



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยาทางสัตว)

ปริญญา

สัตววิทยาทางสัตว

สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในช้างเลี้ยงเอเชีย

Study of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin in Domesticated Asian Elephant

นามผู้วิจัย นายราชันย์ อภัยชา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์อภัสสรา ชูเทศะ, Dr.rer.nat.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ชัชวัฒน์ บุญแก้ววรรณ, ป.ร.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อภัสสรา ชูเทศะ, Dr.rer.nat.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในช้างเลี้ยงเอเชีย

Study of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin
in Domesticated Asian Elephant

โดย

นายราชนันท์ อภัยชา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ราชันย์ อภักย์ชา 2555: การศึกษาฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินใน
ช้างเลี้ยงเอเชีย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยาทางสัตว) สาขาสัตววิทยาทาง
สัตว ภาควิชาสัตววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:

รองศาสตราจารย์อภัสสรฯ ชูเทศะ, Dr.rer.nat. 92 หน้า

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในช้างเลี้ยงเอเชีย พบ ค่าเม็ดเลือดแดงอัด
แน่นเฉลี่ยและ ค่าความเข้มข้น เฉลี่ย ของฮีโมโกลบิน เท่ากับ 30.38 ± 3.17 เปอร์เซ็นต์และ
 11.97 ± 3.31 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ โดยเทคนิค เซลลูโลสอะซีเตต อิเล็กโตรโฟรีซิส
ฮีโมโกลบินของ ช้างเลี้ยงมีฟิโนไทป์เดียวที่ประกอบด้วยฮีโมโกลบิน 1 ชนิด เมื่อนำสารละลาย
ฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยงที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G-100 มาศึกษาโดยวิธีเนทีฟ
พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสได้ผลเช่นเดียวกัน เมื่อใช้วิธีไซเดียมโดคิซิลซัลเฟตพอ
ลิวอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสศึกษาหน่วยย่อย พบหน่วยย่อย 1 แลบน มีน้ำหนักโมเลกุล
16,595 ดาลตัน เมื่อศึกษาคุณสมบัติของฮีโมโกลบินโดยวิธี MALDI-TOF พบว่าน้ำหนักโมเลกุล
ของฮีโมโกลบิน เท่ากับ $64,519 \pm 699$ ดาลตันและวิธี นาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน
แมสสเปกโตรเมตรีพบฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายเบต่าน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 16,216 ดาลตัน
มีลำดับกรดอะมิโน 146 หน่วย และสายอัลฟาน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,578 ดาลตัน มีลำดับ
กรดอะมิโน 141 หน่วย ตามลำดับ

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Rachan Appaicha 2012: Study of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin in Domesticated Asian Elephant. Master of Science (Animal Physiology), Major Field: Animal Physiology, Department of Physiology. Thesis Advisor: Associate Professor Apassara Choothesa, Dr.rer.nat. 92 pages.

The biochemical properties in hemoglobin of Domesticated Asian Elephant were studied. The mean values of packed cell volume and hemoglobin concentration were $30.38 \pm 3.17\%$ and 11.97 ± 3.31 g/dL, respectively. Cellulose acetate electrophoresis revealed one hemoglobin phenotype which was composed of one type of hemoglobin. Native-PAGE of purified hemoglobin by sephadex G-100 column also showed the same result. By SDS-PAGE, the denatured hemoglobin migrated as one band with the molecular weight of 16,595 dalton. The accurate molecular weight of hemoglobin by MALDI-TOF mass spectrometry was $64,519 \pm 699$ dalton. The result of nano-electrospray ionization mass spectrometry revealed that the molecular weights and the amino acid compositions of β -chain and α -chain of hemoglobin were 16,216 dalton, 146 residues, 15,578 dalton and 141 residues, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อาทิตย์สุนทร ชูเทศะ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ในการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆและ สนับสนุนในการ
ทำงานวิจัยด้วยความหวังดีตลอดมา ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล
และอาจารย์ ดร.ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษา
แนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุพร หนูสุด ผู้ที่เป็นทั้งกัลยาณมิตรและผู้ให้คำปรึกษา
อีกทั้งช่วยเหลือในการทดลองรวมทั้งการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนัก งาน พัฒนา
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้โอกาสในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ ตลอดจนสถานที่ใน
การทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ขอขอบคุณปางช้างสยามและอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา รวมทั้งความห่วงใยและ
ผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่เอื้อเฟื้อและช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้มีพระคุณ ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ และญาติๆทำให้
วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ราชันย์ อภัยชา

มิถุนายน 2555

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ (1)
สารบัญตาราง (2)
สารบัญภาพ (3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	34
ผลและวิจารณ์	52
สรุปและข้อเสนอแนะ	73
สรุป	73
ข้อเสนอแนะ	74
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	75
ภาคผนวก	87
ภาคผนวก ก การศึกษาค่าโลหิตวิทยา	88
ภาคผนวก ข การแยกโปรตีน โดยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี	89
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีสำหรับการย่อยเจลด้วยทริปซิน	90
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สูตรการเตรียมเจลวิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส	40
2	สูตรการเตรียมเจลวิธีโซเดียม ไดดีซัลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส	46
3	แสดงค่าไอหัตถวิทยาของช้างเลี้ยง	52
4	แสดงค่าไอหัตถวิทยาเปรียบเทียบระหว่างช้างเพศผู้และเพศเมีย	53
5	ค่าไอหัตถวิทยาของช้างในประเทศ	56
6	ค่าไอหัตถวิทยาของช้างเลี้ยงในประเทศไทย	57
7	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน โดยใช้เทคนิค โซเดียม ไดดี ซัลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส ของสัตว์ชนิดต่างๆ ในประเทศไทย	65
8	แสดงแสดงน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินช้างเลี้ยงแบ่งตามวิธีการศึกษา	68
9	แสดงชนิดโปรตีนของแถบของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินช้างเลี้ยงที่ทำให้บริสุทธิ์ที่ด้วยเทคนิค โซเดียม ไดดีซัลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันและระบุนชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การสร้างฮีโมโกลบิน	10
2	โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลฮีโมโกลบิน	13
3	โครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบิน	15
4	โครงสร้างของ ฮีโมโกลบิน จากโครง รูป แบบ T state ที่อยู่ในรูปดีออกซีฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin form) ไปเป็น R state ที่อยู่ในรูปออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin form) โดยมีการหมุนเคลื่อนที่ไปจากเดิมประมาณ 15 องศา	18
5	กราฟการเปรียบเทียบการจับออกซิเจนของไมโอโกลบินและฮีโมโกลบิน (oxygen binding curve) ไมโอโกลบินอิ่มตัวที่ 50% ที่ความดันออกซิเจน 2.8 ทอร์ แต่ฮีโมโกลบินจะอิ่มตัวที่ 50% เมื่อความดันออกซิเจน 26 ทอร์	20
6	กราฟแสดงการจับกันของออกซิเจนและฮีโมโกลบิน (HbO ₂ dissociation curve) การเปลี่ยนแปลงของกราฟไปทางขวาจากการเพิ่มความเข้มข้นของ H ⁺ (การลดลงของพีเอช) การเพิ่มขึ้นของ CO ₂ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ และการเพิ่มขึ้นของ 2,3-BPG	21
7	แสดงคุณสมบัติการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบิน โดยมีและไม่มี BPG	23
8	แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสของคณและช้างเลี้ยงโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)	60
9	แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของช้างเลี้ยงบนเมทิลอะครีลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่พีเอช 8.3) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซึบลูอาร์-250	62
10	แสดงผลการเคลื่อนที่ของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินช้างเลี้ยงโดยเทคนิคไซเดียมโดดีซิลซัลเฟตอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 15% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	<p>แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินซึ่งเลี้ยงด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker UltraFlex III, Germany) ใช้กรดไซแนฟีนิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์</p>	67
12	<p>แสดงผลวิเคราะห์ความเหมือนของ MS/MS ของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินซึ่งเลี้ยงกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรมMASCOT</p>	70
ภาพผนวกที่		
ข1	<p>แสดงผลการชะสารชนิดต่างๆของฮีโมโกลบินซึ่งเลี้ยงและโปรตีนมาตรฐานที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที</p>	89

การศึกษาฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในช้างเลี้ยงเอเชีย

Study of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin in Domesticated Asian Elephant

คำนำ

ช้างเป็นสัตว์ที่อยู่คู่ประวัติศาสตร์ชาติไทยมาอย่างยาวนาน เป็นสัตว์ที่มีความเกี่ยวข้องกับสถาบันหลักของไทย คือ ชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ จนชาวตะวันตกเรียกประเทศไทยว่าเป็นแผ่นดินแห่งช้างเผือก ด้านพุทธศาสนาช้างเป็นสัตว์ที่ประเสริฐ มีศีลธรรม มีความกตัญญู มีความเสียสละ ซื่อสัตย์จงรักภักดี เฉลียวฉลาดและมีพลังกำลังมาก ในพุทธประวัติก่อนพระนางสิริมหามายาทรงพระครรภ์เจ้าชายสิทธัตถะทรงสุบินว่ามีพระเสวตกุญชร ช้างเผือกที่มีผิวขาวผ่องมากระทำทักษิณาวัตร (เวียนขวา) เป็นการเคารพพระนาง 3 รอบแล้วจึงเข้าสู่พระครรภ์ ช้างเผือกนั้นหมายถึงพระโพธิสัตว์ลงมาปฏิสนธิในครรภ์ของพระนาง จากสุบินครั้งนั้นหลังสมัยพุทธกาลชาวอินเดียยังไม่มีรูปแทนองค์พระพุทธรูปเจ้า จึงใช้รูปช้างและรูปดอกบัวเป็นสัญลักษณ์เพื่อเคารพกราบไหว้ จึงกล่าวได้ว่าช้างมีส่วนเกี่ยวข้องกับพุทธศาสนาและพุทธศาสนิกชนตั้งแต่สมัยพุทธกาลจนปัจจุบัน ในประวัติศาสตร์ชาติไทยช้างได้เกี่ยวข้องกับทุกช่วงประวัติศาสตร์เพื่อรักษาเอกราชของชาติไทย เช่นในสงครามยุทธหัตถี เมื่อวันอังคาร แรม 2 ค่ำ เดือนยี่ พ.ศ.2131 สมเด็จพระนเรศวรมหาราชทรงทำสงครามยุทธหัตถีกับพระมหาอุปราชาแห่งกรุงหงสาวดีโดยใส่ช้างเจ้าพระยาไชยานุภาพเข้าทำยุทธหัตถีจนได้รับชัยชนะ (อารีย์, 2534) วันที่ 13 มีนาคม ซึ่งเป็นวันที่คณะกรรมการคัดเลือกสัตว์ประจำชาติ มีมติให้ช้างเผือกเป็นสัญลักษณ์ของประเทศไทย จึงตั้งวันที่ 13 มีนาคมของทุกปีให้เป็นวันช้างไทย ประเทศไทยเคยมีช้างป่าและช้างเลี้ยงจำนวนมากนับแสนตัว แต่ปัจจุบันทั้งช้างป่าและช้างเลี้ยงได้ลดลงเป็นจำนวนมาก ประมาณว่า มีช้างเลี้ยงในประเทศไทยประมาณ 1,575 เชือก (กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลทางสถิติ, 2551) และมีช้างป่าประมาณ 1,975 ตัว (มัทนา, 2542) ปัจจุบันช้างอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์โดย The International Union for Conservation of Nature (IUCN) จัดสถานภาพความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของสัตว์ป่าของช้างเอเชียอยู่ในระดับ Endangered และอยู่ใน Appendix I ของ Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) นักสัตววิทยาได้จัดช้างตามหลักอนุกรมวิธานดังนี้ อันดับ (Order) : โพรบอสซิเดีย (Proboscidea) วงศ์ (Family) : อีลิเฟนทีดี (Elephantidae) สกุก

(Genus) : แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana*) และช้างเอเชีย (*Elephas maximus*)

ช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana*) มี 2 ชนิดย่อย คือ 1.ชนิดย่อยช้างป่าแอฟริกัน (Forest Elephant, *Loxodonta africana cyclotis*) 2.ชนิดย่อยช้างทุ่งแอฟริกัน (Savannah Elephant, *Loxodonta africana africana*) ช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) มี 3 ชนิดย่อย คือ 1.ชนิดย่อยช้างศรีลังกา (*Elephas maximus maximus*) 2.ชนิดย่อยช้างอินเดีย (*Elephas maximus indicus*) 3.ชนิดย่อยช้างสุมาตรา (*Elephas maximus sumatranus*) สำหรับช้างในประเทศไทยเป็นช้างเอเชียชนิดย่อยช้างอินเดีย (*Elephas maximus indicus*) บางครั้งจึงเรียก Indian Elephant

ในประเทศไทยมีผู้ศึกษาค่าโลหิตวิทยาของช้างเลี้ยงที่อยู่ในหลายภูมิภาค เสาวนิตย์และคณะ (2533) ศึกษาค่าโลหิตวิทยาของช้างไทย เพ็ญศรีและคณะ (2545) ศึกษาค่าโลหิตวิทยาของช้างเลี้ยงในจังหวัดลำปาง Tuntasuvan *et al.* (2001) ศึกษาเปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาและแร่ธาตุในซีรัมระหว่างช้างเลี้ยงและช้างเลี้ยงแบบปล่อยอิสระ Jareansak *et al.* (2005) ศึกษาค่าโลหิตวิทยา cytochemistry และโครงสร้างของเม็ดเลือดในช้างเอเชีย สามารถและสาโรช (2551) ศึกษาค่าโลหิตวิทยาของช้างเอเชียที่เลี้ยงในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี แต่จากการศึกษาวิจัยทั้งหมดยังไม่มียารายงานการศึกษาฮีโมโกลบินฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินของช้างไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินของช้างไทย เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับช้างไทยต่อไป การศึกษาฮีโมโกลบินฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยงเอเชียเป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับช้างเลี้ยงเอเชีย รวมทั้งใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ช้างเลี้ยงเอเชียต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินโดยวิธีเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟริซิส (cellulose acetate electrophoresis) ของช้างเลี้ยง
2. เพื่อแยกฮีโมโกลบินให้บริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี (gel filtration column chromatography)
3. เพื่อศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีเนทีฟ อลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส (native- polyacrylamide gel electrophoresis, N-PAGE)
4. เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส (sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) แบบดิสคอนตินิวอัสเจล (discontinuous gel)
5. เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินและหน่วยย่อย โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry)
6. เพื่อศึกษาชนิดของหน่วยย่อยของ ฮีโมโกลบิน ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินที่แยกได้ โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry)
7. เพื่อศึกษากรดอะมิโนของสายกลอบินของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์จากวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส แบบดิสคอนตินิวอัสเจล โดยวิธี นาโนอิเล็กโตรสเปร์ย์ ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมตรี (nanoelectrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS/MS)

การตรวจเอกสาร

ลักษณะช้าง

ช้างเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเป็นสัตว์บกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก ช้างแอฟริกาเพศผู้มีความสูงเฉลี่ย 2.7-3.2 เมตร น้ำหนักเฉลี่ย 4,100-5,000 กิโลกรัม เพศเมียมีความสูงเฉลี่ย 2.3-2.7 เมตร น้ำหนักเฉลี่ย 2,300-3,700 กิโลกรัม ช้างเอเชียเพศผู้มีความสูงเฉลี่ย 2.4-2.9 เมตร น้ำหนักเฉลี่ย 3,700 -4,500 กิโลกรัม ช้างเอเชียเพศเมียมีความสูงเฉลี่ย 2.1-2.4 เมตร น้ำหนักเฉลี่ย 2,300-3,700 กิโลกรัม ผิวหนังช้างมีความหนาตลอดทั้งตัวไป ไขหูเป็นบริเวณที่หนังกหนาที่สุดหนาไม่กัมีลติเมตร บริเวณลำตัวหนาประมาณ 1.9-3.2 เซนติเมตร ผิวหนังบริเวณลำตัวจะบางกว่าขาหน้าและไหล่ บริเวณขาหลังและช่วงท้ายเป็นส่วนที่ผิวหนังหนาที่สุด สีผิวหนังปกติเป็นเทาดำ แต่ในช้างเอเชียอาจมีรอยด่างหรือสีจางลงเนื่องจากเซลล์สร้างสีโดยเฉพาะบริเวณหัว งวง ไขหู ต่อมเหงื่อพบทั่วทุกส่วนของผิวหนัง โดยกระจายตัวอย่างเบาบาง ยกเว้นที่นิ้วเท้าที่มีมากจนปรากฏเป็นเหงื่อไหลออกมา เล็บเท้าช้างเอเชียและแอฟริกา มีจำนวนต่างกันคือ ช้างเอเชียเท้าหน้ามี 5 เล็บ เท้าหลังมี 4 เล็บ ช้างแอฟริกาเท้าหน้ามี 4 เล็บ เท้าหลังมี 3 เล็บ ขณะเป็นลูกช้างจะมีขนจำนวนมากกว่าช้างโตเต็มวัย โดยเฉพาะบริเวณหน้าผาก ริมฝีปากกลาง ริมฝีปากบน รูหู ปลายหาง หลัง ขนช้างเส้นโต แข็ง ตั้งชันและยากต่อการถอน

ช้างเอเชียมีโครงสร้างกระดูกสันหลังเป็นรูปโค้งคล้ายโดมไล่จากไหล่ไปจนถึงหาง ต่างจากช้างแอฟริกาที่มีการโค้งขึ้นเล็กน้อยหลังกระดูกไหล่ก่อนไปทางท้ายจนถึงบริเวณสะโพก กระโหลกศีรษะมีขนาดใหญ่แต่ภายในเป็นโพรงกระดูกพรุน ทำให้เกิดช่องอากาศ น้ำหนักจึงเบาแต่แข็งแรง โดยมีช่องรองรับส่วนของงาที่ฝังตัวลึกเข้ามาประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของความยาวงาทั้งหมด กระดูกขาหน้าและขาหลังของช้างอยู่ในแนวตั้งฉากกับพื้น รองรับน้ำหนักด้วยอุ้งเท้าซึ่งยึดหยุ่นคล้ายหมอนรองกระดูกอย่างดี กล้ามเนื้อของช้างมีเส้นใยขนาดใหญ่แข็งแรงและจำนวนมากกว่าสัตว์ชนิดอื่น งวงเป็นอวัยวะที่มีกล้ามเนื้อ เส้นเลือดและเส้นประสาทรับความรู้สึกมาหล่อเลี้ยงอย่างมาก ช้างหายใจผ่านงวงเป็นส่วนใหญ่ และหายใจผ่านทางปากเล็กน้อย อากาศ 70 % ถูกหายใจผ่านงวง ปอดของช้างที่โตเต็มวัยจะยึดติดกับผนังช่องอกด้วยเส้นใยเกี่ยวพันทำให้ไม่มีช่องว่างระหว่างปอดกับผนังช่องอก

ระบบไหลเวียนโลหิตของซ้าง ซ้างมีแอ่งเลือดขนาดใหญ่เชื่อมต่อระหว่างเส้นเลือดอยู่ในบริเวณสำคัญของร่างกาย ภายใต้การห่อหุ้มของร่างกายเป็นอย่างดี ได้แก่ บริเวณขมับ หลอดลม หน้าอกด้านหน้า ด้านในของกระดูก ขาหลังตอนบน ไตรักรั้ เนื่องจากผิวหนังที่หนามากเส้นเลือดจึงปรากฏที่ผิวหนังซึ่งพบไม่กี่แห่ง โดยพบได้ที่ใบหูด้านบนและด้านล่าง ขาหน้าด้านในตอนบน และขาหลังตอนล่าง

ระบบย่อยอาหาร ซ้างใช้วงเป็นอวัยวะจับอาหารเข้าปาก เพื่อบดเคี้ยวด้วยฟันกรามก่อนที่จะกลืนสู่หลอดอาหาร ผ่านคอหอยที่มีลักษณะเป็นกระพุ้งควบคุมการกลืน ซ้างเป็นสัตว์กระเพาะเดี่ยวซึ่งมีระบบย่อยอาหารคล้ายคลึงกับม้า ลำไส้เล็กยาว 21 เมตร ลำไส้ใหญ่ยาว 12.8 เมตร ลำไส้ตั้งยาว 0.6-0.8 เมตร ซ้างไม่มีถุงน้ำดีแต่มีท่อน้ำดีขนาดใหญ่และมีรอยคอดเป็นระยะๆ เมื่อออกจากตับ ฟันของซ้างเอเชียและซ้างแอฟริกา มีสูตรฟันที่เหมือนกันคือ ฟันตัด 1-1/0-0 ฟันเขี้ยว 0-0 /0-0 ฟันกราม 6-6/6-6 งาซ้างเป็นส่วนหนึ่งของฟันตัดคู่หน้า ซ้างเอเชียเพศผู้ มีงา เพศเมียไม่มีงา แต่มีข้อยกเว้นเพศเมียบางตัวอาจมีงาสั้นๆ เรียกขนาขย มีโพรงประสาทบริเวณโคนงาซ้าง ซึ่งมีความลึกโดยประมาณเท่ากับระยะวัดจากตาไปยังริมฝีปากตรงตำแหน่งที่จะงอกออกไป ดังนั้นในลูกซ้างโพรงประสาทจะยาวกว่าซ้างโตเต็มวัย ฟันซ้างมีทั้งหมด 6 ชุด แบ่งเป็นฟันน้ำนม 3 ชุด และฟันแท้ 3 ชุด ฟันน้ำนมชุดแรกมีมาตั้งแต่เกิด (ปานเทพ, 2540)

ระบบปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ ซ้างมีไตลักษณะเป็นพู (lobe) ประมาณ 5-7 พู ซ้างเพศเมียมีช่องเปิดอวัยวะเพศ และช่องขับถ่ายปัสสาวะอยู่ด้านล่างท้อง รูเปิดปัสสาวะอยู่หลังช่องคลอด อวัยวะเพศผู้ซ้างมีลักษณะคล้ายม้า เปิดออกสู่ด้านล่างตรงหน้าท้องเช่นกัน อัณฑะซ้างอยู่ในช่องท้อง ฉะนั้นการดูเพศซ้างจากภายนอกบางครั้งทำได้ค่อนข้างลำบาก

ระบบรับความรู้สึก ซ้างมีตาขนาดเล็กอยู่ด้านข้างหัว จอรับภาพมีสีจาง ซ้างไม่มีต่อมน้ำตา แต่มีต่อมฮาร์ดเอร์เรียน (Harderian gland) บนผิวด้านในของหนังตาชั้นที่สาม ทำหน้าที่หลั่งสารหล่อเลี้ยงตาให้ชุ่มชื้นแทน หูของซ้างมีขนาดใหญ่ด้านข้างกระดูก โลก ซ้างแอฟริกา มีหูขนาดใหญ่กว่าซ้างเอเชีย การไหลเวียนเลือดบริเวณขอบใบหูไม่ค่อยดี ต่อมน้ำมันหรือต่อมที่ขมับ (Temporal gland) เป็นลักษณะจำเพาะของซ้าง อยู่ที่ผิวหนังสองข้างศีรษะตำแหน่งขมับระหว่างหูและตา โดยมีช่องเปิดเป็นรูเล็กๆออกด้านนอก เพื่อขับสารคล้ายน้ำมัน

การเต้นของหัวใจซ้างฟังได้ยาก เนื่องจากความหนาของผิวหนัง แต่สามารถวัดชีพจรได้จากเส้นเลือดแดงที่ใบหู มีค่าการเต้นหัวใจปกติ 24-35 ครั้งต่อนาที ซ้างหายใจ 4-6 ครั้งต่อนาที แต่ถ้าอยู่

ในภาวะตื่นตื่นจะมากกว่า 15 ครั้งต่อนาที อุณหภูมิร่างกายช้างเอเชียปกติ 36-37 องศาเซลเซียส (97.5-99.0 องศาฟาเรนไฮต์) ช้างทนต่อสภาพอากาศร้อนจัดได้ไม่ดี เพราะมีพื้นผิวร่างกายในการกระจายความร้อนค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับมวลของร่างกาย ดังนั้นช้างจึงไม่ชอบยืนกลางแดดนึ่งๆ นานๆ ช้างลดความร้อนโดยการคายความร้อนทางใบหูด้วยวิธีโบกใบหูไปมา ใช้งวงดูดน้ำและพ่นใส่ลำตัวทั่วร่างกาย ยืนหลบในร่มเงา ผ่อนลมหายใจออกทางงวง และกินพืชที่มีน้ำและอุณหภูมิต่ำกว่าบรรยากาศภายนอก ช้างเอเชียมีระบบย่อยอาหารเพื่อปรับการกินเฉพาะพืช จัดเป็น True Herbivorous กระเพาะและลำไส้จึงไม่ซับซ้อน ไม่มีกระเพาะหมัก ลำไส้ตั้ง (Caecum) มีขนาดใหญ่ และมีรอยหยัก ตับเป็นพูขนาดใหญ่และมีรอยหยัก ไม่มีถุงน้ำดี หลอดอาหารค่อนข้างสั้นและแคบมีรูปร่างต่างไปจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง จำนวนต่อมเมือกมีมากในผนังหลอดอาหาร กระเพาะอาหารของช้างเป็นแบบกระเพาะเดี่ยววางตัวขวางตั้งฉากกับแกนลำตัว ขนาดยาว 100 ถึง 140 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 เซนติเมตร ความต้องการพลังงานของช้างต่อวันคือ 15.79 กิโลแคลอรี ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อ 24 ชั่วโมง อาหารที่ถูกกินเข้าไปใช้เวลาย่อยและดูดซึมจนถูกขับออกเป็นอุจจาระใช้เวลาต่อหนึ่งรอบประมาณ 21 ถึง 54.5 ชั่วโมง ช้างมีระบบย่อยอาหารและเปลี่ยนแปลงสภาพอาหารที่มีประสิทธิภาพต่ำ การย่อยหญ้าถูกดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ได้เพียง 44 เปอร์เซ็นต์ ต่างจากโคที่ใช้ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ม้า 53 เปอร์เซ็นต์และแกะ 61 เปอร์เซ็นต์ ช้างจึงต้องกินอาหารจำนวนมาก อาหารส่วนใหญ่เป็นอาหารที่มีเส้นใยสูง ทำให้อุจจาระเป็นก้อนกลมใหญ่ บางครั้งหนักถึง 2 กิโลกรัม ช้างที่ได้รับอาหารเป็นหญ้าแห้งทุกวันจะถ่ายวันละ 10-12 ครั้ง แต่ครั้งมีอุจจาระ 4-6 ก้อน Clauss *et al.* (2007) รายงานว่าลำไส้ของช้างเอเชียยาวกว่าช้างแอฟริกา สอดคล้องกับ retention time ของช้างเอเชียที่นานกว่าช้างแอฟริกาและมีการย่อยอาหารที่ดีกว่า ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากการปรับตัวของช้างเอเชียในธรรมชาติที่อยู่ในพื้นที่อาหารจำพวกหญ้า ในสัดส่วนที่สูงกว่าที่อยู่ตามธรรมชาติของช้างแอฟริกา ช้างต้องการน้ำเฉลี่ยวันละ 140 ถึง 200 ลิตรต่อวัน โดยใช้งวงดูดขึ้นมาแล้วป้อนเข้าปาก อัตราการกินน้ำของช้างมากน้อยแล้วแต่อุณหภูมิ บรรยากาศภายนอก ยิ่งร้อนมากจะกินน้ำมาก กรณีป่วยช้างจะกินน้ำมากขึ้น อาหารของช้างแบ่งออกเป็น 5 ประเภท คือ 1.อาหารพวกหญ้า (Grasses) ได้แก่หญ้าแพรง หญ้าปล้อง หญ้าปากห้วย หญ้าคา หญ้ากก อ้อ พงแขม 2.อาหารจำพวกไม้ (Bamboos) ได้แก่ ไม้ไผ่หนาม ไม้ป่า ไม้บ้าน ไม้ข้าวหลาม ไม้รวก ไม้ซาง 3.อาหารจำพวกเถาวัลย์และไทร (Greepers and Fiews) ได้แก่บอระเพ็ด ส้มป่อย เครือสะบ้า กระทงลาย ผักเปบป่า หวาย ไทร เถาวัลย์แดง 4.อาหารจำพวกไม้ยืนต้น (Tree, Plams and Shrubs) ได้แก่ กัลย ชนุน ลัก จิวป่า มะพร้าว มะเดื่อ มะขามป้อม จามจุรี โพธิ์ มะขาม 5.อาหารจำพวกพืชไร่ (Cultivated Crops) ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เต๋อย สับประรด อ้อย พักแดง ช้างกินอาหารคิดเป็นน้ำหนักวันละประมาณ 250-350 กิโลกรัม เนื่องจากช้างไม่มีกระเพาะลำกรองเหมือนโคและกระบือ จึงกินอาหารตลอดเวลา

