่ากัน แต่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ เอบี เม็ดเลือดแดงหนูแรท หนูเมาส์ หนูตะเภาเกาะกลุ่ม และเมื่อนำสิ่งสกัดไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าสิ่งสกัดไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ แสดงว่าสิ่งสกัดเป็นโปรตีนจึงถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน

นอกจากนี้ได้ศึกษาสมบัติบางประการของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia* ไว้ดังนี้

- สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเล พบว่าการสกัดเลคตินด้วยน้ำกลั่น, 0.85% NaCl, 0.01 M Phosphate buffer saline pH 7.1 และ Tris-HCl buffer saline pH 7.4 ปั่นเป็นเวลา 1 นาที สิ่งสกัดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มได้ค่าไตเตอร์ใกล้เคียงกัน คือ 64 ไตเตอร์

- เสถียรภาพของเลคติน เลคตินที่สกัดด้วยน้ำกลั่น, phosphate buffer saline pH 7.1, 0.85% NaCl รวมทั้ง Tris-HCl buffer saline pH 7.4 สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้ 2 อาทิตย์ โดยที่ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มคงเดิม

- ผลของโลหะไอออนต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคติน พบว่าการเกาะกลุ่มนี้ไม่ต้องการแคลเซียม แมกนีเซียม หรือแมงกานีสไอออน

- การทดสอบการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยน้ำตาล จากการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะ พบว่าเลคตินจากกราซิลาเรียถูกยับยั้งด้วยกลูโคซามีน มิวซิน และเฟตูอิน แสดงในตาราง 3.15

ตาราง 3.15 ความสามารถของคาร์โบไฮเดรตในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงไก่

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม (หลุม)	
	ก่อนไดอะไลซ์	หลังไดอะไลซ์
0.21 M D-raffinose.5H_2O	0	0
0.33 M D-cellobiose	0	0
0.5 M α-lactose.H_2O	0	0
0.8 M N-acetyl -D-glucosamine	0	0
1.2 M Sucrose	0	0
1.2 M L-fucose	0	0
1.2 M D(+)-glucose	0	0
1.2 M D(+)-mannose	0	0
1.2 M D(+)-galactose	0	0
1.2 M D(+)-glucosamine	3	3
1.2 M D(+)-galactosamine	0	0
1.2 M L(+)-arabinose	0	0
1.2 M L(+)-rhamnose.H_2O	0	0
1.2 M D(-)-fructose	0	0
1.2 M D(-)-ribose	0	0
1.2 M D - maltose.H_2O	0	0
1.2 M D - xylose	0	0
1.2 M D - sorbital	0	0
1.2 M α - D - melibiose.H_2O	0	0
1.2 M Metyl -D-mannopyranoside	0	0
1.2 M N - acetyl -D-glucosamine	0	0
0.25% mucin	1	4
0.25% fetuin	3	5
การเจือจางตัวอย่างแล้วทดสอบกับเม็ดเลือดแดง	32 ไตเตอร์ เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม	16 ไตเตอร์ เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

3.4.2 ปริมาณเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต

การทำเลคตินจากสิ่งสกัดหยาบสาหร่ายทะเลกราซิลาเรีย ซาลิโคเนียให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นต่างกันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ชุด แล้วนำแต่ละส่วนที่ตกตะกอนได้ไปวิเคราะห์ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม และปริมาณโปรตีน

สำหรับการตกตะกอนชุดที่ 1 โดย 0-40 และ 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ พบว่าเลคตินส่วนใหญ่ตกตะกอนที่ 40-75% ดังแสดงในตาราง 3.16 เลคตินตกตะกอนที่ 0-40 และ 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ได้เลคตินมากมีค่า Total activity 256,000 และ 532,480 ไตเตอร์ และตะกอนที่ได้จาก 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$,มีค่า specific activity มากกว่า 1.3 เท่า แต่มีค่า purificationใกล้เคียงกันและได้ค่าไม่สูงนัก

ตาราง 3.16 ปริมาณเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* saliconia ที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน

Fraction	Volume (ml)	Hemagglutination Activity (titer)	Hemagglutination Activity (titer/ml)	Protein (mg/ml)	Specific Activity (titer/mg)	Total Activity (titer)	Yield (%)	Purification
Crude extract	400	1024	20480	0.027	755719	8192000	100	1
0-40% sat.AS	25	512	10240	0.112	91674	256000	3.1	0.12
40-75% sat.AS	13	2048	40960	0.336	121868	532480	6.5	0.16
supernatant	487	64	1280	0.028	45878	623360	7.6	0.06

เนื่องจากเลคตินตกตะกอนได้มากที่ความเข้มข้นของเกลือ 40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ดังนั้นจึงได้ทดลองตกตะกอนโปรตีนที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-60 และ 0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.17 จากค่า specific activity แสดงว่าเลคตินตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$ มากกว่า 0-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$ เมื่อพิจารณาการตกตะกอนเลคตินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน สรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$ ได้ค่า specific activity มากที่สุด รองลงไปคือการตกตะกอนที่ 0-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$ จากผลิตผลที่ได้พบว่าที่ 0-70% ให้ผลผลิตมากที่สุด 28 % ซึ่งมากกว่า0-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$ 2 เท่า ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปจึงเลือกตกตะกอนที่ 0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$

ตาราง 3.17 ปริมาณเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria salicornia* ที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกัน

Fraction	Volume (ml)	Hemagglutination Activity (titer)	Hemagglutination Activity (titer/ml)	Protein (mg/ml)	Specific Activity (titer/mg)	Total Activity (titer)	Yield (%)	Purification
Crude extract	300	1024	20480	0.027	755719	6144000	100	1
0-60%sat. $(NH_4)_2SO_4$	13	4096	81920	0.567	144531	1064960	17	0.19
Supernatant	353	128	2560	0.028	93090	903680	15	0.12
Crude extract	343	1024	20480	0.027	755719	7024640	100	1
0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$	12	8192	163840	0.868	188521	1966080	28	0.28
Supernatant	412	32	640	0.019	34409	263680	4	0.03

3.4.3 การไดอะไลซ์เลคตินที่ตกตะกอนด้วยเกลือ

จากการนำสิ่งสกัดที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ผ่านการไดอะไลซ์ แล้วทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง แสดงในตาราง 3.14 พบว่าการไดอะไลซ์สารละลายเลคตินที่ผ่านการตกตะกอนแล้วทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ลดลงในทุกส่วนของตะกอน

ตาราง 3.18 การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของเลคตินที่ผ่านการไดอะไลซ์และไม่ได้ไดอะไลซ์

ส่วนของตะกอน	การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ไตเตอร์)	
	ไดอะไลซ์	ไม่ได้ไดอะไลซ์
Crude	64	512
0-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$	64	512
40-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$	512	2048
0-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$	1024	4096
0-70% sat. $(NH_4)_2SO_4$	2048	4096

3.5 การเก็บเลคตินที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตไว้ใช้ในงานวิจัย

เนื่องจากสาหร่ายทะเลมีให้เก็บมาใช้ในงานวิจัยช่วงฤดูหนาวเท่านั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีในการเก็บสิ่งสกัดไว้ให้นานพอที่จะทำวิจัย ดังนั้นข้อมูลความสามารถของเลคตินที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 ^{o}ซ เป็นเวลาประมาณ 1 ปี แล้วนำมาทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ผลดังแสดงในตาราง 3.19 เลคตินที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วส่วนใหญ่ยังคงมีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ค่าไตเตอร์ใกล้เคียงกับเมื่อวิเคราะห์ในครั้งแรก มีเพียงเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) เท่านั้นที่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ อาจเนื่องมาจากความสดของสาหร่ายที่เก็บมาวิเคราะห์ไม่ค่อยสมบูรณ์

ตาราง 3.19 ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคตินที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วเก็บไว้ 1 ปี

ตัวอย่าง	ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกล	
	วิเคราะห์ ปี 2544	วิเคราะห์ ปี 2
1. *Gracilaria* sp. (fisheri type) 0-40%AS(29.3.44)	8	0
2. *Gracilaria* sp. (fisheri type) 40-75%AS(29.3.44)	9	8
3. *Gracilaria* sp. (fisheri type) 0-60%AS(29.3.44)	8	0
4. *Gracilaria* sp. (fisheri type) 0-70%AS(29.3.44)	9	0
5. *Gracilaria verrucosa* 0-40%AS(28.10.43) dialyse	6	6
6. *Gracilaria verrucosa* 40-75%AS(28.10.43) dialyse	9	10
7. *Gracilaria verrucosa* 0-60%AS(28.10.43) dialyse	8	8
8. *Gracilaria verrucosa* 0-70%AS(28.10.43) dialyse	9	9
9. *Gracilaria verrucosa* 0-75%AS(28.10.43) dialyse	9	9
10. *Gracilaria saliconia* 0-40%AS(27.3.44)	9	6
11. *Gracilaria saliconia* 40-75%AS(28.3.44)	11	12
12. *Gracilaria saliconia* 0-60%AS(29.3.44)	12	12
13. *Gracilaria saliconia* 0-70%AS(29.3.44)	13	12
14. *Gracilaria saliconia* 0-40%AS(29.3.44) dialysis	6	8
15. *Gracilaria saliconia* 40-75%AS(29.3.44) dialysis	9	12
16. *Gracilaria saliconia* 0-60%AS(3.4.44) dialysis	10	12
17. *Gracilaria saliconia* 0-70%AS(3.4.44) dialysis	11	12

3.6 การทำเลคตินให้บริสุทธิ์โดยใช้เจลฟิลเตรชัน

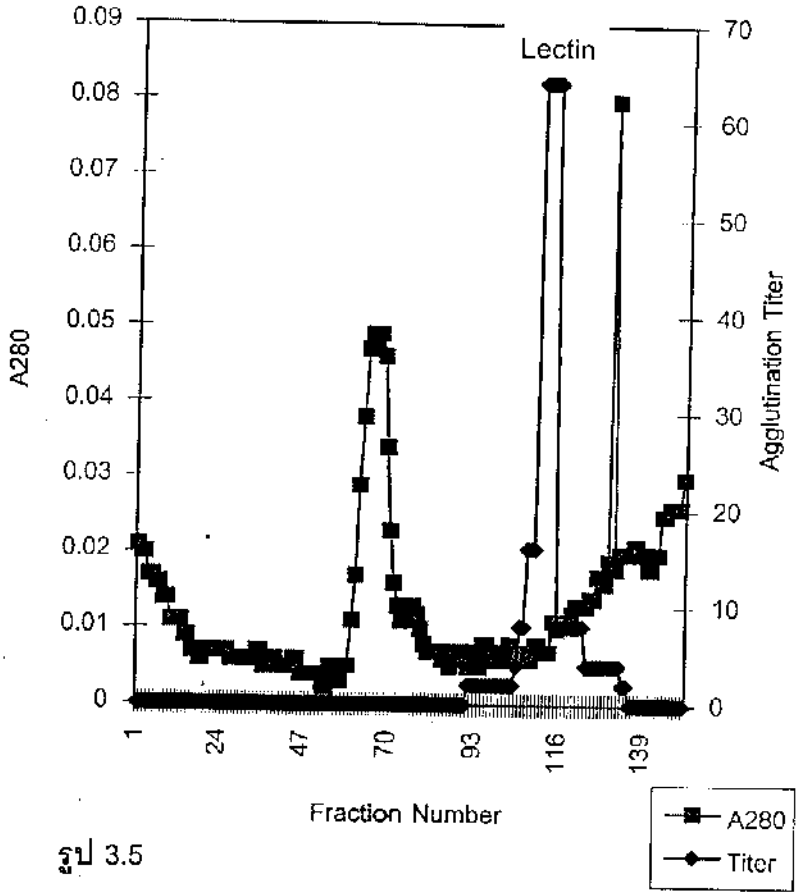
3.6.1 โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaris verrucosa*

จากการนำสิ่งสกัดหยาบของสาหร่ายทะเล *G. verrucosa* ตกตะกอนโปรตีนด้วย 0-60% แอมโมเนียมซัลเฟต ทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ 256 ไตเตอร์ แล้วนำสารละลายโปรตีนดังกล่าว ปริมาตร 4 มล. ผ่านลงในคอลัมน์แก้วที่บรรจุด้วย Sephacry S-200 จากนั้นชะตัวอย่างด้วย 0.01 M PBS ที่มี 0.02% NaN_3 เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองปริมาตร 3 มล. / หลอด นำแต่ละหลอดไปวิเคราะห์ปริมาณเลคตินและปริมาณโปรตีน ได้ผลดังแสดงในรูป 3.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร มีขีดจำกัดที่วัดเกิน 2.0 AU ไม่ได้จึงเหมาะสำหรับการยืนยันว่าโปรตีนถูกชะออกจากเลคตินหมดแล้วหรือยังเท่านั้น

โครมาโทแกรมรูป 3.5 แสดงให้เห็นว่าพีคของโปรตีนและพีคของเลคตินแยกออกจากกัน โดยที่เลคตินเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ตั้งแต่หลอดที่ 91 ถึงหลอดที่ 134 และถูกชะออกจากคอลัมน์มากที่สุดในหลอดที่ 110 - 114 มีค่าไตเตอร์ในแต่ละหลอดเท่ากับ 64 ไตเตอร์ เพื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และผลผลิตของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *G. verrucosa* ดังนั้นจึงได้รวมหลอดที่ 107 - 122 เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรได้ 46 มล. คิดเป็น 320 ไตเตอร์/มล. มีค่า specific activity 213,333 ไตเตอร์/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5 เท่า และได้ผลผลิต 72 % สำหรับหลอดที่ 123 - 132 เมื่อรวมแล้ววัดปริมาตรได้ 29 มล. คิดเป็น 80 ไตเตอร์/มล. มีค่า specific activity 100,000 ไตเตอร์/มก. โปรตีน มีความบริสุทธิ์ 2 เท่า และได้ผลผลิต 11 % ผลการวิเคราะห์แสดงในตาราง 3.20

ction	A280	Titer
1	0.021	0
2	0.02	0
3	0.02	0
4	0.017	0
5	0.017	0
6	0.016	0
7	0.016	0
8	0.014	0
9	0.014	0
10	0.011	0
11	0.011	0
12	0.011	0
13	0.011	0
14	0.009	0
15	0.009	0
16	0.007	0
17	0.007	0
18	0.006	0
19	0.006	0
20	0.007	0
21	0.007	0
22	0.007	0
3	0.007	0
4	0.007	0
5	0.007	0
6	0.007	0
7	0.006	0
8	0.006	0
	0.006	0
	0.006	0
	0.006	0
	0.006	0
	0.006	0
	0.006	0

Grasilaria verrucosa (0 - 60% (NH4)2SO4



รูป 3.5

Sample : G. verrucosa fraction 0 - 60 %(NH4)2SO4

load 4.0 ml H.A. = 256 titer (8 หลุม)

Packing : Sephacryl S - 200

Column : 2.5 x 100 cm

Flow rate : 30 ml / h , 3 ml / fraction / 6.18 min

รวม fraction 107 - 122 = 46 มล. 3,3

รวม fraction 123 - 132 = 29 มล. H.A. = 2,2 หลุม

Pแต 5

34	0.007	0	A280	titer	A280	titer	A280	titer	
35	0.007	0	0.046	0	0.006	2	0.02	2	
36	0.005	0	0.034	0	0.008	2	0.02	0	
37	0.005	0	0.023	0	0.006	2	0.021	0	
38	0.006	0	0.016	0	0.007	4	0.021	0	
39	0.006	0	0.013	0	0.006	8	0.02	0	
40	0.005	0	0.011	0	0.006	8	0.02	0	
41	0.005	0	0.011	0	0.007	16	0.018	0	
42	0.005	0	0.011	0	0.006	16	0.018	0	
43	0.005	0	0.013	0	0.008	16	0.02	0	
44	0.006	0	0.012	0	0.008	64	0.02	0	
45	0.006	0	0.01	0	0.007	64	0.025	0	
46	0.004	0	0.008	0	0.007	64	0.025	0	
47	0.004	0	0.007	0	0.007	64	0.026	0	
48	0.004	0	0.007	0	0.011	64	0.026	0	
49	0.004	0	0.007	0	0.01	8	0.026	0	
50	0.004	0	0.007	0	0.011	8	0.026	0	
51	0.004	0	0.006	0	0.011	8	0.03	0	
52	0.002	0	0.007	0	0.011	8			
53	0.002	0	0.005	0	0.012	8			
54	0.005	0	0.006	0	0.013	8			
55	0.005	0	0.006	0	0.013	8			
56	0.003	0	0.007	0	0.013	8			
57	0.003	0	0.006	0	0.013	4			
58	0.005	0	0.005	2	0.014	4			
59	0.005	0	0.006	2	0.014	4			
60	0.011	0	0.007	2	0.017	4			
61	0.017	0	0.005	2	0.017	4			
62	0.029	0	0.008	2	0.016	4			
63	0.038	0	0.008	2	0.019	4			
64	0.047	0	0.007	2	0.08	4			
65	0.049	0	0.006	2	0.018	4			
66	0.047	0	0.007	2	0.02	4			
67	0.049	0	0.007	2	0.02	2			

68	0.046	0
69	0.034	0
70	0.023	0
71	0.016	0
72	0.013	0
73	0.011	0
74	0.011	0
75	0.011	0
76	0.013	0
77	0.012	0
78	0.01	0
79	0.008	0
80	0.007	0
81	0.007	0
82	0.007	0
83	0.007	0
84	0.006	0
85	0.007	0
86	0.005	0
87	0.006	0
88	0.006	0
89	0.007	0
90	0.006	0
91	0.005	2
92	0.006	2
93	0.007	2
94	0.005	2
95	0.008	2
96	0.008	2
97	0.007	2
98	0.006	2
99	0.007	2
00	0.007	2
01	0.006	2

102	0.008	2
103	0.006	2
104	0.007	4
105	0.006	8
106	0.006	8
107	0.007	16
108	0.006	16
109	0.008	16
110	0.008	64
111	0.007	64
112	0.007	64
113	0.007	64
114	0.011	64
115	0.01	8
116	0.011	8
117	0.011	8
118	0.011	8
119	0.012	8
120	0.013	8
121	0.013	8
122	0.013	8
123	0.013	4
124	0.014	4
125	0.014	4
126	0.017	4
127	0.017	4
128	0.016	4
129	0.019	4
130	0.08	4
131	0.018	4
132	0.02	4
133	0.02	2
134	0.02	2
135	0.02	0

136	0.021	0
137	0.021	0
138	0.02	0
139	0.02	0
140	0.018	0
141	0.018	0
142	0.02	0
143	0.02	0
144	0.025	0
145	0.025	0
146	0.026	0
147	0.026	0
148	0.026	0
149	0.026	0
150	0.03	0

ตาราง 3.20 ความบริสุทธิ์และผลผลิตของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria verrucosa* ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน

Fraction	Volume (ml)	Hemagglutination Activity (titer)	(titer/ml)	Protein (mg/ml)	Specific Activity (titer/mg)	Total Activity (titer)	Yield (%)	Purification
0-60% AS, dialysis	4.0	256	5,120	0.1163	44,024	20,480	100	1
Gel filtration Fraction 107-122, P5.1	46.0	16	320	0.0015	213,333	14,720	71.87	4.8
Gel filtration Fraction 123-132, P5.2	29.0	4	80	0.0008	100,000	2,320	11.32	2.3

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

Purification = $\frac{\text{Specific activity ของเลคตินบริสุทธิ์ (ไตเตอร์/มก.)}}{\text{Specific activity ของเลคตินที่ตกตะกอน (ไตเตอร์/มก.)}}$

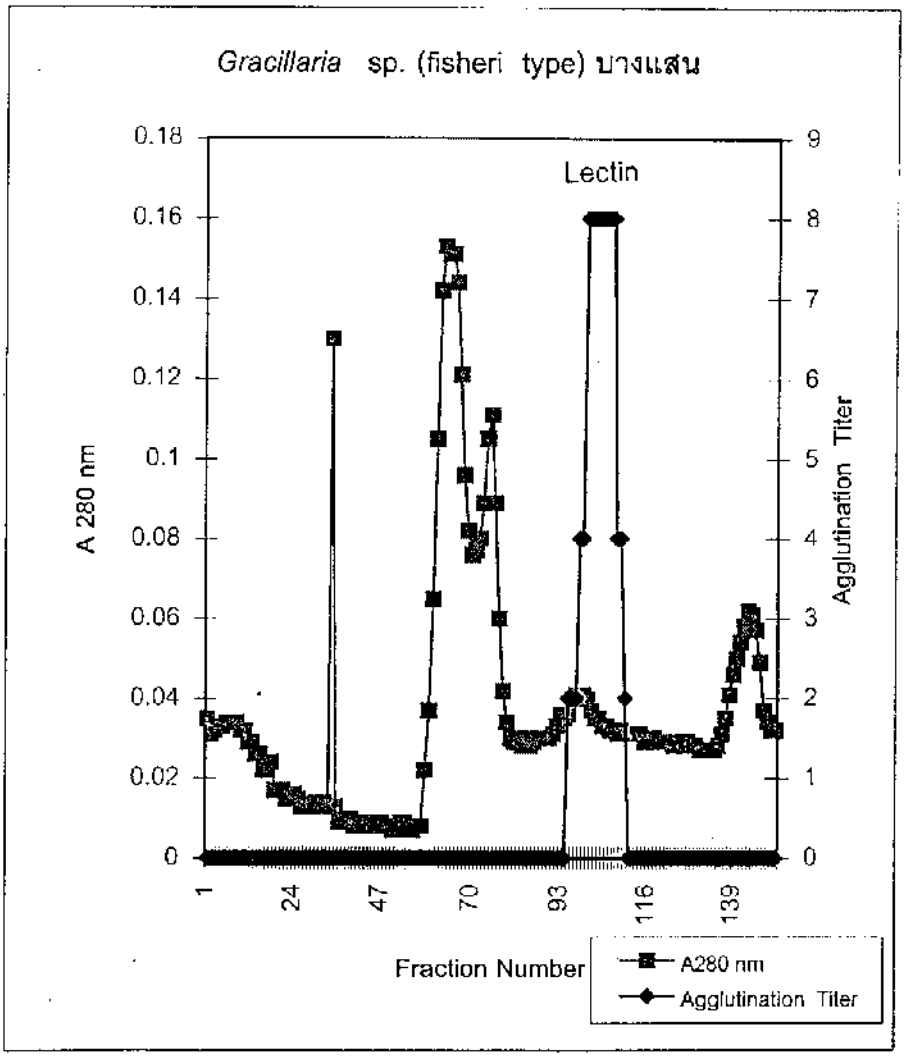
Yield = $\frac{\text{ปริมาณเลคตินทั้งหมดในเลคตินบริสุทธิ์(ไตเตอร์)}}{\text{ปริมาณเลคตินทั้งหมดที่ตกตะกอนได้ (ไตเตอร์)}} \times 100\ \%$

3.6.2 **โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type)**

จากการนำสิ่งสกัดหยาบของสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp.(fisheri type) ตกตะกอนโปรตีนด้วย 0-60% แอมโมเนียมซัลเฟต ทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ 128 ไตเตอร์ แล้วนำสารละลายโปรตีนดังกล่าว ปริมาตร 4 มล. ผ่านลงในคอลัมน์แก้วที่บรรจุด้วย Sephacry S-200 จากนั้นชะตัวอย่างด้วย 0.01 M PBS ที่มี 0.02% NaN_3 เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองปริมาตร 3 มล. / หลอด นำแต่ละหลอดไปวิเคราะห์ปริมาณเลคตินและปริมาณโปรตีน ได้ผลดังแสดงในรูป 3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร มีขีดจำกัดที่วัดเกิน 2.0 AU ไม่ได้จึงเหมาะสำหรับการยืนยันว่าโปรตีนถูกชะออกจากเลคตินหมดแล้วหรือยังเท่านั้น

โครมาโทแกรมรูป 3.6 แสดงให้เห็นว่าพีคของโปรตีนและพีคของเลคตินแยกออกจากกัน โดยที่เลคตินเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ตั้งแต่หลอดที่ 95 ถึงหลอดที่ 110 และถูกชะออกจากคอลัมน์มากที่สุดในหลอดที่ 100 - 107 มีค่าไตเตอร์ในแต่ละหลอดเท่ากับ 8 ไตเตอร์ เพื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และผลผลิตของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp.(fisheri type) ดังนั้นจึงได้รวมหลอดที่ 98 - 110 เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรได้ 36.5 มล. คิดเป็น 320 ไตเตอร์/มล. มีค่า specific activity 168,421 ไตเตอร์/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 43 เท่า และได้ผลผลิต 114% ผลการวิเคราะห์แสดงในตาราง 3.21

raction	A 280	Titer
1	0.035	0
2	0.031	0
3	0.032	0
4	0.033	0
5	0.033	0
6	0.034	0
7	0.034	0
8	0.034	0
9	0.034	0
10	0.032	0
11	0.032	0
12	0.029	0
13	0.029	0
14	0.026	0
15	0.026	0
16	0.022	0
17	0.022	0
18	0.024	0
19	0.017	0
20	0.017	0
21	0.017	0
22	0.015	0
23	0.015	0
24	0.016	0
25	0.015	0
26	0.013	0
27	0.014	0
28	0.013	0
29	0.013	0
30	0.013	0
31	0.014	0
32	0.014	0
33	0.013	0



รูป 3.6

Sample : Gracilaria sp. (fisheri type) fraction 0 - 60 %(NH4)2SO4

load 4.0 ml H.A. = 128 titer (7 หลุม)

Packing : Sephacryl S - 200

Column : 2.5 x100 cm

Flow rate : 30 ml / h , 3 ml / fraction / 6.09 min

โดย จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

วันที่ 1 กรกฎาคม 2544

รวม fraction 98 - 110 = 36.5 ml H.A. = 4,4 หลุม

P แต 3

34	0.13	0
35	0.013	0
36	0.009	0
37	0.009	0
38	0.01	0
39	0.01	0
40	0.008	0
41	0.008	0
42	0.008	0
43	0.009	0
44	0.008	0
45	0.008	0
46	0.009	0
47	0.009	0
48	0.008	0
49	0.008	0
50	0.007	0
51	0.007	0
52	0.009	0
53	0.009	0
54	0.007	0
55	0.007	0
56	0.008	0
57	0.008	0
58	0.022	0
59	0.037	0
60	0.065	0
61	0.105	0
62	0.142	0
63	0.153	0
64	0.151	0
65	0.151	0
66	0.144	0
67	0.121	0

3	0.096	0	0.027	0
3	0.082	0		
1	0.076	0		
	0.077	0		
	0.08	0		
	0.089	0		
	0.105	0		
	0.111	0		
	0.089	0		
	0.06	0		
	0.042	0		
	0.034	0		
	0.03	0		
	0.029	0		
	0.029	0		
	0.028	0		
	0.03	0		
	0.028	0		
	0.029	0		
	0.03	0		
	0.03	0		
	0.03	0		
	0.03	0		
	0.031	0		
	0.033	0		
	0.036	0		
	0.035	0		
	0.036	2		
	0.04	2		
	0.041	2		
	0.041	4		
	0.041	4		
	0.04	8		
	0.037	8		

0.035	8
0.035	8
0.033	8
0.033	8
0.032	8
0.032	8
0.031	4
0.032	4
0.031	2
0.031	0
0.031	0
0.031	0
0.031	0
0.029	0
0.029	0
0.03	0
0.03	0
0.029	0
0.029	0
0.029	0
0.029	0
0.028	0
0.029	0
0.029	0
0.028	0
0.029	0
0.028	0
0.028	0
0.027	0
0.027	0
0.027	0
0.027	0
0.027	0
0.028	0

136	0.031	0
137	0.035	0
138	0.041	0
139	0.046	0
140	0.05	0
141	0.054	0
142	0.058	0
143	0.062	0
144	0.061	0
145	0.057	0
146	0.049	0
147	0.037	0
148	0.034	0
149	0.032	0
150	0.032	0

ตาราง 3.21 ความบริสุทธิ์และผลผลิตของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp.(fisheri type) ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน

Fraction	Volume (ml)	Hemagglutination Activity (titer)	Hemagglutination Activity (titer/ml)	Protein (mg/ml)	Specific Activity (titer/mg)	Total Activity (titer)	Yield (%)	Purification
0-60% AS, dialysis	4.0	128	2560	0.6538	3915	10240	100	1
Gel filtration Fraction 98-110, P3	36.5	16	320	0.0019	168421	11680	114	43

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

Purification $= \frac{\text{Specific activity ของเลคตินบริสุทธิ์ (ไตเตอร์/มก.)}}{\text{Specific activity ของเลคตินที่ตกตะกอน (ไตเตอร์/มก.)}}$

Yield $= \frac{\text{ปริมาณเลคตินทั้งหมดในเลคตินบริสุทธิ์(ไตเตอร์)}}{\text{ปริมาณเลคตินทั้งหมดที่ตกตะกอนได้ (ไตเตอร์)}} \times 100\ \%$

3.6.3 โครมาโทแกรมของโปรตีนและเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia*

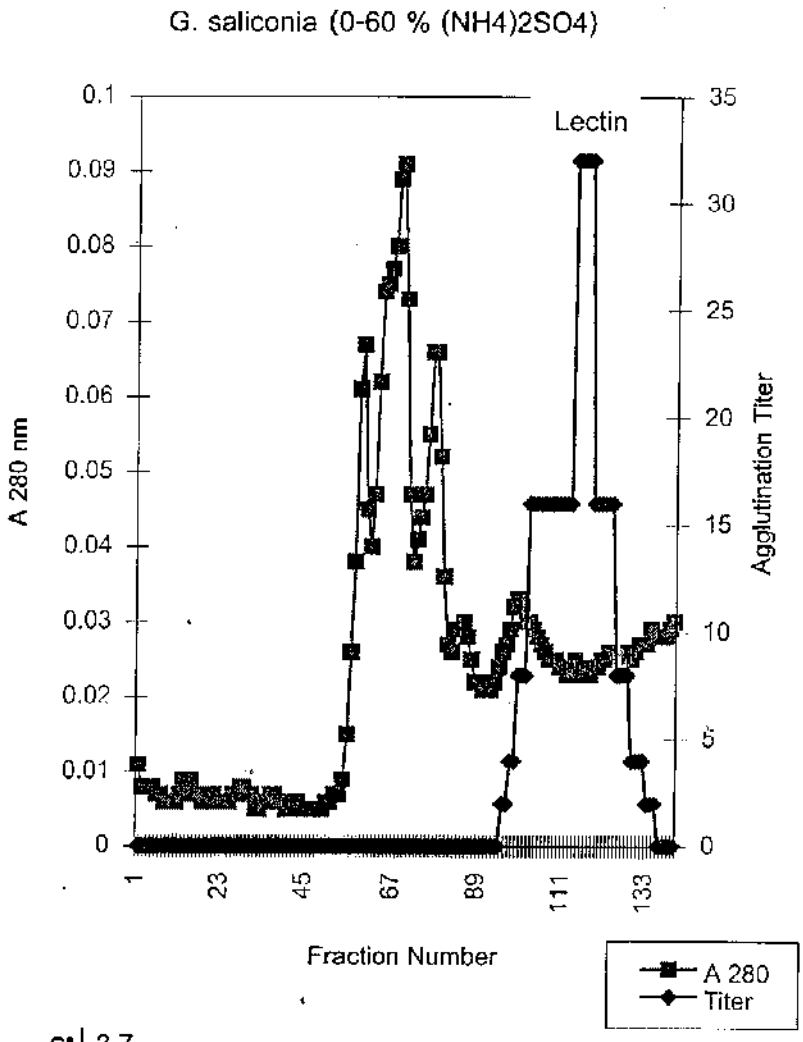
จากการนำสิ่งสกัดหยาบของสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia* ตกตะกอนโปรตีนด้วย 0-60% แอมโมเนียมซัลเฟต ทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ 1024 ไตเตอร์ แล้วนำสารละลายโปรตีนดังกล่าว ปริมาตร 4 มล. ผ่านลงในคอลัมน์แก้วที่บรรจุด้วย Sephacry S-200 จากนั้นชะตัวอย่างด้วย 0.01 M PBS ที่มี 0.02% NaN_3 เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองปริมาตร 3 มล. / หลอด นำแต่ละหลอดไปวิเคราะห์ปริมาณเลคติน และปริมาณโปรตีน ได้ผลดังแสดงในรูป 3.7

โครมาโทแกรมรูป 3.7 แสดงให้เห็นว่าพีคของโปรตีนและพีคของเลคตินแยกออกจากกัน โดยที่เลคตินเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ตั้งแต่หลอดที่ 95 ถึงหลอดที่ 135 และถูกชะออกจากคอลัมน์มากที่สุดในหลอดที่ 114 - 118 มีค่าไตเตอร์ในแต่ละหลอดเท่ากับ 32 ไตเตอร์ เพื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และผลผลิตของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia* ดังนั้นจึงได้รวมสารละลายในแต่ละช่วงเข้าด้วยกันได้ 5 ชุด ผลการวิเคราะห์แสดงในตาราง 3.22 สรุปได้ดังนี้

- การรวมหลอดที่ 97 - 101 เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรได้ 14.8 มล. คิดเป็น 320 ไตเตอร์/มล. มีค่า specific activity 61,538 ไตเตอร์/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า และได้ผลผลิต 6%
- การรวมหลอดที่ 102-113 เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรได้ 34 มล. คิดเป็น 1280 ไตเตอร์/มล. มีค่า specific activity 412,903 ไตเตอร์/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 11 เท่า และได้ผลผลิต 53%
- การรวมหลอดที่ 114-118 เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรได้ 14.6 มล. คิดเป็น 1280 ไตเตอร์/มล. มีค่า specific activity 304,762 ไตเตอร์/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8 เท่า และได้ผลผลิต 23%
- การรวมหลอดที่ 119-124 เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรได้ 17.2 มล. คิดเป็น 640 ไตเตอร์/มล. มีค่า specific activity 914,286 ไตเตอร์/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 25 เท่า และได้ผลผลิต 13%
- การรวมหลอดที่ 125-132 เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรได้ 23 มล. คิดเป็น 160 ไตเตอร์/มล. มีค่า specific activity 228,571 ไตเตอร์/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6 เท่า และได้ผลผลิต 4%

จากผลการทดลองfractionที่ให้ผลผลิตมากที่สุดคือ การรวมหลอดที่ 102-113 เข้าด้วยกัน ได้ผลผลิตมากกว่า 50 %

fraction	A280	titer
1	0.011	0
2	0.008	0
3	0.008	0
4	0.008	0
5	0.008	0
6	0.007	0
7	0.007	0
8	0.006	0
9	0.006	0
10	0.006	0
11	0.006	0
12	0.007	0
13	0.009	0
14	0.009	0
15	0.009	0
16	0.007	0
17	0.007	0
18	0.006	0
19	0.006	0
20	0.007	0
21	0.007	0
22	0.006	0
23	0.006	0
24	0.006	0
25	0.006	0
26	0.007	0
27	0.007	0
28	0.008	0
29	0.008	0
30	0.007	0
31	0.007	0
32	0.005	0
33	0.005	0



รูป 3.7

Sample : G. saliconia fraction 0 - 60 %(NH4)2SO4

Packing : Sephacryl S - 200

Column : 2.5 x100 cm Load : 4 ml H.A. = 10 หลุม

Flow rate : 30 ml / h , 3 ml / fraction / 6.09 min

P แต 4 โดย จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

วันที่ 10 กรกฎาคม 2544

รวม fraction 97 - 101 = 14.8 มล H.A. = 4,4 หลุม

รวม fraction 102 - 113 = 34.0 มล. H.A. = 6,6 หลุม

รวม fraction 114 - 118 = 14.6 มล. H.A. = 6,6 หลุม

รวม fraction 119 - 124 = 17.2 มล. H.A = 5,5 หลุม

รวม fraction 125 - 132 = 23.0 มล. H.A. = 3,3 หลุม

34	0.006	0	A280	titer	A280	titer	A280	A280
35	0.006	0	0.089	0	0.03	8	0.029	2
36	0.007	0	0.091	0	0.03	16	0.029	2
37	0.007	0	0.073	0	0.029	16	0.029	2
38	0.006	0	0.047	0	0.028	16	0.028	0
39	0.006	0	0.038	0	0.027	16	0.028	0
40	0.005	0	0.041	0	0.026	16	0.028	0
41	0.005	0	0.044	0	0.025	16	0.029	0
42	0.006	0	0.047	0	0.025	16	0.03	0
43	0.006	0	0.055	0	0.025	16		
44	0.005	0	0.066	0	0.024	16		
45	0.005	0	0.066	0	0.024	16		
46	0.005	0	0.052	0	0.023	16		
47	0.005	0	0.036	0	0.024	16		
48	0.005	0	0.027	0	0.025	32		
49	0.005	0	0.026	0	0.023	32		
50	0.006	0	0.029	0	0.024	32		
51	0.006	0	0.029	0	0.024	32		
52	0.007	0	0.03	0	0.023	32		
53	0.007	0	0.028	0	0.024	16		
54	0.009	0	0.025	0	0.024	16		
55	0.015	0	0.022	0	0.025	16		
56	0.026	0	0.022	0	0.025	16		
57	0.038	0	0.021	0	0.026	16		
58	0.061	0	0.021	0	0.025	16		
59	0.067	0	0.021	0	0.025	8		
60	0.045	0	0.022	0	0.024	8		
61	0.04	0	0.024	0	0.025	8		
62	0.047	0	0.026	2	0.026	8		
63	0.062	0	0.027	2	0.026	4		
64	0.074	0	0.029	4	0.026	4		
65	0.075	0	0.032	4	0.027	4		
66	0.077	0	0.033	8	0.027	4		
67	0.08	0	0.032	8	0.027	2		

68	0.089	0
69	0.091	0
70	0.073	0
71	0.047	0
72	0.038	0
73	0.041	0
74	0.044	0
75	0.047	0
76	0.055	0
77	0.066	0
78	0.066	0
79	0.052	0
30	0.036	0
31	0.027	0
32	0.026	0
33	0.029	0
34	0.029	0
35	0.03	0
36	0.028	0
37	0.025	0
38	0.022	0
39	0.022	0
40	0.021	0
41	0.021	0
42	0.021	0
3	0.022	0
4	0.024	0
5	0.026	2
6	0.027	2
7	0.029	4
8	0.032	4
9	0.033	8
0	0.032	8
1	0.03	8

102	0.03	16
103	0.029	16
104	0.028	16
105	0.027	16
106	0.026	16
107	0.025	16
108	0.025	16
109	0.025	16
110	0.024	16
111	0.024	16
112	0.023	16
113	0.024	16
114	0.025	32
115	0.023	32
116	0.024	32
117	0.024	32
118	0.023	32
119	0.024	16
120	0.024	16
121	0.025	16
122	0.025	16
123	0.026	16
124	0.025	16
125	0.025	8
126	0.024	8
127	0.025	8
128	0.026	8
129	0.025	4
130	0.026	4
131	0.027	4
132	0.027	4
133	0.027	2
134	0.029	2
135	0.028	2

0.028	0
0.028	0
0.028	0
0.029	0
0.03	0

ตาราง 3.22 ความบริสุทธิ์และผลผลิตของเลคตินจากสาหร่ายทะเล *Gracilaria saliconia* ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน

Fraction	Volume (ml)	Hemagglutination Activity (liter)	Hemagglutination Activity (titer/ml)	Protein (mg/ml)	Specific Activity (titer/mg)	Total Activity (titer)	Yield (%)	Purification
0-60% AS, dialysis	4.0	1024	20480	0.5668	36133	81920	100	1
Gel filtration Fraction 97-101, P4.1	14.8	16	320	0.0052	61538	4736	6	1.7
Gel filtration Fraction 102-113, P4.2	34.0	64	1280	0.0031	412903	43520	53	11.4
Gel filtration Fraction 114-118, P4.3	14.6	64	1280	0.0042	304762	18688	23	8.4
Gel filtration Fraction 119-124, P4.4	17.2	32	640	0.0007	914286	11008	13	25.3
Gel filtration Fraction 125-132, P4.5	23.0	8	160	0.0008	228571	3680	4.5	6.3

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

Purification = $\frac{\text{Specific activity ของเลคตินบริสุทธิ์ (ไตเตอร์/มก.)}}{\text{Specific activity ของเลคตินที่ตกตะกอน (ไตเตอร์/มก.)}}$