ในประเทศไทยช่างตัวผู้เรียกว่า “ช่างปลาย” มีงาหนึ่งคู่ โดยเฉลี่ยยาว 4-5 ฟุต ช่างปลายบางตัวไม่มีงาเรียก “สิดอ” ส่วนช่างตัวเมียเรียกว่า “ช่างพัง” ช่างพังบางตัวมีงาสั้นๆเรียกว่า “ช่างขนาบ” ตามปกติแล้วช่างพังมีส่วนสูงและน้ำหนักน้อยกว่าช่างปลาย ช่างมีอายุระหว่าง 80-150 ปี แต่ถ้าใช้งานหนักมาก จะมีอายุได้ประมาณ 60 ปีเท่านั้น ช่วงที่ช่างสามารถทำงานได้ดีที่สุดคือ ช่วงอายุระหว่าง 30-38 ปี ตามปกติช่างป่ามีอายุยืนกว่าช่างบ้าน ช่างชอบหากินเป็นหมู่ (โขลง) ช่างหนึ่งโขลงมีตั้งแต่ 10-20 ช้าง หรือ 30-50 ช้าง หัวหน้าโขลงช้างจะเป็นช่างพังใหญ่ เรียกว่า “แม่หนัก” หรือ “แม่แปรก” ทำหน้าที่นำโขลงช้างเที่ยวหากินและคอยหลบหนีภัยอันตราย สำหรับช่างที่แยกออกไปอยู่ตามลำพังเรียกว่า “ช่างโทน” มินิสิคคูราย เกร (อารีย์, 2534)

การตกมัน (Musth) คือการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีรวิทยา ทำให้พฤติกรรมของช้างเปลี่ยนแปลงในช่วงระยะเวลาหนึ่ง สามารถเกิดขึ้นกับช้างทั้งเพศผู้และเพศเมีย ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ซึ่งอยู่ระหว่าง 16 ถึง 60 ปี การตกมันเกิดขึ้นหลังจากช้างได้กินอาหารที่อุดมสมบูรณ์และมีคุณภาพสูง และได้พักผ่อนเต็มที่ไม่ต้องทำงานหนัก ร่างกายสมบูรณ์แข็งแรง เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา มีผลทำให้เกิดการแสดงออกที่ผิดปกติของพฤติกรรม เช่น ก้าวร้าว กระสับกระส่าย ปัสสาวะตลอดเวลา และมีน้ำมันไหลจากต่อมข้างขมับทั้งสองข้าง (Temporal glands) กลิ่นเหม็นรุนแรง สาเหตุการตกมันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เมื่อตกมันครั้งหนึ่งแล้วจะตกมันทุกปี ช้างที่ไม่ตกมันในเวลาอันสมควรคือช้างอ่อนแอหรือเป็นโรค อาการตกมันอาจเกิดขึ้นได้ทุกฤดู ก่อนตกมันมีอาการซึม บางครั้งคูราย ก้าวร้าว อารมณ์ไม่ดี พยายามดิ้นโซ่ล่ามให้ขาดและทำร้ายช้างอื่น จำใครไม่ได้แม้กระทั่งคนเลี้ยง อาการตกมันเป็นอยู่ราว 2-3 สัปดาห์ จนถึงหลายเดือนก็จะค่อยๆหายไป การตกมันเกิดได้ทุกเวลา แต่จะเกิดเพียงระยะหนึ่งเท่านั้น ช้างปลายที่ตกมันมีอาการคูรายมากกว่าช่างพัง ผู้เลี้ยงช้างต้องแยกช้างที่ตกมันออกจากช้างอื่นๆ เปลี่ยนโซ่ล่ามให้ใหญ่ขึ้นนำไปผูกล่ามอย่างแข็งแรงในที่ร่ม ก่อไฟไว้รอบๆเพื่อดับกลิ่นน้ำมัน มิฉะนั้นช้างอื่นๆที่ไม่ตกมันอาจเข้ามาทำร้าย อาหารที่นิยมให้ช้างตกมันคือ พักเขียว หญ้า และน้ำพอสมควร งดการใช้งานจนกว่าอาการตกมันจะหายไป ช่างพังช่วงตกมันพฤติกรรมไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม มีอาการเซื่องซึมแต่ไม่คูราย (สุรเชษฐ์, 2540)

การตั้งท้องและการตกลูก ช่างพังที่ร่างกายสมบูรณ์ดีจะเริ่มมีลูกตั้งแต่อายุ 7 ปีขึ้นไปจนถึง 50 ปี อายุของช้างที่เหมาะสมสำหรับการผสมพันธุ์คือระหว่างอายุ 30-40 ปี ช้างตั้งท้องนาน 21-22 เดือน แม่ช้างจะตกลูกได้เพียงครั้งละ 1 ช้าง แต่บางครั้งอาจเกิดลูกแฝดได้ ช่างพังเมื่อออกลูกแล้วจะไม่ตั้งท้องอีก 3-4 ปี ดังนั้นการตกลูกครั้งหนึ่งจะใช้เวลานานถึง 4 ปี แม่ช้างในช่วงชีวิตหนึ่งจึงออกลูกได้ประมาณ 4 ครั้งเท่านั้น

การนอนหลับ โดยปกติซึ่งจะนอนหลับในระยะเวลาสั้นๆ คั่นละ 3-4 ชั่วโมง เวลานอนจะอยู่ในช่วงเวลา 23.00-03.00 น. ของวันรุ่งขึ้น ช้างเมื่อหลับสนิทจะนอนตะแคงลำตัวข้างใดข้างหนึ่งลงกับพื้น ช้างจะไม่นอนหลับเวลากลางวัน

เซลล์เม็ดเลือด ชนิดต่างๆ สร้างมาจากเซลล์ต้นกำเนิด ในไขกระดูก (pluripotential hematopoietic stem cell) โดยเซลล์ต้นกำเนิดสร้างเม็ดเลือดแดงมาจาก colony forming unit-erythrocytes (CFU-E) ระบบการสร้างเม็ดเลือด มี 2 ระบบ คือ 1.การสร้างในไขกระดูก (medullary hematopoiesis) พบในภาวะปกติหลังเกิด 2.การสร้างนอกไขกระดูก (extramedullary hematopoiesis) ได้แก่การสร้างที่ตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง เซลล์ที่สร้างขึ้นอาจมีทั้งเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกร็ดเลือด ถ้ามีการสร้างเม็ดเลือดที่อวัยวะเหล่านี้หลังเกิด มักเป็นการสร้างชดเชยจากภาวะ หรือโรคบางชนิด เช่น โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) เซลล์ที่สร้างมาจากแหล่งดังกล่าวมักมีตัวอ่อนออกมาในกระแสเลือด

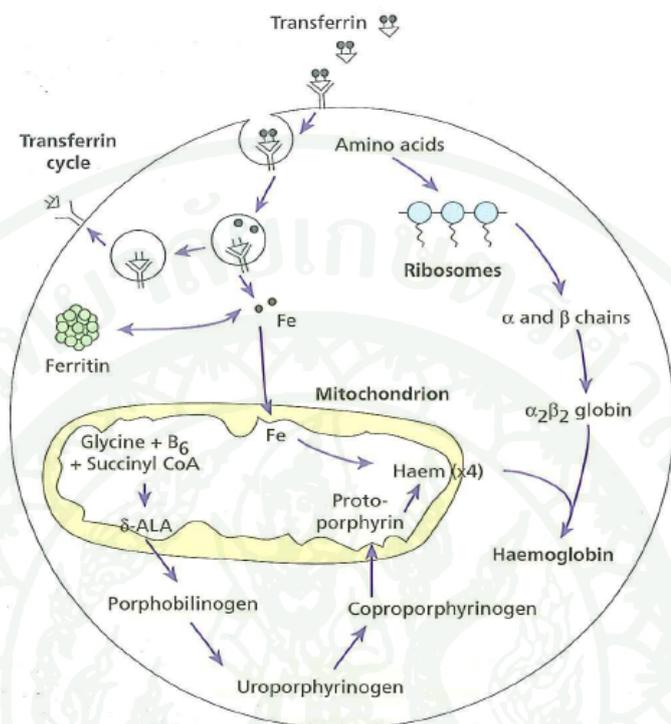
การสร้างเม็ดเลือดของทารกก่อนคลอด (development of hematopoiesis in embryo) การสร้างเม็ดเลือดของทารกในครรภ์เริ่มตั้งแต่เอ็มบริโออายุ 3 สัปดาห์ โดยเริ่มสร้างใน blood island ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของเม็ดเลือดและเซลล์บุชั้นใน (endothelium) ของหลอดเลือดในระยะแรกของทารก ในครรภ์ ต่อมาการสร้างเม็ดเลือดเกิดขึ้นในกลุ่มอวัยวะที่เรียกว่า reticuloendothelium system คือ ตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง และไขกระดูก เมื่อเอ็มบริโอมีอายุมากขึ้นการสร้างเม็ดเลือดจะสร้างที่ไขกระดูกมากขึ้นตามลำดับ โดยจะมีการสร้างเม็ดเลือดที่ไขกระดูกเมื่ออายุครรภ์ประมาณ 5 เดือน เมื่อทารกครบกำหนดคลอด (full term) จะมีการสร้างเม็ดเลือดที่ไขกระดูกเท่านั้น ส่วนต่อมน้ำเหลืองจะสร้างเฉพาะ lymphoid cell เท่านั้น การสร้างเม็ดเลือดแดงอาศัยขบวนการอิริโทรพอยอซิส (erythropoiesis) ที่ถูกควบคุมโดยระดับฮอร์โมนอิริโทรพอยอิติน (erythropoietin, EPO) ซึ่งสร้างมาจากไตและตับ มีหน้าที่กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง การสร้างเม็ดเลือดแดงเริ่มเกิดขึ้นที่โปรอิริโทรบลาสต์ (proerythroblast) มีการแบ่งเซลล์หลายครั้งจนได้เม็ดเลือดแดงโตเต็มที่ (mature erythrocyte) โดยเซลล์ที่มีการแบ่งครั้งแรกเรียกว่า เบโซฟิล อิริโทรบลาสต์ (basophil erythroblast) เพราะย้อมติดสีประเภทต่างได้ (basic dye) เซลล์ในระยะนี้มีการสะสมของฮีโมโกลบินน้อยมาก และมีการพัฒนาต่อไปอย่างช้าๆ จาก โพลีโครมาโตฟิล อิริโทรบลาสต์ (polychromatophil erythroblast) ออร์โธโครมาติก อิริโทรบลาสต์ (orthochromatic erythroblast) ระยะนี้เซลล์จะมีฮีโมโกลบินประมาณ 34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของนิวเคลียสเข้มขึ้นและมีขนาดเล็กลง จนถึงระยะเรติคูลไซต์ (reticulocyte) จะไม่มีนิวเคลียสและเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum) แต่มีส่วนของสารเบโซฟิลเล็กน้อยที่ประกอบด้วยกอลจิ แอปพาราตัส (golgi apparatus) ไมโต

คอนเดรีย (mitochondria) และออร์แกเนลล์ภายในไซโตพลาสซึมเพียงเล็กน้อย เมื่อเรติคูลูโลไซต์เคลื่อนที่ออกจากไขกระดูกเข้าสู่ผนังหลอดเลือดฝอย (capillary) โดยวิธีการลอดผ่านช่องว่างของผนังหลอดเลือดฝอย (diapedesis) โดยปกติส่วนของสารเบโซฟิลในระยะเวลาเรติคูลูโลไซต์จะหายไปภายใน 1-2 วัน ทำให้มีการพัฒนาไปเป็นเม็ดเลือดแดงโตเต็มที่ จุดประสงค์หลักของการสร้างเม็ดเลือดแดงคือ การสังเคราะห์ฮีโมโกลบินเพื่อการขนส่งออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆ นอกจากนั้นโครงสร้างของฮีโมโกลบินมีส่วนช่วยคงไว้ซึ่งโครงสร้างเม็ดเลือดแดง ผิวของเม็ดเลือดแดงเป็น lipid bilayer ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วย actin และ spectin เป็นเมมเบรนโปรตีน ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ที่มวลโมเลกุลสูงเพื่อคงไว้ซึ่งโครงสร้างของเม็ดเลือด (ณัฐประภา, 2547; พรเทพ, 2541; Feldman *et al.*, 2000; Reed, 2009; Guyton and Hall, 2011)

การสร้างฮีโมโกลบิน (Formation of Hemoglobin)

การสร้างฮีโมโกลบิน ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน คือ 1. การขนส่งเหล็กมายังแหล่งสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน 2. การสังเคราะห์ห่วงแหวนโปรโตพอร์ไฟริน (protoporphyrin ring) ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของฮีม (heme) 3. การสังเคราะห์กลอบิน เหล็กจะถูกส่งมายังเซลล์ที่สังเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยโปรตีน transferrin เมื่อเหล็กเข้าสู่เซลล์ที่สร้างฮีโมโกลบินจะถูกส่งไปยังไมโทคอนเดรียเพื่อสอดใส่เข้าไปในโมเลกุล protoporphyrin ring ทำให้เกิดโมเลกุลของฮีม ส่วนเหล็กที่เหลือเกินพอจะรวมกันกับโปรตีนเกิดเป็น ferritin สองในสามของเหล็กในร่างกายทั้งหมดจะรวมกันอยู่ในฮีม การสังเคราะห์โปรโตพอร์ไฟริน เกิดที่ไมโทคอนเดรีย โดยการสังเคราะห์สารชนิดหนึ่งคือ delta aminolevulinic acid (δ ALA) จากไกลซีน (glycine) และซัคซินิลโคเอ (succinyl-CoA) ขบวนการสังเคราะห์สารดังกล่าวโดยอาศัยเอนไซม์ δ ALA synthetase นอกจากนี้แล้วยังอยู่ใต้อิทธิพลของฮอร์โมนอิริโทรพอยอิตินและวิตามินบี₂ (pyridoxal phosphate) ที่ไซโตพลาสซึม โมเลกุลของ ALA 2 โมเลกุลจะรวมเข้าเป็น pyrrole porphobilinogen (PBG) ด้วยเอนไซม์ δ ALA dehydrase แล้ว porphobilinogen 4 โมเลกุล มารวมกันเกิดเป็น uroporphyrinogen (UPG) ต่อมา มีการสังเคราะห์ corprotoporphyrinogen (CPG) โดยการดึงเอา carboxyl group ออกไปจาก UPG ซึ่งขั้นตอนต่อไปเป็นการสังเคราะห์ฮีมในไมโทคอนเดรีย คือ โปรโตพอร์ไฟริน IX (protoporphyrin IX) จากนั้นจะเข้าจับกับเหล็กหรือเฟอร์รัสไอออน (ferrous, Fe^{2+}) เป็น ferroprotoporphyrin IX สร้างเป็นโมเลกุลฮีม ในช่วงท้ายโมเลกุลฮีมจับกับสายพอลิเปปไทด์ เรียกว่าสายกลอบิน (globin) โดยฮีมมีปัจจัยในการควบคุมการสร้างสายกลอบิน ซึ่งสังเคราะห์จากไรโบโซม (ribosome) และสร้างเป็นหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน เรียกว่าสายฮีโมโกลบิน (hemoglobin chain) การสร้างสายอัลฟาและสายเบต้ามีความสัมพันธ์กัน ถ้ามีการสร้างสายใดสายหนึ่งมากเกินไปจะมีการยับยั้งการสร้างสายนั้น

ในขณะที่เดียวกันก็มีการกระตุ้นการสร้างอีกสายหนึ่ง สายพอลิเปปไทด์ของกลอบินถูกสังเคราะห์ขึ้นในไซโทพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงอ่อน (ภาพที่1) (พรเทพ, 2541; Guyton and Hall, 2011)



ภาพที่ 1 การสร้างฮีโมโกลบิน

ที่มา: Hoff brand *et al.* (2006)

การทำลายเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบิน (Destruction of Red Blood Cells and Hemoglobin)

เม็ดเลือดแดงที่แก่เต็มที่มีอายุประมาณ 120 วัน มีการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ และเมื่อผ่านเข้าไปในหลอดเลือดฝอยของม้าม ผนังเซลล์ จะแตกออก ร้อยละ 90 ของเม็ดเลือดแดงถูกทำลายในม้าม และ reticuloendothelial system (RES) ในระบบนี้เม็ดเลือดแดงที่อายุมากจะถูกจับ โดย RES แล้วถูกย่อยด้วยขบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) อาศัยแมโครเฟจ (macrophages) จากส่วนต่างๆของร่างกายโดยเฉพาะม้าม ไชกระดุก คูปฟ์เฟอร์เซลล์ (kupffer cell) ในตับ ส่วนฮีมมีการเปลี่ยนแปลงใน RES โดยmicrosomal heme oxygenase ผลิตpyrrole ring ของฮีมที่ตำแหน่ง α -methane bridge กลาย เป็นบิลิ

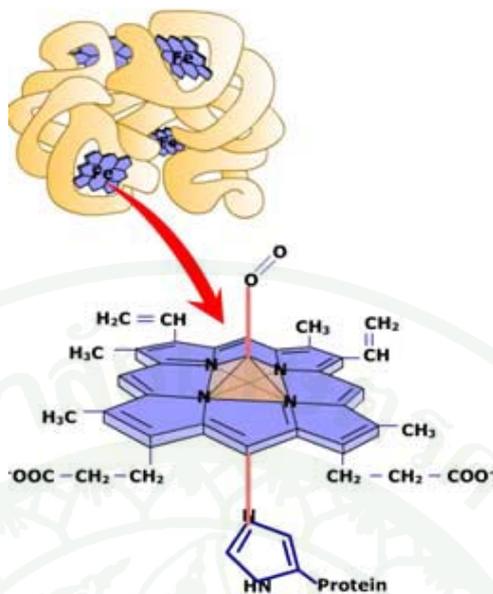
เวอดิน (biliverdin) และเป็นบิลิรูบิน (bilirubin) โดยอาศัยแมโครเฟจ พร้อมปล่อยเหล็กและคาร์บอนมอนอกไซด์ออกมา แล้วถูกขับออกทางปอด ส่วนเหล็กถูกขนส่งโดย transferrin เพื่อให้เนื้อเยื่ออื่นใช้หรือสะสมไว้เพื่อใช้ต่อบิลิรูบินเข้าสู่ตับโดยอาศัยแอลบูมิน (albumin) และถูกเปลี่ยนเป็น bilirubin diglucuronide แล้วขับออกทางน้ำดี (bile) ออกสู่ลำไส้ขณะที่อยู่ในลำไส้บิลิรูบินจะถูกแบคทีเรียเปลี่ยนไปเป็น urobilinogen (stercobilinogen) ถูกขับออกมาทางอุจจาระ urobilinogen ส่วนน้อยจะถูกดูดกลับผ่าน enterohepatic circulation ไปออกที่ไตและขับออกมากับปัสสาวะ ส่วนกลอบินจะถูกแยกสลายเป็นกรดอะมิโนนำไปเก็บไว้ในแหล่งสะสมกรดอะมิโน (amino acid pool) เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ เม็ดเลือดแดงปกติในระบบไหลเวียนโลหิตมีอายุ (life span) เฉลี่ยประมาณ 140-145 วันในม้า 143 วันในวัว 130 วันในคน 120 วันในสุนัข 100 วันในแมว 72 วัน ในสุกร 67 วัน ในแกะ 135 วัน ในแพะ 115 วัน ในกระต่าย 57 วันในหนูแฮมสเตอร์ 50 วันในหนูตะเภา 80 วัน และ 56 วันในหนูแรท ซึ่งสปีชีส์ที่มีขนาดใหญ่จะมีอายุเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงยาวนานกว่าสปีชีส์ที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากสปีชีส์ที่มีขนาดเล็กจะมีอัตราเมแทบอลิซึม (metabolism) และออกซิเดทีฟสเตรส (oxidative stress) ที่เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ สูงกว่าสปีชีส์ที่มีขนาดใหญ่ มีผลทำให้ช่วงชีวิตของเม็ดเลือดสั้นลงและมีอายุแก่ไวขึ้น ในสัตว์แต่ละตัวเม็ดเลือดแดงสามารถมีอายุยาวนานขึ้นโดยลดอัตราเมแทบอลิซึมลง เช่น การจำศีล (hibernation) เม็ดเลือดแดงโตเต็มที่ไม่มีนิวเคลียส เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม และไมโทคอนเดรีย จึงไม่มีเอนไซม์ในไซโตพลาสซึมที่ใช้ในเมแทบอลิซึมของกลูโคสและสร้าง ATP ซึ่งเอนไซม์มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน นอกจากนี้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงอาจเสื่อมจากการเสียดสีขณะที่อยู่ในระบบหมุนเวียนโลหิต โดยเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดใหญ่จะเสื่อมเร็วกว่าเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดเล็ก จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เม็ดเลือดแดงที่มีอายุมากแตกได้ง่าย สิ่งสำคัญ 3 อย่างที่ทำให้เม็ดเลือดแดงคงสภาพอยู่ได้และทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ คือ 1.ฮีโมโกลบิน 2.ผนังเซลล์และโมเลกุลต่างๆในเซลล์เม็ดเลือดแดง ได้แก่เอนไซม์ โคเอนไซม์ 3.สารจำพวกกลูโคส (ฉัฐประภา, 2547; พรเทพ, 2541; Kaneko *et al*, 2008; Guyton and Hall, 2011)

โครงสร้างของฮีโมโกลบิน (Structure of Hemoglobin)

ฮีโมโกลบินมีโครงสร้างเป็นจตุรหมู่ (tetramer) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 สาย เป็นสายอัลฟา 2 สายและสายเบต้า 2 สาย โครงสร้างโดยรวมของฮีโมโกลบินคือ $\alpha_2\beta_2$ ทั้งสายอัลฟาและเบต้าของฮีโมโกลบินมีโครงรูป (conformation) คล้ายกับสายไมโอโกลบินมาก ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลประกอบด้วยฮีโม 4 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลของฮีโมจับกันเป็นหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) กับแต่ละสายของสายพอลิเปปไทด์ หมู่พรอสเทติกในฮีโมโกลบิน คือ หมู่ฮีโมที่ประกอบด้วย

ส่วนอะตอมของเหล็กในรูปเฟอร์รัสไอออน (ferrous, Fe^{2+}) อยู่กลางอะตอม และสารอินทรีย์โปรโตพอร์ไฟริน ประกอบด้วยหมู่ไพร์รอล 4 หมู่ ที่เชื่อมต่อกันด้วยสะพานเมธีน (methene bridge) เกิดเป็นเตตระไพร์รอล (tetrapyrrol) ในโมเลกุลประกอบด้วยโซ่ข้างเป็นหมู่เมทิล (methyl group) 4 หมู่ หมู่ไวไนล (vinyl group) 2 หมู่ และหมู่โพรปิโอเนต (propionate group) 2 หมู่ (ภาพที่ 2) (อาภัสสรา, 2551; Horton *et al.*, 2002) ฮีโมโกลบินมีน้ำหนักโมเลกุล 64,500 ดาลตัน ในสายอัลฟาประกอบด้วยกรดอะมิโน 141 กรดอะมิโน และสายเบต้าประกอบด้วย 146 กรดอะมิโน เปรียบเทียบกับสายไมโอโกลบินที่ประกอบด้วย 153 กรดอะมิโน หนึ่งในโมเลกุลของฮีโมโกลบินสามารถจับได้กับสี่โมเลกุลของออกซิเจน ในเลือด 1 ลิตรมีฮีโมโกลบิน 106 กรัมขนส่งออกซิเจนได้ 210 มิลลิลิตรแต่ถ้าเม็ดเลือดแดงไม่มีฮีโมโกลบินจะขนส่งออกซิเจนได้เพียง 3 มิลลิลิตรเท่านั้น ฮีโมโกลบินที่อึดตัว 1 กรัมสามารถจับออกซิเจนได้ 1.36-1.39 มิลลิลิตร ดังนั้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมปกติมี ฮีโมโกลบินเฉลี่ยประมาณ 10-15 กรัมต่อเดซิลิตรมีความจุออกซิเจน (oxygen capacity) ประมาณ 3.6-21 มิลลิลิตรต่อเดซิลิตร ความจุออกซิเจนของเลือดคือปริมาณออกซิเจนมากที่สุดที่อยู่ในเลือด ปริมาณออกซิเจน (oxygen content) เป็นปริมาณของออกซิเจนในเลือดที่จับกับ ฮีโมโกลบินเกือบทั้งหมด ฮีโมโกลบินมีความสามารถที่จะจับกับออกซิเจนได้อย่างอึดตัวในสภาวะที่มีออกซิเจน ทำให้ความจุออกซิเจนและปริมาณออกซิเจนในเลือดเท่ากัน เมื่อ ออกซิเจน ไปเลี้ยงส่วนของเนื้อเยื่อ ทำให้ปริมาณออกซิเจนในเลือดลดลง แต่ความจุออกซิเจนในเลือดยังคงเหมือนเดิม (ศักดิ์, 2553; Cunningham and Klein, 2007)

ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีน ที่สำคัญในเม็ดเลือดแดง ชนิดกลอบูลาร์ (globular protein) ขนาดประมาณ $65 \times 55 \times 50 \text{ \AA}$ พบว่าในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์จะมีฮีโมโกลบินประมาณ 400 ล้านโมเลกุลซึ่งคิดเป็นร้อยละ 95 ของน้ำหนักแห้งเม็ดเลือดแดง (Jain *et al.*, 1986; Voet and Voet, 2004) ฮีโมโกลบินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 สาย ที่มี 4 หน่วยย่อย (tetrameric protein) ซึ่งจะมีสายของอัลฟา (α -chain) 2 สาย และไมโซสายอัลฟา (β , δ และ γ -chain) 2 สาย แต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินจับกันด้วยแรงดึงดูดแบบอ่อนที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ได้แก่ แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic force) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงระหว่างประจุ (electrostatic force) และแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ ที่เรียกว่าสายกลอบิน ม้วนตัวหุ้มสี่กลุ่มของโมเลกุลของฮีมซึ่งมีเหล็ก (ferrous, Fe^{2+}) 1 อะตอม อยู่ตรงกลาง มีลักษณะเป็นรูปทรงสี่หน้า (tetrahedron) (ปริยานันท์ และคณะ, 2553; สมปอง, 2550; Jain *et al.*, 1986; Ritter, 1996; Feldman *et al.*, 2000; Guyton and Hall, 2011)



ภาพที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลฮีโมโกลบิน

ที่มา: ภิญโญ และคณะ (2555)

ไนโตรเจนทั้ง 4 อะตอมที่บริเวณศูนย์กลางของวงแหวนโปรโตพอร์ไฟริลจับกับอะตอมของเหล็ก ในฮีโม โดยที่ อะตอมของเหล็กสามารถสร้างพันธะได้ 6 พันธะ กับอะตอมอื่นๆ 4 พันธะกับไนโตรเจนอะตอมที่อยู่ในระนาบเดียวกับหมู่ฮีม พันธะที่ 5 และ 6 ตั้งฉากกับระนาบของฮีม ซึ่งพันธะที่ 5 หรือตำแหน่งโคออร์ดิเนชัน (coordination position) ที่ 5 จะจับกับไนโตรเจนอะตอมของกรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine) ของโปรตีนที่เรียกว่า ฮิสติดีน F8 (His F8) หรือพรอกซิมอลฮิสติดีน (proximal histidine) ส่วนพันธะที่ 6 หรือ ตำแหน่งโคออร์ดิเนชันที่ 6 จับกับโมเลกุลของออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าสารโมเลกุลเล็ก เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) สามารถสร้างพันธะที่ 6 ของ Fe^{2+} ได้ ทำให้ทั้งฮีโมโกลบินและไมโอโกลบินมีความชอบต่อสารโมเลกุลเล็กๆเหล่านี้สูงกว่าออกซิเจน (อาภัสสร, 2551; Horton *et al.*, 2002) แต่ละสายของพอลิเปปไทด์จับอยู่กับหมู่ฮีม 1 หน่วย เกาะภายในโมเลกุลบริเวณที่ไม่มีขั้ว (non-polar residues) สูง เหล็กของฮีมเชื่อมที่สองตำแหน่งกับอะตอมไนโตรเจนของหน่วยอิมิดาโซลของกรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine imidazole nitrogen atom) ของสายพอลิเปปไทด์

เมื่อเอาฮีมออกจากฮีโมโกลบินความเสถียรของโมเลกุลฮีโมโกลบินจะลดลง ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะมีผลทำให้โมเลกุลฮีโมโกลบินแยกออกจาก

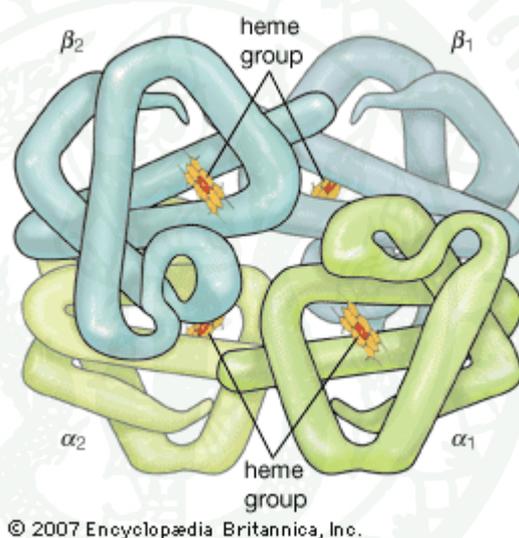
กันอย่างรวดเร็วจึงเป็น 2 หน่วยย่อย (dimer) นำหนักโมเลกุลของสายกลอบินประมาณ 16,000 ดาลตัน โดยที่สายกลอบินมีจำนวนกรดอะมิโนในสายอัลฟา 141 หน่วย ส่วนสายเบต้า แกมมา และเดลต้า มี 146 หน่วย ซึ่งฮีโมโกลบินของสัตว์แต่ละชนิดมีความหลากหลายแตกต่างกัน (Sripanitan, 1983; Jain *et al.*, 1986; Voet and Voet, 2004; Guyton and Hall, 2011)