Yield = $\frac{\text{ปริมาณเลคตินทั้งหมดในเลคตินบริสุทธิ์(ไตเตอร์)}}{\text{ปริมาณเลคตินทั้งหมดที่ตกตะกอนได้ (ไตเตอร์)}} \times 100\ \%$

3.7 ความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเลคติน

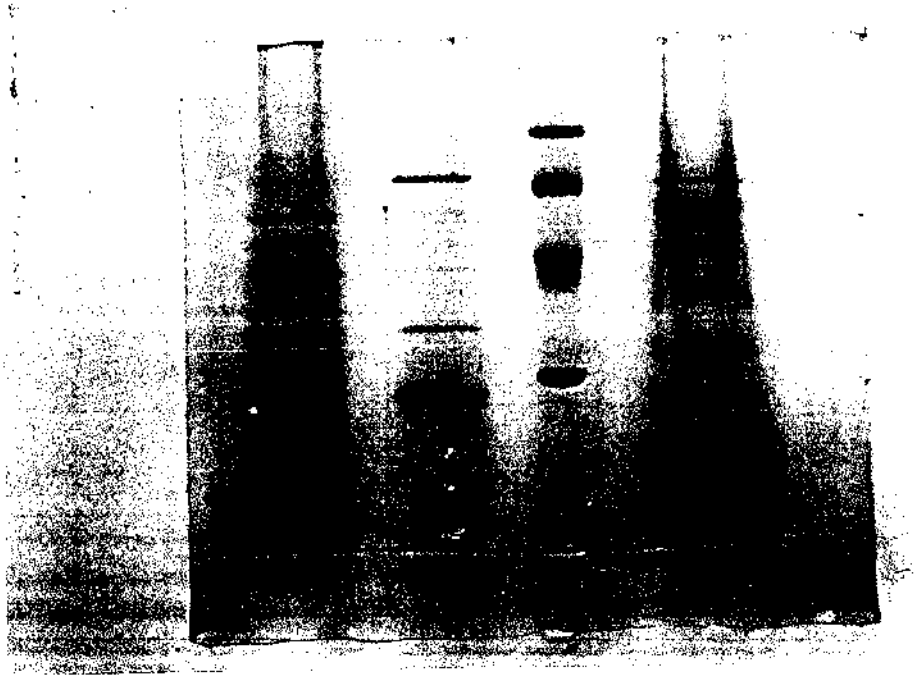
3.7.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดย SDS-PAGE

การทำอิเลคโตรโฟรีซีสของโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตหรือนำสารละลายตะกอนที่ได้ผ่านเจลฟิลเตรชันเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอน และวัดระยะทางที่โปรตีนแต่ละชนิดเคลื่อนที่ไปใน Separating gel แล้วคำนวณการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนนั้นโดยนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแต่ละชนิดมาเขียนกราฟ log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน จากค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเลคติน นำไปอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินได้จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งจากการแยกโปรตีนมาตรฐานโดย SDS-PAGE โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากหรือขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปได้น้อย ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์จะมีค่าน้อย โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์มาก

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ Bromophenol blue เคลื่อนที่}}$$

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินที่ตกตะกอนด้วย 0-70 %แอมโมเนียมซัลเฟต แล้ววิเคราะห์โดย SDS-PAGE แสดงในรูป3.8 สิ่งสกัดหยาบของเลคตินจากสาหร่ายทะเลมีปริมาณโปรตีนน้อยมากเมื่อแยกโดย SDS-PAGE ทำให้เห็นแถบของโปรตีนน้อยมาก ดังแสดงในรูป 3.3 สำหรับรูป 3.8 เป็นการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจากสิ่งสกัดหยาบสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) *G. verrucosa* และ *G. saliconia* ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 2.49, 0.9675 และ 0.868 มก./มล. ตามลำดับ โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนยังไม่บริสุทธิ์เพราะได้แถบของโปรตีนมากกว่า 2 แถบ โดยที่โปรตีนจาก *G. verrucosa* ให้จำนวนแถบของโปรตีนน้อยที่สุด 4 แถบ และแถบที่เข้มที่สุดอาจเป็นหน่วยย่อยของเลคติน นอกจากนี้รูปแบบของแถบโปรตีนของสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) ยังคล้ายกับของ *G. saliconia* เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอน รูป 3.10 และได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.23 โปรตีนแถบที่มีความเข้มสูงที่สุดของ *Gracilaria* sp. (fisheri type) *G. verrucosa* และ *G. saliconia* มีน้ำหนักโมเลกุล 24,000, 33,000 และ 24,000 ดาลตัน ตามลำดับ

สำหรับการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเตรชันของสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp. (fisheri type) และ *G. verrucosa* แสดงในรูป 3.9 แถบของโปรตีนที่ผ่านเจลฟิลเตรชันบางมากเนื่องจากโปรตีนที่ได้มีปริมาณน้อยมาก 0.0013 และ0.0015 มก./ มล.ตามลำดับ ซึ่งจะได้ทดลองเปลี่ยนสีที่ใช้ย้อมแผ่นเจลที่มีความไวสูงขึ้น เช่นย้อมด้วยซิลเวอร์ อย่างไรก็ตามแถบของโปรตีนที่ผ่านเจลฟิลเตรชันแล้วน้อยจนเกือบได้เลคตินที่บริสุทธิ์ แถบที่มีความเข้มมากที่สุดของเลคตินจาก *Gracilaria* sp. (fisheri type) และ *G. verrucosa* อยู่ตำแหน่งเดียวกัน มีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดาลตัน



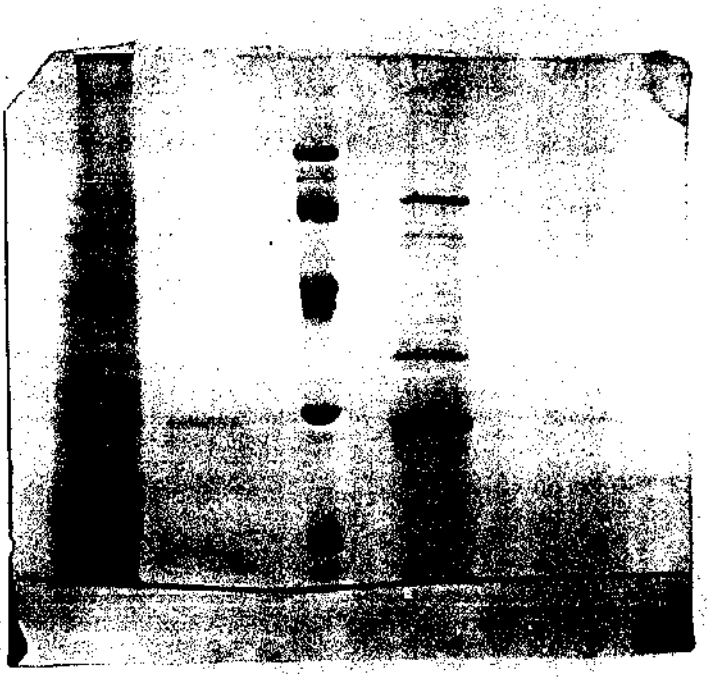
รูป 3.8 SDS-PAGE ของโปรตีนจากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเลที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

แถวที่ 1 *Gracilaria* sp. (fisheri type) 0-70% $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

แถวที่ 2 *G. verrucosa* 0-70% $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

แถวที่ 3 โปรตีนมาตรฐาน ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

แถวที่ 4 *G. saliconia* 0-70% $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร



1 2 3 4 5

รูป 3.9 SDS-PAGE ของโปรตีนจากสิ่งสกัดลาหร่ายทะเลที่ตกตะกอนด้วย
แอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านเจลฟิลเตรชัน

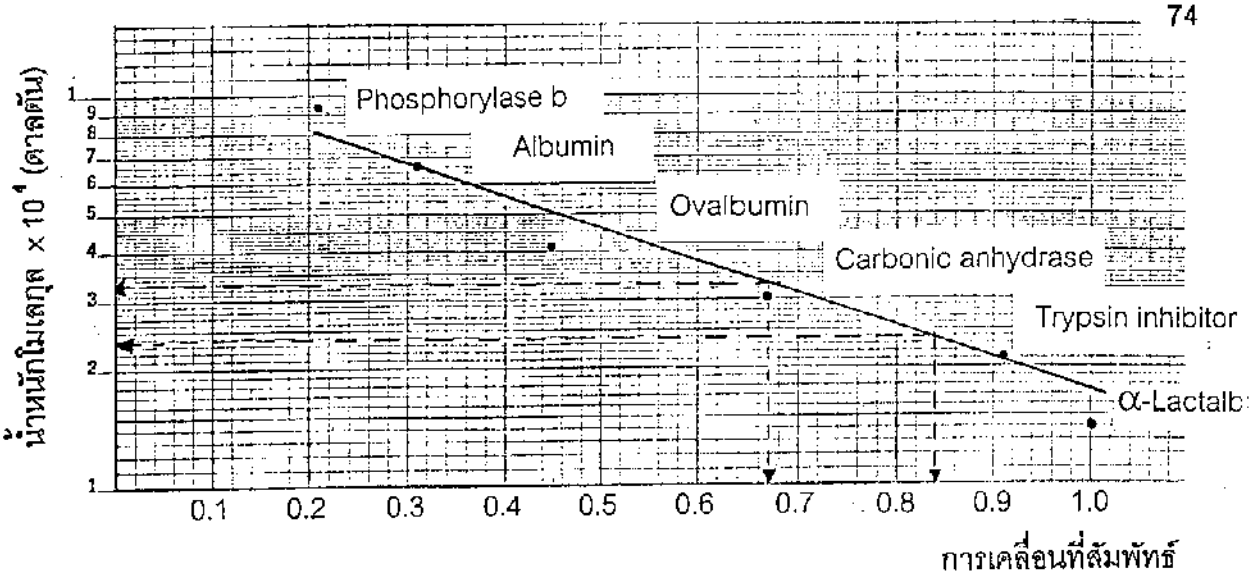
แถวที่ 1 *Gracilaria* sp. (fisheri type) 0-70% $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

แถวที่ 2 *Gracilaria* sp. (fisheri type) ที่ผ่านเจลฟิลเตรชัน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

แถวที่ 3 โปรตีนมาตรฐาน ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

แถวที่ 4 *G. verrucosa* 0-70% $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

แถวที่ 5 *G. verrucosa* ที่ผ่านเจลฟิลเตรชัน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร



รูป 3.10 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินจากสาหร่ายทะเล

ตาราง 3.23 การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานและเลคตินบริสุทธิ์ใน SDS-PAGE

โปรตีน	สิ่งสกัดสาหร่ายตกตะกอนด้วยเกลือ			สารละลายโปรตีนตกตะกอนด้วยเกลือแล้วผ่านเจลฟิลเตรชัน		
	น้ำหนักโมเลกุล	ระยะทาง (ซม.)	การเคลื่อนที่สัมพัทธ์	น้ำหนักโมเลกุล	ระยะทาง (ซม.)	การเคลื่อนที่สัมพัทธ์
Phosphorylase b	94000	1.4	0.21	94000	1.4	0.21
Albumin	67000	2.1	0.31	67000	2.0	0.29
Ovalbumin	43000	3.0	0.45	43000	3.0	0.44
Carbonic anhydrase	30000	4.5	0.67	30000	4.6	0.68
Trypsin inhibitor	20100	6.1	0.91	20100	6.3	0.93
α-Lactalbumin	14400	6.7	1.00	14400	6.8	1.00
Bromophenolblue	-	6.7	1.00	-	6.8	1.00
Gracilaria sp. (fisheri type)	24000	5.6	0.84	24000	36000	0.69
G. verrucosa	33000	4.5	0.67	33000	36000	0.69
G. saliconia	24000	5.6	0.84	24000	-	-

3.7.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยเจลฟิลเตรชัน

เจลฟิลเตรชันเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดหนึ่งที่ใช้หลอดแก้วบรรจุเจล (gel) ซึ่งประกอบด้วยอนุภาคที่มีรูเล็กๆ ลักษณะคล้ายฟองน้ำ ทำหน้าที่เหมือนตะแกรงกรองสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเข้าไปข้างในเนื้อเจลไม่ได้ และถูกชะออกจากหลอดแก้วก่อน โดยผ่านไประหว่างระหว่างอนุภาคเจลเท่านั้น แต่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กสามารถเข้าไปข้างในเนื้อเจลได้ จึงถูกชะออกมาช้ากว่า เพราะต้องผ่านทั้งเนื้อที่ภายในเจลและเนื้อที่ระหว่างอนุภาคเจล เทคนิคนี้สามารถใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้ โดยเปรียบเทียบปริมาตรของตัวชะ (elution volume หรือ V_e)ที่ใช้ชะโปรตีนตัวอย่างออกมากับปริมาตรของตัวชะที่ใช้ชะโปรตีนมาตรฐานที่มีรูปร่างเหมือนกัน แสดงในภาคผนวก

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล

ก่อนบรรจุเม็ดเจลลงคอลัมน์ได้ทำการวิเคราะห์ค่า V_t ของคอลัมน์โดยการบบรุน้ำถึงขีดที่ต้องการใส่เจล แล้ววัดปริมาตรน้ำได้ 480 มล. ค่าที่ได้จากการคำนวณคือ 490 มล. ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าที่ได้จากการทดลอง คือ 480 มล.

จากค่า V_t, V_0 และ V_e ของโปรตีนมาตรฐาน นำมาคำนวณหาค่า K_{av} ของโปรตีนแต่ละชนิดได้โดยใช้สมการ

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

เมื่อ V_e = elution volume for the protein

V_0 = column void volumn = elution volume for blue dextran 2000

V_t = total bed volumn

คำนวณค่า V_e / V_0 จากค่า K_{av} และ V_e / V_0 ของโปรตีนมาตรฐานนำมาเขียนกราฟกับ log ของน้ำหนักโมเลกุลที่ทราบแน่นอนแล้ว จะได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง ดังนั้นเมื่อนำค่า K_{av} และ V_e / V_0 ของเลคตินไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินได้

สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่นำมาใช้ในการทดลองมีส่วนประกอบดังนี้

Contents of Calibation Kits

Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit

Protein	Molecular Weight
ribonuclease A	13,700
chymotrypsinogent A	25,000
ovalbumin	43,000
albumin	67,000

จากการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานตามรายละเอียดในภาคผนวก แล้วผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephacryl S-200 ขนาด 2.5x 100 ซม.เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ส่วนละ 3.0 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูป3.11 และ รูป 3.12

V_e ของ albumin, ovalbumin, chymotrypinogen และ ribonuclease A มีค่า เท่ากับ 252, 282, 324 และ 351มล. ตามลำดับ จากค่า V_e นำไปคำนวณค่า K_{av} ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.24 แล้วนำค่า K_{av} ไปเขียนกราฟกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ดังแสดงในรูป 3.13 กราฟมาตรฐานที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วง K_{av} = 0 - 0.5

น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินจากสาหร่ายทะเล

เมื่อนำสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด คือ *G. verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) และ *G. saliconia* ผ่านลงในคอลัมน์เจลฟิลเตรชันที่บรรจุด้วย Sephacryl S - 200 เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ส่วนละ 3.0 มล. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ส่วนที่พบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงทำการเจือจางสารตัวอย่างเพื่อหาค่าไตเตอร์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และปริมาณเลคตินเป็นไตเตอร์ ได้โครมาโทแกรมของการแยกเลคตินจากสิ่งสกัดสาหร่ายทะเล *G. verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) และ *G. saliconia* ดังแสดงในรูป

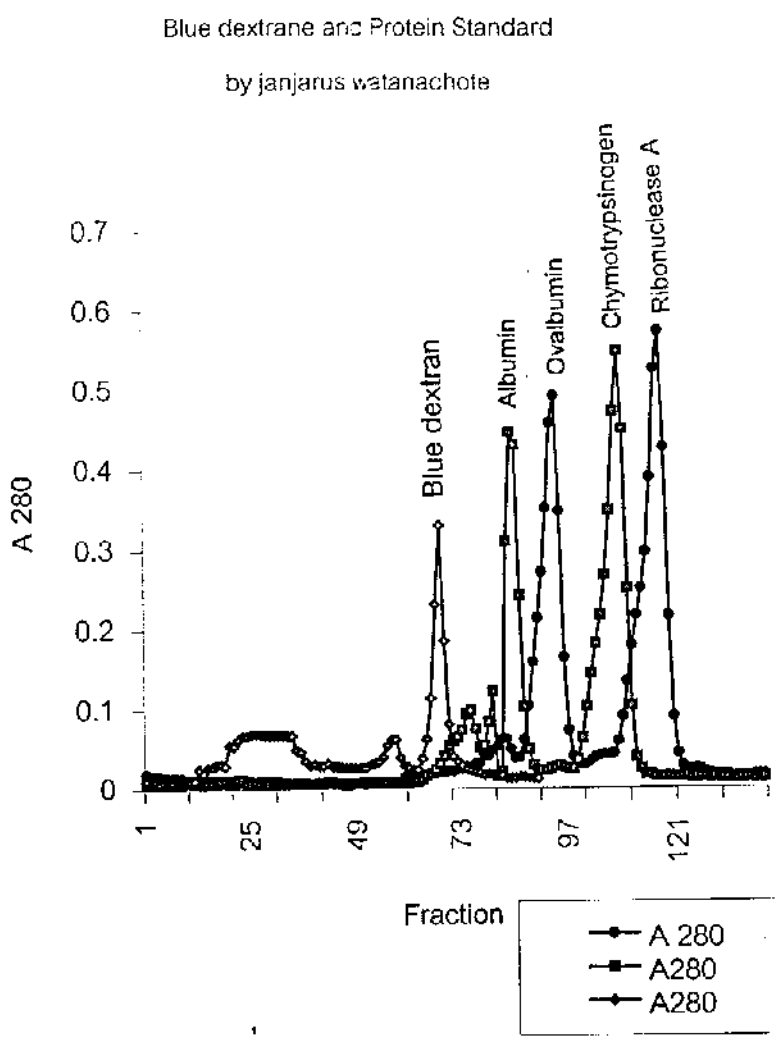
3.14, 3.15 และ 3.16 ตามลำดับ พบว่าทุกโครมาโทแกรมมีพีคของเลคติน 1 พีค แยกออกจากโปรตีนอื่น การวิเคราะห์ค่า Ve ของเลคตินจาก *G. verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) และ *G. saliconia* มีค่าเท่ากับ 336, 309 และ 348 มล. ตามลำดับ ค่า V_0 ของ Blue dextran มีค่าเท่ากับ 204 มล.