โครงสร้างปฐมภูมิของฮีโมโกลบิน (primary structure) มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรง (linear polymer) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) สายพอลิเมอร์นี้สามารถหมุนได้อิสระ จึงเกิดส่วนที่เป็นเกลียว (helical segment) และส่วนที่ไม่เป็นเกลียว (non-helical segment) กลายเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ซึ่งสามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และพบว่าส่วนที่เป็นเกลียวเฮลิคซ์ (helix)) มี 80 เพอร์เซ็นต์ สายเบต้ามี 8 เกลียว ได้แก่ A B C D E F G และ H ส่วนสายอัลฟามี 7 เกลียวเฮลิคซ์ ไม่มีเกลียวเฮลิคซ์ D โดยนับจากปลาย N (N - terminus) ไปยังปลาย C (C - terminus) ส่วนไม่เป็นเกลียวเฮลิคซ์มี 20 เพอร์เซ็นต์ เช่น NA AB และ BC เป็นต้น (Sripanitan, 1983; Rodak *et al.*, 2007; Schechter, 2008)

โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของฮีโมโกลบินมีลักษณะการม้วนตัวของโครงสร้างทุติยภูมิ โดยหันส่วนมีขั้ว (polar side chain) สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำบริเวณผิวด้านนอก โดยมีหมู่อิมมูอยู่ด้านในมีลักษณะแบบกระเป๋า (pocket) ซึ่งเชื่อมกับสายกลอบินส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic side chain) อะตอมของ Fe^{2+} ในอิมมูมีการสร้างพันธะโคเวเลนต์กับกรดอะมิโนฮิสติดีน F8 (histidine F8) หรือกรดอะมิโนฮิสติดีนด้านใกล้ (proximal histidine) ที่ตำแหน่ง His 87 ของสายอัลฟาและตำแหน่ง His 92 ของสายเบต้าและยังมีตำแหน่งลิแกนด์ (ligand) ที่สำคัญคือ กรดอะมิโนฮิสติดีน E7 (histidine E7) หรือกรดฮิสติดีนด้านไกล (distal histidine) ที่ตำแหน่ง 58 ของสายอัลฟาและตำแหน่ง 63 ของสายเบต้า ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จับกับออกซิเจน เมื่อ Fe^{2+} จับกับออกซิเจนแล้ว แต่ละสายพอลิเปปไทด์ของฮีโมโกลบินอยู่ในโครงสร้างตติยภูมิเช่นเดียวกับฮีโมโกลบิน (อาภัสสร, 2551; ปรียานันท์ และคณะ, 2553; Boonyarat, 1977; Sripanitan, 1983; Rodak *et al.*, 2007)

โครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบิน ในคนอยู่ในรูปเตตระเมอร์ ที่มี 4 หน่วยย่อย (subunit) ประกอบด้วย 4 สายพอลิเปปไทด์ และ 4 หมู่อิมมูซึ่งเป็นหมู่พอร์สเทติกที่มี เหล็กหรือเฟอร์รัสไอออน เป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 3) ซึ่งภายในโมเลกุลของฮีโมโกลบินมีการเชื่อมกัน 2 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบที่ 1 เป็นการเชื่อมระหว่างสายที่คล้ายกัน ได้แก่ $\alpha_1\alpha_2$ และ $\beta_1\beta_2$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการเชื่อมกันระหว่างหมู่อิมมู (heme-heme interaction) และการขนส่งคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 carriage) (อาภัสสร

รา, 2551; Stripanitan, 1983; Voet and Voet, 2004) และรูปแบบที่ 2 เป็นการเชื่อมกันระหว่างสายต่างกัน ได้แก่ $\alpha_1\beta_1$ หรือ $\alpha_2\beta_2$ ที่เกี่ยวข้องกับส่วนเกลียว B G H และส่วนมุม GH และ $\alpha_1\beta_2$ หรือ $\alpha_2\beta_1$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับเกลียวหลัก C G และส่วนมุม FG (Shikawa and Matsuoka, 2003) พบพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในโครงสร้างนี้ ที่เกิดขึ้นจากหมู่ ไธออลของกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine-SH group) ในสายฮีโมโกลบิน (Ritter, 1996) สายอัลฟาและสายเบต้าทั้งสองสายมาอยู่รวมกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ โดยแต่ละโซ่จับกับหมู่ฮีมซึ่งมีระยะห่างประมาณ 2.5 นาโนเมตร โมเลกุลออกซิเจนจับกับตำแหน่งโคออร์ดิเนชันที่ 6 ของอะตอม Fe^{2+} ในหมู่ฮีมแต่ละหมู่ ความแตกต่างระหว่างฮีโมโกลบินและไมโอโกลบินจะพบในโครงสร้างจตุรภูมิ (อาภัสตรา , 2551; Voet and Voet, 2004)



ภาพที่ 3 โครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบิน

ที่มา: Encyclopedia Britannica (2007)

ฮีโมโกลบินมีสีแดงเนื่องจากคุณสมบัติของหมู่ฮีมทำให้ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร โดยอิทธิพลของหมู่ โปรโตพอร์ไฟรินจับกับเหล็ก เหล็กจับกับออกซิเจนแบบหกหน้า (six coordination) ทำให้มีการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน (Piras *et al.*, 2008) อะตอมของเหล็กในโมเลกุลของฮีมสามารถอยู่ใน รูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) หรือรูปเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ได้ เมื่ออยู่ในรูปเฟอร์รัสเรียกว่าเฟอโรฮีโมโกลบิน (ferrohemoalbumin) ถ้ารูปเฟอร์รัส ถูกออกซิไดส์ให้อยู่ใน รูปเฟอร์ริกเรียกว่า เมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) หรือเฟอโรฮีโมโกลบิน (ferrihemoalbumin) ซึ่งไม่สามารถจับกับออกซิเจนได้ แต่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำ โดยปกติทั่วไปมีปริมาณ เหล็กในรูปเฟอร์ริกในเลือด

ไม่มากนัก จึงมีผลลดจำนวนออกซิเจนที่จับกับฮีโมโกลบินเพียงเล็กน้อย ในเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์ เมทฮีโมโกลบินรีดักเทส (methemoglobin reductase) ที่สามารถเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินปริมาณน้อย กลับไปเป็นเฟอโรฮีโมโกลบินได้ แต่ถ้ามี เมทฮีโมโกลบิน ปริมาณมากในเลือดจะทำให้ผิวหนังมีสีเขียวคล้ำ (cyanosis) (พิพัฒน์, 2536; สมปอง, 2550; อาภัสสร, 2551; Whitford, 2005; Piras *et al.*, 2008)

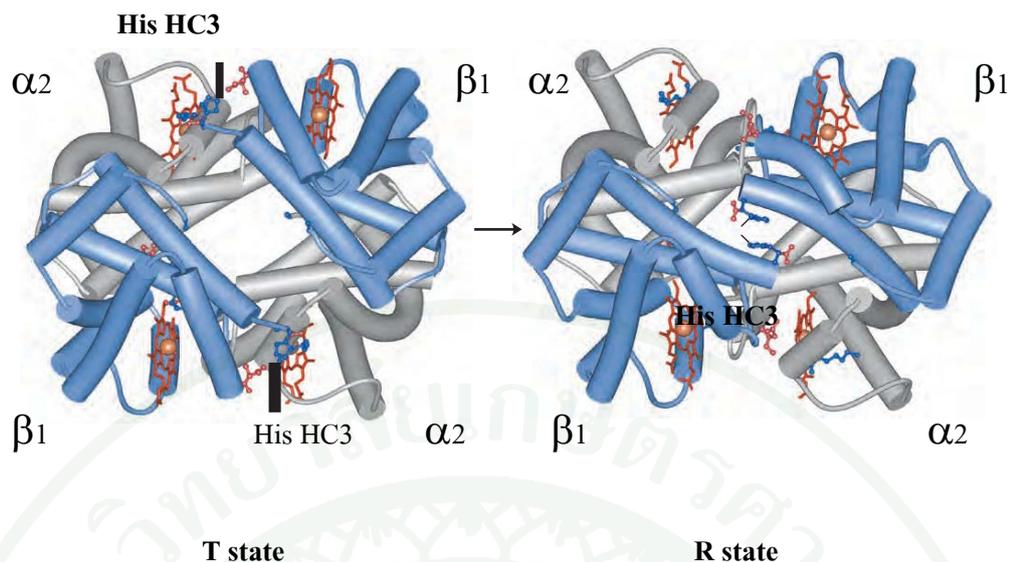
กลไกการจับออกซิเจน (Mechanism of Oxygen-Binding Cooperativity)

ฮีโมโกลบินทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจน จึงต้องสามารถจับอย่างแน่นกับออกซิเจน และปล่อยออกซิเจนออกไปได้โดยง่ายตามสภาวะแวดล้อม ในถุงลมปอด (alveoli) ความดันออกซิเจนเท่ากับ 100 ทอร์รี่ ที่ความดันนี้ฮีโมโกลบินจะอึดตัวออกซิเจนเท่ากับ 100 % ในหลอดเลือดฝอยของกล้ามเนื้อที่ทำงานจะมีความดันออกซิเจนเท่ากับ 20 ทอร์รี่ ซึ่งฮีโมโกลบินจะอึดตัวออกซิเจนน้อยกว่า 50% ที่ 26 ทอร์รี่ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เมื่อมีความต้องการออกซิเจนอย่างมากในหลอดเลือดฝอย ฮีโมโกลบินจะปล่อยออกซิเจนให้ได้โดยง่าย ออกซิเจนที่ส่งถ่ายจากฮีโมโกลบินจะถูกจับได้อย่างรวดเร็วโดยไมโอโกลบินภายในเซลล์ เพราะคุณสมบัติของไมโอโกลบินที่จับได้ง่ายกับออกซิเจน ถึงแม้จะมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ ซึ่งการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้เป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการขนส่งออกซิเจนจากปอดไปสู่กล้ามเนื้อหรือจากบริเวณที่มีออกซิเจนสูงไปสู่เนื้อเยื่อที่มีออกซิเจนต่ำกว่า ฮีโมโกลบินจะจับกับออกซิเจนแบบผันกลับได้ (reversible) และจับกับโมเลกุลออกซิเจนได้ 4 โมเลกุล โมเลกุลของฮีโมโกลบินทั้ง 4 โมเลกุลสามารถจับกับออกซิเจนได้ไม่พร้อมกัน เมื่อฮีโมโกลบินแรกจับกับออกซิเจน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของฮีโมโกลบิน (conformation change) โดยเป็นผลจากการเชื่อมกัน ด้วยพันธะอ่อน (weak bond) ระหว่าง $\alpha_1\beta_2$ หรือ $\alpha_2\beta_1$ เรียกว่า sliding contacts ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความร่วมมือในการจับกับออกซิเจน โดยทำให้ช่องว่าง (gap) ระหว่างสายเบต้าปรับให้เหมาะต่อการจับของ 2,3-บิสฟอสโฟกลีซีเรต (2,3-bisphosphoglycerate) มีผลทำให้ฮีโมโกลบิน ลดความชอบต่อออกซิเจนลง เรียกโครงสร้างแบบนี้ว่า รูปแบบ R state (Relaxed state) ซึ่งส่งผลให้มีการสื่อสารสัญญาณไปยังหมู่อิมของโมโนเมอร์อื่นๆ (heme-heme interaction) ทำให้ฮีโมโกลบินอื่น ๆ มีความสามารถในการจับ ออกซิเจนได้ดีขึ้น จึงเรียกว่าการจับแบบทำงานร่วมกันเชิงบวก (positive cooperativity) โดยเมื่อโมเลกุลของออกซิเจนตัวแรกเข้าไปจับ จะทำให้ออกซิเจนโมเลกุลต่อไปเข้าจับง่ายขึ้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติของโปรตีนอัลโลสเทอริกคือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อโปรตีนจับกับโมเลกุลเล็กๆ ฮีโมโกลบินมีโครงสร้างจตุรภูมิที่ต่างกัน 2 แบบ คือ ออกซิเจน (oxygenated) ซึ่งเป็นรูปที่มีออกซิเจน และคือออกซิเจน (deoxygenated) ซึ่งเป็นรูปที่ไม่มีออกซิเจน ในออกซิเจนฮีโมโกลบินสายบีตาสองสายจะ

เข้ามาอยู่ใกล้กันมากกว่าคือออกซีฮีโมโกลบิน การเปลี่ยนแปลงนี้ค่อนข้างมากจนทำให้ทั้งสองรูปของฮีโมโกลบินมีโครงสร้างผลึกที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4) (เกียรติทวี, 2554; Ritter, 1996; Horton *et al.*, 2002; Shikawa and Matsuoka, 2003; Whitford, 2005) นอกจากนี้การเชื่อมกันด้วยพันธะคงที่ (stable bond) ระหว่าง $\alpha_1\beta_1$ หรือ $\alpha_2\beta_2$ ที่เรียกว่า packing contacts ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงเล็กน้อย มีหน้าที่ในการควบคุม ความคงตัวต่อการจับกับออกซิเจน และยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน โดยเฉพาะกับ สายเบต้าที่มีค่า พีเอช (pH) เป็นกรด ทำให้เกิดการเติมออกซิเจนได้ยาก เรียก โครงรูปแบบนี้ว่า รูปแบบ T state (Tense state) (Prisco *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2002; Shikawa and Matsuoka, 2003)

ฮีโมโกลบินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ โครงรูปแบบ R state ไม่มี salt bridge อยู่ในสภาพคลาย เป็นโครงสร้างที่จับกับออกซิเจนหรือออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin) จึงเป็นกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูง (high oxygen affinity) และโครงสร้างแบบ Tense state มี salt bridge จำนวนมากยึดโครงสร้างไว้อยู่ในสภาพเครียดซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ได้จับกับ ออกซิเจน หรือคือออกซีฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin) เป็นกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ (low oxygen affinity) โดยที่ CO_2 , H^+ และ Cl^- มีผลลดความชอบต่อออกซิเจน โดยทำให้เกิด salt bridge ที่แข็งแรง T state มีความเสถียรมากกว่า R state เนื่องจากมี ionic salt bridge จำนวนมากที่ $\alpha_1\beta_2$ ในสภาพปกติตามธรรมชาติทั้งสองรูปแบบนี้จะอยู่ในภาวะสมดุล (equilibrium) (ภาพที่ 4) (Lehninger *et al.*, 1993; Whitford, 2005)

ความแตกต่างระหว่าง กลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูง และกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำอยู่ที่ปลาย N ของกรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 2 ($\text{NA}_2\beta$) ในสายเบต้า ส่วนที่ไม่ใช่เกลียวเฮลิคซ์ โดยกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูงเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophilic ได้แก่ กรดอะมิโนฮิสติดีน กลูตามีน (glutamine) หรือ แอสพาราจีน (asparagine) ส่วนกลุ่มที่ชอบต่อออกซิเจนต่ำเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophobic ได้แก่ กรดอะมิโนลิวซีน (leucine) เมทไธโอนีน (methionine) หรือ เฟนิลอะลานีน (phenylalanine) (Perutz and Imai, 1980; Ritter, 1996; Horton *et al.*, 2002)



ภาพที่ 4 โครงรูปของดีออกซีฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin form) ที่อยู่ในรูป T state ไปเป็นออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin form) ที่อยู่ในรูป R state โดยมีการหมุนเคลื่อนที่ไปจากเดิมประมาณ 15 องศา

ที่มา: Lehninger (1993)

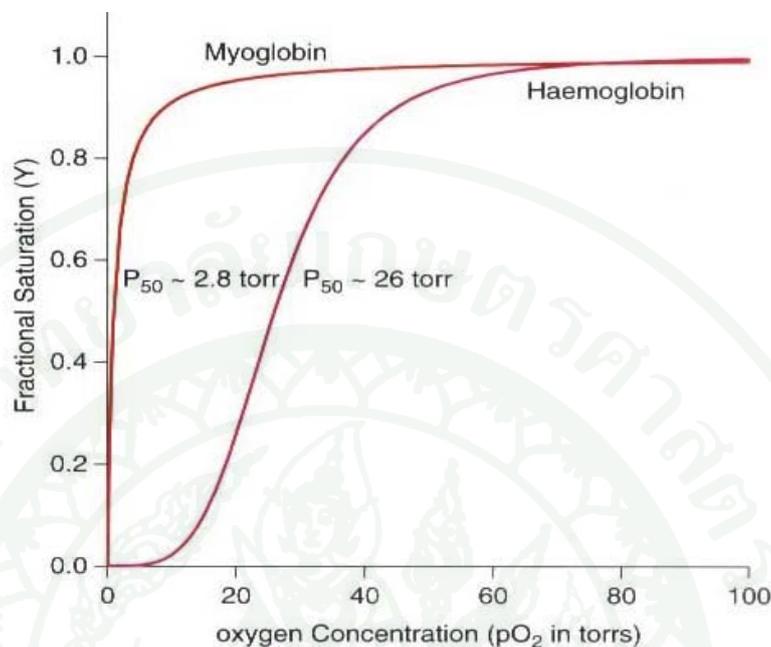
การวัดความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบิน ใช้วัดค่า P_{50} ซึ่งเป็นความดันของออกซิเจนที่ทำให้มีปริมาณของฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจนครึ่งหนึ่งของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด ค่า P_{50} จึงเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงฮีโมโกลบินว่ามีความชอบต่อออกซิเจนมากน้อยเพียงใด ถ้าค่า P_{50} ต่ำ แสดงว่ามีความชอบต่อออกซิเจนสูง เนื่องจากแม้ความดันของออกซิเจนต่ำแต่ฮีโมโกลบินก็สามารถอิ่มตัวไปด้วยออกซิเจนถึงครึ่งหนึ่ง แต่ถ้าค่า P_{50} สูง แสดงว่ามีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ เนื่องจากต้องมีความดันของออกซิเจนสูงเพื่อให้ฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจนถึงครึ่งหนึ่ง ฮีมแต่ละโมเลกุลจับกับออกซิเจนได้ 1 โมเลกุล ทำให้ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุล สามารถจับกับออกซิเจนได้ 4 โมเลกุล หรือออกซิเจน 8 อะตอม เมื่อฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลจับกับออกซิเจนที่ตำแหน่งจับ (binding site) ครบทั้ง 4 ตำแหน่ง เรียกว่าการอิ่มตัวของฮีโมโกลบิน (saturated hemoglobin) (Ritter, 1996 ; Horton *et al.*, 2002) ทั้งฮีโมโกลบินและไมโอโกลบินจะจับกับออกซิเจนแบบผันกลับได้เมื่อเขียนกราฟระหว่างระดับการอิ่มตัวของไมโอโกลบินด้วยออกซิเจนกับความดันออกซิเจนจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวมีการเพิ่มขึ้นอย่างคงที่จนกระทั่งใกล้การอิ่มตัวอย่างสมบูรณ์ระดับความชันจะหยุดลง ดังนั้นกราฟการจับกับออกซิเจนของไมโอโกลบินจึงเป็นไฮเพอร์โบลิก (hyperbolic) ในทางตรงกันข้ามกราฟการจับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบินนั้นเป็นซิกมอยด์ล (sigmoidal) กราฟรูปร่างนี้บ่งชี้ว่าการ

จับของออกซิเจน โมเลกุลแรกจะช่วยให้การจับของออกซิเจนตัวที่สองง่ายขึ้น และช่วยให้การจับตัวที่สาม และต่อไปของตัวที่สี่ง่ายขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า การจับแบบทำงานร่วมกัน (cooperative binding) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในการจับแบบทำงานร่วมกันของฮีโมโกลบินนั้นการจับของออกซิเจนตัวถัดไปจะเข้าจับได้ง่ายกว่าตัวก่อนหน้า แต่กราฟเส้นโค้งของการจับก็ยังต่ำกว่าของไมโอโกลบินที่ความดันออกซิเจนเดียวกัน กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ที่ความดันออกซิเจนใดๆ ไมโอโกลบินจะมีเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวสูงกว่าฮีโมโกลบิน (ภาพที่ 5) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ฮีโมโกลบินที่ปอดจะจับกับออกซิเจนได้อย่างสมบูรณ์พร้อมขนส่งไปให้เซลล์อื่นๆในร่างกาย ซึ่งเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆที่มีออกซิเจนต่ำ ออกซิเจนที่ขนส่งผ่านฮีโมโกลบินจะถูกจับอย่างรวดเร็วโดยไมโอโกลบินภายในเซลล์ เนื่องจากไมโอโกลบินสามารถจับได้แน่นกับออกซิเจนแม้จะมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีประโยชน์ในการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ในการขนส่งออกซิเจนจากปอดไปสู่กล้ามเนื้อหรือบริเวณที่มีออกซิเจนสูงไปสู่เนื้อเยื่อที่มีออกซิเจนต่ำ (เกียรติทิ, 2554; Horton *et al.*, 2002; Boron and Boulpaep, 2003; Whitford, 2005; Cunningham and Klein, 2007; Nelson and Cox, 2008)

มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อ กราฟของการอิ่มตัวด้วยออกซิเจน ของฮีโมโกลบิน ทำให้ความสามารถในการจับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ความชอบออกซิเจนของฮีโมโกลบิน (hemoglobin-oxygen affinity) ขึ้นอยู่กับพีเอชในเลือด ความดันย่อยของออกซิเจน (pO_2) ความดันย่อยของคาร์บอนไดออกไซด์ (pCO_2) อุณหภูมิ และ 2,3-บิสฟอสโฟเกสเซอร์เรต (บัวรอง, 2536; สมปอง, 2550; Murray *et al.*, 1996; Boron and Boulpaep, 2003; Cunningham and Klein, 2007; Nelson and Cox, 2008)

เมื่อพีเอชของเลือดลดลงเลือดมีความเป็นกรดมากขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของ โปรตอน (H^+) เพิ่มขึ้น ฮีโมโกลบินจะจับออกซิเจนได้น้อยลง กราฟจึงเลื่อนไปทางขวา หรือ pCO_2 เพิ่มขึ้นก็ มีผลทำให้ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้น้อยลงทำให้ความชอบต่อออกซิเจน ลดลง เป็นผลให้ HbO_2 dissociation curve เลื่อนไปทางขวา (ฮีโมโกลบินปล่อยออกซิเจนมากขึ้น) เรียกว่าโบร์เอฟเฟกต์ “Bohr effect” ตามชื่อของผู้ค้นพบ คริสเตียน โบร์ (Christian Bohr) การมี H^+ และ CO_2 อยู่จะไม่ส่งผลต่อความสามารถในการจับออกซิเจนของไมโอโกลบิน คือเมื่อมีการ เพิ่มความเข้มข้นของ H^+ หรือการเพิ่มความเป็นกรด หรือการลดค่า พีเอชทำให้มีการปลดปล่อยออกซิเจนออกจากโมเลกุลของฮีโมโกลบิน แล้วมีผลลดความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินลง ดังนั้นในภาวะที่ต้องการใช้ออกซิเจนมากๆ เช่น ออกกำลังกายอย่างหนักหรือในภาวะที่มีระบบการไหลเวียนล้มเหลว และ

ได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอกับความต้องการจะมีแลคเตตเกิดขึ้นมากซึ่งเป็นต้นตอของ H^+ ทำให้ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้น้อยลงจึงปล่อยออกซิเจนให้แก่เนื้อเยื่อที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว

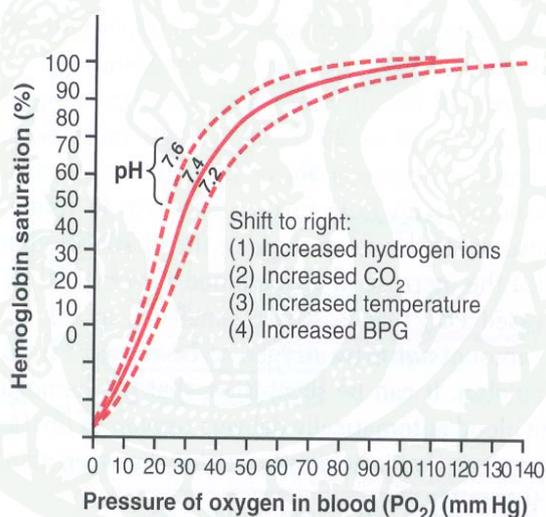


ภาพที่ 5 กราฟเปรียบเทียบการจับออกซิเจนของไมโอโกลบินและฮีโมโกลบิน (oxygen binding curve) ไมโอโกลบินอิ่มตัวที่ 50% ที่ความดันออกซิเจน 2.8 ทอร์ แต่ฮีโมโกลบินจะอิ่มตัวที่ 50% เมื่อความดันออกซิเจน 26 ทอร์

ที่มา: Whitford (2005)

อุณหภูมิ มีผลต่อการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบิน ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้น้อยลง เช่น ระหว่างออกกำลังกายอุณหภูมิของเลือดจะเพิ่มขึ้นจากความร้อนที่เกิดจากการทำงานของกล้ามเนื้อ ฮีโมโกลบินจะปล่อยออกซิเจนให้แก่กล้ามเนื้อที่กำลังทำงาน การเพิ่มอุณหภูมิมีผลให้ออกซิฮีโมโกลบินปล่อยออกซิเจนออกทำให้ HbO_2 dissociation curve เลื่อนไปทางขวา เมื่อเลือดไหลผ่านเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิต่ำซึ่งเป็นเลือดที่มีออกซิเจนมาก ทำให้ออกซิฮีโมโกลบิน มีการปล่อยออกซิเจนน้อยและเซลล์มีอัตราเมแทบอลิซึมลดลงทำให้มีความต้องการออกซิเจนน้อยลง โดยเฉพาะที่ปอดความเย็นมีส่วนช่วยในการทำให้ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้ดีขึ้นทำให้ HbO_2 dissociation curve เลื่อนไปทางซ้าย (บัวรอง, 2536; เกียรติทวี, 2554; Guyton and Hall, 2011)

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ H^+ (โดยการลดลงของค่า pH) จะลดความชอบในการจับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบิน การเพิ่ม H^+ ทำให้เกิดโปรโตเนชัน (protonation) ของกรดอะมิโน หรือการเติมโปรตอนให้กับกรดอะมิโนที่สำคัญ ได้แก่ ปลายด้าน N ของสายอัลฟา และ His¹⁴⁶ ของสายเบต้า ฮิสติดีนที่ได้รับการเติมโปรตอน (protonated histidine) นั้นถูกดึงดูดหรือทำให้เสถียรโดย salt bridge ที่เกิดกับ Asp⁹⁴ ซึ่งจะทำให้ฮีโมโกลบินมีโครงสร้างแบบคือออกซีจินต์ ในเนื้อเยื่อที่กำลังมีเมแทบอลิซึมจะต้องการออกซิเจนและมีการปลดปล่อย H^+ ออกมา จึงทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด ภายในสภาวะนี้ฮีโมโกลบินจะมีความชอบในการจับออกซิเจนลดลง และปล่อยออกซิเจนออกมาเมื่อมีความต้องการ (ภาพที่ 6) กรดและเบสจะส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของฮีโมโกลบินในการจับกับออกซิเจน ออกซีจินต์ฮีโมโกลบินจะเป็นกรดที่แรงกว่า (มีค่า pK_a ต่ำกว่า) คือออกซีจินต์ฮีโมโกลบิน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบินจะสามารถควบคุมบัฟเฟอร์ของเลือดผ่านทางโมเลกุลของฮีโมโกลบินนั่นเอง



ภาพที่ 6 กราฟแสดงการจับกันของออกซิเจนและฮีโมโกลบิน (HbO₂ dissociation curve) การเปลี่ยนแปลงของกราฟไปทางขวาจากการเพิ่มความเข้มข้นของ H^+ (การลดลงของพีเอช) การเพิ่มขึ้นของ CO₂ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ และการเพิ่มขึ้นของ 2,3-BPG

ที่มา: Guyton and Hall (2011)

CO₂ ปริมาณมากถูกผลิตออกมาระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึม CO₂ จะรวมกับน้ำในเลือดเกิดเป็น H₂CO₃ ค่า pKa ของ H₂CO₃ มีค่าเท่ากับ 6.35 CO₂ ที่อยู่ในเลือดและจากสายฮีโมโกลบิน เมื่อ CO₂ ทำปฏิกิริยากับน้ำจะได้กรดคาร์บอนิกซึ่งจะแตกตัวให้ H⁺ ดังสมการ



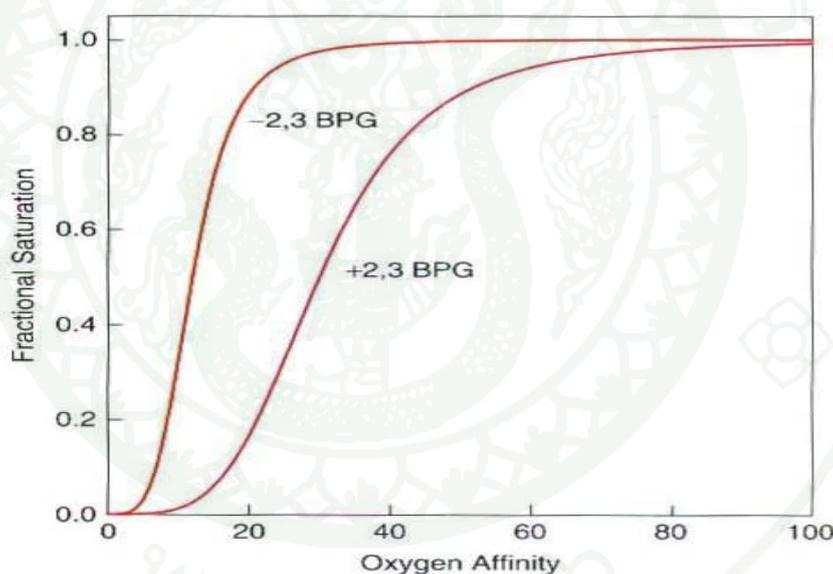
ค่า pH ปกติของเลือดมีค่าเท่ากับ 7.4 ดังนั้นประมาณ 90 % ของ CO₂ จะละลายในเลือด และอยู่ในรูปของไบคาร์บอเนตไอออน (bicarbonate, HCO₃⁻) โดยปลดปล่อย H⁺ การมี H⁺ อยู่ในปริมาณมากเป็นผลมาจากการผลิต CO₂ นี้ทำให้โครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบินชอบที่จะอยู่ในรูปของไดออกซิเจนฮีโมโกลบิน ดังนั้นความชอบในการจับกับออกซิเจนจึงต่ำลง HCO₃⁻ จะถูกขนส่งไปยังปอดซึ่งจะไปรวมกับ H⁺ ที่ถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อฮีโมโกลบินได้รับออกซิเจนได้เป็น H₂CO₃ นั้นจะปล่อย CO₂ ซึ่งจะออกมากับลมหายใจออก ฮีโมโกลบินสามารถขนส่ง CO₂ โดยตรงได้ด้วยเหมือนกัน เมื่อความเข้มข้นของ CO₂ สูงขึ้น CO₂ นี้จะรวมกับหมู่อัลฟาอะมิโนอิสระ ได้เป็นคาร์บาเมต (carbamate)

ปฏิกิริยานี้จะเปลี่ยนหมู่อัลฟาอะมิโนที่อยู่ด้านปลายไปเป็นแอนไอออน (anion) ซึ่งจากนั้นจะเข้าไปปฏิสัมพันธ์กับ Arg¹⁴¹ ของสายอัลฟา ทำให้รูปแบบไดออกซิเจนฮีโมโกลบินมีความเสถียร ฮีโมโกลบินในเลือดนั้นจับอยู่กับลิแกนด์ตัวอื่นด้วย เช่น บิสฟอสโฟกลีเซอเรต (2,3-bisphosphoglycerate, BPG) ซึ่งส่งผลอย่างมากกับความสามารถในการจับกับออกซิเจน 2,3-BPG เป็นแอนไอออนิก ฟอสเฟตอินทรีย์ จากขบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ในเม็ดเลือดแดง สามารถจับกับสายเบต้าทั้งสองของฮีโมโกลบินตรงตำแหน่งของหมู่อะมิโนที่ปลายและหมู่ฮิสทิดีนของ β-143 ฮิสทิดีนของฮีโมโกลบิน 2,3-BPG ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมแบบอัลโลสเตอริก (allosteric effector) ของฮีโมโกลบิน จะจับกับไดออกซิฮีโมโกลบินทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของฮีโมโกลบินส่งผลให้ความชอบต่อออกซิเจนลดลงดังนั้นเมื่อมี 2,3-BPG มากขึ้นออกซิฮีโมโกลบินจะปล่อยออกซิเจนให้แก่เนื้อเยื่อ ทำให้ HbO₂ dissociation curve เลื่อนไปทางขวา การทำงานในลักษณะนี้เป็นการปรับสมดุลทางโครงสร้างของฮีโมโกลบินระหว่างรูปไดออกซิฮีโมโกลบินและออกซิฮีโมโกลบิน ดังสมการ



ดังนั้นขบวนการไกลโคไลซิสที่เกิดขึ้นจากการออกกำลังกาย การขึ้นไปบนที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล (high altitude) และการขาดออกซิเจนเป็นเวลานาน (chronic hypoxia) มีผลทำให้ระดับ 2,3-BPG ในเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ทำให้ร่างกายได้รับออกซิเจนมากขึ้น (บั้วรอง, 2536; อาภัสสรุ, 2551; Horton *et al.*, 2002)

การจับของ BPG เกิดขึ้นด้วยแรงอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic forces) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างประจุลบของ BPG และประจุบวกของโปรตีน เมื่อมี BPG ความดันที่ 50% ของฮีโมโกลบินถูกจับโดยออกซิเจน คือ 26 ทอร์ แต่ถ้าไม่มี BPG ในเลือด ความสามารถของฮีโมโกลบินในการจับกับออกซิเจนจะสูงกวานั้นมาก (ความดันที่ 50% ของฮีโมโกลบินถูกจับโดยออกซิเจนคือ 1 ทอร์) ออกซิเจนเพียงเล็กน้อยก็จะถูกปลดปล่อยออกมาในหลอดเลือดฝอย ฮีโมโกลบินที่แยกได้จากเลือดและแยกเอา BPG ที่จับอยู่ออกไปแล้วจะแสดงพฤติกรรมนี้ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงคุณสมบัติการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินโดยมีและไม่มี BPG

ที่มา: Whitford (2005)

BPG มีบทบาทการให้ออกซิเจนกับตัวอ่อนที่กำลังเติบโต ตัวอ่อนในครรภ์จะได้รับออกซิเจนจากเลือดของแม่ทางรก ฮีโมโกลบินของตัวอ่อน (fetal hemoglobin, Hb F) จะมีความชอบในการจับกับออกซิเจนสูงกว่าฮีโมโกลบินของแม่ ทำให้เกิดการขนส่งออกซิเจนจากแม่สู่ลูกอย่างมีประสิทธิภาพ

ประสิทธิภาพ ซึ่งกระบวนการนี้เกิดขึ้นได้เนื่องจาก Hb F มีลักษณะพิเศษสองประการ ลักษณะแรกคือ มีสายพอลิเปปไทด์ที่ต่างกันสองสาย โครงสร้างของหน่วยย่อยใน Hb F คือ $\alpha_2\beta_2$ สายเบต้าของฮีโมโกลบินผู้ใหญ่ปกติ (Hb A) ถูกแทนที่ด้วยสายแกมมา ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันแต่ไม่เหมือนกันทุกประการ ลักษณะที่สองคือ Hb F จับกับ BPG ได้ไม่แน่นเท่ากับ Hb A ในสายเบต้าของคนปกติ His¹⁴³ จะสร้าง salt bridge กับ BPG ใน Hb F นั้นสายแกมมามีการแทนที่ His¹⁴³ ด้วย Ser การเปลี่ยนกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (His) ไปเป็นกรดอะมิโนที่เป็นกลาง (Ser) นี้ทำให้ความสามารถของฮีโมโกลบินในการจับ BPG ลดลง จึงทำให้ปรากฏการณ์อัลโลสเตอริกลดลง ซึ่งมากพอที่จะทำให้กราฟการจับของ Hb F สูงกว่า Hb A

ฮีโมโกลบินที่ได้รับการศึกษาอย่างมากคือ ฮีโมโกลบินของเซลล์รูปเคียว (sickle-cell hemoglobin, Hb S) ใน Hb S นั้นสายเบต้าจะมีการแทนที่ของกรดอะมิโนหนึ่งหน่วยจากกรดกลูตามิก (glutamic acid) ไปเป็นแวลีน (valine) การแทนที่กรดอะมิโนที่มีขั้วด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วบนผิวของโปรตีนทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) ของโมเลกุลด้วยแรงแบบไม่มีขั้ว (nonpolar force) และการเกาะกลุ่มกันดังกล่าวเป็นสาเหตุให้เม็ดเลือดเป็นรูปเคียว (เกียรติทวี, 2554)

นอกจากนี้ยังมีสารฟอสเฟตอินทรีย์อื่นๆที่มีผลต่อการทำงานของฮีโมโกลบินในลักษณะเดียวกัน ได้แก่ อินอซิทอล เฮกซาฟอสเฟต (inositol hexaphosphate; IHP) ทำหน้าที่แทน BPG ในนก อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate; ATP) ทำหน้าที่แทน BPG ในปลาและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibian) ส่วนใหญ่ และกวานโนซีน ไตรฟอสเฟต (guanosine triphosphate; GTP) ทำหน้าที่แทน BPG ในปลากระดูกแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าในเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี ATP ประมาณ 2 มิลลิโมลาร์ ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ฮีโมโกลบินจับ Fe^{2+} เกิดเป็นคอมเพลกซ์เชิงซ้อน (ฮาภัสสร, 2551)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฮีโมโกลบิน

จากการศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินโค โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบกระดาษ (paper electrophoresis) พบฮีโมโกลบิน 2 ฟิโนไทป์ คือ Hb AA และ Hb BB (Bangham and Blumberg, 1958) ซึ่ง Bangham and Blumberg (1958) ได้ศึกษาเพิ่มเติมพบฮีโมโกลบิน 3 ฟิโนไทป์ คือ Hb AA, Hb BB และ Hb AB Bachmann *et al.* (1978) รายงานพบฮีโมโกลบินชนิด AA, AB และ BB ในโคยุโรป ซึ่งลักษณะของ Hb มียีนคู่ที่มีรูปแบบต่างกันอยู่ที่ตำแหน่งโลกัส (locus)

เดียวกัน เรียกว่าอัลลีล (allele) ซึ่ง Hb A ถูกควบคุมโดยอัลลีลหนึ่งขณะที่ Hb B ถูกควบคุมโดยอัลลีลตรงกันข้าม Hb AA และ Hb BB มีคู่ยีนเหมือนกัน (homologus) ส่วน Hb AB มีคู่ยีนต่างกัน (heterozygous) (Bachmann *et al.*, 1978)

มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบินและความต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในเลือดโค โดยโคที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb AA แสดงความต้านทานต่อการติดเชื้อทริพาโนโซม (trypanosome) ได้สูงกว่าโคที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb BB (Bachmann *et al.*, 1978) เช่นเดียวกับ Francis and Little (1964) ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฮีโมโกลบินในโคและความต้านทานต่อเห็บ ลักษณะของ ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ที่มีแถบของฮีโมโกลบินปรากฏเพียงแถบเดียวนั้นน่าจะเป็นผลมาจากยีนที่ควบคุมลักษณะของฮีโมโกลบินนั้นๆ มีลักษณะเป็น โฮโมไซกัส อัลลีล (homozygous allele)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสายเบต้าของ Hb A และ Hb B ในโคพันธุ์เจอร์ซี่ และโคพันธุ์เฮียร์ฟอร์ด พบว่าลำดับกรดอะมิโน 145 หน่วย (residues) ในตำแหน่งที่ 15 18 และ 119 มีความแตกต่างกันโดยสายเบต้าของ Hb A ตำแหน่งที่ 15 เป็นกรดอะมิโนไกลซีน สายเบต้าของ Hb B เป็นกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ตำแหน่งที่ 18 สายเบต้าของ Hb A เป็นกรดอะมิโนไลซีน (lysine) สายเบต้าของ Hb B เป็นกรดอะมิโนฮิสทีดีน และตำแหน่งที่ 119 สายเบต้าของ Hb A เป็นกรดอะมิโนไลซีน สายเบต้าของ Hb B เป็นกรดอะมิโนแอสพาราจีน นอกจากนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N (N-terminal) ของสายเบต้ามีกรดอะมิโนเป็นเมทไธโอนีน และ ลิวซีน (Schroeder *et al.*, 1967)

จากการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของสายอัลฟาโกลบินในฮีโมโกลบินจากกระบือแม่น้ำจำนวน 4 ตัว พบว่ามีความแตกต่างกันของ ยีน A และ ยีน B ซึ่งโคคอนที่ 64 ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน หรือกรดอะมิโนแอสพาราจีน ยีน A ถอดรหัสได้ 2 สายอัลฟาโกลบิน คือ I alpha 1 และ II alpha 3 โดยอัลฟาทั้งสองสายมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันที่ตำแหน่ง 129 และ 131 ซึ่ง I alpha 1 ตำแหน่งที่ 64 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนอะลานีน (alanine), กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน และกรดอะมิโนแอสพาราจีน ตามลำดับ ขณะที่ II alpha 3 ตำแหน่งที่ 64, 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนอะลานีน กรดอะมิโนลิวซีน และกรดอะมิโนเซอรีนตามลำดับ (Ferranti *et al.*, 2001) และ Ferranti *et al.* (2001) ได้รายงานความแตกต่างของสายอัลฟาหนึ่งและสายอัลฟาสามที่ตำแหน่ง 129 และ 131 พบว่า I alpha 1 และ II alpha 3 คือ สายอัลฟาหนึ่งและสายอัลฟาสามตามลำดับ ใน Hb AA ส่วนยีน B ถอดรหัสได้ 2 สายอัลฟา คือ I alpha 2 และ II alpha 4 หรือ Hb 2 และ Hb 4 ใน Hb BB (Di Luccia *et al.*, 1991) โดยสายอัลฟาหนึ่งและสายอัลฟาสองมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันที่

ตำแหน่ง 10 11 และ 64 คือ I alpha 2 ตำแหน่ง 10 11 และ 64 เป็นกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (isoleucine) กรดอะมิโนกลูตามีน และกรดอะมิโนแอสพาราจีนตามลำดับ ขณะที่ II alpha 4 ตำแหน่ง 10 11 และ 64 เป็นกรดอะมิโนวาเลิน (valine) กรดอะมิโนไลซีนและกรดอะมิโนแอสพาราจีนตามลำดับ ขณะที่ II alpha 4 ตำแหน่ง 10 11 และ 64 เป็นกรดอะมิโนวาเลิน กรดอะมิโนไลซีน และกรดอะมิโนแอสพาราจีนตามลำดับ ซึ่งในตำแหน่งที่ 64 อาจเป็นกรดอะมิโนอะลานีนหรือกรดอะมิโนแอสพาราจีนก็ได้ โดยกรดอะมิโนถูกแทนที่ในตำแหน่งโลกัสเดียวกันและไม่ใช้ตำแหน่งโลกัสเดียวกันในสายอัลฟา ซึ่งเป็นผลจากการเกิดการกลายแบบ single point mutation (Ferranti *et al.*, 2001)

การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องแม่น้ำโดยใช้เทคนิค electrospray mass spectrometry (ES/MS) พบว่าสายเบต้าของ Hb AA มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,985.98±1.00 ดาลตัน ส่วนสายอัลฟาหนึ่งและอัลฟาสามมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,058.12±0.43 ดาลตัน และ 14,997.18±0.44 ดาลตัน ตามลำดับ สายอัลฟาทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งมีค่าสูงกว่าโครงสร้างปฐมภูมิพื้นฐานที่ได้คาดไว้ นอกจากนี้ ลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย C (C-terminal region) ของสายอัลฟาหนึ่งใน Hb AA ตำแหน่งที่ 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนชนิดลิวซีนและเซอรีน ในขณะที่สายอัลฟาสามเป็นกรดอะมิโนชนิดเฟนิลอะลานีนและแอสพาราจีน (Ferranti *et al.*, 1993)

การศึกษาฮีโมโกลบินของกลุ่มตระกูลแมวน้ำมีหู (pinnipeds) จำนวน 7 สปีชีส์โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแป็งเจล ใช้ทริส EDTA บอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) พีเอช 8.6 พบแถบฮีโมโกลบินหลัก (major hemoglobin) 2 แถบ ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow โดยพบว่า elephant grey ribbon และ harbor seal มีอัตราส่วนระหว่าง Hb fast ต่อ Hb slow เท่ากับ 3 ต่อ 1 ในขณะที่ fur seal sea lion และ walrus มีอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 1 ตามลำดับ และมีแถบฮีโมโกลบินรอง (minor hemoglobin) 1 แถบ เมื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ ฮีโมโกลบินของ elephant seal โดยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่ง ใช้เซฟาเดกซ์ G-75 และ G-100 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65,000 ดาลตัน การศึกษาส่วนประกอบของกรดอะมิโนของ elephant seal รูปแบบโครมาโทแกรมของสายกลอบินจากส่วน Hb slow พบว่าส่วนของ Hb slow-1 เทียบเท่ากับสายอัลฟา และส่วนของ Hb slow-2 เทียบเท่ากับสายเบต้า ตามลำดับ ส่วนรูปแบบโครมาโทแกรมของสายกลอบินจากส่วน Hb fast พบว่าส่วนของ Hb fast-1 เทียบเท่ากับสายอัลฟา และส่วนของ Hb fast-2 เทียบเท่ากับสายเบต้า ตามลำดับ (Lincoln *et al.*, 1973)

การศึกษาฮีโมโกลบินอูฐโหนกเดียว (one-humped camel, *Camelus dromedarius*) ในอิหร่าน จากตัวอย่างทั้งหมด 53 ตัวอย่าง เป็นตัวผู้ 35 ตัว และตัวเมีย 18 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 อายุน้อยกว่า 5 ปี จำนวน 25 ตัว กลุ่มที่ 2 อายุมากกว่า 5 ปี จำนวน 28 ตัว พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิด คือ A_1 และ A_2 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ความเข้มข้นฮีโมโกลบิน และ Hb A_1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศ ($p < 0.05$) แต่อายุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mohri, 2000)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของม้า Turkoman ในอิหร่าน และความเข้มข้นของ ฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรูโลพลาสมีน และเหล็ก โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากม้า จำนวน 50 ตัว แบ่งตามเพศ และช่วงอายุเป็น 2-3 ปี 3-5 ปี และ มากกว่า 5 ปี พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิดคือ Hb A_1 96.02 เปอร์เซ็นต์ และ Hb A_2 3.98 เปอร์เซ็นต์ Hb A_1 เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วและพบเป็นแถบหลัก และ Hb A_2 เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่า โดยที่เพศและอายุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรูโลพลาสมีน และเหล็ก (Nazifi *et al.*, 2003)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของม้า Caspian miniature ในอิหร่าน และความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรูโลพลาสมีน และเหล็ก โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากม้า จำนวน 50 ตัว ตามช่วงอายุ 1.5-3 ปี 3-5 ปี และ มากกว่า 5 ปี พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิดคือ Hb A 66.58 เปอร์เซ็นต์ และ Hb B 33.42 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนของ Hb A และ Hb B เท่ากับ 1.99:1 ซึ่งต่ำกว่าอัตราส่วนของม้าพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้คือมีอัตราส่วนของ Hb A และ Hb B เท่ากับ 2.5:1 โดยที่เพศและอายุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรูโลพลาสมีน และเหล็ก (Nazifi and Rategh, 2005)

การศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบินของแกะ 2 สายพันธุ์ Moghani และ Makouei ที่สำคัญในอิหร่าน โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิดในพันธุ์ Moghani คือ Hb AA มี 71.6 เปอร์เซ็นต์ และ Hb AB มี 28.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในพันธุ์ Makouei คือ Hb AA มี 69.3 เปอร์เซ็นต์ และ Hb AB มี 30.7 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ฟีโนไทป์ AB มีปริมาณฮีโมโกลบิน B มากกว่า A แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับฮีโมโกลบิน A และ B ของทั้งสองสายพันธุ์ นอกจากนี้ปริมาณฮีโมโกลบินรวมในพันธุ์ Makouei มีมากกว่าพันธุ์ Moghani อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Esharatkah *et al.*, 2007) ฮีโมโกลบิน ฟีโนไทป์

ของแกะประกอบด้วย Hb A Hb B Hb C Hb E Hb F โดยที่ Hb E เป็นฮีโมโกลบินใน ระยะตัวอ่อน คงอยู่ในมดลูกของแม่ในสภาพที่มีออกซิเจน และ Hb A เป็นฮีโมโกลบินในระยะเต็มวัยนอกมดลูก การเปลี่ยนจาก Hb E ไปเป็น Hb A เริ่มเกิดขึ้นในมดลูกและเกิดขึ้นสมบูรณ์ในระยะ 1 เดือนหลังคลอด โดยที่ Hb F เป็นฮีโมโกลบินในระยะลูกอ่อนจะแทนที่ Hb E ในมดลูก ต่อจากนั้น Hb F จะเปลี่ยนเป็น Hb A แต่มีลักษณะที่สำคัญพิเศษในแกะและแกะที่มีฮีโมโกลบินลักษณะเฉพาะ คือ Hb C ซึ่งจะแทนที่ Hb F ในระยะแรกเกิดภายใน 2-3 เดือน ก่อนที่จะเปลี่ยนไปเป็น Hb A โดยที่ในแกะที่มี Hb A ฟีนไทป์ A ($\alpha_2\beta_2^A$) หรือ AB ($\alpha_2\beta_2^{A,B}$) จะแสดง Hb C มีประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมด ในขณะที่แกะที่มี Hb B ฟีนไทป์ B ($\alpha_2\beta_2^B$) จะไม่แสดง Hb C พบว่าประมาณ 30 วันหลังเกิด Hb C จะเปลี่ยนไปเป็น Hb A (Hb A-to-C switching) โดยอาศัยอิทธิกรของยอิติน (Jain, 1986) หน้าที่ของ erythropoietic stimulating factor (ESF) กระตุ้นการสร้าง Hb C ($\alpha_2\beta_2^C$) ในแกะและแกะ ฮีโมโกลบินฟีนไทป์ A พบมากกว่า AB และ AB พบมากกว่า B เมื่ออาศัยหลักการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าพบว่า Hb A เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกที่พีเอช 8.6 ได้เร็วที่สุด ส่วน Hb C เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้าที่สุด Hb F เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่า Hb B และ Hb B เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่า Hb C (Jain, 1986)

การศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบินของแกะ จำนวน 36 ตัว โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแ่งเจล พบฮีโมโกลบินฟีนไทป์ 2 ชนิด คือ Hb AA 89.9 เปอร์เซ็นต์ และ Hb AB 11.1 เปอร์เซ็นต์ ตาม กฎสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ความถี่ของอัลลีล A และ B เท่ากับ 0.94 และ 0.06 ตามลำดับ ค่าเฮเทอโรไซโกซิติ (heterozygosity) เท่ากับ 0.218 ฮีโมโกลบินฟีนไทป์ไม่ขึ้นกับลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait) เช่น ความยาวของขาและขน (Akinyemi and Salako, 2010)

Cigremis *et al.* (2008) ศึกษาารูปแบบของอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิสของฮีโมโกลบินของเม่น (*Hystrix cristata*) เปรียบเทียบกับคนปกติ พบว่าฮีโมโกลบินของเม่นมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ไกลกว่าฮีโมโกลบินของคน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินชนิดต่างๆมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าแตกต่างกันเนื่องจากมีประจุต่างกัน การเปรียบเทียบฮีโมโกลบินในครั้งนี้แสดงให้เห็นความแตกต่างของฮีโมโกลบินทั้ง สปีชีส์มีประจุต่างกัน แต่ผลที่ได้มีความแตกต่างจากการศึกษาฮีโมโกลบินเปรียบเทียบระหว่างคนและเม่นแคระ (*Erinaceus romanicus*) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแ่งเจล พบว่าฮีโมโกลบินของเม่นแคระมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ไกลกว่าฮีโมโกลบินของคนและมีการละลายต่ำกว่าของคน (Maisar, 1970)

การศึกษาค่าโลหิตวิทยาและ ฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระรอกเปอร์เซีย (*Sciurus anomalus*) จำนวน 30 ตัว พบว่า ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย มีค่าเท่ากับ 46.0 ± 6 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.5 ± 1.5 กรัมต่อเดซิลิตรเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ 2 ชนิด คือ Hb A มีมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และ Hb F มีประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของฮีโมโกลบินของกระรอก คนและกระต่าย พบว่ามีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าใกล้เคียงกับคนและมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกเร็วกว่ากระต่าย ฮีโมโกลบินของกระรอกมีประจุลบมากกว่ากระต่าย อาจเนื่องมาจากการที่มีกรดอะมิโนที่มีประจุลบในสายฮีโมโกลบิน (Khazraimnia *et al.*, 2008) Duffy *et al.* (1986) รายงานการศึกษาฮีโมโกลบินของกระรอกทั่วไป (ground squirrel) โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบิน ฟิโนไทป์ชนิดเดียวที่ประกอบด้วย 1 แถบ ซึ่งมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ไกลกว่าฮีโมโกลบินของคนเล็กน้อย

อรพรรณ (2546) ศึกษาฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางเคมีของฮีโมโกลบินโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน (Kamphaengsaen beef cattle) และกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*) โดยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส และเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลักมีน้ำหนักโมเลกุล 64,565 ดาลตันเมื่อใช้ เทคนิค เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบแต่ละหน่วยย่อยของ โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลัก มีน้ำหนักโมเลกุล 11,150 ดาลตันเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ 3 ชนิดในโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน คือ Hb AA จำนวน 8 ตัว, Hb BB จำนวน 2 ตัว และ Hb AB จำนวน 5 ตัว ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ของแถบฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยที่ Hb AA ประกอบด้วย Hb slow เพียงอย่างเดียว และ Hb BB ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว ขณะที่ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ 2 ชนิดในกระบือปลัก เมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ Hb BB 11 ตัว และ Hb AB 1 ตัว ซึ่งฮีโมโกลบินทั้งสองประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow โดยมีอัตราส่วนเป็น 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ จากการศึกษาด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แอมโพลไทท์ พีเอช 3-10 พบว่าฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนชนิด Hb AA มีค่า pI เท่ากับ 7.27 และ 7.48 และ Hb BB มีค่า pI เท่ากับ 6.8 และ 6.9 ขณะที่ Hb AB มีค่า pI เท่ากับ 6.82, 7.05, 7.27 และ 7.48 ส่วนฮีโมโกลบินของกระบือปลักชนิด Hb BB และ Hb AB มีค่า pI เท่ากับ 6.82 และ 7.27 ตามลำดับ

Sittivilai *et al.* (2004) ศึกษาหน้าหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของสัตว์ปีกเลี้ยง (domestic fowl) โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบมี หน้าหนักโมเลกุล 51,784 คาลตันเมื่อใช้เทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสัตว์ปีกเลี้ยงมีหน้าหนักโมเลกุล 12,519 และ 10,984 คาลตัน ตามลำดับ

สุวิช และคณะ (2548) ศึกษาฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของโคเนื้อ โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบ Hb C มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เท่ากับ Hb fast ของกระบือปลัด นอกจากนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ฮีโมโกลบิน กับผลผลิตของโคพื้นเมืองและโคพันธุ์ผสมชิมเมนทัลผสมบราห์มัน (Simmental×Brahman crossbred) โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 5 ชนิด ใน โคพื้นเมืองประกอบด้วย Hb AA 35.59 เปอร์เซ็นต์ Hb AB 28.81 เปอร์เซ็นต์ Hb AC 20.34 เปอร์เซ็นต์ Hb BB 11.6 เปอร์เซ็นต์ และ Hb BC 3.39 เปอร์เซ็นต์ และพบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 3 ชนิด ใน โคพันธุ์ผสมชิมเมนทัลผสมบราห์มัน ประกอบด้วย Hb AA 50.98 เปอร์เซ็นต์ Hb AB 45.10 เปอร์เซ็นต์ และ Hb BB 3.92 เปอร์เซ็นต์ โคพื้นเมืองที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb AB ให้น้ำหนักแรกเกิดสูงที่สุด Hb BB ให้น้ำหนักแรกเกิดต่ำที่สุด และ Hb AC ให้อัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนโคพันธุ์ผสมชิมเมนทัลผสมบราห์มันที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb AA ให้น้ำหนักที่แรกเกิด 200 วัน 400 วัน และ 600 วันมากกว่าโคพันธุ์ผสมที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb AB (Boonprong *et al.*, 2007)

เกรียงไกร (2548) ศึกษาค่าโลหิต วิทยาและ คุณสมบัติ ทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินบางประการ ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่า เม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย ของปลานิลมีค่าเท่ากับ 25.80 ± 3.71 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ของปลานิลมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.05 ± 1.08 กรัมต่อเดซิลิตร เมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 9-11 ชนิดในปลานิล เมื่อใช้เทคนิคเนทีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสามารถแบ่งฮีโมโกลบินเป็น 2 กลุ่ม ตามการเคลื่อนที่ในระบบอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ กลุ่มแอนดิก และกลุ่มแคโรดิกมีประมาณ 45.72 และ 54.28 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมดเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสสามารถแบ่งกลุ่มแคโรดิกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือกลุ่มแคโรดิก I และกลุ่มแคโรดิก II มีประมาณ 47.62 และ 6.66 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมด กลุ่มแคโรดิก เคลื่อนที่ในระบบอิเล็กโตรโฟรีซิสจากขั้วลบไปยังขั้วบวกได้ ช้ากว่ากลุ่ม แอนดิก จากการศึกษด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าฮีโมโกลบินกลุ่มแอนดิกมีค่า pI 5-9 ค่า ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 5.28-6.80 และกลุ่มแคโรดิก มีค่า pI 8-10 ค่า มีค่าอยู่ในช่วง 7.27-9.71 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินโดยเทคนิค เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ เซฟาเดกซ์ G-100 พบว่า

ฮีโมโกลบินของปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุล 60,792 คาลตัน โดยเทคนิค โซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลานิล มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 15,415 คาลตัน และโดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีพบว่าฮีโมโกลบินของปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุล 62,954 คาลตัน ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 15,340 15,621 และ 16,126 คาลตัน ซึ่งเป็นสายของกลอบิน 3 ชนิด คือ α_1 , α_2 และ β ตามลำดับ

นันทวรรณ (2549) ศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระป๋องปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ ส่วนฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระป๋องแม่ น้ำมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB ซึ่งตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับเช่นเดียวกันเนื่องจาก Hb fast มีประจุสุทธิเป็นลบมากกว่า Hb slow และ Hb slow ประกอบด้วยกรดอะมิโนส่วนใหญ่เป็นอาร์จินีน หรือไลซีน นอกจากนี้สายอัลฟาสองที่พบใน Hb slow มีค่า pI สูงกว่าสายอัลฟาหนึ่ง ที่พบใน Hb fast เพราะสายอัลฟาหนึ่งมีกรดอะมิโน ทริปโตเฟน ซีสเตอีน และไลซีนที่ต่างจากสายอัลฟาสอง Hb fast จึงเคลื่อนที่ใน สนามไฟฟ้า ไปยังขั้วบวกได้เร็วกว่า Hb slow การศึกษาฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ ของกระป๋องปลักและกระป๋องแม่ น้ำ โดยใช้วิธีซีเทตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระป๋องปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB จำนวน 59 ตัว (เพศผู้ 27 ตัวและเพศเมีย 32 ตัว) และ Hb AB จำนวน 12 ตัว (เพศผู้ 4 ตัวและเพศเมีย 8 ตัว) ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ ส่วนฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระป๋องแม่ น้ำมี 2 ชนิด คือ Hb BB จำนวน 3 ตัว (เพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว) และ Hb AB จำนวน 2 ตัว (เพศผู้ 1 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว) ซึ่งตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับเช่นเดียวกัน ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับผลที่ได้จากเทคนิคเซลลูโลส อะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส จากเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก มีน้ำหนักโมเลกุล 46,209 คาลตัน จากเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักและกระป๋องแม่ น้ำมีน้ำหนักโมเลกุล 13,227 คาลตัน และ 13,525 คาลตัน จากเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักมีน้ำหนัก

โมเลกุลของฮีโมโกลบินแบบ monomer dimer trimer และ tetramer มีค่าเท่ากับ 15,359.67 30,894.40 45,912.42 และ 60,942.79 คาลตัน ตามลำดับ

คมสัน (2551) ศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินใน ปลาตุก (*Clarias batrachus*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*) ชนิดละ 30 ตัว โดยใช้เทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตตพบว่าฮีโมโกลบินของปลาตุกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า เข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียน การศึกษาฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของปลาตุก และปลาตะเพียน โดยใช้วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากสารละลายฮีโมโกลบิน ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G-100 พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของทั้งปลาตุกและปลา ตะเพียน มีเพียงชนิดเดียว ฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของปลาตุกมี 2 แถบที่ประกอบด้วยฮีโมโกลบิน หลัก 98 เปอร์เซ็นต์ และฮีโมโกลบินรอง 2 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของปลา ตะเพียนมี 1 แถบ เมื่อใช้วิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสศึกษา หน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน พบว่าหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลาตุกมีน้ำหนักโมเลกุล 15,260 คาลตันและ 14,740 คาลตัน และหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 14,630 คาลตัน วิธีแอสเพกโตรเมตรีพบว่าฮีโมโกลบินของปลาตุกมีน้ำหนักโมเลกุล 63,460.678 คาลตัน ส่วนของปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 63,634.812 คาลตัน วิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โคร มาโทกราฟี พบว่าฮีโมโกลบินของปลาตุกและปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 63,096 คาลตัน และ 64,565 คาลตัน ตามลำดับ ปลาตุกมีความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ยเท่ากับ 8.17 ± 0.01 กรัมต่อ เดซิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าปลาตะเพียนที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.83 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร แต่ค่าเปอร์เซ็นต์ เม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยของปลาตุกเท่ากับ 30.17 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ซึ่งต่ำกว่าของปลาตะเพียนที่มี ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.45 ± 1.70 เปอร์เซ็นต์

จตุพร (2554) ศึกษาเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทย บางแก้วโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบสุนัขทั้งสองสายพันธุ์มีฟิโนไทป์เดี่ยวที่ เหมือนกัน ประกอบด้วย 1 แถบ เมื่อนำสารละลายฮีโมโกลบินของ สุนัขที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน คอลัมน์เซฟาเดกซ์ G-100 มาศึกษาโดยวิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบ ฮีโมโกลบินของสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์ มีฟิโนไทป์เดี่ยวและ เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหา ขั้วบวกเหมือนกับวิธีเซลลูโลสอะซีเตต จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้ วัน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานแสดงฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์ประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดหลัก เฉลี่ย เท่ากับ 84.37 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ และชนิดรองเฉลี่ยเท่ากับ 15.63 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสุนัขพันธุ์ ไทยบางแก้วแสดงฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์เช่น เดียวกัน ประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดหลัก เฉลี่ย

เท่ากับ 93.93 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ และชนิดรองเฉลี่ยเท่ากับ 6.07 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ วิธีเจลดฟิลเตรชัน คอลัมน์โครมาโทกราฟี พบฮีโมโกลบินของ สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มี น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 64,000 ดาลตัน และ 65,956 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ ฮีโมโกลบินในสภาพธรรมชาติ ที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย วิธีโซเดียมไดดีซัลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลดอิเล็กโตรโฟรีซิส พบหน่วยย่อย 2 แถบ ของฮีโมโกลบิน ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และ สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายกลอบินด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ แผ่นเจลควอนติตัน พบว่าฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสาย กลอบินของแถบล่างและแถบบน เท่ากับ $13,637.5 \pm 229.65$ และ $15,087.5 \pm 52.81$ ดาลตัน ตามลำดับ ส่วนฮีโมโกลบินของ สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีน้ำหนักโมเลกุล เฉลี่ยของสายกลอบิน ของแถบล่าง และแถบบนเท่ากับ $13,030 \pm 75.93$ และ $15,115 \pm 314.89$ ดาลตัน ตามลำดับ วิธีแมสสเปกโตรเมตรี พบน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และ สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มี น้ำหนักโมเลกุล ที่ถูกต้องเฉลี่ย เท่ากับ $15,216.84 \pm 8.25$ $15,969.62 \pm 8.46$ $31,785.13 \pm 206.44$ $47,955.10 \pm 240.39$ และ $63,486.75 \pm 389.42$ ดาลตัน ($n=4$) ตามลำดับ ส่วนฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ ไทยบางแก้ว ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ที่ถูกต้อง เฉลี่ย เท่ากับ $15,230.11 \pm 15.96$ $15,980.23 \pm 16.67$ $31,752.16 \pm 194.91$ $48,018.41 \pm 303.74$ และ $63,728.82 \pm 488.21$ ดาลตัน ($n=4$) ตามลำดับ วิธีรี เวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของ ฮีโมโกลบิน ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และ สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว พบฮีโมโกลบิน ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานมี น้ำหนักโมเลกุล ของ สายอัลฟาเท่ากับ 15,269.63 ดาลตัน และสายเบต้าเท่ากับ 16,018.56 ดาลตัน ส่วนฮีโมโกลบินของ สุนัขพันธุ์ไทย บางแก้วมีน้ำหนักโมเลกุล ของสายอัลฟาเท่ากับ 15,219.55 ดาลตัน และ สายเบต้า เท่ากับ 15,978.01 ดาลตัน วิธีนาโนอิเล็กโตรสเปร์ย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมตรี พบลำดับ กรดอะมิโนของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วย สายอัลฟา 141 หน่วยและสายเบต้า 146 หน่วย ค่า pI ของฮีโมโกลบินของ สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว อยู่ในช่วง 7.0-7.9 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยของสุนัขพันธุ์ไทยหลัง อานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เท่ากับ 39.39 ± 1.23 และ 36.38 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าความ เข้มข้น เฉลี่ย ของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และ สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เท่ากับ 13.75 ± 0.47 และ 13.10 ± 0.32 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือดข้างเลี้ยง

1. อุปกรณ์

- 1.1 เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ความยาว 1.5 นิ้ว
- 1.2 กระจกฉีดยาขนาด 10 ซีซี
- 1.3 หลอดเก็บตัวอย่างเลือด
- 1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2. สารเคมี

- 2.1 กรดเอทิลีน ไคเอมีน เตตระอะซิติก (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid, EDTA)
- 2.2 เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)

3. สัตว์ทดลอง

ข้างเลี้ยง ที่นำมาใช้ในการทดลองในครั้งนี้เป็น ข้างเลี้ยงในอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา อ.บางละมุง จ.ชลบุรี และข้างเลี้ยงในปางช้างสยาม อ.บางละมุง จ.ชลบุรี ไม่จำกัดเพศ มีอายุระหว่าง 3-50 ปี จำนวนทั้งสิ้น 58 เชือก โดยช้างทุกเชือกมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี มีโปรแกรมการฉีดวัคซีนและถ่ายพยาธิตามคำแนะนำของสัตวแพทย์เป็นประจำทุกปี ข้างทุกเชือกไม่แสดงอาการป่วยทางคลินิกในวันที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจาก ข้างทั้ง 58 เชือก โดยเจาะเก็บจากเส้นเลือดดำขนาดใหญ่ที่ใบหู (ear vein) ถ้าเป็นข้างสูงต้องให้ช้างหมอบต่ำลง หรือให้นอนตะแคง หรือขึ้นไปยืนเทียบโรงเรือน ทำความสะอาดผิวหนังด้วยแอลกอฮอล์ เจาะเลือดด้วยกระบอกฉีดยา 10 ซีซี เข็มฉีดยาขนาดเบอร์ 18 ยาวนิ้วครึ่ง เชือกละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA เคลือบอยู่เพื่อตรวจค่าทางโลหิตวิทยา ศึกษาฮีโมโกลบินไฟโนไทป์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบิน

การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

1. การเตรียมสารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลเสต (Hemolysate)

อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge, Hermle Z 233 MK-2)
2. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer, Vortex Genie-2 TM)
3. ครอปเปอร์ไปเปต (dropper pipette)
4. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารเคมี

1. สารละลายฮีโมไลเสต (hemolysate reagent) ประกอบด้วย 0.005 โมลาร์ EDTA และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide)
2. โซเดียมคลอไรด์ 0.90 เปอร์เซ็นต์ (0.90% sodium chloride, NaCl)

สารตัวอย่าง

เลือดช้างเลี้ยง

วิธีการ

1. นำตัวอย่างเลือดมาปั่นเพื่อแยกพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
2. ล้างเม็ดเลือดแดง ด้วย 0.90 เปอร์เซ็นต์ NaCl ด้วยปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่างเลือดจำนวน 3 ครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง

3. จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงที่ได้มาเติมสารละลายฮีโมไลสในอัตราส่วน 1:5 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ (cell debris) และผนังเซลล์ (cell membrane)

4. เก็บสารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลสที่อยู่ด้านบนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2. การศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบิน ช้างเลี้ยง โดยวิธี เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส และวิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.1 วิธีเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส (Helena Laboratories, 2001)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส (Helena Laboratories, France)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Titan Plus, Helena Laboratories, France)
3. แผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (TITAN III-H) ขนาด 76 x 60 มิลลิเมตร
4. จานแก้ว
5. ตู้อบ (Memmert UM 500, Germany)
6. กระดาษกรอง เบอร์ 1
7. แผ่นสไลด์
8. กระดาษกรองแผ่นยาว (wick)
9. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล ควอนติตี้วัน (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-EDTA-กรดบอริก (Supre-Heme Buffer) พีเอช 8.2-8.6
2. สีย้อมฟองโซเอส (Ponceau S) ประกอบด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ ฟองโซเอส ในสารละลาย

3.5 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulfosalicylic acid) และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ กรดไทรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid)

3. สารล้างสีย้อม (destaining reagent) ประกอบด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก (acetic acid)

4. สารละลาย clearing ประกอบด้วย กรดอะซิติก 30 ส่วน เมทานอล (methanol) 70 ส่วน และ Clear aid 4 ส่วน (Helena Laboratories, France)

5. สารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐาน [hemoglobin control (AFSA₂)] (Helena Laboratories, France)

สารตัวอย่าง

สารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลเสดของช้างเลี้ยง

วิธีการ

1. แช่แผ่นเซลลูโลสอะซิเตดในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที
2. เทสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในอ่างอิเล็กโทรดของชุดเครื่องมืออิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระดาษกรองเป็นสะพานเชื่อม (wick) สนามไฟฟ้าระหว่างแผ่นเซลลูโลส อะซิเตดและสารละลายบัฟเฟอร์ โดยเซให้ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์และวางพาดลงในอ่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 อ่าง
3. บรรจุสารละลายฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยงและสารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐานปริมาตร 8 ไมโครลิตรในช่องใส่ตัวอย่าง ปิดด้วยแผ่นสไลด์เพื่อป้องกันการระเหย
4. นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตดที่แช่ในบัฟเฟอร์ครบ 5 นาทีมาจับด้วยกระดาษกรองให้หมาด วางแผ่นเซลลูโลสอะซิเตดบนเพลทแอปพลิเคชัน (applicator plate) ที่ตำแหน่งขั้วลบ (cathode application) แล้วใช้แอปพลิเคชัน (applicator) เคลือบ สารละลายฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยง และสารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ บรรจุไว้ในช่องใส่ตัวอย่างมา กดลงบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตด

5. นำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตที่ เคลือบตัวอย่างแล้วมาวางคว่ำหน้าบนอ่างอิเล็กโทรด โดยหันด้านที่ใส่ตัวอย่างไว้ทางซ้ายบน ใช้แผ่นสไลด์วางทับลงบนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตเพื่อให้ผิวหน้าสัมผัสกับกระดาษกรองและปิดฝาอ่างอิเล็กโทรด
6. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 350 โวลต์ เป็นเวลานาน 25 นาที
7. เมื่อครบกำหนดเวลานำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตมาข้อมสีในสารละลายสีข้อมฟองโซเอส เป็นเวลา 8 นาที
8. ล้างสีข้อมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก จนมองเห็นแถบของอีโมโกลบินชัดเจนหรือสังเกตจากแถบของสารละลายอีโมโกลบินมาตรฐาน
9. แช่แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตในเมธานอล 4 นาที หลังจากนั้นแช่ในสารละลาย clearing เป็นเวลา 9 นาที
10. ให้ความร้อนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตโดยนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 10 นาที เพื่อให้แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตเปลี่ยนจากแผ่นทึบแสงเป็นแผ่นโปร่งแสง

2.2 วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ดัดแปลงจาก Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมืออิเล็กโทรโฟรีซิส (Mini Protein III, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power PAC 200, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
3. ไมโครไซริงค์ (microsyringe, Fortuna[®], Transferpette[®]-digital) ขนาด 25 ไมโครลิตร
4. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)
5. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตีวัน (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมแผ่นเจล ประกอบด้วย

1.1 สารละลายอะคริลาไมด์และบิส มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร (30% T 2.67% C) (30% acrylamide / N, N'-methylene-bis-acrylamide stock solution) ประกอบด้วย อะคริลาไมด์ 14.6 กรัม และบิส 0.4 กรัม

1.2 1.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8

1.3 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)

1.4 N, N, N', N' เตตราเมทิลีนไดเอมีน (N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine; TEMED)

2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer) ประกอบด้วย

2.1 0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8

2.2 99.5 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล

2.3 1 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue)

2.4 น้ำกลั่น

3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 (electrode buffer, pH 8.3) ประกอบด้วย

3.1 ทริส

3.2 ไกลซีน (glycine)

3.3 น้ำกลั่น

4. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย

4.1 กรดอะซิติก 10 ส่วน

4.2 เอทานอล 25 ส่วน

4.3 น้ำกลั่น 65 ส่วน

5. สีย้อม ประกอบด้วยโคมัสซิบลูอาร์-250 (coomassie blue R-250) ในสารละลายล้างสีย้อม

สารตัวอย่าง

สารละลายอีโมโกลบินหรืออีโมไลเซตของข้างเลี้ยง

วิธีการ

1. ทำการเตรียมแผ่นเจลดังนี้

1.1 เตรียมสารละลายสำหรับเจล (12%T) ยกเว้น TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตดังตารางที่ 1 คู่อากาศออกด้วยปั๊มสูญญากาศ

1.2 ประกอบชุดเตรียมเจล ใส่หัว (comb) ในช่องว่างระหว่างกระจกเรียงทำมุมประมาณ 10 องศา

1.3 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลายเจลที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 แล้วเปิดใส่ช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนถึงขอบกระจก

1.4 จัดหัวให้อยู่ในแนวเส้นตรง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้เจลแข็งตัว (polymerization) ประมาณ 30-45 นาที

ตารางที่ 1 สูตรการเตรียมเจลวิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส

สารในการเตรียมเจล	ปริมาณสารในการเตรียมเจล
	12% T
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	3.45
1.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8 (มิลลิลิตร)	2.5
30 เปอร์เซ็นต์ สารละลายอะคริลาไมด์และบิส (มิลลิลิตร)	4
10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ไมโครลิตร)	100
TEMED (ไมโครลิตร)	7

หมายเหตุ สูตรสำหรับเจล 2 แผ่น

1.5 ดึงหัวอย่างระมัดระวังแล้วล้างหลุมเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรโอด

พีเอช 8.3 จะได้เจลที่พร้อมใช้งาน จากนั้นประกอบแผ่นเจลเข้ากับชุดอิเล็กโตรด เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรด พีเอช 8.3 ในอ่างอิเล็กโตรดบนและล่างให้ท่วมผิวหน้าเจล

2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยผสมสารละลายอีโมไลเสดกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับ บตัวอย่าง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสม ประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบรรจุใส่หลอดเจลด้วยไมโครไซริงค์

3. ต่อชุดอิเล็กโตรดโพริซีสที่พร้อมทำงานกับเครื่องจ่ายกระแสไฟ โดยตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 200 โวลต์คงที่และค่ากระแสไฟฟ้าที่ 60 มิลลิแอมแปร์ ต่อเจล 1 แผ่น ใช้เวลา 45 นาที

4. นำแผ่นเจลออกมาข้อมสี เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะข้อม

5. ล้างสีข้อมด้วยสารละลายล้างสีข้อม โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะล้างสีข้อม จนกระทั่งเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจลใส

6. เก็บแผ่นเจลในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

3. การทำอีโมโกลบินให้บริสุทธิ์และการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินข้างเคียง โดยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ดัดแปลงจาก Vanderdon and Colacino, 1989)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือ Econo System (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
2. ตู้เย็น Kelvinator Scientific Model ETBB39RGCH-2 (U.S.A.) ที่ 4 องศาเซลเซียส
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible recording spectrophotometer UV-160, Shimadzu, Japan)
4. ไซริงค์ขนาด 3 ซีซี
5. คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ยาว 80 เซนติเมตร

สารเคมี

1. เซฟาเดกซ์ G-100 (Sephadex G-100 Grade fine, Pharmacia Laboratories, Sweden)
2. 0.05 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ 0.02 เปอร์เซนต์ โซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) พีเอช 7.4
3. สารละลายมาตรฐาน (standard solution) ประกอบด้วย
 - 3.1 บลูเดกซ์แทรน (blue dextran) น้ำหนักโมเลกุล 2,000,000 ดาลตัน
 - 3.2 ซีรัมอัลบูมินของโค (bovine serum albumin; BSA) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน
 - 3.3 โอวัลบูมิน (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน
 - 3.4 ไซโตโครม ซี (cytochrome C) น้ำหนักโมเลกุล 12,384 ดาลตัน
 - 3.5 ดีเอ็นพี-แอสปาร์เตต (DNP-aspartate) น้ำหนักโมเลกุล 299.2 ดาลตัน

สารตัวอย่าง

สารละลายอีโมโกลบินหรืออีโมไลเซตของช้างเลี้ยง

วิธีการ

1. การเตรียมคอลัมน์

1.1 ชั่งเซฟาเดกซ์ G-100 ในปริมาณที่ต้องการ (5 กรัม ได้ปริมาตรเจล 30 มิลลิลิตร) ทำให้พองอิมตัว (swelling) ด้วย 0.05 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ที่มี 0.02 เปอร์เซนต์ โซเดียมเอไซด์ พีเอช 7.4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

1.2 เตรียมคอลัมน์ไว้ในตู้เย็น ปิดปลายล่างของคอลัมน์ เดิมบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์สูงประมาณหนึ่งในสามของคอลัมน์ รินบัฟเฟอร์ในเจลทิ้งให้เหลือบัฟเฟอร์ประมาณ 25 เปอร์เซนต์ของเจล แล้วทำการบรรจุเจลลงในคอลัมน์ โดยคนและเทเบาๆ ให้หมดในครั้งเดียว

1.3 เมื่อเจลเรียงตัวในคอลัมน์ ใส่ adapter และ equilibrate ด้วยทริสบัฟเฟอร์ที่อัตราไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาทีจนปริมาตรของเจลคงที่แล้วหาปริมาตรเจลที่แน่นอนจากนั้น equilibrate ต่อไปประมาณ 1.5 เท่าของปริมาตรเจลจะได้คอลัมน์เจลที่พร้อมใช้งาน

2. แยกโปรตีนมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 10 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และแยกโปรตีนในฮีโมโกลบินของ ช้างเลี้ยง มีความเข้มข้นของ โปรตีน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชะด้วย ทริสบัฟเฟอร์ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

3. เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรสำหรับโปรตีน และที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรสำหรับฮีโมโกลบิน

4. สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกับปริมาตร (มิลลิลิตร) ของแต่ละ หลอด (fraction) ที่ได้ จากกราฟหาปริมาตรที่ใช้ในการชะสารแต่ละชนิดหรือ V_e คำนวณหาค่า V_t และ V_o เพื่อนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient, K_d) ดังสมการ

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

โดยที่ V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ที่บรรจุเม็ดเจล (total volume)

V_e คือ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการชะสารออกมา (elution volume)

V_o คือ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ล้อมรอบเม็ดเจล (void volume)

5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การกระจายกับค่าลอการิทึมของน้ำหนัก โมเลกุล (log molecular weight) ของสารมาตรฐานเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของ ช้าง เลี้ยง

4. การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของฮีโมโกลบินช้างเลี้ยงโดยวิธีไซโตเคมี โดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล (Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini Protein III, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power PAC 200, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
3. ไมโครไซริงค์ขนาด 25 ไมโครลิตร
4. เครื่องให้ความร้อน (Stuart Scientific รุ่น SHT 1, UK)
5. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมแผ่นเจล ประกอบด้วย
 - 1.1 30 เปอร์เซ็นต์ สารละลายอะคริลาไมด์ และบิส จำนวน 50 มิลลิลิตร (30% T 2.67%
- C) ประกอบด้วย อะคริลาไมด์ 14.6 กรัม และบิส 0.4 กรัม
 - 1.2 1.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8
 - 1.3 0.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8
 - 1.4 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต
 - 1.5 N, N, N', N' เตตราเมทิลลีนไดเอมีน
 - 1.6 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (10% sodium dodecylsulfate; 10% SDS)
2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง
 - 2.1 0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8
 - 2.2 99.5 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล
 - 2.3 1 เปอร์เซ็นต์บรอมฟินอลบลู
 - 2.4 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)
 - 2.5 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย
 - 3.1 ทริส
 - 3.2 ไกลซีน
 - 3.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
 - 3.4 น้ำกลั่น
4. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย
 - 4.1 กรดอะซิติก 10 ส่วน
 - 4.2 เอทานอล 25 ส่วน
 - 4.3 น้ำกลั่น 65 ส่วน
5. สีย้อม ประกอบด้วยโคแมสซิบลูอาร์-250 ในสารละลายล้างสีย้อม

6. โปรตีนมาตรฐานชนิด broad range molecular weight (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) ประกอบด้วย

- 6.1 ไมโอซิน (myosin) น้ำหนักโมเลกุล 200,000 ดาลตัน
- 6.2 เบต้า กาลแลคโตซิเดส (β -galactosidase) น้ำหนักโมเลกุล 116,250 ดาลตัน
- 6.3 ฟอสโฟไรเลส บี (phosphorylase b) น้ำหนักโมเลกุล 97,400 ดาลตัน
- 6.4 ซีรัมอัลบูมินของโค (bovine serum albumin, BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,200 ดาลตัน

ตัน

- 6.5 โอวัลบูมิน (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน
- 6.6 คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) น้ำหนักโมเลกุล 31,000 ดาลตัน
- 6.7 ตัวยับยั้งทริปซินของถั่วเหลือง (soy bean trypsin inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 21,500 ดาลตัน

ดาลตัน

- 6.8 ไลโซไซม์ (lysozyme) น้ำหนักโมเลกุล 14,400 ดาลตัน
- 6.9 อะโปรตีนิน (aprotinin) น้ำหนักโมเลกุล 6,500 ดาลตัน

สารตัวอย่าง

สารละลายซีโมโกลบินของ ช้างเลี้ยง ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. ทำการเตรียมแผ่นเจลดังนี้

1.1 เตรียมสารละลายสำหรับ separating gel (15% T 2.67% C) ยกเว้น TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ดังตารางที่ 2 แล้วดูดอากาศออกด้วยปั๊มสุญญากาศ

1.2 ประกอบชุดเตรียมเจลและทำเครื่องหมายแสดงความสูงของ separating gel บนแผ่นกระจก

1.3 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลายเจลแล้ว ปิดปิเปตใส่ช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนถึงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมาย ปิดผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นเบาๆ

1.4 ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30-45 นาที

1.5 เตรียม stacking gel (4% T 2.67% C) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับการเตรียม separating gel ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สูตรการเตรียมเจลวิธีโซเดียมโคดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

สารในการเตรียมเจล	ปริมาณสารในการเตรียมเจล	
	15% T	4% T
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	2.35	3.05
1.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8 (มิลลิลิตร)	2.5	-
0.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 (มิลลิลิตร)	-	1.25
10 เปอร์เซนต์ โซเดียมโคดีซิลซัลเฟต (ไมโครลิตร)	100	50
30 เปอร์เซนต์สารละลายอะคริลาไมด์และบิส(มิลลิลิตร)	5	0.665
10 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ไมโครลิตร)	100	50
TEMED (ไมโครลิตร)	14	7

หมายเหตุ สูตรสำหรับเจล 2 แผ่น

1.6 เมื่อเจลแข็งตัวจะเกิดแนวเส้นตรงบริเวณผิวหน้าเจล ชับน้ำบนผิวหน้าเจลแล้วใส่ หัวในช่องว่างระหว่างกระจกเอียงทำมุมประมาณ 10 องศา

1.7 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลาย stacking gel ปิดสารละลายเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนเต็ม แล้วจัดหัวให้อยู่ในแนวเส้นตรงปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30-45 นาที

1.8 ดึงหัวอย่างระมัดระวังแล้วล้างหลุมเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรด พีเอช 8.3 จะได้เจลพร้อมใช้งาน จากนั้นประกอบแผ่นเจลเข้ากับชุดอิเล็กโตรด เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรด พีเอช 8.3 ในอ่างอิเล็กโตรดบนและล่างให้ท่วมผิวหน้าเจล

2. เตรียมสารละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยผสมละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างเพื่อให้ได้ ความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความร้อนสารละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหยอดใส่หลุมเจลด้วยไมโครไพริงค์

3. ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสกับเครื่องจ่ายกระแสไฟ โดยตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 200 โวลต์คงที่ และค่ากระแสไฟฟ้าที่ 60 มิลลิแอมแปร์ ต่อเจล 1 แผ่น ใช้เวลา 45 นาที

4. นำแผ่นเจลออกมาซ่อมสีเป็นเวลา 30 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะซ่อม
 5. ล้างสีซ่อม โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะล้างสีซ่อม จนกระทั่งเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจลอใส
 6. เก็บแผ่นเจลในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส
5. การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินและน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของฮีโมโกลบินข้างเลี้ยงโดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี

อุปกรณ์

1. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) แบบ MALDI-TOF (Bruker UltraFlexIII, Germany)
2. เพลทตัวอย่าง (target plate) ที่มีโปรตีนฮีโมโกลบินจับอยู่กับเมทริกซ์

สารเคมี

1. 0.01 โมลาร์ กรดไซแนพินิก (sinapinic acid) เป็นเมทริกซ์
2. 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, ACN)
3. 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid, TFA)

สารตัวอย่าง

สารละลายฮีโมโกลบินของข้างเลี้ยงที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. ผสมสารละลายฮีโมโกลบินของข้างเลี้ยงที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) กับกรด