จากการนำค่า V_e ของเลคตินไปคำนวณค่า Kav แล้วอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐาน พบว่าเลคตินจากสาหร่ายทะเล *G. verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) และ *G. saliconia* มีน้ำหนักโมเลกุล 18,000, 26,500 และ 14,500 ดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 3.24

ตาราง 3.24 น้ำหนักโมเลกุลและค่า K_{av} โดยคอลัมน์ Sephacryl S - 200 ของโปรตีนมาตรฐานและเลคตินจากสาหร่ายทะเล

สารที่ผ่านคอลัมน์	น้ำหนักโมเลกุล	V_e(มล.)	$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$	V_e / V_0
Blue dextran	2,000,000	204	0.174	1.00
Albumin	67,000	252	0.283	1.235
Ovalbumin	43,000	282	0.435	1.382
Chymotrypsinogen	25,000	324	0.533	1.588
Ribonuclease A	13,700	351	1.739	1.720
เลคตินจาก *G.verrucosa*	18,000	336	0.478	1.647
เลคตินจาก *Gracilaria* sp.(fisheri type)	26,500	309	0.380	1.515
เลคตินจาก *Gracilaria saliconia*	14,500	348	0.522	1.706

n	A 280	A280	A280
1	0.019	0.007	0.01
2	0.017	0.007	0.008
3	0.017	0.007	0.008
4	0.016	0.006	0.007
5	0.015	0.006	0.008
6	0.014	0.006	0.009
7	0.014	0.006	0.009
8	0.014	0.006	0.01
9	0.014	0.006	0.011
10	0.012	0.008	0.01
11	0.012	0.008	0.01
12	0.01	0.007	0.011
13	0.01	0.007	0.025
14	0.009	0.006	0.02
15	0.009	0.006	0.027
16	0.012	0.007	0.028
17	0.012	0.007	0.03
18	0.012	0.008	0.031
19	0.012	0.008	0.029
20	0.01	0.007	0.055
21	0.01	0.007	0.054
22	0.01	0.012	0.062
23	0.011	0.012	0.066
24	0.009	0.007	0.067
25	0.01	0.007	0.069
26	0.009	0.007	0.069
27	0.01	0.007	0.069
28	0.009	0.006	0.068
29	0.011	0.006	0.068
30	0.01	0.006	0.068
31	0.01	0.006	0.068
32	0.008	0.006	0.068
33	0.008	0.006	0.067



รูป 3.11

Sample : Blue dextrane Albumin, Ovalbumin,Chymotrypsinogen, ribonuclea

Packing : Sephacryl S - 200

Column : 2.5 x 100 cm

Flow rate : 30 ml / h ; 3 ml / fraction / 6.18 min

Albumin 7 mg/ml load 20ml

Chymotrypsinogen 3 mg/ml load 2 ml

Ovalbumin 0.014 g/2ml

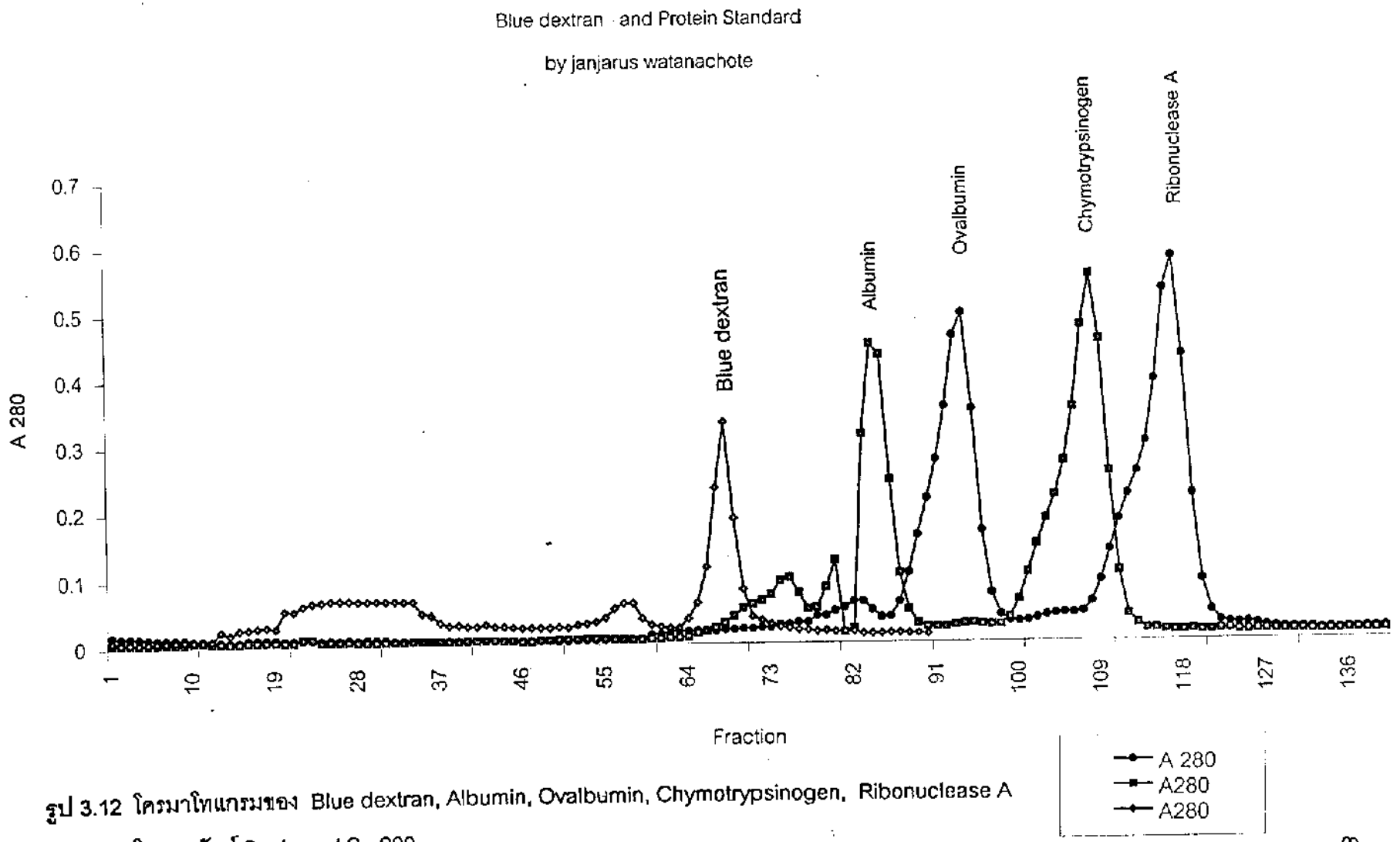
Ribonuclease A 0.009 g/2 ml

34	0.007	0.007	0.067
35	0.007	0.007	0.049
36	0.007	0.007	0.046
37	0.007	0.007	0.035
38	0.007	0.006	0.03
39	0.007	0.006	0.031
40	0.008	0.007	0.029
41	0.008	0.007	0.029
42	0.008	0.008	0.032
43	0.008	0.008	0.028
44	0.007	0.007	0.028
45	0.007	0.007	0.027
46	0.007	0.005	0.026
47	0.007	0.005	0.026
48	0.007	0.007	0.026
49	0.007	0.007	0.026
50	0.006	0.008	0.027
51	0.006	0.008	0.026
52	0.007	0.008	0.03
53	0.007	0.009	0.032
54	0.007	0.009	0.034
55	0.007	0.009	0.04
56	0.007	0.008	0.054
57	0.007	0.008	0.062
58	0.007	0.007	0.062
59	0.007	0.007	0.039
60	0.015	0.008	0.029
61	0.015	0.008	0.026
62	0.019	0.009	0.024
63	0.019	0.009	0.024
64	0.019	0.011	0.038
65	0.019	0.016	0.062
66	0.019	0.019	0.114
67	0.019	0.024	0.232

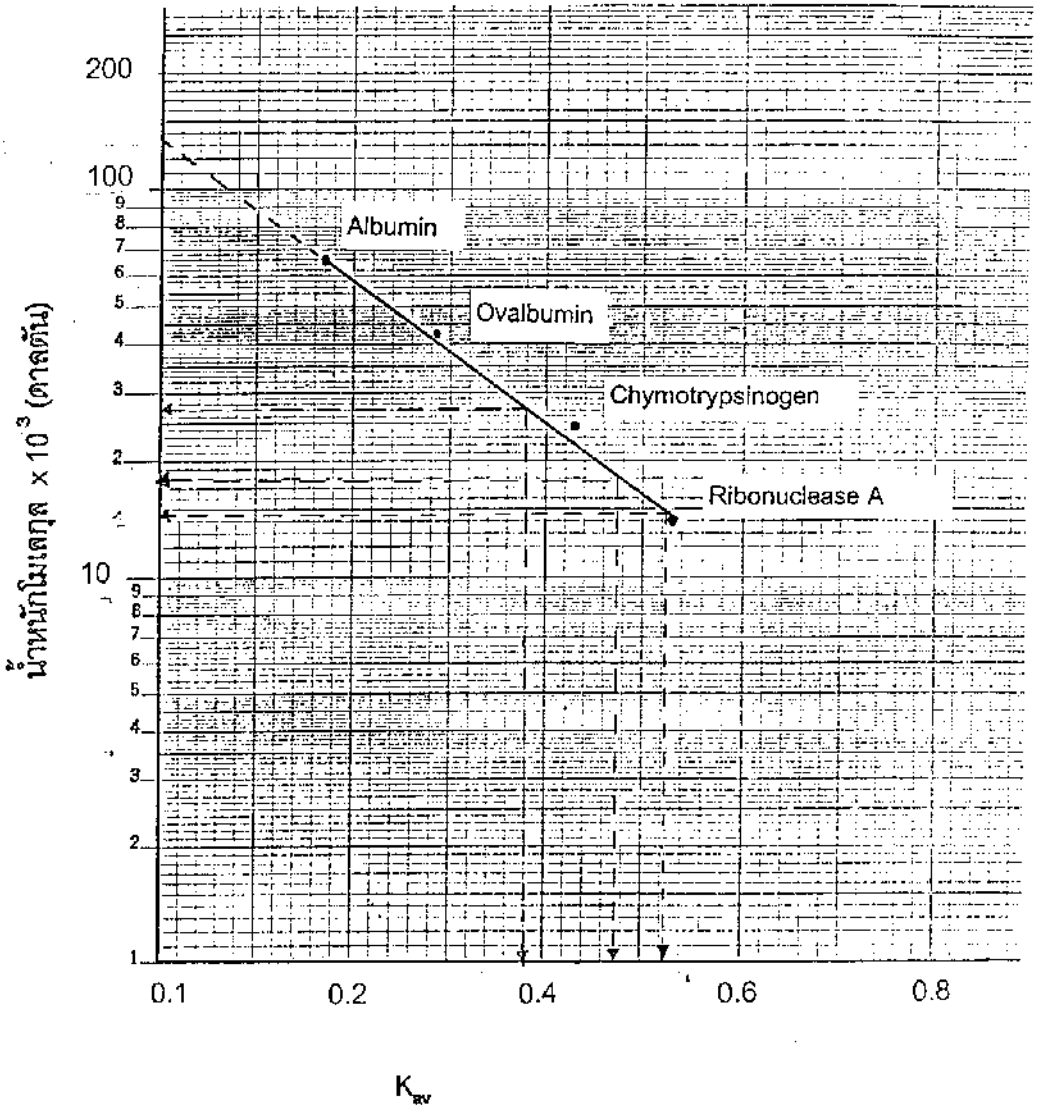
68	0.021	0.031	0.331
69	0.021	0.041	0.186
70	0.022	0.053	0.081
71	0.022	0.059	0.04
72	0.024	0.064	0.034
73	0.024	0.073	0.029
74	0.028	0.093	0.024
75	0.028	0.098	0.022
76	0.031	0.075	0.02
77	0.031	0.051	0.019
78	0.041	0.053	0.017
79	0.041	0.083	0.018
80	0.048	0.122	0.016
81	0.053	0.0159	0.016
82	0.062	0.0212	0.016
83	0.062	0.311	0.013
84	0.049	0.447	0.013
85	0.038	0.431	0.013
86	0.039	0.242	0.014
87	0.061	0.103	0.014
88	0.104	0.049	0.013
89	0.159	0.028	0.013
90	0.214	0.023	0.012
91	0.272	0.022	
92	0.352	0.022	
93	0.459	0.025	
94	0.493	0.027	
95	0.348	0.028	
96	0.165	0.026	
97	0.073	0.025	
98	0.04	0.025	
99	0.031	0.036	
00	0.03	0.063	
01	0.031	0.103	

102	0.035	0.144
103	0.039	0.182
104	0.041	0.217
105	0.042	0.268
106	0.042	0.349
107	0.044	0.473
108	0.059	0.549
109	0.091	0.451
110	0.135	0.252
111	0.18	0.104
112	0.218	0.039
113	0.252	0.025
114	0.297	0.017
115	0.39	0.017
116	0.527	0.015
117	0.575	0.014
118	0.428	0.014
119	0.217	0.015
120	0.09	0.014
121	0.044	0.014
122	0.028	0.015
123	0.025	0.015
124	0.024	0.013
125	0.025	0.013
126	0.023	0.014
127	0.02	0.014
128	0.018	0.013
129	0.017	0.013
130	0.016	0.013
131	0.016	0.013
132	0.016	0.012
133	0.014	0.012
134	0.015	0.012
135	0.014	0.012

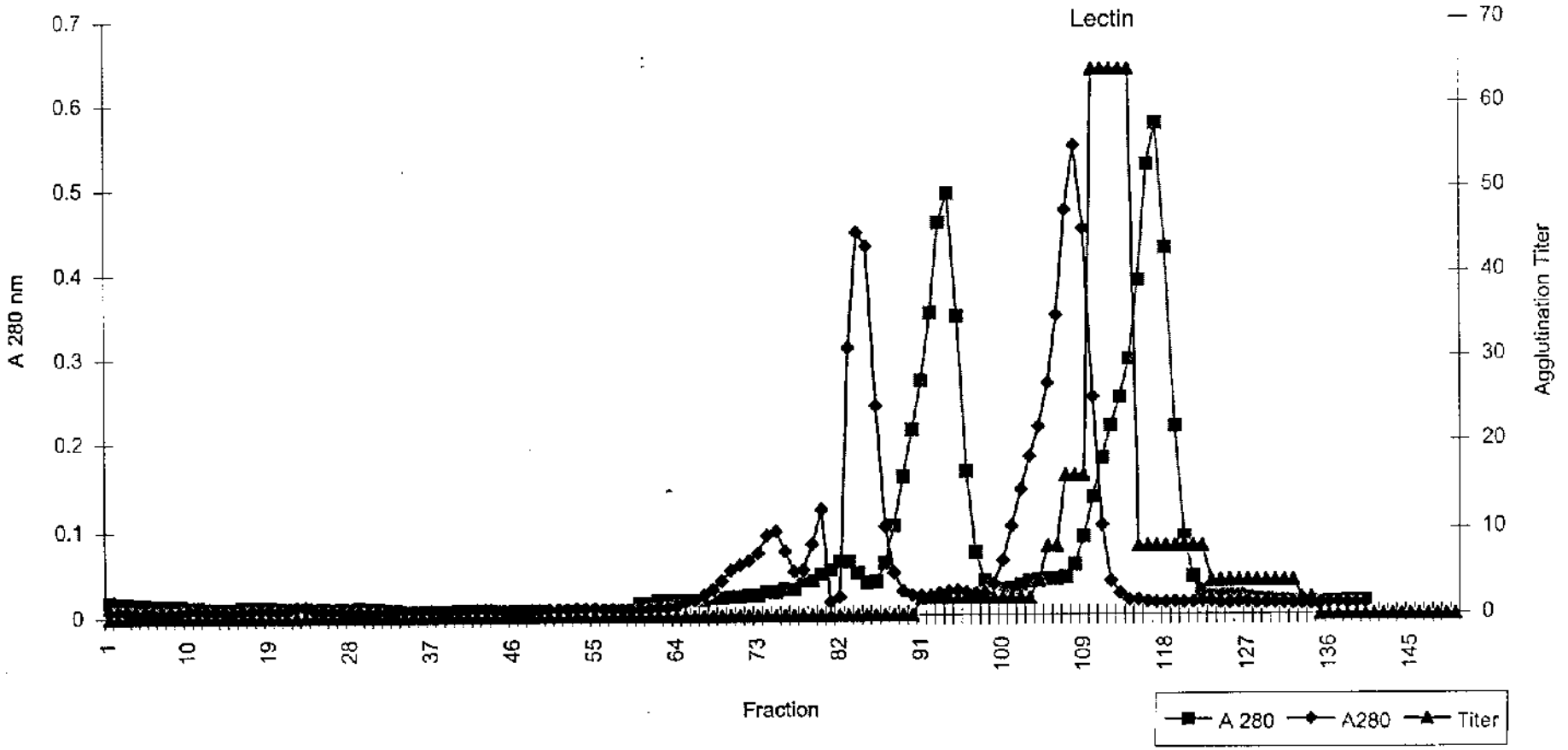
136	0.015	0.013
137	0.015	0.013
138	0.016	0.012
139	0.016	0.012
140	0.016	0.013



รูป 3.12 โครมาโทแกรมของ Blue dextran, Albumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen, Ribonuclease A โดยคอลัมน์ Sephacryl S - 200