ไซแนพติกปริมาตร 1 ไมโครลิตร ที่อิมมัลด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ใส่ลงบนเพลทตัวอย่างโดยใช้ไมโครปิเปตดูดเบาๆ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2. นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้ linear positive mode ที่ 20 kV เมื่อยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์ (nitrogen laser) เครื่องจะรายงานผลตามน้ำหนักโมเลกุลผ่านทางหน้าจอคอมพิวเตอร์

6. การศึกษาลำดับกรดอะมิโน(amino acid sequence) ของสายกลอบินของฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยง โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปร์ย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี

อุปกรณ์

1. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ต่อเชื่อมกับเครื่องรีเวอส์-เฟส เอชพีแอลซี (Ultimate 3000 LC system (Dionex, U.S.A.) coupled to ESI-Ion Trap MS (HCT ultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik, Germany) with electrospray)
2. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)
3. ตู้บ่ม (incubator)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Centurion Scientific, UK)
5. เครื่อง shaking incubator (VS-84805FN, Korea)

สารเคมี

1. 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (100% acetonitrile, ACN)
2. 50 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (50% acetonitrile, ACN)
3. 30 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (30% acetonitrile, ACN)
4. 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก (0.1% acetic acid)
5. 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอไธรตอล (10 mM Dithiothreitol, DTT)
6. 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (10 mM ammonium bicarbonate)
7. 100 มิลลิโมลาร์ ไอโอโดอะเซตามายด์ (100 mM iodoacetamide)
8. 10 นาโนกรัม ทริปซิน (10 ng trypsin)

9. 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก (0.1% formic acid)

10. โปรตีนมาตรฐานซีรัมอัลบูมินของโค (Bovine Serum Albumin, BSA)

สารตัวอย่าง

แถบของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินที่ได้จากการแยกด้วยวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

วิธีการ

1. ตัดชิ้นเจลบริเวณแถบของโปรตีนขนาดประมาณ 1×1×1 มิลลิเมตร ใส่นำใน 96-well plate
2. ล้างสีโคแมสซึบลูอาร์-250 ด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น
3. เติม 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
4. ดูดอะซิโตไนไตรล์ทิ้งไป แล้วปล่อยให้เจลแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที
5. เติมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ ไดไซโอไซรูดอล ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. ดูดสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ ไดไซโอไซรูดอล ทิ้งไป
7. เติมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 100 มิลลิโมลาร์ ไอโอโดอะเซตาไมด์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
8. ดูดสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 100 มิลลิโมลาร์ ไอโอโดอะเซตาไมด์ ทิ้งไป

9. เติม 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดอะซิโตไนไตรล์ทิ้งไป ทำซ้ำ 3 รอบ
10. เติมสารละลาย 10 นาโนกรัม ทริปซิน ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 50 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อย่อยโปรตีน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
11. เติม 30 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
12. ดูดของเหลวแต่ละตัวอย่างใส่ใน 96-well plate อันใหม่
13. เติมสารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ในน้ำกลั่น ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใน 96-well plate อันเดิม เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูดตัวอย่างแต่ละชนิดใส่ใน 96-well plate อันใหม่ ทำซ้ำ 3 รอบ
14. ทำตัวอย่างให้แห้งด้วย ตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือ 1 คืน เก็บรักษาตัวอย่างที่ได้ที่ -80 องศาเซลเซียส รอนำไปวิเคราะห์ผลด้วย LC/MS/MS
15. ละลายตัวอย่างที่ย่อยได้ด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ปริมาตร 6 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
16. ดูดของเหลวที่ได้ใส่ insert tube เพื่อวิเคราะห์ผลด้วย LC/MS/MS ที่อัตราเร็ว 20 ไมโครลิตรต่อนาที ต่อ μ -precolumn (Acclaim PepMap 100 C 18, 5 μ m, 100 A, 300 μ m i.d. x 5 mm) ตัวอย่างถูกแยกด้วยนาโนคอลัมน์ (Acclaim PepMap 100 C18, 3 μ m, 100 A, 75 μ m id x 150 mm) ด้วยอัตราเร็ว 300 นาโนลิตรต่อนาที โดยใช้สารละลายเกรเดียนต์ (solvent gradient) (Solvent A: 0.1% formic acid in water; Solvent B: 0.1% formic acid in 80% ACN) เป็นเวลา 20 นาที
17. นำผล LC/MS/MS มาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม MASCOT จาก Matrix Science Ltd. (London, UK) (Perkin *et al.*, 1999)

18. นำข้อมูลสเปกตรัมพีคที่ได้ในรูปแบบ MASCOT generic-format (mgf) ทำการระบุชนิดของโปรตีน โดยใช้โปรแกรม MASCOT ค้นหาใน MASCOT MS/MS ion search เลือกค้นจากฐานข้อมูลจาก NCBI ในอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของคลาส (Class) แมมมาเลีย (Mammalia) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals) โดยเลือกใช้เอ็นไซม์ทริปซินในการย่อยโปรตีนและให้โอกาส ทริปซินในการตัดผิดหลังหมู่คาร์บอกซิลของไลซีนและอาร์จินีนเพียง 1 ตำแหน่ง เลือกใช้วิธีการบามีโดเมทิลเลชัน (carbamidomethylation) ที่กรดอะมิโนซิสเทอีน เป็นการปรับแต่งแบบคงที่ (fixed modification) เลือกใช้การออกซิเดชันของเมทไธโอนีน เป็นการปรับแต่งแบบตัวแปร (variable modification) นอกจากนี้ตั้งค่าพารามิเตอร์ในการหาประจูปเปปไทด์ที่ 1+ 2+ 3+ เลือกเครื่องมือที่ใช้เป็น ESI-Trap ซึ่งจากข้อมูล MASCOT ที่ได้ มีค่า Ion score เท่ากับ $-10 \cdot \log(P)$ โดยที่ P เป็นค่าความน่าจะเป็นในเหตุการณ์ที่เกิดเป็นอิสระ ถ้าค่า Ion score แต่ละส่วนมีค่ามากกว่า 45 แสดงว่ามีความเหมือนกัน (identity หรือ extensive homology) ($P < 0.05$)

ผลและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

เมื่อหาค่า PCV (Packed cell volume) ค่า Hb ค่า MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration) ค่า MCH (Mean corpuscular hemoglobin) ค่า MCV (Mean corpuscular volume) ค่า Plasma protein (PP) ร่วมกับการพิจารณาค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (RBC indices) ของช้างเลี้ยงที่นำมาศึกษามีค่าอยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิง (reference range) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าโลหิตวิทยาของช้างเลี้ยง

ค่าโลหิตวิทยา	ปางช้างสยาม (n=31)	อุทยานหินล้านปี และฟาร์มจระเข้ พัทยา (n=27)	ค่าเฉลี่ยของ ทั้ง 2 กลุ่ม (n=58)	พิสัยค่าอ้างอิง (Mikota, 2006)
PCV (%)	31.26±0.51 ^a	29.29±0.61 ^b	30.38±3.17	30-40
Hb (g/dL)	11.40±0.19 ^a	12.59±0.25 ^b	11.97±3.31	11-15
RBC (10 ⁶ /μL)	2.56±0.43 ^a	2.90±0.08 ^b	2.73±0.05	2.5-5.0
MCHC (%)	36.46±0.08 ^a	43.00±0.10 ^b	39.51±0.44	25-40
MCH (pg)	44.47±0.39	43.56±0.46	43.99±0.30	35-50
MCV (fL)	121.87±0.89 ^a	101.35±1.00 ^b	112.15±1.48	80-160
PP (g/dL)	7.56±0.10 ^a	6.62±0.16 ^b	7.13±0.11	6-12

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่มีอักษรตัวกำกับต่างกัน (a,b) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างช้างเลี้ยงทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (2010)

ตารางที่ 4 แสดงค่าโลหิตวิทยาเปรียบเทียบระหว่างช้างเพศผู้และเพศเมีย

ค่าโลหิตวิทยา	ปางช้างสยาม		อุทยานหินล้านปี และฟาร์มจระเข้พัทยา		ค่าเฉลี่ย	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
	(n=4)	(n=27)	(n=4)	(n=23)	(n=8)	(n=50)
PCV (%)	32.37±1.51	31.10±0.55	29.82±0.87	29.19±0.71	31.1±0.94	30.22±0.46
Hb (g/dL)	11.75±0.51	11.34±0.20	12.8±0.33	12.55±0.29	12.47±0.34	11.9±0.19
RBC (10 ⁶ /μL)	2.68±0.14	2.54±0.45	3.19±0.19	2.85±0.07	2.93±0.14 ^a	2.68±0.04 ^b
MCHC (%)	36.37±0.27	36.47±0.08	42.95±0.16	43.07±0.11	39.66±1.25	39.48±0.47
MCH (pg)	44.00±1.00	44.54±0.43	40.27±1.54 ^a	44.14±0.37 ^b	42.13±1.10	44.35±0.28
MCV (fL)	121.0±1.91	122.0±0.99	94.0±3.50 ^a	102.63±0.77 ^b	107.5±5.42	113.09±1.51
PP (g/dL)	7.30±0.23 ^a	8.27±0.10 ^b	7.35±0.28	7.78±0.17	7.32±0.17 ^a	8.04±0.10 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่มีอักษรตัวยกกำกับต่างกัน (a,b) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างเพศโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (2010)

จากตารางที่ 3 ช้างเลี้ยงจากปางช้างสยาม มีค่า PCV เท่ากับ 31.26±0.51 เปอร์เซ็นต์ ค่า Hb เท่ากับ 11.40±0.19 กรัมต่อเดซิลิตร ช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยามี ค่า PCV เท่ากับ 29.29±0.61 เปอร์เซ็นต์ ค่า Hb เท่ากับ 12.59±0.25 กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงทั้ง 2 กลุ่ม ค่า PCV ของช้างเลี้ยงจากปางช้างสยามอยู่ในพิสัยค่าอ้างอิงแต่ค่า PCV ของช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยาดูต่ำกว่าค่าอ้างอิง ซึ่งเมื่อรวมช้างเลี้ยงทุกเชือกในทั้ง 2 กลุ่มพบว่าค่า PCV เฉลี่ยอยู่ในพิสัยค่าอ้างอิง ค่า MCHC ของช้างเลี้ยงจากปางช้างสยามและจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยาค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36.46±0.08 และ 43.00 ±0.10 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงทั้ง 2 กลุ่ม ค่า MCHC ของช้างเลี้ยงจากปางช้างสยามและอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยามีค่า อยู่ในพิสัยค่าอ้างอิง แต่ช้างจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยามีค่า MCHC สูงกว่าช้างเลี้ยงจากปางช้างสยาม อาจเนื่องมาจากค่า PCV ที่ศึกษาต่ำกว่า เมื่อนำค่า PCV

ไปหารจึงทำให้ค่า MCHC เพิ่มขึ้น โดยทั่วไปในสภาพปกติค่า MCHC ไม่ควรเพิ่มขึ้น เพราะเม็ดเลือดแดงไม่สามารถเพิ่มการสร้างฮีโมโกลบินได้ แต่ค่า MCHC เพิ่มขึ้นได้เพียงเล็กน้อยจากกรณีที่มีการเพิ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิดสเฟียร์โรไซต์ (spherocyte) เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีผลทำให้ค่า PCV ลดลง เมื่อนำไปหารจึงทำให้ค่า MCHC เพิ่มขึ้น (เนลิยว, 2548) และอาจเนื่องจากอายุเฉลี่ยช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัตยาต่ำกว่าช้างเลี้ยงจากปางช้างสยามมาก โดยอายุเฉลี่ยของช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัตยาเท่ากับ 16.77 ปี ช้างเลี้ยงจากปางช้างสยามมีอายุเฉลี่ย 31.10 ปี ซึ่งสอดคล้องกับค่า RBC ของช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีที่สูงกว่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับช้างเลี้ยงจากปางช้างสยาม โดยสัตว์อายุน้อยจะมีจำนวนเม็ดเลือดแดงมากกว่าแต่ขนาดเม็ดเลือดแดงจะเล็กกว่าสัตว์ที่มีอายุมากกว่า จึงทำให้ค่า PCV ของช้างจากปางช้างสยามสูงกว่าด้วย ค่า MCHC ที่ต่ำกว่าค่าปกติ อาจเกิดจากเม็ดเลือดแดงติดสีของฮีโมโกลบินน้อยกว่าปกติ (hypochromasia) ทำให้ติดสีขาวกลางเซลล์กว้าง (central pallor) ทำให้ค่า MCHC ต่ำ สามารถพบได้ในกรณีการขาดธาตุเหล็ก การขาดโปรตีนรุนแรงทำให้ความเข้มข้นของ Hb ต่ำ ส่งผลให้ค่า MCHC ต่ำลง จะเห็นได้ว่าค่า MCHC ขึ้นกับปัจจัยที่มีผลคล้ายกับค่า MCHC ในทางปฏิบัตินิยมใช้ค่า MCHC มากกว่า (เนลิยว, 2548; Tvedten, 1989; Jain, 1993)

ค่า MCV ของช้างเลี้ยงจากปางช้างสยามและอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัตยาเท่ากับ 121.87 ± 0.89 และ 101.35 ± 1.00 เฟมโตลิตร ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงทั้ง 2 กลุ่ม ค่า MCV ของช้างเลี้ยงทั้ง 2 กลุ่ม อยู่ในพิสัยค่าอ้างอิง เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่นแล้วเม็ดเลือดแดงของช้างมีค่า MCV สูงที่สุด แสดงว่ามีเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดใหญ่ สอดคล้องกับ Mikota (2006) และ เนลิยว (2548) รายงานว่าเม็ดเลือดแดงของช้างมีขนาดใหญ่ที่สุดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 9 ไมครอน แต่ปริมาณเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าในสัตว์ชนิดอื่นเนื่องจากขนาดเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใหญ่มากซึ่งจะได้รับการชดเชยโดยมีปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่า และในเลือดช้างไม่พบเรติคูลูไลไซต์ ช่วงชีวิตของเม็ดเลือดแดงในช้างยังไม่มีรายงาน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับม้า เม็ดเลือดแดงของช้างอาจมีอายุถึง 160 วัน และเม็ดเลือดแดงช้างมีความต้านทานต่อออสโมติกไลซิสสูง (Osmotic lysis) ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการที่เม็ดเลือดแดงของช้างมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อขนาดสูง จึงมีส่วนสำคัญในการป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดแดงแตกจากการกินน้ำปริมาณมากๆ หลังจากการขาดน้ำอย่างรุนแรง และในหน้าหนาวช้างเลี้ยงเอเชียจะมีปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ต่ำกว่าปกติและค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงกว่าปกติ นอกจากนี้ในลูกสัตว์อายุน้อยเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก (microcytic) มีค่า MCV ต่ำอาจแปลผลว่าเกิดภาวะการขาดธาตุเหล็กได้ (Jain, 1986; Tvedten, 1989; Jain, 1993) เมื่อเปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาของช้างเลี้ยงตามอายุ โดย แบ่งช้างเลี้ยงออกเป็น 3 กลุ่มตามช่วงอายุ กลุ่มที่ 1 อายุตั้งแต่ 1 ถึง 10 ปี

โดยมีช่วงเฉลี่ยจากปางช้างสยามจำนวน 1 เชือก จากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 10 เชือก พบค่า Hb (ปางช้างสยาม 9.9 กรัมต่อเดซิลิตร, อุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 12.87±0.39 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่า MCV (ปางช้างสยาม 115 เฟมโตลิตร, อุทยานหินล้านปี 100±1.45 เฟมโตลิตร) และค่า MCHC (ปางช้างสยาม 36.4 เปอร์เซ็นต์, ช้างอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 43.05±0.16 เปอร์เซ็นต์) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงในกลุ่มที่ 1 ส่วนค่า RBC ค่า PCV ค่า MCH และค่า PP ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 อายุตั้งแต่ 11 ถึง 20 ปี โดยมีช้างจากปางช้างสยาม 4 เชือก ช้างจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 7 เชือก พบค่า MCV (ปางช้างสยาม 122.25±1.75 เฟมโตลิตร, ช้างอุทยานหินล้านปี 100.48 ±2.83 เฟมโตลิตร) และ MCHC (ปางช้างสยาม 36.35 ±0.36 เปอร์เซ็นต์, อุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 43.21±0.18 เปอร์เซ็นต์) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงในกลุ่มที่ 2 ส่วนค่า RBC ค่า Hb ค่า PCV ค่า MCH และค่า PP ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงในกลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ 3 อายุตั้งแต่ 21-50 ปี มีช้างจากปางช้างสยาม 26 เชือก จากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 10 เชือก พบว่าค่า RBC (ปางช้างสยาม 2.55±0.04 10⁶/ไมโครลิตร, อุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 2.81 ±0.10 10⁶/ไมโครลิตร) ค่า Hb (ปางช้างสยาม 11.35±0.20 กรัมต่อเดซิลิตร, อุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 12.46±0.52 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่า PCV (ปางช้างสยาม 31.11±0.54 เปอร์เซ็นต์, อุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 29.11±1.24 เปอร์เซ็นต์) ค่า MCHC (ปางช้างสยาม 36.47±0.08 เปอร์เซ็นต์, อุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา 42.82 ±0.16 เปอร์เซ็นต์) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงในกลุ่มที่ 3 ส่วนค่า MCV ค่า MCH ค่า PP ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช้างเลี้ยงในกลุ่มที่ 3

จากตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาระหว่างช้างเพศผู้และเพศเมียพบว่า ช้างเลี้ยงจากปางช้างสยามมีค่า PP แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (เพศผู้ 7.30±0.23 กรัมต่อเดซิลิตร, เพศเมีย 8.27±0.10 กรัมต่อเดซิลิตร) ช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยามีค่า MCH (เพศผู้ 40.27±1.54 พิโคกรัม, เพศเมีย 44.14±0.37 พิโคกรัม) และค่า MCV (เพศผู้ 94.00±3.50 เฟมโตลิตร, เพศเมีย 102.63±0.77 เฟมโตลิตร) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แต่ค่าโลหิตวิทยาเฉลี่ยของช้างเลี้ยงทั้ง 2 กลุ่มรวมกันพบค่า RBC (เพศผู้ 2.93±0.14 10⁶/ไมโครลิตร, เพศเมีย 2.68±0.04 10⁶/ไมโครลิตร) และค่า PP (เพศผู้ 7.32±0.17 กรัมต่อเดซิลิตร, เพศเมีย 8.04±0.10 กรัมต่อเดซิลิตร) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศผู้และเพศเมีย อาจเนื่องจากช้างเพศผู้มีขนาดของร่างกายและน้ำหนักมากกว่า ช้างเพศเมียจึงทำให้มีค่า RBC สูงกว่า

มีรายงานการศึกษาค่าโลหิตวิทยาในช้างต่างประเทศซึ่งมีทั้งช้างเอเชียและช้างแอฟริกา รวมทั้งช้างที่เป็นช้างเลี้ยงและช้างป่า สรุปดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าโลหิตวิทยาของช้างในต่างประเทศ

อ้างอิง	ค่าโลหิตวิทยา						
	PCV (%)	Hb (g/dL)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	MCHC (%)	MCH (pg)	MCV (fL)	PP (g/dL)
ช้างเอเชีย (n=42)							
Jainudeen <i>et al.</i>							
(1971)	33.70	12.10	3.18	36.10	42.10	117.90	-
ช้างแอฟริกา (n=23)							
Debbies and Clausen.							
(1975)	-	7.08	3.77	-	-	-	-
ช้างแอฟริกา (n=5)							
Woodford (1979)	34.10	11.30	2.85	33.10	39.60	120.00	-
ช้างเอเชีย							
Gromadzka <i>et al.</i>							
(1988)	39.20	10.01	2.66	-	-	-	6.98
ช้างเอเชียและช้างแอฟริกา							
Schmidt (1986)	34-44	10-13	2-4	30-60	-	-	8.0-9.2
ช้างเอเชีย (n=3)							
Yathirij <i>et al.</i>							
(1922)	33.25	11.65	-	-	-	-	-
ช้างเอเชีย (n=145)							
Silva and Kuruwita.							
(1993a, 1993b)	25-45	7.4-15.8	1.7-5.4	23-40	24-56	81-160	6-13
I.S.I.S.(International Species Information System)							
ช้างแอฟริกา(2002a)	39.20	13.90	3.13	34.70	43.60	125.70	7.70
ช้างเอเชีย(2002b)	46.60	16.10	3.84	34.60	41.90	121.30	7.20

จากตารางที่ 5 สรุปรายงานการศึกษาค่าโลหิตวิทยาของช้างจากต่างประเทศมีค่า PCV ระหว่าง 25-45 เปอร์เซ็นต์ ค่า Hb 7.04-16.10 กรัมต่อเดซิลิตร ค่า RBC $1.70-5.40 \times 10^6$ /ไมโครลิตร ค่า MCHC 23-40 เปอร์เซ็นต์ ค่า MCH 24-56 พิโคกรัม ค่า MCV 81-160 เฟมโตลิตร และค่า PP 6-13 กรัมต่อเดซิลิตร โดยพบว่าค่าโลหิตวิทยาของช้างที่ศึกษาอ้างอิงมีค่าอยู่ในช่วงที่กว้างมาก อาจเป็นเพราะเป็นค่าที่มีการศึกษาทั้งในช้างเอเชียและช้างแอฟริกา ความแตกต่างของเทคนิคการศึกษา สภาพแวดล้อมแต่ละภูมิภาคประเทศที่แตกต่างกัน ภาวะโภชนาการ โรคพยาธิต่างๆ กิจกรรมการดำรงชีวิตของช้างรวมทั้งระยะเวลาของรายงานการศึกษาที่ห่างกันเป็นอย่างมาก โดยช้างเลี้ยงจากปางช้างสยามและช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา มีค่าโลหิตวิทยาอยู่ในช่วงของค่าอ้างอิงจากการศึกษาในต่างประเทศ และมีรายงานการศึกษาค่าโลหิตวิทยาของช้างเลี้ยงในหลายภูมิภาคของประเทศไทยดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าโลหิตวิทยาของช้างเลี้ยงในประเทศไทย

อ้างอิง	ค่าโลหิตวิทยา						
	PCV (%)	Hb (g/dL)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	MCHC (%)	MCH (pg)	MCV (fL)	PP (g/dL)
เสาวนิตย์และคณะ (2533) (n=52)	29.12	12.78	4.14	-	-	-	-
Tuntasuvan <i>et al.</i> (2001) (n=47)	31.70	-	-	-	-	-	7.97
เพ็ญศรีและคณะ (2545) (n=90)	37.86	13.10	3.09	34.79	42.54	122.55	-
Salakij <i>et al.</i> (2005) (n=14)	32.20	11.50	2.66	35.60	43.40	121.80	8.04
สามารถและสาโรช (2551) (n=70)	26.41	10.52	2.18	39.80	48.17	120.84	7.86

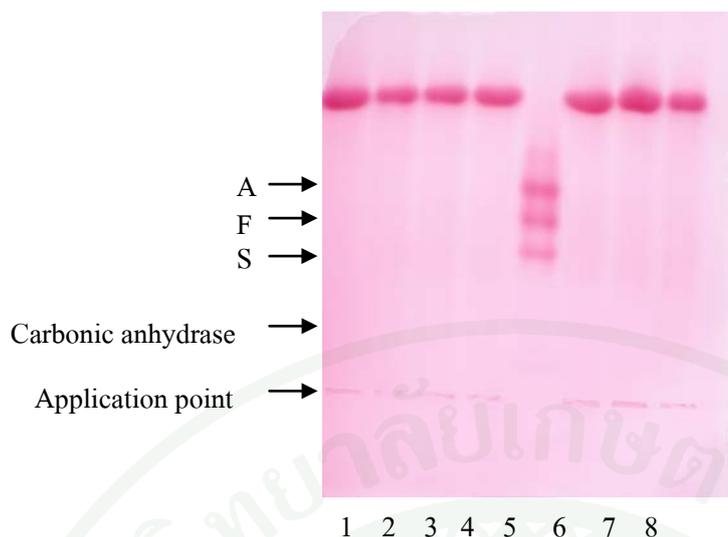
จากตารางที่ 6 สรุปรายงานการศึกษาค่าโลหิตวิทยาของช้างเลี้ยงในประเทศไทยมีค่า PCV 26-32 เปอร์เซ็นต์ ค่า Hb 10-13 กรัมต่อเดซิลิตร ค่า RBC $2-4 \times 10^6$ /ไมโครลิตร ค่า MCHC 35-39 เปอร์เซ็นต์ ค่า MCH 43-48 พิโคกรัม ค่า MCV 120-122 เฟมโตลิตร และค่า PP 7-8 กรัมต่อเดซิลิตร โดยค่าโลหิตวิทยาของช้างจากปางช้างสยามและจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้

อาหารได้มาจากหญ้าที่ตัดมาให้กิน ต้นสับปะรด มีอ้อยและอาหารเม็ดให้กินเสริมบางช่วง จากการวิเคราะห์ค่า PCV ค่า Hb ร่วมกับค่า RBC ของช้างเลี้ยงทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าอยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิง

2. การศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินช้างเลี้ยง

2.1 วิธีเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส

จากการศึกษาฟิโนไทป์ และชนิดของฮีโมโกลบินช้างเลี้ยง โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีของ Helena Laboratories (U.S.A.) โดยใช้สารละลายฮีโมไลเซต พบว่าฮีโมโกลบินของ ช้างเลี้ยง มีฟิโนไทป์เดียว ที่มีแถบความคมชัด เมื่อเทียบกับ สารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินของคน ซึ่งแยกออกจากกันชัดเจน (ภาพที่ 8, เลนที่ 5) ประกอบด้วย Hb A ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ระยะทางไกลที่สุด รองลงมาคือ Hb F Hb S Hb A₂ และ carbonic anhydrase ตามลำดับ ฮีโมโกลบินช้างเลี้ยง ประกอบด้วย 1 แถบ (ภาพที่ 8, เลนที่ 1,2,3,4,6,7 และ 8) ให้ผลการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกเหมือนกัน โดยเคลื่อนที่ไกลกว่า Hb A แสดงให้เห็นว่าที่พีเอช 8.2-8.6 ฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยง มีประจุลบ ทำให้มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก สอดคล้องกับ Dhindsa *et al.* (1972) และ Mikota (2006) รายงานการศึกษาฮีโมโกลบินของช้างเอเชียโดยวิธี Starch gel electrophoresis พบว่าฮีโมโกลบินของช้างเอเชียเคลื่อนที่ช้ากว่าช้างแอฟริกา แต่ฮีโมโกลบินของทั้งช้างเอเชียและช้างแอฟริกาเคลื่อนที่เร็วกว่า Hb A ของคน และ ทั้งช้างเอเชียและช้างแอฟริกามีฮีโมโกลบินฟิโนไทป์เดียว



ภาพที่ 8 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสของคน (เลนที่ 5) และซ่างเลี้ยง (เลนที่ 1, 2, 3, 4, 6, 7 และ 8) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตด ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)

การศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินโดยใช้เทคนิค เซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้หลักการการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้า ตัวกลางค้ำจุนเป็นแผ่นเซลลูโลสอะซิเตด ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่อะซิเตด ทำให้มีคุณสมบัติไม่ดูดซับสารผลการแยกดีขึ้น สามารถแยกโปรตีนออกเป็นแถบๆที่มีความคมชัด รวดเร็ว แม้ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ จากคุณสมบัติของเซลลูโลสอะซิเตดที่ไม่ดูดซับสารทำให้หลังจากการย้อมสีจะเกิดสีของพื้นหลัง (background) น้อย สามารถทำให้เป็นแผ่นโปร่งใสจึงเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีได้ และสามารถวิเคราะห์สารละลายหลายชนิดในการชะสารที่แยกออกจากแผ่นเมมเบรนนี้ได้ (อาภัสสร, 2537) ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีน ที่มีประจุเป็นลบจึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปหาขั้วบวก โดยระยะทางของการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับ อัตราส่วนของประจุต่อมวล (charge per mass ratio) ของฮีโมโกลบินชนิดนั้นๆ และเนื่องจากฮีโมโกลบินแต่ละชนิดมี มวล (mass) ที่ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดมีการเคลื่อนที่ได้ระยะทางแตกต่างกันก็คือประจุสุทธิของฮีโมโกลบิน โดยพบว่าฮีโมโกลบินที่มีประจุสุทธิเป็นลบมากกว่าจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางไกลกว่าในเวลาเท่ากันและในกรณีที่เป็นฟิโนไทป์ที่ประกอบด้วยฮีโมโกลบินมากกว่า 1 ชนิดนั้นจะมีการเคลื่อนที่แยกออกจากกันของฮีโมโกลบินตามประจุสุทธิที่ต่างกัน เทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสนิยมใช้แยกฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ได้ผลรวดเร็ว แต่ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีเท่ากับวิธี พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เนื่องจากเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส ยังไม่สามารถแยกฮีโมโกลบินที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทาง