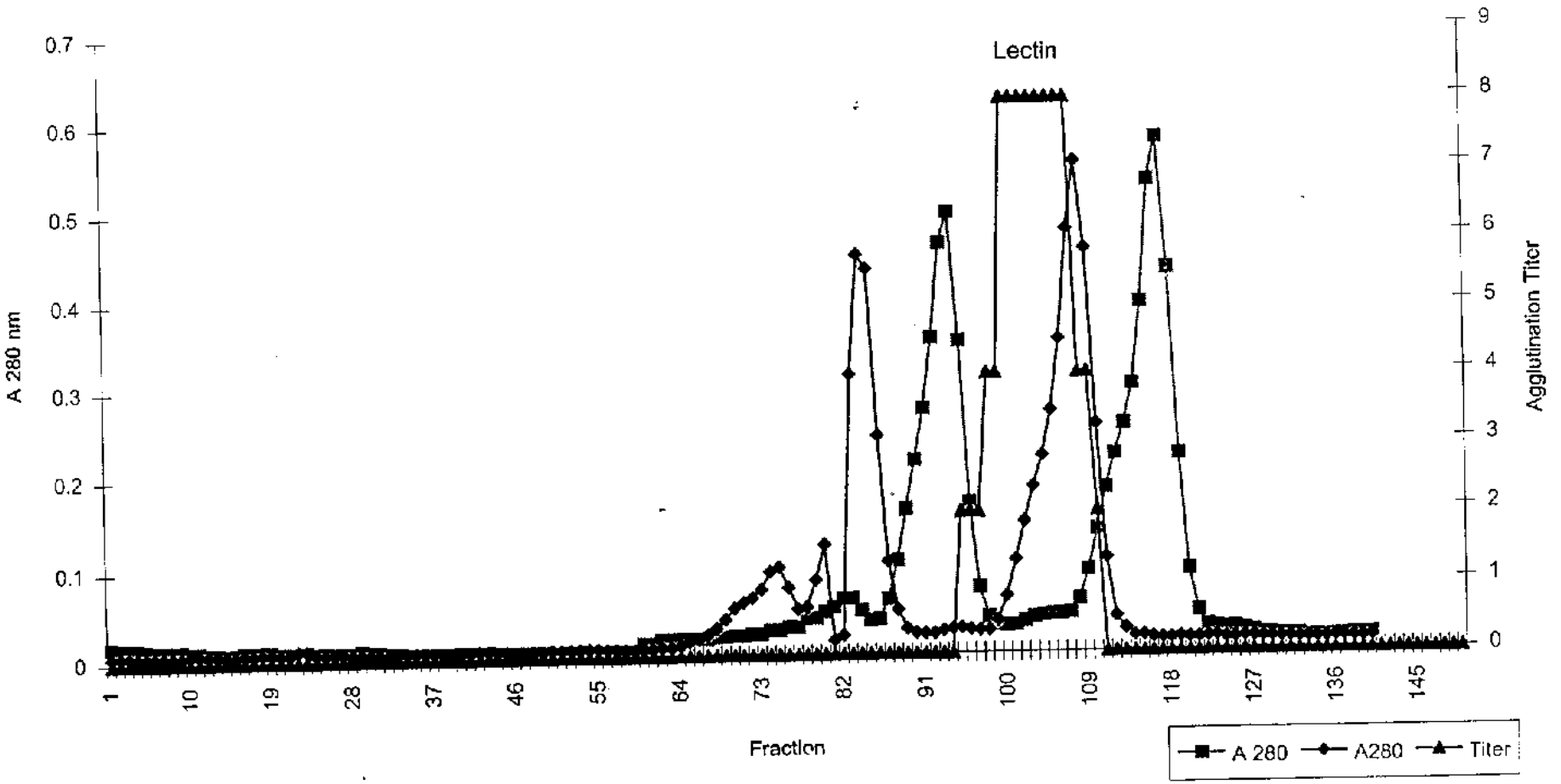


รูป 3.13 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

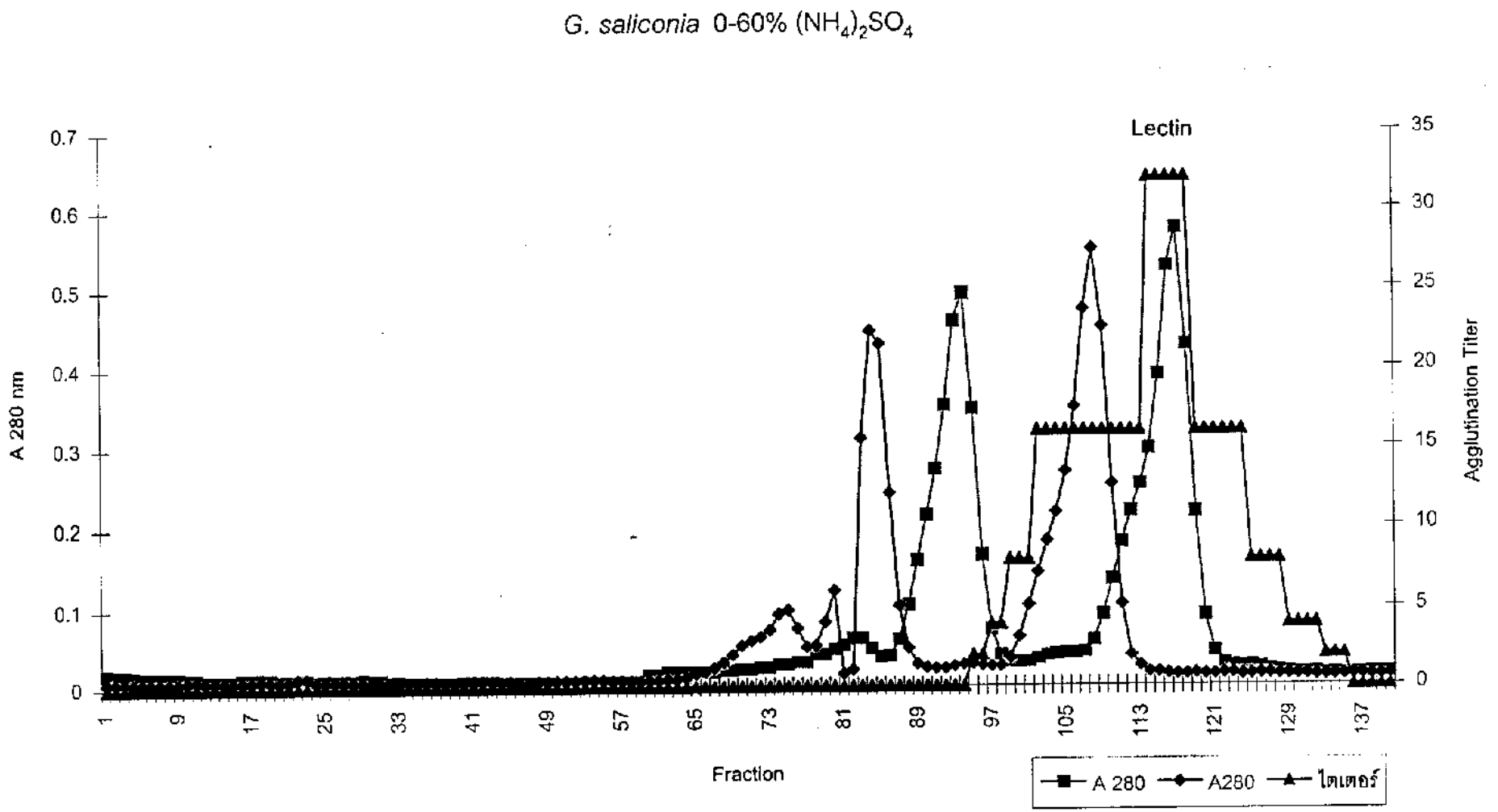


รูป 3.14 โครมาโทแกรมของ *Gracilaria verrucosa* 0 - 60 % $(NH_4)_2SO_4$ โดยคอลัมน์ Sephacryl S - 200

Gracilaria sp. (fisheri type) บางแสน 0-60% $(NH_4)_2SO_4$



รูป 3.15 โครมาโทแกรมของ *Gracilaria* sp. (fisheri type) 0 - 60 % $(NH_4)_2SO_4$ โดยคอลัมน์ Sephacryl S - 200



รูป 3.16 โครมาโทแกรมของ *Gracilaria saliconia* 0 - 60 % $(NH_4)_2SO_4$ โดยคอลัมน์ Sephacryl S - 200

สรุปและวิจารณ์

4.1 สมบัติของสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเล

สาหร่ายทะเลที่นำมาสกัดเลคตินได้แก่ *Gracilaria verucosa* จากอ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี *Gracilaria* sp.(fisheri type) จากหาดบางแสน และ *Gracilaria saliconia* จากจังหวัดระยอง จากการศึกษาสมบัติบางประการของเลคตินจากสาหร่ายทะเลสรุปได้ดังนี้

1. การสกัดเลคตินจากสาหร่ายทะเลสามารถใช้น้ำกลั่น, 0.85% โซเดียมคลอไรด์ หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเกลือโซเดียม (PBS) ในอัตราส่วนสาหร่ายทะเลสดต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ต่อ 5 ปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสไว้ใช้ทดสอบสมบัติอื่นได้นาน 2 อาทิตย์

2. การตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง พบว่าสิ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มได้ แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนและสัตว์อื่นๆ เช่นกระต่าย หนู ห่าน และแกะเกาะกลุ่มได้ ยกเว้นเลคตินจาก *Gracilaria* sp.(fisheri type) และ *Gracilaria saliconia* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงม้าเกาะกลุ่มได้

3. เลคตินจากสาหร่ายทะเล G. verucosa สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ และ โอที่ปรับปรุงด้วยปาเปนเกาะกลุ่มได้ ซึ่งเลคตินจาก *Gracilaria* sp.(fisheri type) ไม่มีคุณสมบัตินี้ สำหรับเลคตินจาก *G. saliconia* จะได้มีการทดสอบต่อไป

4. จากการทดสอบความต้องการโลหะไอออนของเลคตินในการช่วยทำให้เกาะกลุ่ม พบว่าสิ่งสกัดไม่ต้องการโลหะไอออนช่วยทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

5. การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคตินโดยทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยคาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ พบว่าเลคตินจับจำเพาะกับไกลโคโปรตีนคือ ไวซิน หรือเฟตูอิน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยเลคตินที่ได้จากสาหร่ายทะเล โดย Rogers และ Fish 1991) สรุปไว้ว่าเลคตินจากสาหร่ายทะเลสีแดงส่วนใหญ่ถูกยั้งยั้งโดยไกลโคโปรตีนมากกว่ามอโนซคคาร์ไรด์

6. การทดสอบการเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์โดยใช้ *E. coli* *Staphylococcus aureus* พบว่าเลคตินจาก *G. verrucosa* ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถทำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวเกาะกลุ่มได้แต่ไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากสัตว์น้ำในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มที่เกิดโรคจำนวน 20 ชนิดพบว่าเลคตินจาก *Gracilaria* sp.(fisheri type) *G. verrucosa* และ *Gracilaria saliconia* ยังไม่สามารถทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่มได้ ซึ่งจะได้มีการทดลองต่อไป เนื่องจากเลคตินมีความจำเพาะกับน้ำตาลที่ผิวเซลล์การทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่มอาจช่วยในการจำแนกชนิดจุลินทรีย์

7. เลคตินจากสาหร่าย *G. verrucosa* สูญเสียความสามารถในการทำงานที่อุณหภูมิตั้งแต่ 60 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป และสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้ดีกว่ากรด สำหรับสาหร่ายทะเล *Gracilaria* sp.(fisheri type) และ *Gracilaria saliconia* จะได้มีการศึกษาต่อไปคุณสมบัติการทนต่อความร้อน และความเป็นกรด-ด่าง ทำให้สามารถช่วยตัดสินใจในการเลือกบัฟเฟอร์ที่จะใช้ในการทำเลคตินให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี และสภาวะแวดล้อมขณะทำการทดลอง จากข้อมูลของ *G. verrucosa* การทำเลคตินจากสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิดให้บริสุทธิ์ได้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

8. การทดลองทำเลคตินจากกราซิลาเรียให้บริสุทธิ์ขึ้นในเบื้องต้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเลคตินจาก *G. verucosa* ตกตะกอนได้มากที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-75 % $(NH_4)_2SO_4$ มีค่า specific activity = 13,561 titer/mg *Gracilaria* sp. (fisheri type) ตกตะกอนได้มากที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-70 % $(NH_4)_2SO_4$ มีค่า specific activity = 4,112 titer/mg ส่วนเลคตินจาก *G. saliconia* ตกตะกอนได้มากที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-70 % $(NH_4)_2SO_4$ มีค่า specific activity = 188,821 titer/mg

8. การไดอะไลซ์เลคตินที่ตกตะกอนด้วยเกลือพบว่าความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มใกล้เคียงกับก่อนไดอะไลซ์ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปผ่านลงในจลฟิลเตรชัน

9. เลคตินที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วสามารถเก็บไว้เพื่อใช้ในงานวิจัยได้ประมาณ 1 ปี ข้อควรคำนึงคือสาหร่ายทะเลที่จะนำมาสกัดเพื่อเก็บสิ่งสกัดไว้ได้นานต้องมีภาพสมบูรณ์ ถ้าสามารถดำลงไปเก็บใต้น้ำได้จะได้สาหร่ายสดมีคุณภาพดีกว่าตามชายหาด

และสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ในบ่อดินมีคุณภาพดีกว่าที่เลี้ยงในถังไฟเบอร์ โดยที่คุณภาพวัดจากปริมาณเลคตินที่ได้ในแต่ละครั้งที่สกัดคิดเป็นไดเตอร์

4.2 เลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากสาหร่ายทะเล

เทคนิคที่ใช้ในการทำเลคตินจากสาหร่ายทะเลให้บริสุทธิ์ คือ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และเจลฟิลเตรชัน เนื่องจากจุดมุ่งหมายของงานวิจัยต้องการเปรียบเทียบชนิดของเลคตินจากสาหร่ายทะลทั้ง 3 ชนิดว่าเหมือนหรือคล้ายคลึงกันหรือไม่ แหล่งและปริมาณสาหร่ายทะเลที่ต้องมีเพียงพอในการทำวิจัยระยะยาว รวมทั้งแนวทางในการประยุกต์ใช้ จึงใช้เพียงแค่ 2 วิธี ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. การทำเลคตินให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นและหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเลคติน ได้ทำการทดลองผ่านเลคตินที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตลงในคอลัมน์ประเภทเจลฟิลเตรชันที่บรรจุด้วย Sephacryl S-200 พบว่าเลคตินจากสาหร่ายทะเล *G. verrucosa*, *Gracilaria* sp. (fisheri type) และ *G. saliconia* มีน้ำหนักโมเลกุล 18,000, 26,500 และ 14,500 ดาลตัน ตามลำดับ

2. การทดสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ SDS-PAGE electrophoresis ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue พบว่าแถบโปรตีนของสิ่งสกัดหยาบนั้นบางมากไม่สามารถบอกได้ว่าแถบไหนเป็นเลคติน ส่วนแถบของโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและที่ผ่านเจลฟิลเตรชันให้แถบของโปรตีนที่ชัดเจน 4 แถบ สรุปได้ว่าเลคตินที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ และการย้อมสีโปรตีนอาจต้องเปลี่ยนไปใช้ silver stain ที่มีความไวในการทดสอบมากกว่า Coomassie blue 10 เท่า เพื่อให้เห็นแถบของโปรตีนชัดเจนขึ้น ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินโดย SDS-PAGE จาก *Gracilaria* sp. (fisheri type) *G. verrucosa* และ *G. saliconia* พบว่าเลคตินมีน้ำหนักโมเลกุล 24,000, 33,000 และ 24,000 ดาลตัน ตามลำดับ

3. เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินจากเจลฟิลเตรชันและจาก SDS-PAGE เลคตินจากสาหร่ายทะเลทั้ง 3 ชนิดน่าจะมีเพียง 1 หน่วยย่อย จากการศึกษาของ Kaita,H และคณะ (1999) ซึ่งได้แยกเลคตินจากสาหร่ายทะเล G. verrucosa โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออน และเจลฟิลเตรชัน พบว่าการแยกเลคตินโดยใช้เจลฟิลเตรชัน ได้พีคของเลคติน 2 พีค คือพีคที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก 49kDa 1 พีค และอีกหนึ่งพีคมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย 51 kDa 1พีค และพีคที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยนี้ไม่ถูกยับยั้งด้วยน้ำตาลหรือไกลโคโปรตีน เช่น asilofetuin และ fetuin ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงไก่เกาะกลุ่มได้ และทนความร้อน100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สมบัติเหล่านี้แตกต่างจากข้อมูลของงานวิจัยนี้มาก ดังนั้นต้องทำการทดสอบซ้ำโดยเพิ่มขั้นตอนในการทำเลคตินให้บริสุทธิ์ ได้แก่ การใช้โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออน การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง การทำ native electrophoresis เปลี่ยนสีย้อม SDS-PAGE จาก Coomassie brilliant เป็น Alcian blue และอาจจะต้องวิเคราะห์โปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส 2 มิติ

ข้อเสนอแนะ

เลคตินจากสาหร่าย *Gracilaria* sp.(fisheri type) และ *G. verucosa* มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณใกล้เคียงกัน เลคตินที่สกัดได้อาจเป็นชนิดเดียวกัน หรือสาหร่ายทะเลดังกล่าวอาจเป็นชนิดเดียวกัน แต่มีลักษณะภายนอกต่างกันเนื่องจากคุณภาพของน้ำทะเลหรือฤดูกาล ถ้าต้องการทราบข้อมูลในส่วนนี้ต้องทำเลคตินให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนโดย HPLC หลังจากนั้นตรวจสอบลำดับของกรดอะมิโน ซึ่งค่าใช้จ่ายในส่วนนี้สูงมาก อย่างไรก็ตามการทราบถึงรายละเอียดของเลคตินอาจช่วยในการจำแนกชนิดของสาหร่ายทะเลได้ดีขึ้น ตัวอย่าง *G. verucosa* ที่ได้มีรายงานมาก่อนแล้วว่าสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม (Hori และคณะ, 1981 Chiles และ Bird, 1989) นักวิทยาศาสตร์ในญี่ปุ่นที่ทำการศึกษาเช่น Ssiomi และคณะ, 1981, Kanoh และคณะ, 1992 Kakita และคณะ 1999 เป็นต้น ทำให้ได้ข้อมูลใหม่ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลเดิม ในประเทศไทยมีสาหร่ายทะเลกราซิลาเรียอยู่หลายชนิด มีหลายชนิดที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ชัดเจน งานวิจัยที่จะทำต่อไปจะมุ่งเน้นที่ความสามารถในการทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่ม และสมบัติในการยับยั้งจุลินทรย์โดยใช้เลคตินที่ทำให้ตกตะกอนและผ่านเจลฟิลเตรชันแล้ว ซึ่งจะมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้งานต่อไป รวมทั้งการทำเลคตินให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

กาญจนจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์ (2527) สาหร่ายทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 343 หน้า

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, ธิดารัตน์ น้อยรักษา และปิยะวรรณ ศรีวิลาศ (2540) การศึกษาเลคตินในสาหร่ายทะเลจากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย รายานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 63 หน้า

ดารารัตน์ ทองขาว (2536) เลคติน : โปรตีนจับจำเพาะคาร์โบไฮเดรต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 215 หน้า

มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ (2542) ชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 589 หน้า

ธนากร บุญโพธิ์ทอง (2535) การปรับปรุงกระบวนการทำเลคตินจากเมล็ดคำบูชา (*Crotalaria juncea*) ให้บริสุทธิ์และการใช้เลคติน วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 92 หน้า

Adams, N.M. (1994) Seaweeds of New Zealand an lilustrated Guid, Canterbury University Press, New Zealand, 360 pp.

Benevides, N.M.B., Holanda, M.L., Melo, F.R., Pereira, M.G., Monteiro, A.C.O.and Freitas, A.L.P. (2001) Purification and Partial Characterization of the Lectin from the Marine Green Algae *Caulerpa cupressoides*. (Vahl) C. Agardh , Botanica Marina 44, 17-22.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utillizing thr principle of protein dye binding, Anal. Biochem. **72**, 248-254.

Chiles, T.C. and Bird, K.T. (1989) A comparatives study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae, Comp. Biochem. Physiol. **94B**, 107-111.

Dawes, C.J. (1981) Marine Botany, A Wiley-Inter Science Publication, New York, 628 pp.

Ortiz, R., Sanchez, R. Paez, A., Montano, L.F. and Zenteno, E. (1992) Induction of Intestinal Malabsorption Syndrome in Rats Fed with Agaricus bisporus Mushroom Lectin, J. Agric. Food Chem. 40, 1375-1378.

Rogers,D.J. and Fish, B.C. (1991) Marine algal lectins. *In* kilpatrick, D.C., Driessche, E.V. and Bog-Hansen, T.C. (eds.), Lectin Reviews Volume 1. Sigma Chemical Company, st. Louis, pp. 129-142.

Taylor, W.R. (1979) Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas, Ann Arbor The University of Michigan Press,870pp.

ภาคผนวก

APPENDIX II

FRACTIONATION WITH SOLID AMMONIUM SULFATE

Final concentration of ammonium sulfate—% saturation at 0°C

Initial concentration of ammonium sulfate, % saturation at 0°C	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	solid ammonium sulfate to add to 100 ml of solution																
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.5	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9
65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
80													0	3.3	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5
90															0	3.4	7.0
95																0	3.5
100																	0

Reprinted by permission of the Oxford University Press (Oxford) from *Data for Biochemical Research*, 2nd ed. Edited by R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones. © Oxford University Press 1969.

Certificate of Analysis

Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit

PRODUCT NUMBER:	17-0442
LOT NUMBER:	7080442011
STORE:	+4°C
SHIP:	Ambient

CONTENTS: Each vial contains a lyophilized protein standard (excluding the vial of Blue Dextran). Reconstitute the protein standard with eluent buffer at a concentration of 5–20 mg/ml.

QUALITY CONTROL

(1) Ribonuclease A
Physical appearance: White to off-white color
Solubility of lyophilized product: Clear liquid at 25 mg/ml

Percent Purity =	100%
specification:	≥80%
Percent Recovery from gel filtration column =	90.4%
specification:	≥90%
Calculated molecular weight =	15.7 kDa
specification:	13.7 kDa ± 15%

(2) Chymotrypsinogen A
Physical appearance: White to off-white color
Solubility of lyophilized product: Clear liquid at 25 mg/ml

Percent Purity =	100%
specification:	≥80%
Percent Recovery from gel filtration column =	99.4%
specification:	≥90%
Calculated molecular weight =	20.7 kDa
specification:	25.0 kDa ± 25%

(3) Ovalbumin
Physical appearance: White to off-white color
Solubility of lyophilized product: Clear liquid at 25 mg/ml

Percent Purity =	100%
specification:	≥80%
Percent Recovery from gel filtration column =	91.3%
specification:	≥90%
Calculated molecular weight =	46.3 kDa
specification:	43.0 kDa ± 15%

(4) Albumin
Physical appearance: Pale yellow color
Solubility of lyophilized product: Clear liquid at 25 mg/ml

Percent Purity =	100%
specification:	≥80%
Percent Recovery from gel filtration column =	93.1%
specification:	≥90%
Calculated molecular weight =	64.6 kDa
specification:	67.0 kDa ± 10%

Gel Filtration Calibration Kit
Instruction Manual
for Protein Molecular Weight Determinations by Gel Filtration

11-B-033-08
Rev. 2

Pharmacia Biotech

GEL FILTRATION CALIBRATION KIT INSTRUCTION MANUAL

• INTRODUCTION

The use of gel filtration chromatography for the determination of the molecular weight and size of proteins is well documented. The technique is based on the well-established ability of gel filtration media, such as Sephadex®, Sepharose®, and Sephacryl®, to separate molecules according to size. Molecular weight determinations by gel filtration are carried out by comparing some elution volume parameter, such as K_{av} of the substance of interest, with the values obtained for several known calibration standards.

In practice it is found that for a homologous series of compounds a sigmoidal relationship exists between their various elution volume parameters and the logarithm of their molecular weights. A calibration curve is prepared by measuring the elution volumes of several standard substances, calculating their corresponding K_{av} values (or similar parameter), and plotting their K_{av} values versus the logarithm of their molecular weight. The molecular weight of an unknown substance can then be determined from the calibration curve once its K_{av} value is calculated from its measured elution volume. For accurate determination of molecular weight, the calibration standards must have the same relationship between molecular weight and molecular size as the substance of interest. Pharmacia Calibration Kits provide highly purified, well-characterized, globular protein standards for protein molecular weight determination.

• CONTENTS OF CALIBRATION KITS

Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit

Protein	Molecular Weight	Stokes' Radius (Å)	Source
ribonuclease A	13,700	16.4	bovine pancreas
chymotrypsinogen A	25,000	20.9	bovine pancreas
ovalbumin	43,000	30.5	hen egg
albumin	67,000	35.5	bovine serum
Blue Dextran 2000			

High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit

Protein	Molecular Weight	Stokes' Radius (Å)	Source
aldolase *	158,000	48.1	rabbit muscle
catalase *	232,000	52.2	bovine liver
ferritin *	440,000	61.0	horse spleen
thyroglobulin	669,000	85.0	bovine thyroid
Blue Dextran 2000			

Each kit contains 50 mg of each protein and 50 mg of Blue Dextran 2000.

* These proteins are supplied mixed with sucrose or mannitol to maintain stability and aid in their solubilization. The percent of protein in each vial is indicated on the label. This quantity should be taken into consideration when making solutions of these proteins to apply to the column.

• SUMMARY OF INSTRUCTIONS FOR USE OF CALIBRATION KITS

		Further Details on Page
1)	Select a gel so that the expected molecular weight of your sample falls approximately in the middle of the fractionation range for that gel.	2
2)	Prepare the gel in the desired buffer. A buffer with a pH of 6 to 8 and an ionic strength >0.1 is suggested.	5
3)	Carefully pack, equilibrate, and adjust the flow rate of a column following the proper procedure.	7
4)	Prepare a fresh solution of Blue Dextran 2000 (1.0 mg/ml) in the eluent buffer. Apply a sample to the column [sample size = 1-2% of the total gel bed volume (V_t)] to determine the void volume (V_o), and check the column packing.	9
5)	Choose the proper Calibration Kit proteins. Include Calibration Kit proteins of a higher molecular weight and of a lower molecular weight than that of the sample.	9
6)	Dissolve the proper combination of Calibration Kit proteins in the eluent buffer. The concentration of each protein should be between 5 to 20 mg/ml (except ferritin 1 mg/ml).	10
7)	Apply Calibration Kit proteins to the column, preferably via a 3-way valve and a flow adaptor. The volume of the calibration solution should be 1-2% of the total gel bed volume (V_t).	10
8)	From a UV chromatogram, determine the elution volumes (V_e) for the Calibration Kit proteins by measuring the volume of the eluent from the point of application to the center of the elution peak.	11
9)	Calculate the K_{av} values for the Calibration Kit proteins and prepare a calibration curve of K_{av} versus log molecular weight.	11
10)	Apply the unknown sample (volume = 1-2% of V_t) and determine the elution volume (V_e) of the component of interest.	13
11)	Calculate the corresponding K_{av} for the component of interest and determine its molecular weight from the calibration curve prepared with the Calibration Kit proteins.	13

• DETAILED INSTRUCTIONS

Gel and Calibration Kit Selection

Fig.1 (p.3) illustrates the molecular weight determination ranges for Sephadex, Sepharose and Sephacryl. These ranges are based on the linear portion of the calibration curve for these gels.

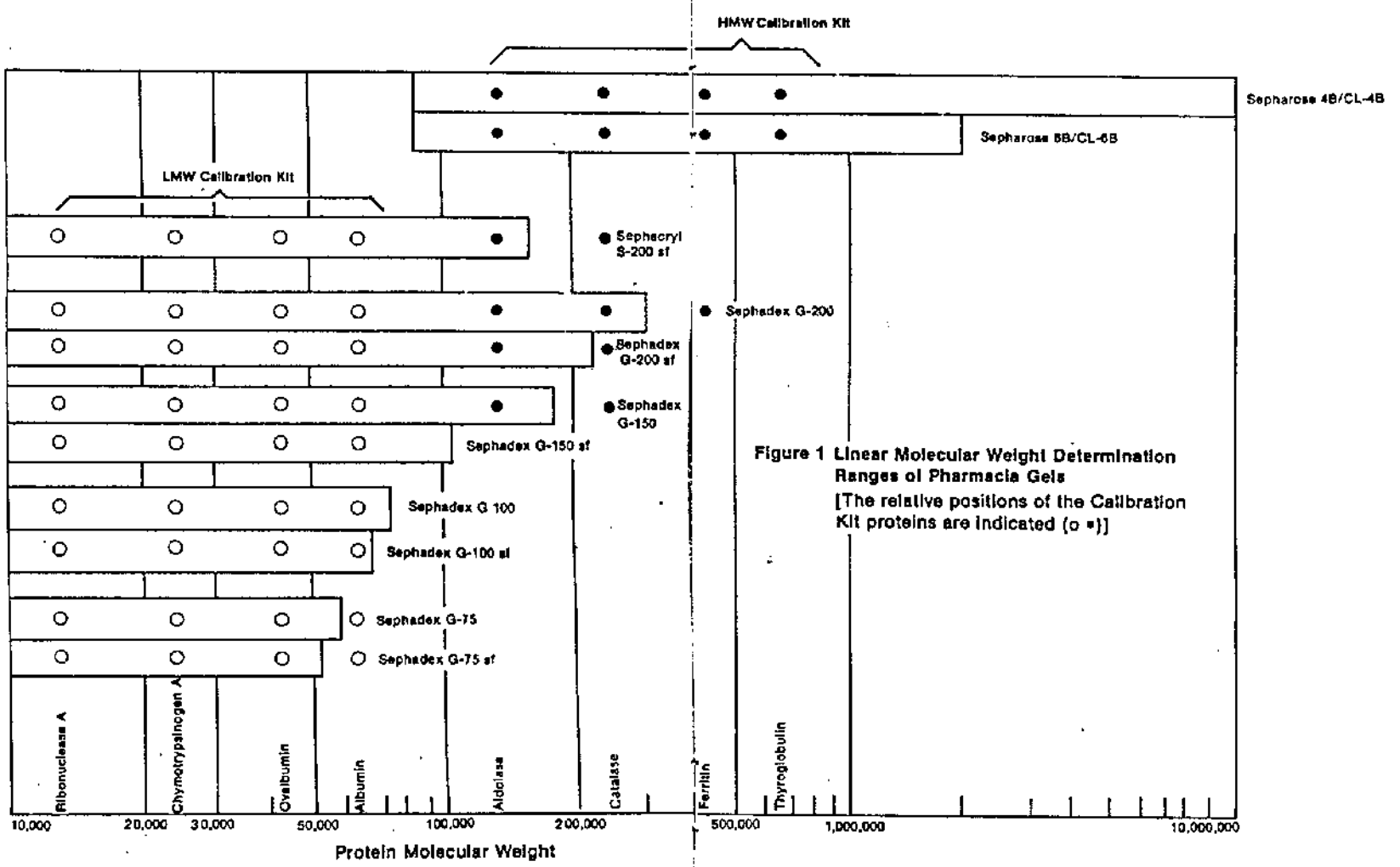


Figure 1 Linear Molecular Weight Determination Ranges of Pharmacia Gels

[The relative positions of the Calibration Kit proteins are indicated (o •)]

The relative elution positions of low molecular weight (o) and high molecular weight (•) Calibration Kit proteins are indicated on the bar graphs for the various gels.

Select a gel so that the sample's expected molecular weight falls approximately in the middle of that gel's molecular weight determination range. Sephacryl S - 200 Superfine can be used for a preliminary, quick approximation of the sample's molecular weight, if it is totally unknown.

The proper choice of Calibration Kit proteins should include protein standards that are higher and lower in molecular weight than the sample. Therefore, the following recommendations are made on the choice of Calibration Kits:

Calibration Kit(s)	Gel
LMW	Sephadex G-75, G-75 sf
LMW	Sephadex G-100, G-100 sf
LMW	Sephadex G-150 sf
HMW	Sepharose 6B/CL-6B
HMW	Sepharose 4B/CL-4B
LMW, HMW	Sephadex G-150
LMW, HMW	Sephadex G-200, G-200 sf
LMW, HMW	Sephacryl S-200 sf

Gel Preparation

To assure the best results, it is recommended that careful attention be given to gel preparation and column packing. It is suggested that a buffer with a pH of 6 to 8 and an ionic strength of >0.1 be employed with the Calibration Kit proteins.

Sephadex

1. With gentle mixing, slowly add the required amount of Sephadex (Table 1, p.6) to a volume of buffer equal to three times expected bed volume.
2. Allow the gel to swell for the period of time shown in Table 1. Continuous stirring should be avoided. Do not use magnetic stirrer.
3. Resuspend the gel and allow it to settle for approximately 20 minutes.
4. Remove excess buffer and fine particles by suction.
5. Resuspend the gel in a volume of buffer approximately equal to the settled volume of gel.
6. Degas the buffer and gel slurry.
7. The gel slurry should reach the temperature of column operation before bed packing is begun. (The Calibration Kit proteins may be chromatographed at room temperature, however, cold room operation may be desirable if sample proteins are labile at room temperature.)

Table 1

PHYSICAL DATA FOR PHARMACIA GELS

	Sephadex				Sepharose/CL-			Sephacryl S-200 SF
	G-75	G-100	G-150	G-200	6B	4B	2B	
Gel Bed Volume (ml/gm dry weight) —	15	20	30	40	Supplied Swollen			Supplied Swollen
Swelling Time 20°C (hrs) —	24	48	72	72	Supplied Swollen			Supplied Swollen
Swelling Time 90°C (hrs) —	3	5	5	5	Supplied Swollen			Supplied Swollen
Maximum Packing Pressure (cm of H_2O) —	160	96	36	16	200	80	40	Pack at constant flow rate of 40 ml/cm²-hr* [0.5-1.0 Kp/cm² (7-14 psi)]
Recommended Operating Flow Rate (ml/cm²-hr) *	2-5 (ml/cm²-hr)							2-30 (ml/cm²-hr)

* Absolute flow rate = cross-sectional flow rate x cross-sectional area of column in cm² (column)

Sepharose and Sephacryl

1. Suspend the pre-swollen gel in buffer equivalent to approximately three times the volume of settled gel.
2. Allow the gel to settle and decant the excess buffer.
3. Repeat the buffer suspension and decanting two more times to allow preliminary equilibration of the gel with the eluent buffer.
4. A) Resuspend *Sepharose* in a volume of buffer approximately equal to the settled volume of gel.
   B) Resuspend *Sephacryl* in a volume of buffer approximately *30% in excess* of the settled volume of gel.
5. Degas the buffer and gel slurry.

Column Selection

Although molecular weight determination by gel filtration can be conducted in a very simple manner by descending column chromatography, for best results, reliability and convenience, it is recommended that a 2.6 x 40 cm column with two flow adaptors be employed (such as the Pharmacia K26/70 column with flow adaptors). Flow adaptors enhance the ease of column operation by allowing simple, quick, and reproducible sample application, as well as upward flow elution. A bed length of 40 cm is sufficient for most determinations although longer columns may be employed.

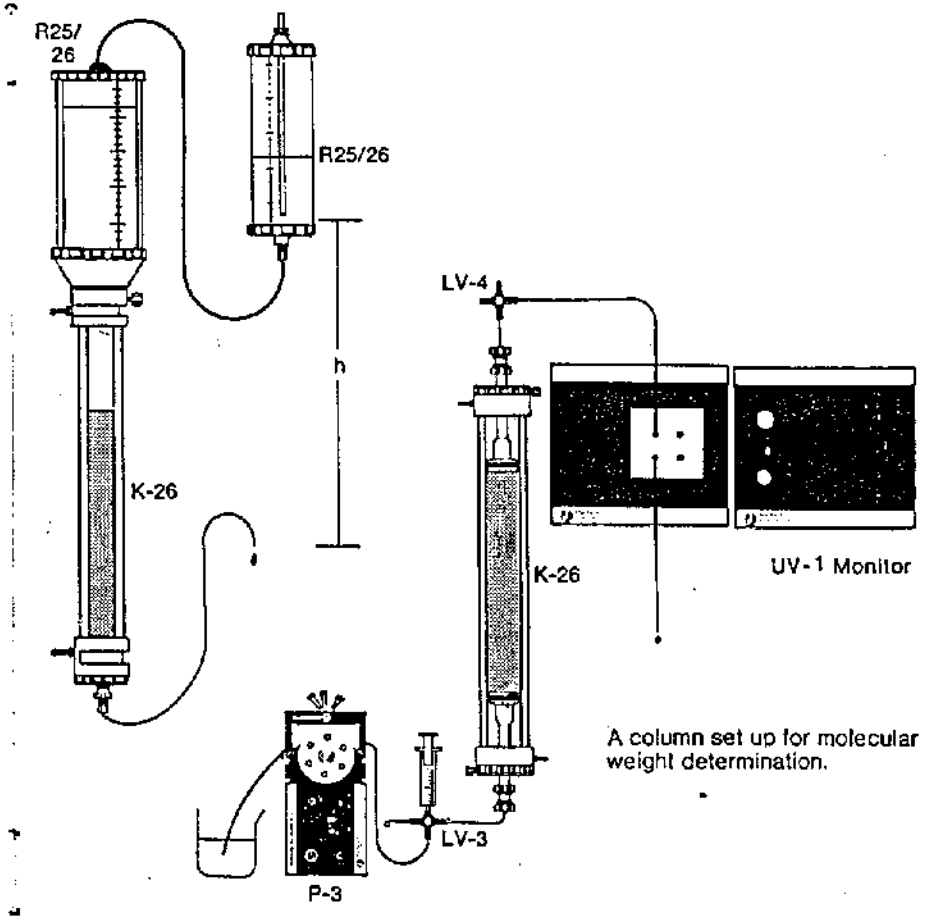
Bed Packing

1. Mount the column and packing reservoir vertically, check for leaks and remove any trapped air from the bed support. A recommended column setup is shown in Figure 2. (p. 8)
2. Fill the column with buffer to a height of 5 to 10 cm and turn off column flow.
3. Suspend swollen gel and carefully pour all the slurry into the gel reservoir. The concentration of slurry should be such that air bubbles which may be formed can readily rise to the surface.
4. Allow the gel to settle for 5 minutes.
5. A) *Sephadex and Sepharose* — Establish recommended hydrostatic pressure shown in Table 1, then open column outlet. Continue packing until the gel reaches a stable bed height and is equilibrated with the eluent buffer.
   B) *Sephacryl S-200 Superfine* — For best results with Sephacryl, the gel should be packed at a flow rate of about 40 ml/cm²-hr.* Pack the gel using downward elution at a constant flow rate of 40 ml/cm²-hr for approximately 2 hours. Secure a flow adaptor, just touching the upper gel surface, and elute upward; maintain the same flow rate for another 2 hours. The column is now ready for upward or downward chromatography at a maximum sustained flow rate of 30 ml/cm²-hr.

   For most gel bed lengths, this packing procedure requires use of a pump for packing and running the columns of Sephacryl because of the large hydrostatic

*Column flow rate = cross-sectional flow rate x column cross-sectional area in cm²

A column set up for packing. **Figure 2**



A column set up for molecular weight determination.

pressure head needed to achieve a 40 ml/cm²-hr flow rate. If a pump is not available, pack the Sephacryl at >200 cm of H_2O hydrostatic pressure and run the column at a hydrostatic pressure less than packing pressure.

Void Volume Determination

The elution volume for Blue Dextran 2000 is equal to the column void volume (V_o). Prepare a fresh solution of Blue Dextran 2000 (1.0 mg/ml) in the eluent buffer. The rate of solubilization of the Blue Dextran 2000 may be increased by heating the buffer to 50° C before adding the Blue Dextran 2000. Do not use Blue Dextran 2000 in buffers of pH lower than 5 on Sephadex and Sepharose, and in buffers below pH 7 on Sephacryl S-200 SF, as adsorption to the gel can result. Also, it is recommended that Blue Dextran 2000 be run *alone*, not mixed with the Calibration Kit or sample proteins, because of the chance of protein adsorption to the Blue Dextran.

Determine the elution volume (V_e) for a sample of the Blue Dextran 2000 Solution according to the procedures described under *Sample Application* and *Measurement of Elution Volumes*. The sample volume of Blue Dextran should be 1% of the total gel bed volume (V_t). The elution of Blue Dextran can be conveniently monitored at wavelengths of 254, 280, or 620nm.

Selection and Preparation of Calibration Standards

In order that the Calibration Kit proteins be sufficiently resolved, it is necessary that the appropriate protein mixtures be employed. In addition, the sample volume and protein concentration must be appropriate for the column size and sensitivity of the detection equipment.

When calibrating a column, it is recommended that the calibration proteins be run in at least two separate groups to insure enough resolution of their peaks for accurate elution volume measurement. Groups of Calibration Kit proteins that can be mixed together for a single chromatographic run on the various gels using a column of at least 40 cm in length are listed below.

For Calibration of:	Run I	Run II
Sephadex G-75, G-75 SF Sephadex G-100, G-100 SF Sephadex G-150 SF	ribonuclease A and ovalbumin	chymotrypsinogen A and albumin
Sephadex G-150 Sephadex G-200 SF Sephacryl S-200 SF	ribonuclease A, ovalbumin, and aldolase	chymotrypsinogen, albumin, and catalase
Sephadex G-200	ribonuclease A, ovalbumin, aldolase, and ferritin	chymotrypsinogen A, albumin, and catalase

For Calibration of:	Run I	Run II
Sepharose 6B/CL-6B Sepharose 4B/CL-4B	aldolase and ferritin	catalase thyroglobulin

Note: Recommended calibration proteins that will not be on the linear portion of the K_{av} vs. log molecular weight curve are:
albumin for Sephadex G-75, G-75 SF
catalase for Sephacryl S-200 SF
ferritin for Sephadex G-200

Each Calibration Kit protein should be dissolved to a concentration of 5 to 20 mg/ml, with the exception of ferritin, which needs to be dissolved to a concentration of only 1 mg/ml (since it has a much higher extinction coefficient at 280 nm than the other Calibration Kit proteins). At a 5 mg/ml concentration and a sample size of 1% of V_t, the Calibration Kit proteins will have a peak absorption of approximately 0.3 O.D. units. When making the calibration solutions containing aldolase, catalase and ferritin, remember to take into consideration that part of the solid material present is sucrose or mannitol.

To dissolve the Calibration Kit proteins:

1. Add a measured volume of buffer to the appropriate preweighed protein mixture.
2. Allow the sample to stand approximately 10 minutes.
3. Mix gently with a stirring rod. Do not heat or mix vigorously.

The resulting protein solutions should be completely dissolved and free of insoluble materials.

The sample volume applied to the column should be 1-2 ml. This represents a sample approximately 1% of the total gel bed volume (V_t) for a 2.6 x 40 cm gel bed.

Sample Application

Sample application is a critical step in liquid chromatography because unnecessary sample dilution and uneven penetration into the bed can result in zone broadening, adversely affecting resolution.

For Ascending Elution of Column using Flow Adaptors
(The Recommended Procedure) -

1. Vent any air from the 3-way valve using a syringe filled with eluent buffer.
2. Draw the sample into a syringe and attach the syringe to the valve being careful to exclude air bubbles.
3. Prepare the column monitoring and fraction collecting equipment. (See Figure 2)
4. Apply the sample manually or with syringe pump at a flow rate one-half that used for column elution.
5. (Optional) Apply 2 ml 10% sucrose in buffer immediately after sample to aid in sharp sample application.
6. Position the 3-way valve to start column elution, and adjust flow rate to agree with the value recommended in Table 1.

Measurement of Elution Volume (V_e)

For reproducible results, it is necessary that the elution volume of each component be determined as accurately as possible. If a device such as a continuously monitoring UV photometer or differential refractometer is used, the elution volume must be correlated to the elution profile. This can be achieved by automatic or manual indexing of the elution profile on a time, volume, or weight basis. A burette for measuring cumulative eluted volume with manual indexing of the eluted profile may also be used. The use of a pump to maintain a constant flow rate is advantageous. It is advisable to check the accuracy and reproducibility of whatever collection method is selected.

Determination of the elution volumes(V_e) for the Calibration Kit proteins from the elution profile is illustrated in Figure 3 (p12).

The elution volume is measured from the start of the sample application to the center of the elution peak, as determined by the intersection of the two tangents drawn to the sides of the peak. [When the sample is Blue Dextran 2000, V_e is then the void volume (V_o).]