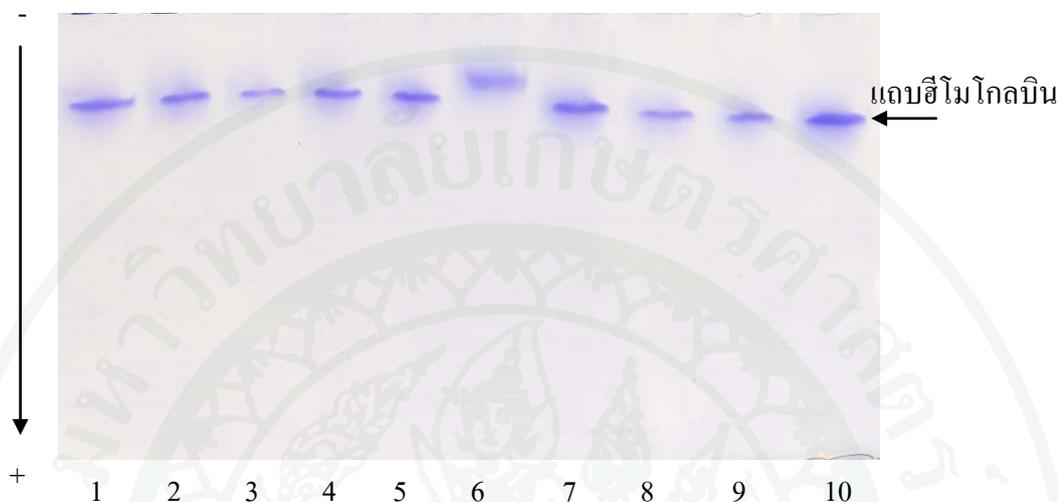
พันธุกรรม จึงจำเป็นต้องใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือแมสสเปกโตรเมตรี (สุกัญญา, 2549) การแยกฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตเพื่อทดสอบแยกชนิดและวัดปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดในคนยังคงได้รับการแนะนำให้ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยัน จากข้อมูลการใช้งานของหน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตั้งแต่ พ.ศ. 2543-2549 หลังจากนำเครื่องอัตโนมัติที่ใช้หลักการ โครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง รุ่น VARIANT II (Biorad, U.S.A.) มาใช้งาน พบว่ามีข้อจำกัดในการใช้เครื่องนี้ที่ไม่สามารถรายงานผลฮีโมโกลบินเอช หรือฮีโมโกลบินบาร์ทได้ ต้องทำการทดสอบซ้ำด้วยชุดคอลัมน์ α -thal short ทำให้เพิ่มต้นทุนและเวลาในการทดสอบมากขึ้น ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงยังคงใช้วิธีแยกฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต เพื่อตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินเอชหรือฮีโมโกลบินบาร์ทเฉลี่ย 9.15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณงานทั้งหมด (ชวดี และคณะ, 2551)

2.2 วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การศึกษาฟิโนไทป์ของ ฮีโมโกลบิน ซ้ำงเลี้ยง โดยวิธี เนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (12% T 2.67% C ที่พีเอช 8.3) เมื่อนำสารละลายฮีโมโกลบินมาศึกษาฟิโนไทป์และชนิดของฮีโมโกลบิน โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่าฮีโมโกลบินของ ซ้ำงเลี้ยง มีฟิโนไทป์เดียว ที่ประกอบด้วยฮีโมโกลบิน 1 ชนิด และเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก เหมือนกับวิธีเซลลูโลสอะซีเตต (ดังภาพที่ 9) วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส มีตัวกลางค้ำจุนเป็น พอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งเชื่อมต่อกับสารเคมีทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่าง และทนต่ออุณหภูมิและความแรงไอออน (ionic strength) อัตราการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของสารที่มีประจุขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ ซึ่งเป็นอัตราส่วนของประจุต่อมวล ถ้าอัตราส่วนนี้สูงโมเลกุลจะเคลื่อนที่ได้รวดเร็ว เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับสารละลาย ฮีโมโกลบิน ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกันทำให้แยกออกจากกันได้

การแยกโปรตีนจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุของโปรตีนที่ค่าพีเอชหนึ่งๆ ที่เลือก ส่วนตัวกลางค้ำจุนเป็น พอลิอะคริลาไมด์เจลสามารถลดการแพร่และป้องกันการเกิดการพาได้ดีทำให้การแยกได้แถบที่คมชัด นอกจากนี้ยังเป็นตัวกลางที่มีรูพรุนทำหน้าที่เป็นตะแกรงร้อนโมเลกุลได้เมื่อปรับขนาดของรูพรุนให้เหมาะสม ดังนั้นการแยกฮีโมโกลบินโดยใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล จึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุและขนาดของสารที่ต้องการแยกจากเหตุผลนี้ทำให้โปรตีนผสมที่มีขนาดแตกต่างกัน แต่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากันจึงไม่ถูกแยกออกจากกันเมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบกระดาษ แต่ถ้าใช้ วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ขนาดของรูพรุนของเจลที่เหมาะสมจะมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของ โปรตีนขนาดใหญ่ช้าลงกว่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดเล็กกว่า ทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากกันได้ (อาภัสสร, 2537; สุภัญญา, 2549)



ภาพที่ 9 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสของคน (เลนที่ 6) และซ่าง เลียง (เลนที่ 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่พี เอช 8.3) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซึบลูอาร์-250

ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ งสัตว์สี่เท้าต่างๆ เมื่อ ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล รายงานพบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ งโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนมี 3 ชนิด คือ Hb AA Hb BB และ Hb AB ซึ่งสอดคล้องกับเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พบ ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ งโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน 3 ชนิดเหมือนกัน และมีการเคลื่อนที่ใน สนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก ส่วนฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ งกระบือปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB ซึ่งสอดคล้องกับเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พบ ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ งกระบือปลัก 2 ชนิดเหมือนกันและมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก (อรพรรณ, 2546) การศึกษาฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ งกระบือปลักและกระบือแม่ค้า โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสและพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ผลเช่นเดียวกัน คือฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของกระบือปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB และพบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของกระบือแม่ค้าน้ำมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB ไม่พบ Hb AAที่ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2:1 และ 5:1 ตามลำดับ (นันทวรรณ, 2549)

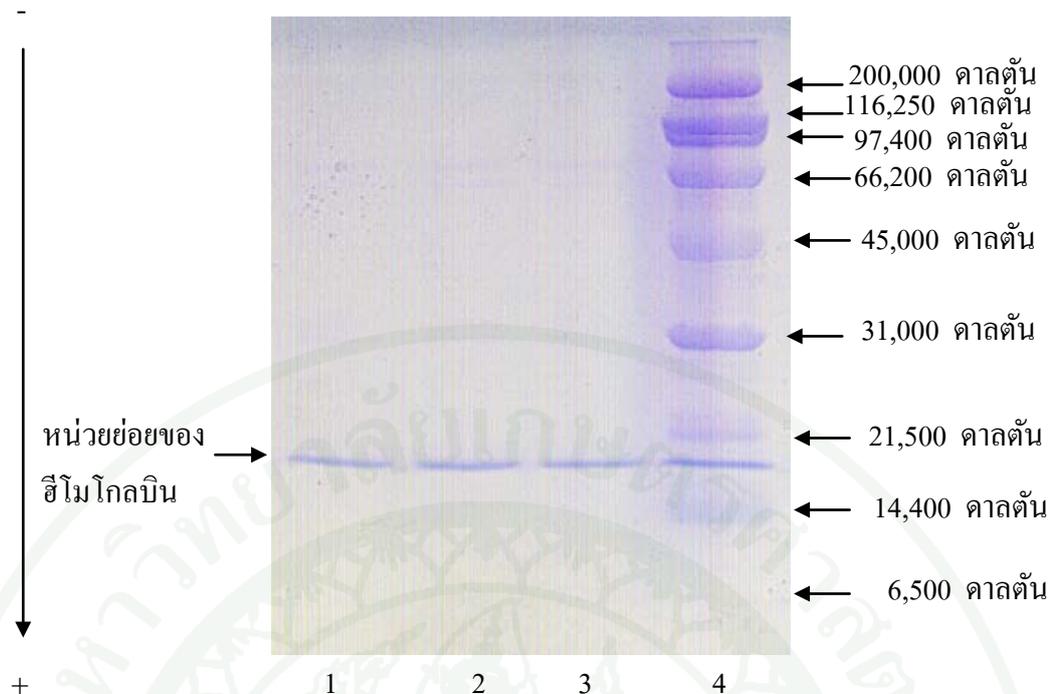
3. การศึกษาการแยกฮีโมโกลบินให้บริสุทธิ์และการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินข้างเลี้ยง และของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินข้างเลี้ยง

3.1 วิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การทำเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 เกรดละเอียด (fine) ซึ่งมีระดับการเชื่อมโยงเป็นตาข่ายร่างแห เหมาะสำหรับการแยกโปรตีน อยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,000-150,000 ดาลตัน ผลของการชะฮีโมโกลบินข้างเลี้ยง บลูเดกซ์แตรนและโปรตีนมาตรฐาน ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาทีดังแสดงในภาพผนวก ข1 ผลที่ได้คือฮีโมโกลบินที่บริสุทธิ์บางส่วน (partial purify) เพื่อนำไปศึกษาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยที่ถูกต้องแน่นอนโดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรีต่อไป

3.2 วิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล

จากการทำเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจลของสารละลายฮีโมโกลบินของข้างเลี้ยงที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่า หน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน แสดงจำนวน 1 แถบ (ดังภาพที่ 10) แสดงว่า หน่วยย่อยหรือสายกลอบินทั้งสี่ของฮีโมโกลบินของ ข้างเลี้ยง มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ในคนพบว่า ฮีโมโกลบินประกอบด้วยหน่วยย่อยของสายอัลฟา 2 สาย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,126 ดาลตัน มีกรดอะมิโน 141 หน่วยและสายเบต้า 2 สาย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,867 ดาลตัน มีกรดอะมิโน 146 หน่วย เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของหน่วยย่อยหรือสายกลอบินด้วยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตีวัน พบว่าฮีโมโกลบินของข้างเลี้ยงมีน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินเฉลี่ยเท่ากับ 16,595 ดาลตัน



ภาพที่ 10 แสดงผลการเคลื่อนที่ของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินข้างเลี้ยง (เลนที่ 1, 2 และ 3) เลนที่ 4 แสดง broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 15% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล 1 แผ่น เวลา 45 นาที)

หมายเหตุ broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

ไมโอซิน	200,000 ดาลตัน
เบต้า-กาแลคโตซิเดส	116,250 ดาลตัน
ฟอสโฟริเลส บี	97,400 ดาลตัน
ซีรัมอัลบูมินของโค	66,200 ดาลตัน
โอวัลบูมิน	45,000 ดาลตัน
คาร์บอนิกแอนไฮเดรส	31,000 ดาลตัน
ตัวยับยั้งทริปซินของถั่วเหลือง	21,500 ดาลตัน
ไลโซไซม์	14,400 ดาลตัน
อะโปรทีนิน	6,500 ดาลตัน

รายงานการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน โดยใช้เทคนิค โซเดียมโคดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ของสัตว์ชนิดต่างๆในประเทศไทยที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน รายงานดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน โดยใช้เทคนิค โซเดียมโคดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ของสัตว์ชนิดต่างๆในประเทศไทย

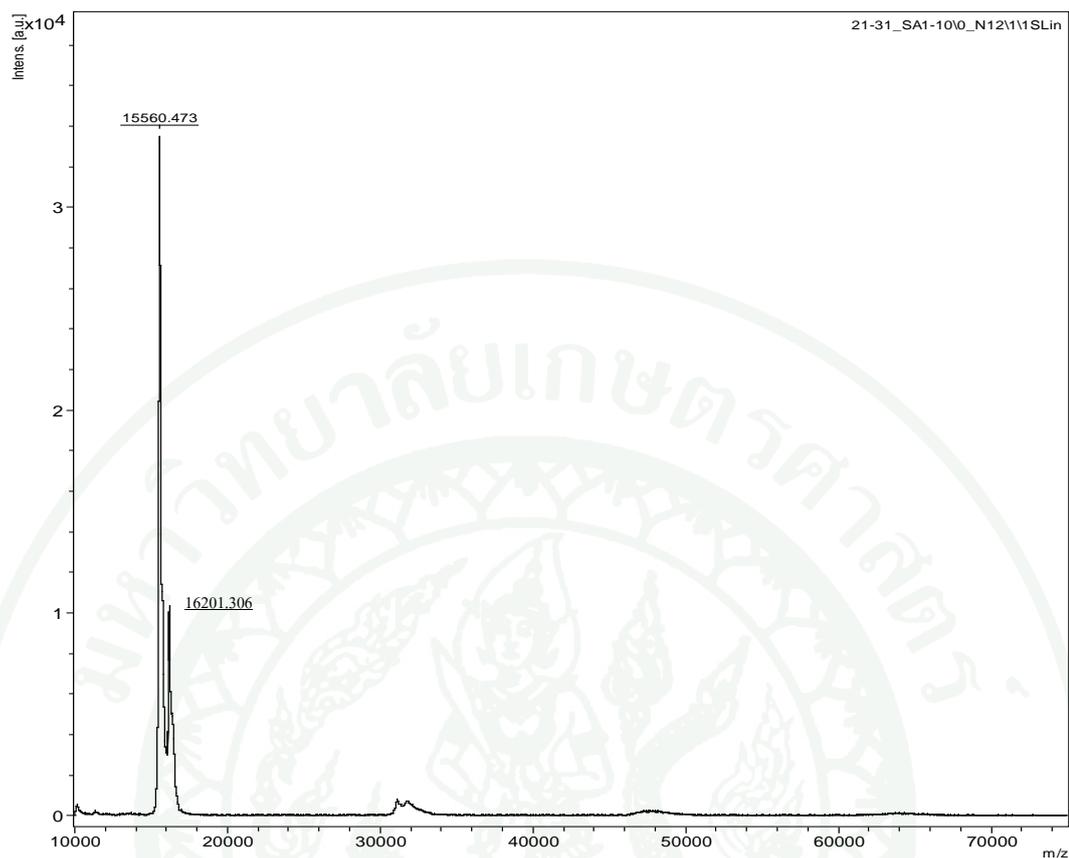
ชนิดสัตว์	น้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน(คาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลัก	11,150	อรพรรณ (2546)
สัตว์ปีก(ไก่)	12,519 และ 10,984	Sittivilai <i>et al.</i> (2004)
โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน	13,227	นันทวรรณ (2549)
ปลานิล	15,415	เกรียงไกร (2548)
ปลาชุก	15,260 และ 14,750	คมสัน (2551)
ปลาตะเพียน	14,630	คมสัน (2551)
สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน	13,637±229.65	จตุพร (2554)
	15,087±52.81	”
สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว	13,030±75.93	จตุพร (2554)
	15,115±314.89	”

3.3 วิธีแมสสเปกโตรเมทรี

การศึกษาในครั้งนี้จะใช้ เทคนิค โซเดียมโคดีซิลซัลเฟตอิเล็กโตรโฟรีซิสและวิธีแมสสเปกโตรเมทรี วัดขนาดโมเลกุลของ ฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยง ที่ทำให้บริสุทธิ์ โมเลกุลของฮีโมโกลบิน จะถูกทำให้เกิดเป็นไอออนด้วยเทคนิค Matrix assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) โดยการให้แสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น ประมาณ 337 นาโนเมตร ผ่านไปที่ สารละลายฮีโมโกลบินที่ผสมอยู่กับกรดไซแนพติก ซึ่งใช้เป็นแมทริกซ์ที่มีสมบัติในการดูดกลืนแสงเลเซอร์ได้ดี สารแมทริกซ์ส่งผ่านพลังงานของแสงเลเซอร์ที่ดูดกลืนไว้ไปให้ สารละลายฮีโมโกลบินเพื่อทำให้เกิดพลังงานกระตุ้น (excitation energy) ทำให้สารละลายฮีโมโกลบิน เกิดเป็นกลุ่มของไอออนของสารตัวอย่างและของสารแมทริกซ์ หลังจากนั้นไอออนจะ เคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มี

สนามไฟฟ้าเครื่องตรวจวัดมวล ชนิด Time of Flight (TOF) จะวัดมวลของไอออนโดยวัดเวลาของแต่ละไอออนที่วิ่งผ่านสนามไฟฟ้า เมื่อความเร่งคงที่ไปตกกระทบกับเครื่องตรวจจับ (detector) ได้เป็นสัญญาณ สเปกตรัมตามขนาดมวลต่อประจุของไอออน (m/z) แล้วส่งสัญญาณต่อไปยังโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป ไอออนที่มีน้ำหนักมากจะวิ่งช้ากว่าไอออนที่มีน้ำหนักน้อย ข้อดีของการวิเคราะห์มวลด้วย TOF คือวิเคราะห์ค่ามวลของไอออนได้รวดเร็ว และ บันทึกค่ามวลของไอออนได้ทั้งหมด ทำให้ลดเวลาในการวิเคราะห์และ ผลการวิเคราะห์เชื่อถือได้ (ชุตินา, 2548; สมปอง, 2550; Veenstra, 2006; Kraj and Macht, 2008) จากผลการศึกษาพบว่าอีโมโกลบินของช้างเลี้ยง (ภาพที่ 11) มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของมอนอเมอร์ เท่ากับ $15,663.18 \pm 274$ และ $16,173.55 \pm 9.99$ ส่วนไดเมอร์ มีขนาดโมเลกุลประมาณ $31,551.00 \pm 538$ สำหรับ ไตรเมอร์และเตตระเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $47,942.62 \pm 411$ และ $64,519.73 \pm 699$ ($n=5$) ตามลำดับ

จากตารางที่ 8 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบิน ช้างเลี้ยงเมื่อพิจารณาการศึกษาด้วยวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตอิเล็กโตรโฟรีซิสและวิธีแมสสเปกโตรเมทรีพบว่าการศึกษาด้วยวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตอิเล็กโตรโฟรีซิสได้น้ำหนักโมเลกุล หน่วยย่อย หรือสายกลอบินของอีโมโกลบินของช้างเลี้ยงแสดงเท่ากับ 16,595 ดาลตัน แต่วิธีแมสสเปกโตรเมทรีให้ผลน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยเท่ากับ $15,663.18 \pm 274$ และ $16,173.55 \pm 9.99$ ดาลตันเนื่องจาก วิธีแมสสเปกโตรเมทรีมีความไวและแม่นยำมากกว่าวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตอิเล็กโตรโฟรีซิส



ภาพที่ 11 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินซึ่งเลี้ยงด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์แบบ MALDI-TOF (Bruker UltraflexIII, Germany) ใช้กรดไซแนมินิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

ตารางที่ 8 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินข้างเลี้ยงแบ่งตามวิธีการศึกษา (หน่วย : คาลตัน)

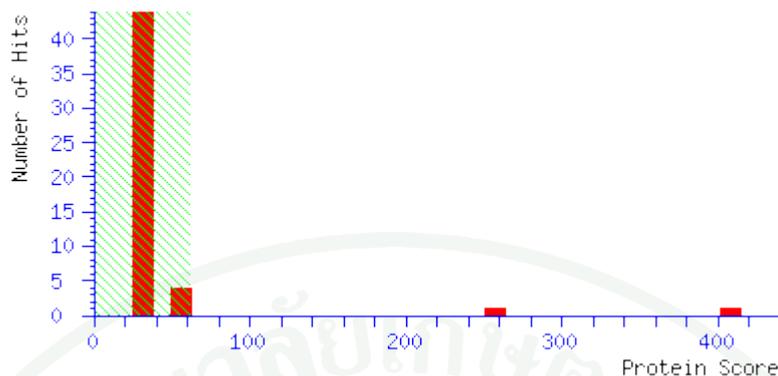
วิธีการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินข้างเลี้ยง		
โมเลกุลของอีโมโกลบิน (คาลตัน)	โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโพรสิส	แมสสเปกโตรเมตรี
เตตระเมอร์	-	64,519.73±699
ไตรเมอร์	-	47,942.62±411
ไดเมอร์	-	31,551.00±538
มอโนเมอร์	16,595	15,663.18±274 และ 16,173.51±9.99

4. ลำดับกรดอะมิโนของสายกลอบินของอีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์จากวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพรสิสแบบติดคอนทินูอัสเจลโดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมตรี (Nano-electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS/MS)

นาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมตรี เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว มีความไวในการวิเคราะห์สูง และใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับอิเล็กโตรสเปรย์แบบธรรมดา อัตราเร็วของการไหลลดลงจาก 1,000 นาโนลิตรต่อนาที เหลือเพียง 10-100 นาโนลิตรต่อนาทีหยดของสารละลายมีขนาดเล็กมากกว่า 1,000,000 เท่า ใช้ปลายเข็มขนาดเล็กและอยู่ใกล้กับคอนสารตัวอย่างจึงส่งผ่านไอออนได้ดีกว่าและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ได้หลายรูปแบบ (ชุติมา,2548;แมนและคณะ,2553; Vekey *et al.*, 2008)

การศึกษาครั้งนี้ใช้ทริปซินเป็น เอนไซม์ที่ใช้ย่อยฮีโมโกลบิน ที่ต้องการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนให้มีขนาดเล็กกลงโดยทริปซินจะตัดโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้น ตรงตำแหน่งหลังหมู่คาร์บอกซิลของไลซีนและอาร์จินีน เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะ ใช้งานง่าย สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิมและประสบความสำเร็จในการย่อยโปรตีนในขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ด้วยโปรตีนฮีโมโกลบินนั้นจะต้องมีการรีดิวซ์โปรตีนและแยกโปรตีนออกเป็นชนิดเดี่ยวก่อน จากการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการบอกรีเมทิลเลชัน (carboxymethylation) ซึ่งวิธีนี้โปรตีนฮีโมโกลบินจะถูกรีดิวซ์ด้วยสารรีดิวซิงก์คือไดไธโอไธรตอล เพื่อตัดพันธะไดซัลไฟด์ที่เป็น พันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรงระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีนที่อยู่ในโครงสร้างทำให้โปรตีนไม่กลับมาจับกันอีกและทำให้หมู่ข้างของกรดอะมิโนซิสเทอีนมีหมู่ซัลไฮดริลอิสระที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอโอโดอะเซตาไมด์เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ของไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ฟังก์ชันซัลไฮดริลด้วยหมู่คาร์บอกซีเมทิลได้ ซึ่งการใช้ทริปซิน มีประโยชน์ในการวิเคราะห์โดยใช้หลักการตรวจหาประจุบวก ของสารละลายจากการย่อย ด้วยทริปซินที่จะนำมาวิเคราะห์หามวลของแต่ละเปปไทด์ที่ตัดได้และได้แผนที่ของเปปไทด์ (peptide map) ที่เป็นสเปกตรัมของมวลโดยการย่อยด้วยทริปซินนั้นนิยมใช้งานทางโปรตีโอมิกส์เพื่อระบุชนิดของโปรตีน วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน และศึกษาโครงสร้างเมื่อเกิดการปรับแต่งหลังจากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (สมปอง, 2550; สุกคร และณรงค์, 2553; Wilkins *et al.*, 2007; Vekey *et al.*, 2008; Henning *et al.*, 2010) โดยมีผู้ศึกษาด้วยเทคนิคเดียวกันในการศึกษาหาลำดับกรดอะมิโนในสายอัลฟาและสายเบต้าของช้างเอเชียและช้างแอฟริกาด้วยวิธี capillary proteolytic digestion nanoESI-MS พบความแตกต่างในสายอัลฟาที่ตำแหน่ง $\alpha_{49}S$ ในช้างเอเชียและตำแหน่ง $\alpha_{49}G$ ในช้างแอฟริกา และความแตกต่างในสายเบต้าที่ตำแหน่ง $\beta_{52}D$ ในช้างเอเชีย และตำแหน่งที่ $\beta_{52}E$ ในช้างแอฟริกา (Henning *et al.*, 2010)

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของสายกลอบินของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ จากวิธีโซเดียมไดดีซัลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจลตัดแถบโปรตีนที่คาดว่าเป็นฮีโมโกลบินของช้างมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้ววิเคราะห์เปปไทด์ ด้วยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรีสารละลายเปปไทด์ของฮีโมโกลบินจะถูกแยกด้วยนาโนคอลัมน์ (Acclaim PepMap 100 C 18, 3 μ m, 100 A, 75 μ m i.d.x 150 mm) ที่อัตราเร็ว 300 นาโนลิตรต่อนาที และชะเปปไทด์ออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายเกรเดียนต์ (solvent gradient) 0-80% ACN ใน 0.1% formic acid เป็นเวลา 20 นาที ข้อมูลแมสสเปกตรัมที่ได้จาก วิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี นำมาระบุชนิดของโปรตีน ที่มีในฐานข้อมูลคอม GenBank โดยโปรแกรม MASCOT ซึ่งแสดงค่า ProteinScore ของแถบฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยง (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงผลวิเคราะห์ความเหมือนของ MS/MS ของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินช้างเลี้ยงกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม MASCOT

ผลการวิเคราะห์แสดงว่า MS/MS ของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน ช้างเลี้ยงมีความเหมือนกับ Hemoglobin subunit beta จาก *Elephas maximus* และ Hemoglobin subunit alpha จาก *Elephas maximus* ด้วยคะแนน Protein score เท่ากับ 408 และ 247 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ซึ่งผลคะแนน Protein score ที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Mascot มีค่าสูงเพียงพอที่จะกล่าวได้ว่าผลลัพธ์มีความถูกต้องที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ซึ่งเมื่อแสดงเป็นกราฟแท่ง จะเห็นว่า Protein score ผลลัพธ์ที่ 408 และ 247 (red bar) อยู่นอกกรอบสีเขียว บริเวณส่วนที่แรเงาสีเขียว (green shaded area) เป็นบริเวณที่แสดงว่าส่วนนี้มีระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 9 แสดงชนิดโปรตีนของแถบของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินซึ่งเลี้ยงที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชันและระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein Name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Protein Score	No. of Match Peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi122604	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Beta-globin; AltName: Full=Hemoglobin beta chain	16216	408	6	R.LLVVYPWTR.R K.VVAGVANALAHK.Y R.LLGNVLVIVLAR.H R.HFGKEFTPQVQAAAYEK.V R.FFEHFGDLSTADAVLHNAK.V R.RFFEHFGDLSTADAVLHNAK.V
gi122398	RecName: Full=Hemoglobin subunit alpha; AltName: Full=Alpha-globin; AltName: Full=Hemoglobin alpha chain	15578	247	6	R.MFFSFPTTK.T + Oxidation (M) K.FLSNVSTVLTSK.Y K.VGDHASDYVAEALER.M K.TYFPFDLSHGSGQVK.G K.TYFPFDLSHGSGQVK.G K.VGEALTQAVGHLLDLPALS ALSDLHAHK.L

จากตาราง แสดงชนิด โปรตีนของแถบหน่วยย่อยฮีโมโกลบินซ้างเลี้ยงและลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแสดงในตารางที่ 9 จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ซ้างเลี้ยงโดยใช้เทคนิค nanoESI-MS พบว่าสายเบต้าหนึ่งสายมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 16,216 ดาลตันและมีลำดับกรดอะมิโน 146 หน่วยแลสายอัลฟามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,578 ดาลตันและมีลำดับกรดอะมิโน 141 หน่วยและพบว่าเปปไทด์จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับหน่วยย่อยฮีโมโกลบินสายเคลต้าของซ้างเอเชีย (*Elephas maximus*) สายเบต้าและเคลต้าในซ้างแอฟริกา (*Loxodonta africana*) สายเบต้าและเคลต้าในซ้างแมมมอธ (*Mammuthus primigenius*) สายเบต้าในกระต่ายภูเขา (*Abyssinian hyrax*) สายเบต้าในวาฬ (sperm whale, mink whale) สายเบต้าในปลาโลมา (*Delphinus delphis*) สายเบต้าในแรคคูน (*Procyon lotor*)

จากการศึกษาโดยนำ ฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเตรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีมาวิเคราะห์โดยวิธี MALDI-TOF สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของซ้างเลี้ยงได้ทั้ง มอนอเมอร์ ไดเมอร์ ไตรเมอร์และเตตระเมอร์ แต่เมื่อศึกษาด้วยวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ผลเป็นแถบหน่วยย่อยฮีโมโกลบินแถบเดียว แสดงว่าในแถบหน่วยย่อยนี้จะมีหน่วยย่อยของทั้ง Hemoglobin subunit beta และ Hemoglobin subunit alpha แต่ไม่สามารถแยกหน่วยย่อยดังกล่าวออกจากกันได้ด้วย วิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เนื่องจากทั้ง 2 หน่วยย่อยมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกัน เมื่อนำแถบหน่วยย่อยไปศึกษาโดยเทคนิคนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมตรี ได้ผลตรงกับ Hemoglobin subunit beta และ Hemoglobin subunit alpha

โดยสรุปเมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินของซ้างเลี้ยงด้วยเทคนิค Maldi-TOF และ nano-ESI MS/MS พบว่า สายอัลฟาของฮีโมโกลบินมีขนาด 15,663.18 ดาลตัน ส่วนสายเบต้ามีน้ำหนักโมเลกุล 16,201.305 ดาลตัน ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของสายอัลฟา 2 สายรวมกัน (α_2) เท่ากับ 31,551 ดาลตัน แสดงว่า พันธะระหว่าง สายอัลฟามีความแข็งแรงมากกว่า ระหว่างสายอัลฟาและสายเบต้า และน้ำหนักโมเลกุลในรูปเตตระเมอร์ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของสายอัลฟา 2 สาย สายเบต้า 2 สาย ($\alpha_2\beta_2$) แสดงว่าโมเลกุลของฮีโมโกลบินของซ้างเลี้ยง ประกอบด้วยการจับกันของสายอัลฟา 2 สายและสายเบต้า 2 สาย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ช้างเลี้ยงจากปางช้างสยาม มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย 31.26 ± 0.51 เปอร์เซ็นต์ และช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทธามีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย 29.29 ± 0.61 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
2. ช้างเลี้ยงจากปางช้างสยาม มีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ย 11.40 ± 0.19 กรัมต่อเดซิลิตร และช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทธามีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ย 12.59 ± 0.25 กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p < 0.05$)
3. การศึกษาด้วยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าฮีโมโกลบินช้างเลี้ยงแสดง 1 ฟีโนไทป์ ประกอบด้วยฮีโมโกลบิน 1 ชนิด ให้ผลการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก โดยเคลื่อนที่เร็วกว่า Hb A ของคน
4. การศึกษาด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่า ฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยงแสดง 1 ฟีโนไทป์และประกอบด้วยฮีโมโกลบิน 1 ชนิดเช่นกัน
5. การศึกษาด้วยเทคนิคไซเดียมโคดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยงแสดง 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 16,595 ดาลตัน
6. การศึกษาด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าฮีโมโกลบินของช้างเลี้ยงประกอบด้วย มอโนเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายอัลฟาเท่ากับ $15,663.18 \pm 274$ และ $16,173.55 \pm 9.99$ ดาลตัน ไดเมอร์ไดเมอร์ และเตตระเมอร์ มี น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ $31,551.00 \pm 538$ $47,942.62 \pm 411$ และ $64,519.73 \pm 699$ ดาลตัน ตามลำดับ
7. การศึกษาลำดับ กรดอะมิโนของสายกลอบินของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ จากวิธีไซเดียมโคดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจลโดยเทคนิคนาโนอิเล็กโตรสเปร์ย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี พบน้ำหนักโมเลกุลของสายเบต้าเท่ากับ 16,216 ดาลตัน

และมีลำดับกรดอะมิโน 146 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลของสายอัลฟาเท่ากับ 15,578 ดาลตัน และมีลำดับกรดอะมิโน 141 หน่วย

ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูล อ้างอิงค่าโดหัตวิทยาในช้างเลี้ยงเอเชียและเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมของช้างไทย



- ณัฐประภา สุริยมณฑล. 2547. โปรงตีนของเลือด, น. 1-34. ใน *โลหิตวิทยาเบื้องต้น* วิชัย ประยูรวิวัฒน์ และ อ้อยทิพย์ ณ ถลาง, บรรณาธิการ. โครงการตำราวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า. กรุงเทพฯ.
- นันทวรรณ เนาวโรจน์. 2549. การศึกษาชนิดและคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินกระบือปลัก โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี อิเล็กโตรโฟรีซิสและสเปกโตรเมทรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บัวรอง ลีวเฉลิมวงศ์. 2536. ระบบหายใจ, น. 197-201. ใน *เสียงชัย ลีมล้อมวงศ์, บรรณาธิการ. สรีรวิทยา*. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ปริญนันท์ อันวิเศษ, จินดา จันดาเรือง, ทัย กาบบัว และสมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2553. ฮีโมโกลบินจระเข้: การนำไปใช้ประโยชน์. *ว. วิทย. มข.* 38 (3): 303-312.
- ปานเทพ รัตนากร. 2540. ชีววิทยาเบื้องต้นของช้าง. น. 13-18. ใน *การสัมมนา เรื่อง ทิศทางของรัฐและเอกชนเพื่อการอนุรักษ์ช้าง*. คณะอนุกรรมการประสานงานอนุรักษ์ช้างไทยในคณะกรรมการเอกลักษณ์แห่งชาติ สำนักงานเลขาธิการรัฐมนตรี. บริษัท การบินไทย จำกัด (มหาชน). กรุงเทพฯ.
- พรเทพ เทียนสีวากุล. 2541. *โลหิตวิทยาคลินิก*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- พิพัฒน์ เจริญมี. 2536. ระบบไหลเวียนเลือด, น. 118-122. ใน *เสียงชัย ลีมล้อมวงศ์, บรรณาธิการ. สรีรวิทยา*. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.
- เพ็ญศรี ชีระวัฒน์, ไกรแก้ว คำดี, สิทธิเดช มหาสว่างกุล, ทวีโชค อังควานิช และพิพัฒน์ฉัตร ดิศกุล. 2545. ค่าโลหิตวิทยาของช้างเอเชียที่เลี้ยงในจังหวัดลำปาง. *วารสารสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 12(2): 22-3

ภิญโญ พานิชพันธ์, พิณทิพย์ รื่นวงษา, กานต์ยุพา จิตติวัฒนา และปิยะฉัตร จิตต์ธรรม. 2555. **โปรตีน**.
ชีวโมเลกุล.สถาบันนวัตกรรมและพัฒนากระบวนการเรียนรู้. มหาวิทยาลัยมหิดล.

แหล่งที่มา: http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/biomolecule/chapter4_1.html,

11 กรกฎาคม 2555.

มัทนา ศรีกระจ่าง. 2542. **ช้างป่าเอเชียในประเทศไทยและแนวทางการอนุรักษ์**. สำนักอนุรักษ์สัตว์
ป่า. กรมป่าไม้. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภควดี สุทธิไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์
เหลี่ยวเรืองรัตน์, อูมาพร สุขม่วง และวันเพ็ญ ช้อนแก้ว. 2553. **หลักการและเทคนิคการ
วิเคราะห์เชิงเครื่องมือ**. บริษัท ชวนพิมพ์ 50 จำกัด, กรุงเทพฯ.

ศักดิ์ดา ดาดวง. 2553. **รู้จักและเข้าใจ เลือด สิ่งมหัศจรรย์ในร่างกายเรา**. สำนักพิมพ์ ศ.ศ.ท. แปลจาก
Hiroshi Mohri. **Tokon Yasashi Ketsuei no Hon**. กรุงเทพฯ.

ศุภสร วณิชเวชรุ่งเรือง และณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์. 2553. **แมสสเปกโตรเมตรี**. สำนักพิมพ์แห่ง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. **โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน**. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สามารถ ประสิทธิ์ผล และสาโรช จันทร์ลาด. 2551. **การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาของช้างเอเชียที่
เลี้ยงในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี**. สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดกาญจนบุรี. กรมปศุสัตว์.

สุกัญญา สุนทรส. 2549. **อิเล็กโทรโฟรีซิส**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุวิษ บุญโปร่ง, อาภัสสร ชูเทศะ, ชุศรี ศรีเพ็ญ และชาญวิทย์ วัชรพุกก์. 2548. ความสัมพันธ์
ระหว่างฮีโมโกลบินพีโนไทป์และซีรัมโปรตีนกับการให้ผลผลิตของโคเนื้อในประเทศไทย
ไทย, น. 279-287. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่
43 (สาขาสัตว์)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรเชษฐ์ อุยณกรกุล. 2540. การตกมันของข้าง.น. 46-54. ใน การสัมมนา เรื่อง ทิศทางของรัฐและ
เอกชนเพื่อการอนุรักษ์ข้าง. คณะอนุกรรมการประสานงานอนุรักษ์ข้างไทยใน
คณะกรรมการเอกลักษณ์แห่งชาติ สำนักงานเลขานายกรัฐมนตรี. บริษัท การบินไทย จำกัด
(มหาชน). กรุงเทพฯ.

เสาวนิตย์ ทิพย์เสวก, นิลิต ม่วงศรี, ภิรมย์ ศรีวรรณ, รุ่งเจริญ กาญจโนมัย, นงนุช จันทราช และ
มาลินี ลีมีโกคา. 2533. การศึกษาเกี่ยวกับข้างเมืองไทย. 1. ค่าโลหิตวิทยา, น. 433-439
ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28 (สาขาสัตว
แพทย์และประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรพรรณ สังข์สัมฤทธิ์. 2546. การศึกษาฟีนไทป์และคุณสมบัติทางเคมีของฮีโมโกลบินโคเนื้อ
พันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ ทองแก้ว. 2534. การศึกษาเกี่ยวกับข้างในประวัติศาสตร์ไทย. ภาควิชาประวัติศาสตร์. วิทยาลัย
ครูสุรินทร์.

อาภัสสร ชูเทศะ. 2551. ชิวเคมี. ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร
ศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อาภัสสร ชูเทศะ. 2537. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว, กรุงเทพฯ.

Akinyemi, M.O. and A.E. Salako. 2010. Hemoglobin polymorphism and morphometrical
correlates in the west African dwarf sheep of nigeria. **Int. J. Morphol.** 28 (1): 205-208.

Bachmann, A.W., R.S.F. Campbell and D. Yellowlees. 1978. Haemoglobins in cattle and
buffalo: haemoglobin types of *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos bangteng* and *Bubalus*
bubalis in Northern Australia. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** 56 (5): 623-629

Bangham, A.D. and B.S. Blumberg. 1958. Distribution of electrophoretically different
hemoglobins among some cattle breeds of Europe and Africa. **Nature** 181: 1551-1552.

- Berg, J.M., J.L. Tymoczko and L. Stryer. 2002. **Biochemistry**. 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A..
- Boonprong, S., A. Choothesa, C. Sribhen, N. Parvizi and C. Vajrabukka. 2007. Relationship between haemoglobin types and productivity of Thai indigenous and Simmental × Brahman crossbred cattle. **Livest. Sci.** 111: 213-217.
- Boonyarat, D. 1977. **Hemoglobin Thailand: Structure Characterization and Oxyhemoglobin Dissociation Studies**. M.Sc. Thesis, Mahidol University.
- Boron, W.F. and E.L. Boulpaep. 2003. **Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach**. Philadelphia, Pennsylvania.
- Clauss, M., H. Steinmetz., U. Eulenberger., P. Ossent., R. Zingg., J. Hummel and J.M. Hatt. 2007. Observations on the length of the intestinal tract of African elephants *Loxodonta Africana* (Blumenbach 1797) and Asian elephants *Elephas maximus* (Linne 1735). **European Journal of Wildlife Research**. 53: 68-72.
- Cigremis, Y., A. Omer, E. Kenan, M. Gaffaroglu, Y. Turkoz and S. Yilmaz. 2008. Comparative analysis of human and porcupine (*Hystrix cristata* L., 1758) haemoglobins. **G.U. J. Sci.** 21 (4): 113-115.
- Cunningham, J.G. and B.G. Klein. 2007. **Textbook of Veterinary Physiology**. 4th ed. Saunders, Elsevier, China.
- Debbies, J.G. and B. Clausen. 1975. Some Hematology Values of Free-Ranging African Elephants. **Journal of Wildlife Diseases**. 11:79-82.
- Di Luccia, A., L. Iannibelli, E. Addato, B. Masala, L. Manca and L. Ferrara. 1991. Evidence for presence of two difference beta-globin chain in the hemoglobin of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.). **Comp. Biochem. Physiol.** 99 (4): 887-892.

- Dhindsa, D.S., C.J. Sedgwick and J. Metcalfe. 1972. Comparative studies of the respiratory functions of mammalian blood. VIII. Asian elephant (*Elephas maximus*) and African elephant (*Loxodonta Africana Africana*). **Respiration Physiology**. 14 (3): 332-342.
- Duffy, L.K., C.T. Genaux and G.L. Florant. 1986. A reinvestigation of haemoglobin alterations in ground squirrels while in various hibernation activity states. **Comp. Biochem. Physiol.** 83: 797-800.
- Esharatkah, B., S. Safi, Z. Khaki, P.K. Nia and M. Sadaghian. 2007. Study on haemoglobin polymorphism in two breeds of Iranian sheep. **J. Anim. Vet.** 6: 1426-1428.
- Encyclopedia Britannica. 2007. **Blood: hemoglobin tetramer**. Available Source: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/260923/hemoglobin>, July 11, 2012
- Feldman, B.F., J.G. Zinkl and N.C. Jain. 2000. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Canada.
- Ferranti, P., A. Di Luccia, A. Malorni, L. Ferrara, G. Marino and P. Pucci. 1993. Electrospray mass spectrometric analysis of river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) hemoglobins reexamination of $\alpha 1$ and $\alpha 3$ globin chain sequences. **Comp. Biochem. Physiol.** 105: 573-578
- Ferranti, P., A. Facchiano, F. Zappacosta, D. Vincenti, R. Rullo, B. Masala and A. Di Luccia. 2001. Primary structure of alpha-globin chains from river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) hemoglobins. **J. Protein Chem.** 20: 171-179.
- Francis, J. and D.A. Little. 1964. Resistance of droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. **Aust. Vet. J.** 40: 247.

Gromadzka, O.J., Jakubow, K., Zalewska B. and Z. Krzywicki. 1988. Haematological and blood biochemical studies in female domesticated Indian elephants (*Elaphas maximus*). **Comp Biochem Physio A Comp Physiol**. 89: 313-315.

Guyton, A.C. and J.E. Hall. 2011. **Textbook of Medical Physiology**. 12th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, U.S.A..

Helena Laboratories. 2001. **Hemoglobin Electrophoresis Procedure**. Instruction manual.

Henning, S., M. Mormann, J. Peter-Katalinic and G. Pohlentz. 2010. Direct analysis of α - and β -chains of hemoglobins from mammalian blood samples by nanoESI mass spectrometry during in-capillary proteolytic digestion. **Amino Acids**. 10: 671-677.

Horton, H.R., L.A. Moran, R.S. Ochs, J.D. Rawn and K.G. Scrimgeour. 2002. **Textbook of Principle of Biochemistry**. 3rd ed. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, U.S.A..

I.S.I.S. 2002a. Reference Range for Physiological Data value. *Loxodonta Africana* (African elephant). **International Species Information System**. 12101 Johnny Cake Ridge Road. Apple Valley, MN 55124. USA.

I.S.I.S. 2002b. Reference Range for Physiological Data value. *Elephas maximus* (Asian elephant). **International Species Information System**. 12101 Johnny Cake Ridge Road. Apple Valley, MN 55124. USA.

Jain, N.C. 1986. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A..

Jain, N.C. 1993. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A..

Jainudeen, M. R., Eisenberg, J. F. and J. B. Jayasingle. 1971. Hemogram of the domesticated Asiatic elephant (*Elephas maximus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. 2: 5-11.

- Kaneko, J.J., J.W. Harvey and M.L. Bruss. 2008. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Elsevier. Academic Press.
- Khazraiiina, P., A. Rostami, H.R. Haddadzadeh and S.M. Nassiri. 2008. Hematological characteristics and hemoglobin typing of the Persian squirrel (*Sciurus anomalus*). **J. Exot. Pet Med.** 17 (1): 44-48.
- Kraj, A. and M. Macht. 2008. Introduction to protein and peptide mass spectrometry: matrix-assisted laser desorption/ionization, pp. 89-99. *In* A. Kraj and J. Silberring, eds. **Proteomics: Introduction to Methods and Applications**. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993. **Principles of Biochemistry**. Worth Pub, New York, U.S.A..
- Lincoln, D.R., D.T. Edmunds, T.J. Gribble and H.C. Schwartz. 1973. Studies on the hemoglobins of pinnipeds. **Blood** 41 (1): 163-170.
- Maisar, P. 1970. On hemoglobin-XXVI. Hemoglobin of hedgehog (*Erinaceus romanicus*), I. **Comp. Biochem. Physiol.** 33: 697-703.
- Mikota, S.K. 2006. Hemolymphatic System, pp. 325-345. *In* Fowler M.E. and Mikota, S.K., eds. **Biology, medicine, and surgery of elephants**. Blackwell Publishing, Oxford
- Mohri, M. 2000. Electrophoretic study of haemoglobin polymorphism in one-humped camel (*Camelus dromedarius*). **Comp. Haematol. Int.** 10: 187-189.

- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes and V.W. Rodwell. 1996. **Harper's Biochemistry**. 24th ed. Simon & Schuster, U.S.A..
- Nazifi, S. and A. Rategh. 2005. Haemoglobin types and blood concentrations of haemoglobin, copper, ceruloplasmin and iron in adult Caspian miniature horses **Revue. Med. Vet.** 1: 50-52.
- Nazifi, S., M. Saeb and A. Khoshvaghti. 2003. Studies on the relationship between haemoglobin types of adult Turkoman horses and the concentrations of haemoglobin, copper, ceruloplasmin and iron. **Comp. Clin. Path.** 12: 53-56.
- Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2008. **Principle of Biochemistry**. 5rd ed. W.H. Freeman, New York.
- Perkins, D.N., D.J.C. Pappin, D.M. Creasy and J.S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence database using mass spectrometry data. **Electrophoresis**. 20: 3551-3567.
- Perutz, M.F. and K. Imai. 1980. Regulation of oxygen affinity of mammalian haemoglobins. **J. Mol. Biol.** 136: 183-191.
- Piras, A.M., A. Dessy, F. Chiellini, E. Chiellini, C. Farina, M. Ramelli and E.D. Valle. 2008. Polymeric nanoparticles for hemoglobin-based oxygen carriers. **Biochimica. et. Biophysica. Acta.** 1784: 1454-1461.
- Prisco, G.D., B. Giardina and R.E. Weber. 2000. **Hemoglobin Function in Vertebrates: Molecular Adaptation in Extreme and Temperate Environments**. Springer, Verlag Italia, Milano.
- Reed, S. 2009. **Essential Physiological Biochemistry: An Organ-Based Approach**. John Wiley & Sons, UK.

Ritter, P. 1996. **Biochemistry: A Foundation**. Brooks/COLE Publishing Company, Pacific Grove, U.S.A..

Rodak, B.F., G.A. Fritsma and K. Doig. 2007. **Hematology: Clinical Principles and Applications**. 3rd ed. Saunders, Elsevier.

Salakij, J., C. Salakij, N. Narkkong, S. Apibal, P. Suthunmapinuntra, J. Rattanakuprakarn, G. Nunklang and M. Yindee. 2005. Hematology, Cytochemistry and Ultrastructure of Blood Cells from Asian Elephant (*Elephas maximus*). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 39 : 482 – 493.

Schechter, A.N. 2008. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood** 112 (10): 3927-3938.

Schmidt, M. 1986. Proboscidea (Elephant). pp. 883-923. *In* Fowler M.E, ed. **Zoo and wild animal medicine** .2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Schroeder, W.A., J.R. Shelton, J.B. Shelton, B. Robberson and D.R. Babin. 1967. A comparison of amino acid sequences in the β -chain of adult bovine hemoglobins A and B. **Arch. Biochem. Biophys.** 120: 124-135.

Shikawa, K. and A. Matsuoka. 2003. Human haemoglobin: A new paradigm for oxygen binding involving two types of $\alpha\beta$ contacts. **Eur. J. Biochem.** 270: 4041-4051.

Silva, I. D. and V. Y. Kuruwita. 1993a. Hematology, plasma, and serum biochemistry values in free- ranging elephants in Sri Lanka. **J. Zoo. Wildl. Med.** 24(4): 434-439.

Silva, I. D. and V. Y. Kuruwita 1993b. Hematology, plasma, and serum biochemistry values in domesticated elephants(*Elephas Maximus Ceylonicus*) in Sri Lanka. **J. Zoo. Wildl. Med.** 24(4): 440- 444.

Sittivilai, R., C. Sribhen, S. Isariyodom, T. Songserm and A. Choothesa. 2004. A chromatographic and electrophoretic study of hemoglobin of domestic fowl. **Kasetsart Journal (Natural Science)** 38: 132-136.

Sripanitan, R. 1983. **Structure Characterization of the Fourth Component of Hemoglobin Constant Spring**. M.Sc. Thesis, Mahidol University.

Tuntasuvan. D., Theeraphan. A., Phoengpong. N., Jitnupong. W. and G. Lungka. 2001. Comparison of serum chemistry Values and serum mineral values between captive and free-ranging elephants in Thailand. **FAO**.

Tvedten, H. 1989. The complete blood count and bone marrow examination: general comments and selected techniques, pp. 14-31. *In* M.D. Willard, H. Tvedten and G.H. Turnwald, eds. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. W.B. Saunders, Philadelphia, U.S.A..

Vanderdon, T.L. and J.M. Colacino. 1989. Characterization of hemoglobin from *Phoronis architecta* (Phoronida). **Comp. Biochem. Physiol.** 94 (1): 31-39.

Veenstra, T.D. 2006. Mass spectrometry, pp. 3-17. *In* T.D. Veenstra and J.R. Yates III, eds. **Proteomics for Biological Discovery**. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.

Vekey, K., A. Telekes and A. Vertes. 2008. **Medical Applications of Mass Spectrometry**. Elsevier. Amsterdam.

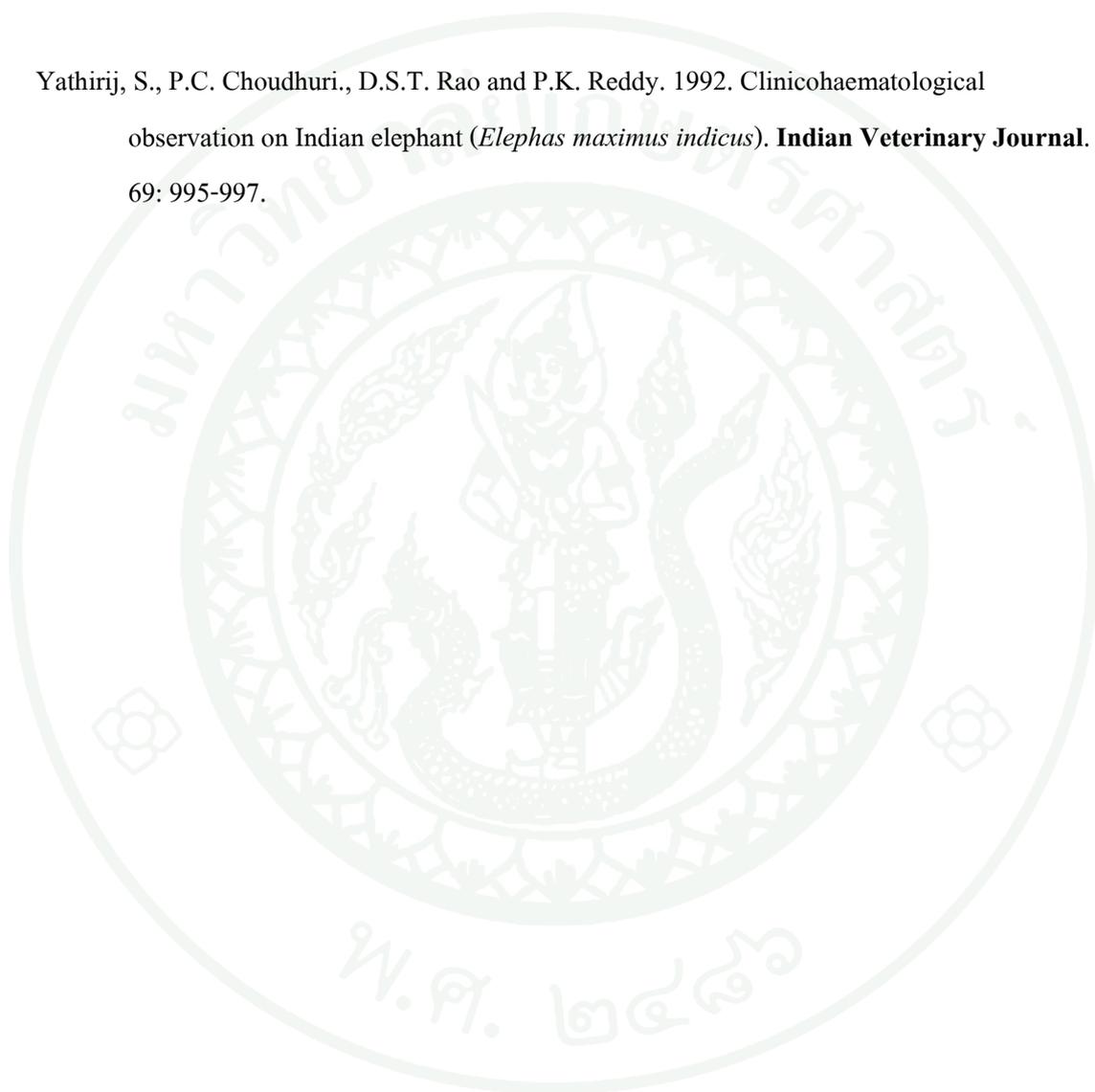
Voet, D. and J.G. Voet. 2004. **Biochemistry**. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Wilkins, M.R., R.D. Appel, K.L. Williams and D.F. Hochstrasser. 2007. **Proteome Research Concepts, Technology and Application**. 3rd ed. Springer, Verlag Berlin, Heidelberg.

Whitford, D. 2005. **Proteins: Structure and Function**. Chichester, West Sussex: J. Wiley & Sons.

Woodford, M. H. 1979. Blood Characteristics of the African Elephant (*Loxodonta africana cylotis*). **Journal of Wildlife Diseases**. 15: 112-113.

Yathirij, S., P.C. Choudhuri., D.S.T. Rao and P.K. Reddy. 1992. Clinicohaematological observation on Indian elephant (*Elephas maximus indicus*). **Indian Veterinary Journal**. 69: 995-997.





ภาคผนวก ก
การศึกษาค่าโลหิตวิทยา

ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดงที่นำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความผิดปกติของเม็ดเลือดหรือภาวะโลหิตจาง ประกอบด้วย

1. ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) สามารถคำนวณหาค่า MCHC จากค่าฮีโมโกลบิน(Hb) และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย (PCV) จากสูตร

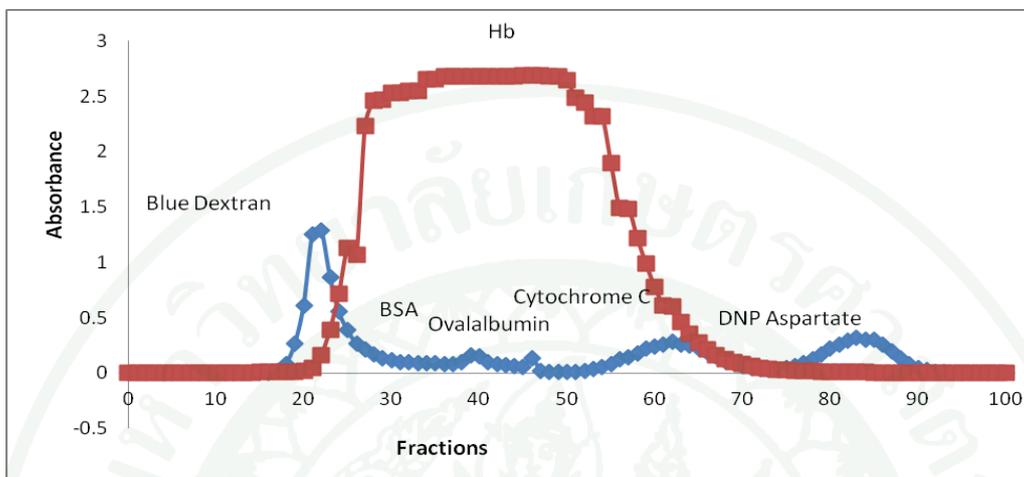
$$\text{MCHC (g/dL)} = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 100}{\text{PCV (\%)}}$$

2. ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (MCH) สามารถคำนวณหาค่า MCH จากสูตร $\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 10}{\text{RBC count (10}^6/\mu\text{L)}}$

3. ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (MCV) สามารถคำนวณหาค่า MCV ตามสูตร คือ $\text{MCV (fL)} = \frac{\text{PCV (\%)} \times 10}{\text{RBC count (10}^6/\mu\text{L)}}$

ภาพผนวก ข

การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี



ภาพผนวก ข1 แสดงผลการชะสารชนิดต่างๆของฮีโมโกลบินซึ่งเลี้ยงและโปรตีนมาตรฐาน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีสำหรับการย่อยเจลด้วยทริปซิน

1. 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต (FW 79.06) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ชั่งสาร แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต 79.6 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile milli Q water) ปรับ ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร
2. 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร
3. 10 มิลลิโมลาร์ ไดโซโพรตอล ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ชั่งสารไดโซโพรตอล (FW 154.25) 3.085 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิโม ลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร
4. 100 มิลลิโมลาร์ ไอโอโดอะเซตาไมด์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ชั่งสารไอโอโดอะเซตาไมด์ (FW 184) 36.8 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร
5. 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต เติม 100 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ลงใน 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต อัตราส่วน 1:1
6. 20 นาโนกรัม ทริปซิน ใน 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต เติม 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 20 นาโนกรัม ทริปซิน จะได้ 20 นาโนกรัม ทริปซิน ใน 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต
7. 30 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโต ไนไตรล์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร

4.8 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม กรดไตรฟลูออโรอะซิติกเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 49.95 มิลลิลิตร

4.9 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กรดฟอร์มิก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร



ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายราชนันท์ อภัยชา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	เกิดวันที่ 9 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2515
ประวัติการศึกษา	สัตวแพทยศาสตรบัณฑิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ตะวันออก
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนโครงการพัฒนาอาจารย์ ประจำปี 2552 ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ผลงานใน วารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