Preparation of Calibration Curve

A molecular weight calibration curve defines the relationship between the elution volumes of a set of standard proteins and the logarithm of their respective molecular weights. Various elution parameters, such as V_e, V_e/V_o, K_d, erf^{-1} of K_d and K_{av} have been used in the literature for the preparation of calibration curves. The use of K_{av} is recommended in lieu of other elution parameters since: 1) it is less sensitive to errors which may be introduced as a result of variations in column preparation and column dimensions, 2) it does not require the unreliable determination of the gel internal volume (V_i) as is required with K_d , and 3) it does not require accessory mathematical tables as is required for the calculation of erf^{-1} of K_d.

The recommended procedure is:

1. Calculate K_{av} values for each protein using the equation

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

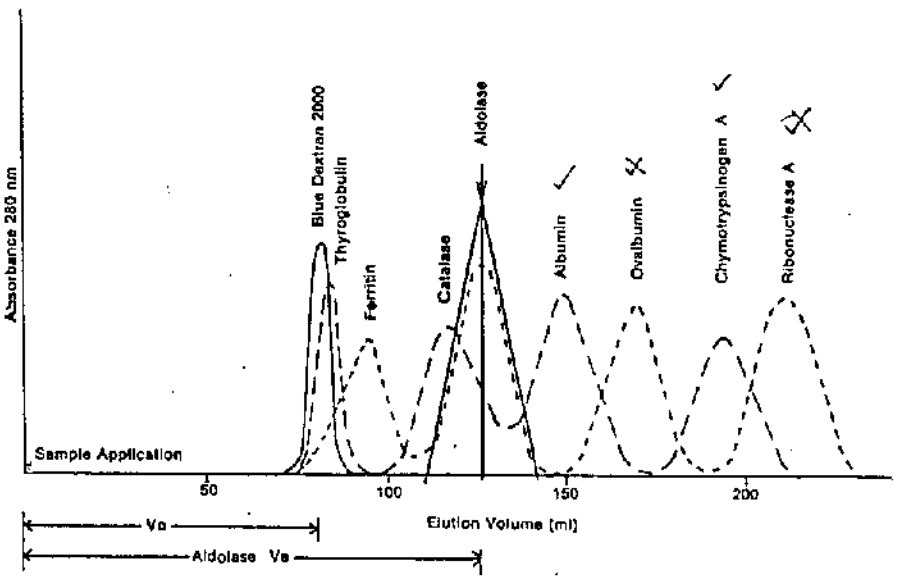
where V_e = elution volume for the protein
V_o = column void volume = elution volume for Blue Dextran 2000
V_t = total bed volume

2. Using semilogarithmic graph paper, plot the K_{av} value for each protein standard (on the linear scale) against the corresponding molecular weight (on the logarithmic scale).
3. Draw the straight line which best fits the points on the graph.

Note that proteins of molecular weights which approach the limits of the fractionation range for a given Sephadex will not have K_{av} values which fall on the linear portion of the calibration curve.

Figure 3 — Elution Profiles for Calibration Kit Proteins on Sephadex G-200

Column: K26/70 with flow adaptors
Bed Dimensions: 2.6 X 49.7 cm
V_o = 81 ml
Eluent: 0.05M potassium phosphate pH 7.5
containing 0.1M NaCl and 0.02% NaN_3
Sample Volume for each run = 1.0 ml
Flow Rate: 18 ml/hr.



	Samples				
1st Run (——)	Blue Dextran 2000	1mg/ml	3rd Run (– – –)	Ferritin	0.5mg/ml
2nd Run (——)	Thyroglobulin	2mg/ml		Aldolase	2mg/ml
	Catalase	5mg/ml		Ovalbumin	7mg/ml
	Albumin	7mg/ml		Ribonuclease	10mg/ml
	Chymotrypsinogen A	3mg/ml			

Figures 4,5 and 6 show examples of calibration curves which have been obtained using the Calibration Kit proteins on Sephadex G-75 Superfine (Figure 4, p. 14) Sephadex G-200 (Figure 5, p. 15), and Sepharose CL-6B (Figure 6, p. 16).

Chromatography of Proteins of Unknown Molecular Weight

1. Adjust the concentration of the sample to allow detection by a convenient method such as UV absorption or enzymatic activity, taking into consideration that a sample 1% of V_t will be diluted 8-15 fold during chromatography.
2. The sample volume should be equal to that used for calibration mixtures.
3. If necessary, centrifuge the sample to obtain a clear solution.
4. Apply the sample solution and elute according to the procedure used for the Calibration Kit proteins.

Molecular Weight Determination

1. Measure the elution volume (V_e) of the protein(s) of interest.
2. Calculate the K_{av} for the protein(s) of interest.
3. Locate the point on the calibration curve which corresponds to the K_{av} (or other elution volume parameter) value for the protein of unknown molecular weight. The value on the logarithmic scale which corresponds to this point is the estimated molecular weight of the protein.

In order to achieve the greatest precision and accuracy in the determination of molecular weights, it is important that *each* column be calibrated with the standard proteins and that the corresponding calibration curves be established. Errors in molecular weight estimations may occur for several reasons if each column is not calibrated. Variations in pore size distribution of gel preparations, column packing, and changes in composition, ionic strength, or pH of eluents may slightly alter elution parameters and consequently affect the slope or position of the calibration curve.

Molecular weight determinations by the above procedure assume the same relationship between molecular size and molecular weight for all unknowns and standards. All of the Calibration Kit proteins are, to a good approximation, globular in shape. The molecular weights of glycoproteins, lipoproteins, non-globular proteins, or other polymers may not correlate well to the calibration curves established for globular proteins by the Calibration Kit proteins. For such compounds, useful information can be obtained by relating their elution volume data to a molecular size parameter, such as Stokes' radius (R_s), rather than to molecular weight values. Plots of $\sqrt{-\log(k_{av})}$ vs. R_s have been used successfully to determine the Stokes' radius of proteins.

Storage

The Gel Filtration Calibration Kits should be stored at 4° C.

It is strongly recommended that solutions of the Calibration Kit proteins and Blue Dextran 2000 be *made fresh* just prior to their use as calibration standards. The

Figure 4 — Calibration Curve using the Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit on Sephadex G-75 Superfine

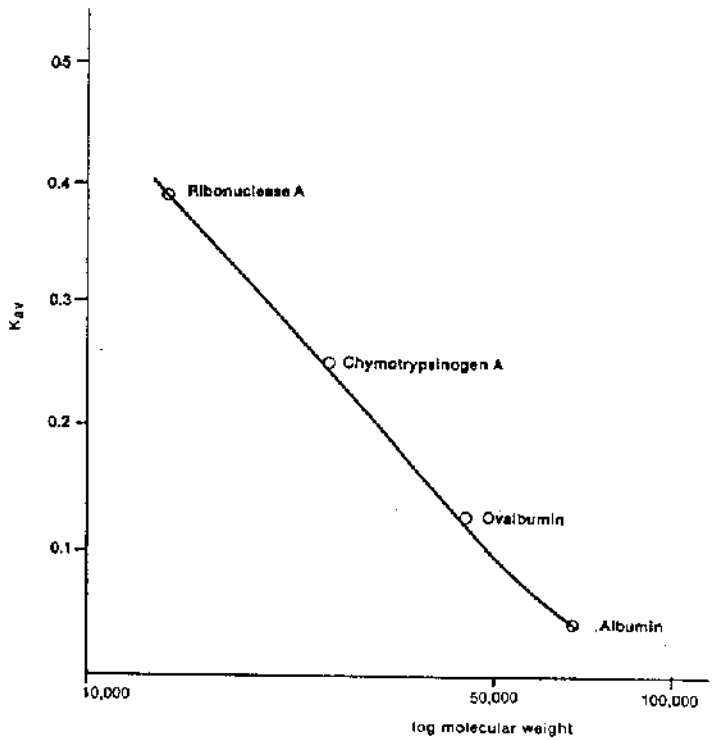


Figure 5 — Calibration Curve using both Low (○) and High (●) Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kits on Sephadex G-200

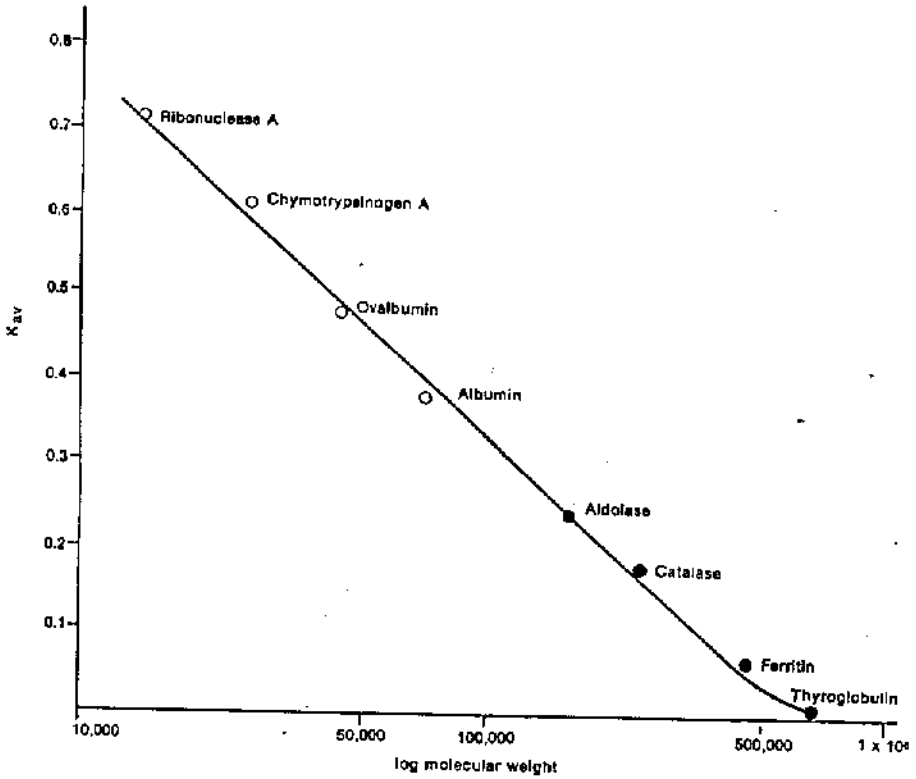
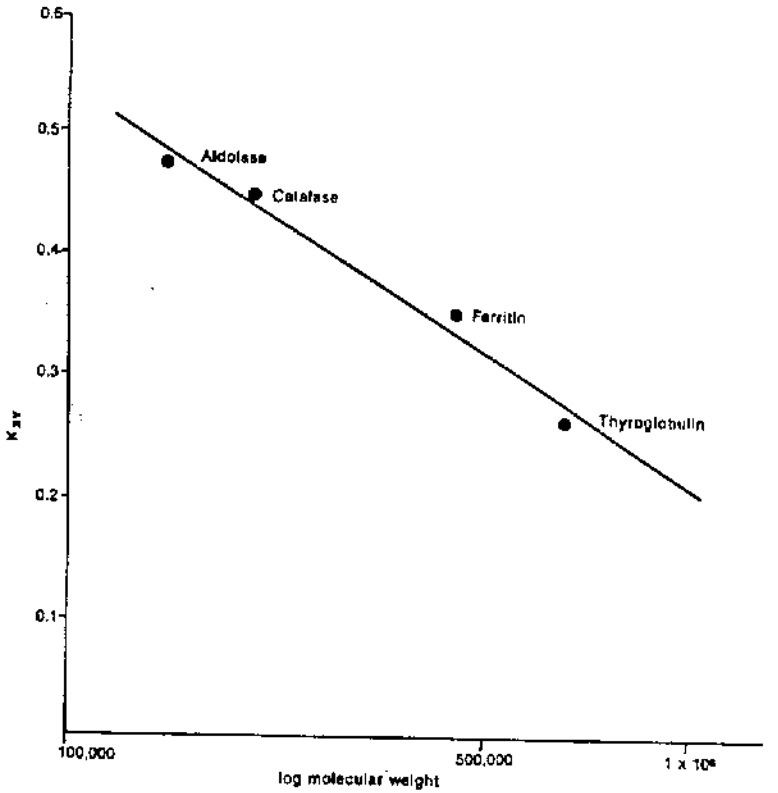


Figure 6 — Calibration Curve using the High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit on Sepharose CL-6B



quality of the Calibration Kit proteins when stored in solution is highly dependent on the particular protein and the composition of the buffer.

- **IMPORTANT NOTES:**

1. **The use of the Calibration Kits with Denaturing Solvents**
   The molecular weight determination ranges given in Table 1 are for globular proteins in their native conformations. The use of denaturing agents like sodium dodecyl sulfate, chaotropic salts and guanidine hydrochloride, and hydrogen bond disrupting agents, such as urea, may alter the molecular conformation of proteins often greatly increasing their hydrodynamic volumes. Since separations by gel filtration are based on molecular size, the molecular weight determination ranges change when the proteins assume extended conformations.

   In fact, the gel with the most useful molecular weight determination range and flow properties in solvents where proteins are completely denatured is Sepharose CL-6B (exclusion limit is approximately 120,000 for completely denatured proteins). The Low Molecular Weight Calibration Kit is suitable for a calibration of columns in denaturing solvents. These proteins are all comprised of a single polypeptide chain, therefore, their molecular weights do not change when they are exposed to denaturants (although their Stokes' Radii do change).

2. **Aggregation of Calibration Kit Proteins**

   The ribonuclease A, albumin, aldolase, ferritin and thyroglobulin standards may contain small amounts of apparent aggregates which elute in the void volumn or slightly before true peak. Tangents drawn to such peaks should neglect shoulders due to aggregates.

3. **Thin-Layer Gel Filtration on Sephadex**

   Sephadex thin-layer gel filtration can also be used for molecular weight determinations with the Calibration Kit when it is desirable to use small amounts of protein. The standard proteins are spotted on thin-layer plates which have been spread with the appropriate Sephadex. At the end of the experiment, the positions of the proteins are determined by staining, enzyme activity, etc. The migration distances of the protein standards are plotted against the logarithms of their molecular weights to obtain the calibration curve. The unknown molecular weight can then be read directly from the calibration curve.

4. **Electrophoresis Calibration Kits**

   The Pharmacia High Molecular Weight and Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kits contain protein standards for use in gel filtration chromatography *only*. Also available from Pharmacia Laboratory Separation are Calibration Kits containing protein standards for molecular weight determination by polyacrylamide gel electrophoresis.

P H A R M A C I A B I O T E C H

Sephacryl® S-100, S-200, S-300, S-400, S-500 High Resolution *INSTRUCTIONS*

To obtain good resolution in gel filtration, it is important that the column is well packed. An air bubble or a small disturbance in the gel bed will cause the sample zone to broaden. This broadening is amplified as the zone migrates down the column. The result is broader peaks and lost resolution.

With traditional packing methods you often get good results. However, a disadvantage is that the gel becomes most tightly packed at the bottom of the column, instead of at the top.

Pharmacia has developed an improved packing method which results in increased resolution. A short version of the packing method follows.

1. Insert an adaptor at the bottom of the column.
2. Pour the gel into the column and pack the column in 2 steps.
3. Insert the bottom piece or a second adaptor at the top.
4. Turn the column upside-down.

The sample will be applied in the most tightly packed zone of the gel, now at the top of the column. The result will be improved resolution.

We recommend you to follow this procedure since it has been shown to give the best results.

Equipment needed

	Laboratory scale		Process scale
Pump	P-1, P-50 or P-500		≈1800 ml/h
Column*	XK 16/40 XK 16/70 XK 16/100	XK 26/40 XK 26/70 XK 26/100	XK 50/60 XK 50/100
Cross-sectional area of the column	2.0 cm^2	5.3 cm^2	19.6 cm^2
Adaptor	AK 16	AK 26	AK 50
Packing reservoir	RK 15/16	RK 25/26	RK 50

* The first number in the column name refers to the inner diameter of the column in mm. The second number refers to the length of the column in cm.

C and HR columns can also be used. The C columns must be used with the appropriate thermostat jacket.

For preparative chromatography we recommend column XK 26/70.

52-2086-00

Edition AH

Pharmacia Biotech

Measuring cylinder, Large beaker, Buffer*, Glass rod, Small spoon or plastic spatula, (Pasteur pipette)

To prepare the gel suspension

1. Determine the desired packed bed volume by multiplying the cross-sectional area of the column (see table above) by the desired bed height.
2. Gently shake the bottle of Sephacryl HR to make an even slurry.
3. Measure out the required volume of gel slurry, 1.5 x the desired packed gel volume**, using a measuring cylinder and pour it into a beaker.
4. Dilute the gel suspension with eluent buffer to 2 x the desired packed gel volume.
5. Stir with a glass rod to make a homogeneous suspension*** free from aggregates. Never use a magnetic stirrer.

To pack the column

Note: Columns may be packed using either one adaptor and a bottom piece, or two adaptors. The packing methods for these two arrangements differ only in point 10 and 13.

Pack the column at the temperature at which it will be used.

1. Make sure the column is not damaged and that all parts are really clean. It is of special importance that the nets, net fasteners and glass tube are not damaged.
2. Attach the packing reservoir tightly (don't forget the sealing ring) and mount the column vertically on a stand.
3. Wet the adaptor by drawing water through it, making sure no air bubbles are trapped under the net. This is best done by submerging the plunger in a beaker of water and attaching the tubing to a pump (Fig. 1) or a syringe. Close the tubing with a stopper when all air bubbles have been removed.
4. Insert the adaptor at the bottom of the column far enough to give the desired bed height.
5. Wet the column glass tube with eluent leaving a few centimeters of fluid in the bottom. Make sure the net is completely free from air bubbles.

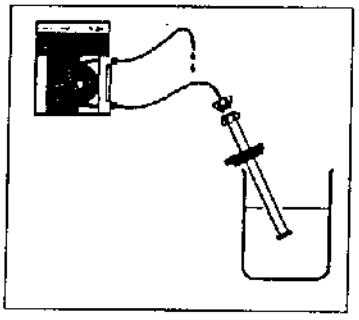


Fig. 1.

* The buffer may be degassed, but it is usually not necessary.

** The required volume of settled gel is about 1.1 x the desired packed gel volume.

*** The gel suspension may be degassed, but it is usually not necessary.

6. Resuspend the gel and pour the well-mixed gel suspension carefully down the wall of the column using a glass rod (Fig. 2). Pour all the gel in one operation. Fill the reservoir to the top with buffer.
7. Screw on the reservoir cap tightly. Connect it to the pump. Open the outlet (Fig. 3).
8. Pack the column in two steps using the flow rates given in the table below. Please note that the recommendations are for aqueous buffers at room temperature. If other conditions are used please consult the column instruction manual for pressure rating. Pack the gel in STEP 1 for 2 hours or until the gel has reached a constant height. Then increase the flow rate to the value listed for STEP 2 and pack for 60 minutes.
9. Stop the pump and close the outlet. Remove the packing reservoir. This is most easily done by first removing the column from the stand and then unscrewing the reservoir over a sink (Fig. 4). For larger columns it may be easier to use a siphon.

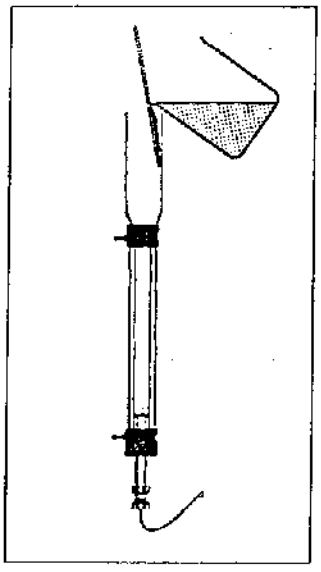


Fig. 2.

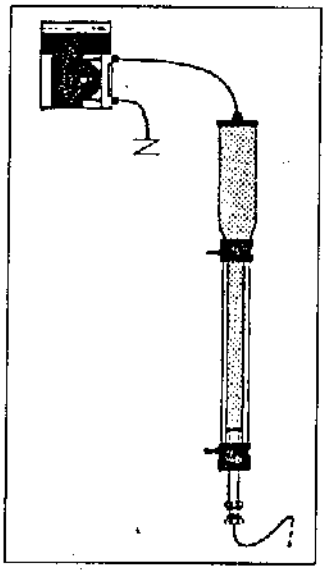


Fig. 3.

Recommended packing flow rates (ml/h) with aqueous buffers at room temperature

	Sephacryl S-100 HR S-200 HR		Sephacryl S-300 HR S-500 HR		Sephacryl S-400 HR	
Column	STEP 1	STEP 2	STEP 1	STEP 2	STEP 1	STEP 2
XK 16/40	60	150	60	190	60	250
XK 16/70	60	110	60	140	60	180
XK 16/100	60	100	60	120	60	160
XK 26/40	150	410	240	490	240	650
XK 26/70	150	300	240	360	240	480
XK 26/100	150	270	180	320	240	430
XK50/60	600	1150	600	1400	600	1800
XK 50/100	500	800	600	950	600	1300

10. Using one adaptor and a bottom piece. Remove excess gel carefully with a small spoon or a plastic spatula. The bed surface should be about 4-5 mm below the end of the glass tube. When the bottom piece is inserted in point 13, it will be pressed about 5 mm into the gel. If there is not enough gel in the column it will be necessary to use an adaptor (see below) or to repack the column with excess gel.

    Using two adaptors. Remove excess gel by gently stirring the top of the bed with a glass rod and removing the suspended gel with a Pasteur pipette. Remove enough gel so that the plunger will be visible below the end piece.

11. Mount the column vertically on the stand and fill the column to the top with buffer.

12. Wet the bottom piece (or a second adaptor) as described above (3).

13. Using one adaptor and a bottom piece. Take up the slack on the O-ring adjusting nut, and tighten one half turn. Screw the bottom piece several turns into the column, making sure that no air bubbles are trapped under the net; see Fig. 5. Remove the stopper from the bottom piece tubing. Note: do not open the outlet on the adaptor at the bottom of the column. Tighten the O-ring adjusting nut half a turn more before screwing the bottom piece itself completely into place. Close the bottom piece outlet, with the stopper, again.

    Using two adaptors. Insert the second adaptor carefully so that no air bubbles are trapped under the net, as shown for the insertion of the botlom piece in Fig. 5. Remove the stopper from the second adaptor tubing (not from the adaptor at the bottom of the column). Bring the adaptor down into the column and make sure that there are no air bubbles under the net. Bring the adaptor to the gel surface and then a further 5 mm into the gel. Tighten the O-ring above the plunger and lock the adaptor in this position. Close the adaptor tubing with a stopper.

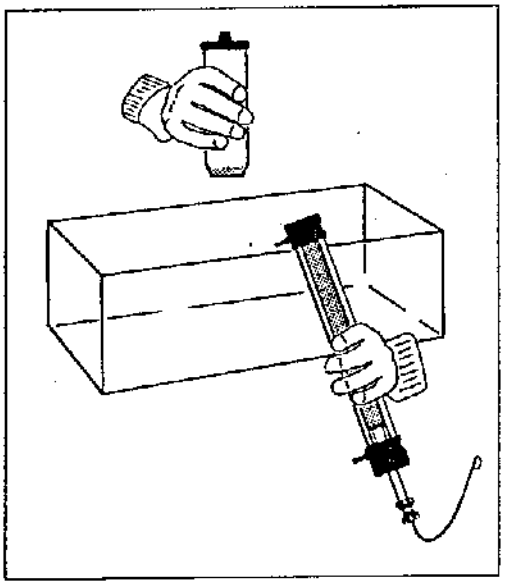


Fig. 4.

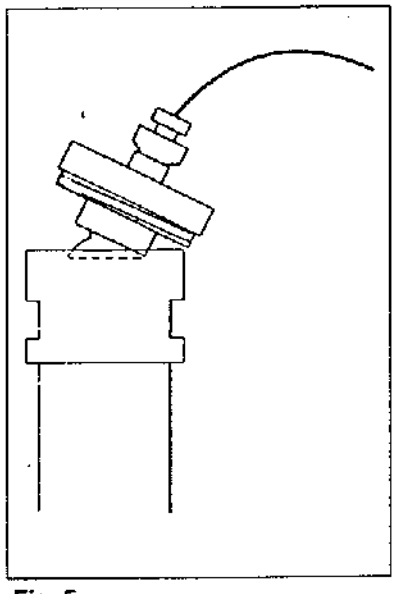


Fig. 5.

14. Run the pump to remove the air from the pump tubing.
15. Remove the stopper from the first adaptor (Fig. 6a). If there is an air bubble in the tubing, remove it by opening the upper outlet for a few seconds. Connect the tubing from the first adaptor to the pump or a valve (Fig. 6a).
16. Turn the column upside-down (Fig. 6) or use it with upward flow.
17. When running the column, do not exceed the flow rate given for STEP 1 in the table above.
18. Equilibrate the column with two bed volumes of start buffer. A larger volume may be required with detergent solutions.

Provided that the packing instruction was followed, you will now have a column with excellent separation capability. In almost all cases you can use the column directly.

Unless you have an extremely difficult separation to perform and must use Sephacryl HR to its maximal limit STOP HERE. For exceptional cases requiring optimal packing, see below.

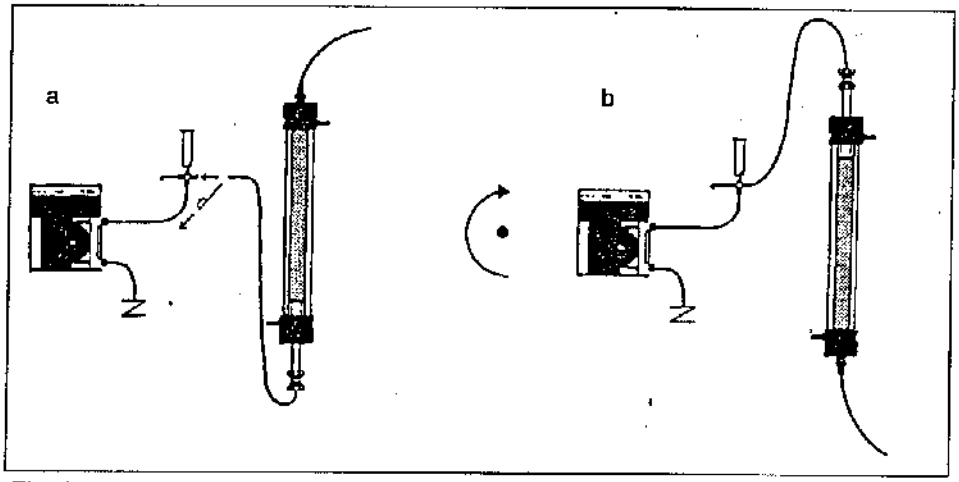


Fig. 6.

Further information

The steps below are special measures only to be carried out for exceptionally difficult separations and are seldom necessary.

Determination of plate number

1. Prepare a sample of acetone 5-10 mg/ml in distilled water or your buffer.
2. Use the test conditions given for the appropriate column in the table below.

	Column		
Test conditions	**XK 16**	**XK 26**	**XK 50**
Sample volume (ill)	200	500	500
Flow rate (ml/h)	60	150	400
Chart speed (cm/h)	30	30	12
Detection (nm)	280	280	280

3. Calculate the plate number (N) according to the formula

$$N = 5.54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2h}}\right)^2 \times \left(\frac{1000}{L}\right)$$

N = Plate number per metre

V_e = Peak elution volume (ml)

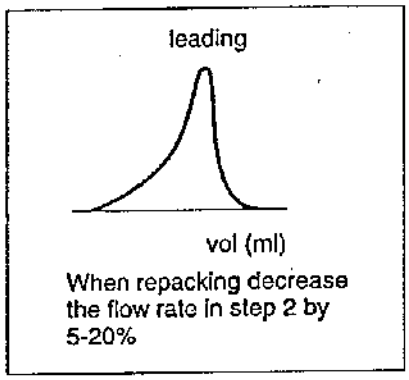
$W_{1/2h}$ = Peak width at half peak height (ml)

L= Length of column, bed height, (mm)

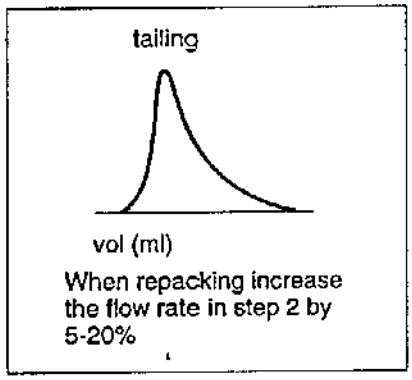
A plate number of 9 000 per metre or more, which corresponds to a reduced plate height of 2.4, is often achieved.

Peak symmetry

For advanced packing the flow rate in STEP 2 can be adjusted depending on the shape of the acetone peak.



When repacking decrease the flow rate in step 2 by 5-20%



When repacking increase the flow rate in step 2 by 5-20%

Gel characteristics

	S-100 HR	S-200 HR	S-300 HR	S-400 HR	S-500 HR
Useful fractionation range (MW)					
globular proteins	$1x10^3$–$1x10^5$	$5x10^3$–$2.5x10^5$	$1x10^4$–$1.5x10^6$	$2x10^4$–$8x10^6$	
dextrans		$1x10^3$–$8x10^4$	$2x10^3$–$4x10^5$	$1x10^4$–$2x10^6$	$4x10^4$–$2x10^7$
DNA exclusion limit (base pairs)		30	118	271	1078
Bead form	Spherical, diameter 25–75 µm in wet form				
Bead structure	Allyl dextran and N,N'-methylene bisacrylamide				
Chemical stability	Stable to all commonly used buffers: 0.2 M NaOH, 0.1 M HCl, 1 M acetic acid, 8 M urea, 6 M guanidine HCl, 1% SDS, 2 M NaCl, 24% ethanol, 30% propanol, 30% acetonitrile (tested at 40°C for 7 days)				
pH stability*					
Long term	3–11				
Short term	2–13				
Physical stability	Negligible volume variation due to changes in pH or ionic strength				
Antimicrobial agent	20% ethanol				
Package sizes	750 ml and 10 l				

* The ranges given are estimates based on our knowledge and experience. Please note the following:
pH stability, long term, refers to the pH interval where the gel is stable over a long period of time without adverse effects on its subsequent chromatographic performance.
pH stability, short term, refers to the pH interval of regeneration, cleaning-in-place and sanitization.
Protein G may hydrolyse at low pH. Complete data on the stability of Protein G as a function of pH are not available.

Ordering information

Product	Pack size	Code No.
Sephacryl S-100 HR	750 ml	17-0612-01
Sephacryl S-200 HR	750 ml	17-0584-01
Sephacryl S-300 HR	750 ml	17-0599-01
Sephacryl S-400 HR	750 ml	17-0609-01
Sephacryl S-500 HR	750 ml	17-0613-01

Pharmacia Biotech

Printed in Sweden by Graphium Västra Aros, May 1999

certificate of analysis

Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis

PRODUCT NUMBER:	17-0446
LOT NUMBER:	9100446011
STORE:	+4°C
SHIP:	Ambient

CONTENTS: Each vial contains a lyophilized mixture of protein standards. When reconstituted with 100 µl of electrophoresis buffer, the solution will contain approximately 25% sucrose, allowing direct application to an electrophoresis gel.

QUALITY CONTROL

Reconstitution of the vial with 100 µl of electrophoresis buffer and application to an 8-25% SDS PhastGel® yielded the results listed below.

Phosphorylase b R_f = 0.33
R_f specification = 0.32 - 0.40

Bovine Serum Albumin R_f = 0.40
R_f specification = 0.39 -0.47

Ovalbumin R_f = 0.50
R_f specification = 0.46 - 0.56

Carbonic Anhydrase R_f = 0.61
R_f specification = 0.58 - 0.70

Trypsin Inhibitor R_f = 0.69
R_f specification = 0.66 - 0.80

α-Lactalbumin R_f = 0.81
R_f specification = 0.75 - 0.91

Band Intensity: Pass

Band Appearance: Pass

48 hour Stability at 37°C: Pass

amersham pharmacia biotech

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

Low Molecular Weight Calibration Kit
for SDS Electrophoresis INSTRUCTIONS

The Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit is a lyophilized mixture of six highly purified, well-characterized proteins for use in molecular weight determination in the presence of the detergent sodium dodecyl sulfate (SDS). The molecular mass of the protein under investigation is determined by comparing its electrophoretic mobility with that of the proteins contained in the kit.

Store at +4°C.

XY-078-00-04
Rev. 3

amersham pharmacia biotech

CONTENTS

Components	2
Size Range	2
Protein Mixture	3
Preparation of Calibration Kit	3
Denaturing Proteins	4
Gel Loading	4
Electrophoresis	4
Detection	4
Molecular Weight Determination	5
Further Reading	7
References	7
Ordering Information	8

COMPONENTS

Ten vials containing a lyophilized mixture of highly purified protein standards.

SIZE RANGE

The proteins contained in this kit cover molecular weights from 14,400 M_r to 94,000 M_r when used in denaturing polyacrylamide electrophoresis.

PROTEIN MIXTURE

Protein	Subunit mol. wt. (M_r)	µg/vial	Source	Ref.
Phosphorylase b	94,000	67	rabbit muscle	1
Albumin	67,000	83	bovine serum	2
Ovalbumin	43,000	147	egg white	2
Carbonic anhydrase	30,000	83	bovine erythrocyte	3
Trypsin inhibitor	20,100	80	soybean	4
α-Lactalbumin	14,400	116	bovine milk	5
Total		576		

The amount of each protein has been chosen to give bands of equal intensity when stained with Coomassie* Brilliant Blue following Laemmli-type gel electrophoresis. The intensities may vary when using other staining methods.

PREPARATION OF CALIBRATION KIT

Preparation of the calibration proteins depends on the detection method used, as described below. When reconstituted as directed, the six calibration proteins will be in a 25% sucrose solution, so it is not necessary to add a density enhancing agent. For best reproducibility, discard any unused portion of the reconstituted protein solution. However, if necessary, the solution can be stored at –80°C for 3 months.

For Coomassie Brilliant Blue Detection*

For Laemmli gels (Figure 2), reconstitute the contents of a vial in 200 µl of a standard 1X sample buffer [0.0625 M Tris-HCl, 2% SDS, 10% v/v glycerol (optional), 0.1 M DTT and 0.01% bromophenol blue, pH 6.8].

For PhastGel™, ExcelGel™ and CleanGel™ precast gels, reconstitute the contents of a vial in 200 µl of 10 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0.1 M DTT, 0.01% bromophenol blue, and 1 mM EDTA, pH 8.0.

For Silver Stain Detection

For silver staining (Figure 3), reconstitute the contents of a vial as described for Coomassie blue staining, then dilute aliquots by at least 50-fold in 1X sample buffer.

DENATURING PROTEINS

Heat the reconstituted protein solution for 5 minutes at 95–100°C.

GEL LOADING

Select the appropriate sample volume for Coomassie Brilliant Blue staining from the table below:

Gel type	Sample volume (µl)
Vertical mini	1–8
Vertical standard	2–8
Multiphor™ II flatbed	1–3
PhastSystem™	0.3–4

ELECTROPHORESIS

Perform electrophoresis according to the instructions supplied with the gel apparatus being used.

DETECTION

Stain the gel using the desired method.

MOLECULAR WEIGHT DETERMINATION

Measure the migration distance of the proteins in the Calibration Kit and of the protein(s) of interest. Measure the migration distance of the dye marker. Calculate the corresponding R_f values by dividing migration distance of the protein by migration distance of the dye marker.

Construct a calibration curve by graphing R_f vs. log molecular weight for the proteins in the Calibration Kit (Figure 1). Determine the molecular weight of the protein(s) of interest from the calibration curve.

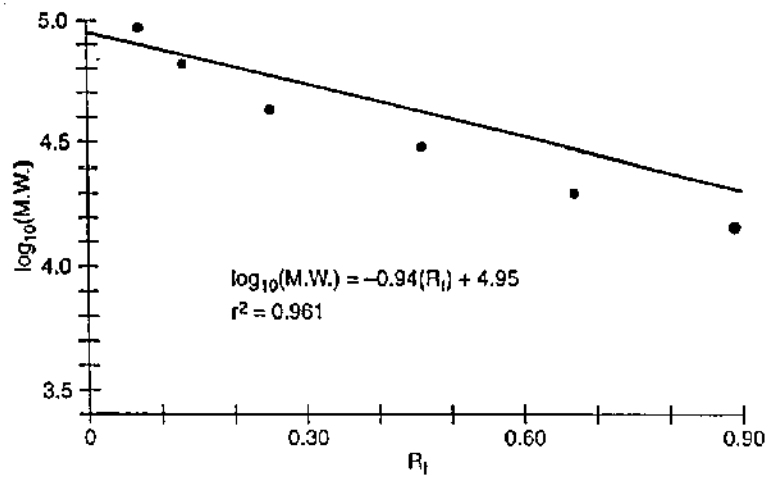


Figure 1. Calibration curve constructed using the results shown in Figure 2.

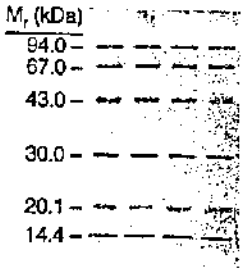


Figure 2. LMW standards stained with Coomassie* Brilliant Blue. Aliquots (3 µl per lane) of a 2X dilution were loaded on a self-cast 15% T, 2.7% C gel. The gel was run at a constant current of 20 mA for 1 hour, 55 minutes on a Mighty Small™ electrophoresis unit. The gel was stained with PhastGel™ Blue R (17-0518-01).

Protein	M_r (Da)	R_f
Phosphorylase b	94,000	.07
Albumin	67,000	.13
Ovalbumin	43,000	.25
Carbonic anhydrase	30,000	.46
Trypsin inhibitor	20,100	.67
α-lactalbumin	14,400	.89

Figure 3. LMW standards stained with silver stain. Aliquots (5 µl) of a 50X dilution were loaded per lane on an ExcelGel™ SDS gradient 8-18 (80-1255-53), run at 600 V, 50 mA, 30 watts for 80 minutes on Multiphor™ II flatbed unit. The gel was stained with PlusOne™ Silver Staining Kit, Protein (17-1150-01) using a Hoefer™ Automated Gel Stainer.

Protein	M_r (Da)	R_f
Phosphorylase b	94,000	.16
Albumin	67,000	.26
Ovalbumin	43,000	.41
Carbonic anhydrase	30,000	.57
Trypsin inhibitor	20,100	.71
α-lactalbumin	14,400	.80

FURTHER READING

For further information regarding molecular weight determinations and denaturing electrophoresis, see the Hoefer™ Protein Electrophoresis Applications Guide (80-6013-88).

REFERENCES

1. Seery, V. L. *et al., Biochem.* 7, 3315 (1967).
2. Castellino, F. J. and Barker, R., *Biochem.* 7, 2207 (1968).
3. Reynaud, J. *et al, Biochimie*, 53,1095 (1971).
4. Koide, T. and Ikenaka, T., *Eur. J. Biochem.* 32, 401 (1973).
5. Brew, K. *et al., J.Biol.Chem.* 242, 3747 (1967).

ORDERING INFORMATION

Low Molecular Weight Calibration Kit 10 vials, 575 µg/vial	17-0446-01

Companion Products

PhastGel™ Blue R (40 Coomassie* Blue R-350 tablets)	17-0518-01
PlusOne™ Silver Staining Kit, Protein	17-1150-01
Hoefer™ Automated Gel Stainer with 19 x 29 cm PTFE coated staining tray with 29 x 35 cm PTFE coated staining tray	 80-6395-02 80-6396-16
Hoefer™ Protein Electrophoresis Applications Guide	80-6013-88

CleanGel, ExcelGel, Hoefer, Mighty Small, Multiphor, PhastGel, PhastSystem and PlusOne are trademarks of Amersham Pharmacia Biotech Limited or its subsidiaries. Amersham is a trademark of Nycomed Amersham plc. Pharmacia and Drop Design are trademarks of Pharmacia & Upjohn Inc.

*Coomassie is a registered trademark of Imperial Chemical Industries, Ltd.

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within the Amersham Pharmacia Biotech group that supplies them. A copy of these terms and conditions of sale is available on request.

© Amersham Pharmacia Biotech Inc. 1999—All rights reserved.

Printed in the United States for Amersham Pharmacia Biotech, Inc.
Amersham Pharmacia Biotech UK Limited. Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, England HP7 9NA.
Amersham Pharmacia Biotech AB. SE-751 84, Uppsala, Sweden.
Amersham Pharmacia Biotech, Inc. 800 Centennial Avenue, PO Box 1327 Piscataway, NJ 08855, USA.
Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH. Munzinger Strasse 9, D-79111, Freiburg, Germany.
Hoefer Pharmacia Biotech, Inc. 654 Minnesota Street, San Francisco, CA 94107, USA.