

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย
Study on Chemical Compositions of Siamese Crocodile Blood

ได้รับทุนวิจัยประจำปี 2554 จำนวนเงิน 713,779 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ มกราคม 2555 ถึง มกราคม 2556 (ปีที่ 2)

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวจินดาวรรณ สิริันทวีเนติ Ph.D.(Agricultural Science)
ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3262

นายวิน เชยชมศรี ปร. ต. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร).
ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264

นางสาวดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์ศรี M. Sc. (Applied Nutrition).
ฝ่ายคั้นคว่ำและวิจัย สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2942-8629-35 ต่อ 906

นางสาวเยาวดี คุปตะพันธ์ M. Sc. (Applied Nutrition).
ฝ่ายคั้นคว่ำและวิจัย สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2942-8629-35 ต่อ 905

นางสุดาวรรณ เชยชมศรี Dr. Agr. Agronomy (Insect Virus Molecular Biology)
ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน
โทรศัพท์ 0-3435-1399, 0-3428-1092 ต่อ 460

บทคัดย่อ

ความรู้พื้นฐานจากงานวิจัยขององค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในเลือดจระเข้พันธุ์ไทยยังมีจำกัด ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในกลุ่มสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ จากส่วนเลือดครบ (whole blood) และส่วนน้ำเลือด (serum) ชนิดของกรดอะมิโนในเลือดครบ และการศึกษาวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้พันธุ์ไทยเพศผู้และเพศเมีย ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาโปรตีนโอมิกของซีรัมจระเข้ อัลบูมิน และ Ig G ถูกกำจัดออกจากซีรัมจระเข้ และโปรตีนที่เหลือถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแบบสองมิติ (2-Dimensional electrophoresis, 2DE) ผลจากการศึกษาด้วย 2DE พบ 90 จุดโปรตีน ในช่วง 20 – 200 kDa ที่ pI 3 – 10 (30 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นกรด (acidic) 45 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นกลาง (neutral) 15 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นเบส (basic)) จุดโปรตีนทั้งหมด 16 จุดโปรตีนถูกวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน ด้วยหลักการ MALDI-TOF/MS ผลการศึกษาเหล่านี้เป็นข้อมูลเอกลักษณ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทยในด้านโปรตีนโอมิกของซีรัมจระเข้พันธุ์ไทย ซึ่งจะมีประโยชน์ต่องานวิจัยต่อเนื่อง และการประยุกต์ใช้เลือดจระเข้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

Abstract

Basic research knowledge about chemical compositions in Siamese crocodile blood has been limited. Recently, the main chemical compositions including organic and inorganic substances from whole blood and serum, amino acids profile of whole blood and male/ female crocodile blood protein pattern were analysed. In this study, proteomic analysis of Siamese crocodile serum was performed. The albumin and immunoglobulin in serum were depleted and the remained proteins were separated by 2-Dimensional electrophoresis (2DE). There were 90 protein spots resolved by 2DE ranging from 20 – 200 kDa with an isoelectric point (pI) of 4 to 10. On the basis of the pI, 30 protein spots were categorized in acidic, forty protein spots in neutral and 15 protein spots in the basic region of 2DE gel image. Of all these spots, 16 brightly stained protein spots were determined by MALDI-TOF/MS analysis. These findings suggest the data of Siamese crocodile blood about the serum proteome. It will be useful as database for the continued researches and application of the crocodile blood in functional food development.

บทนำ

จระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการเพาะเลี้ยงกันมากในประเทศ ในระบบการเพาะเลี้ยงไม่มีการใช้ยาและวัคซีน ไม่มีการใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโต และยังมีรายงานการติดเชื้อโรคที่สำคัญในจระเข้ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย โรคแอนแทรกซ์ โรคควัวบ้า โรคไขหวัดนก ฯลฯ จระเข้เป็นสัตว์เลื้อยคลานดึกดำบรรพ์ที่อยู่รอดมาได้จนถึงปัจจุบัน การอยู่รอดของเผ่าพันธุ์ รวมถึงการปรับตัวของร่างกายจระเข้ที่แข็งแรง และพฤติกรรมจระเข้ในการรักษาบาดแผลที่ดีหลังการกัดกันเองแม้อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่สกปรกมีเชื้อโรคต่างๆ อยู่มากมาย แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบ คุณสมบัติ และความสามารถที่ดีของเลือดจระเข้ที่ไหลเวียนหล่อเลี้ยงร่างกาย ประเทศไทยมีการส่งออกเลือดจระเข้แห้งเพื่อใช้บริโภคเป็นยาสมุนไพรและเครื่องยาสัตว์วัตถุในตำรับยาจีนต่างๆ โดยมีตลาดที่สำคัญอยู่ที่ประเทศจีน เกาหลี ฮองกง และไต้หวัน จากรายงานการศึกษาวิจัยในเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (วิน และคณะ, 2546 ; Siruntawineti *et al.*, 2003, 2004a) จระเข้อเมริกัน (อัลลิเกเตอร์) และจระเข้ออสเตรเลีย (Merchant *et al.*, 2003, 2004) พบว่ามีโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพอยู่เป็นจำนวนมาก โดยการทำหน้าที่ส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากภูมิคุ้มกันของสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปที่มีมาตั้งแต่กำเนิดและช่วยป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัวได้

โดยทั่วไปในขั้นตอนการฆ่าและของอุตสาหกรรมจระเข้ มีการปล่อยเลือดทิ้งไปโดยเปล่าประโยชน์ ซึ่งจะเป็นมลพิษให้กับแหล่งน้ำได้ ดังนั้นเพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเลือดจระเข้พันธุ์ไทยที่น่าจะมีองค์ประกอบที่เป็นยา ประกอบกับที่ประเทศจีนนำสัตว์สมุนไพรคือจระเข้ เข้าไปใช้เป็นอาหารเสริม หรือเครื่องยาสัตว์วัตถุ เพื่อการรักษาโรคต่างๆ มานาน (ชยันต์ และวิเชียร, 2546) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดย วิน และคณะ ได้ประดิษฐ์กรรมวิธีการเจาะเก็บเลือดปริมาณมากจากจระเข้ (คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0601001179, 16 มิถุนายน 2549) ทำให้ได้วัตถุดิบเลือดจระเข้ที่สะอาด มีการศึกษาวิจัยวิธีการนำเลือดจระเข้ดังกล่าว มาทำให้แห้งภายใต้ความเย็นจัด (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5074, 4 กันยายน 2552) และเพื่อพัฒนาใช้เลือดจระเข้พันธุ์ไทยให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับคน ได้มีการทดสอบทางพิษวิทยาในระดับเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แคปซูล พบว่าผลิตภัณฑ์ฯ มีความปลอดภัยสูง รวมทั้งยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในร่างกายสัตว์ทดลองที่กินเลือดจระเข้ด้วย (Chaeychomsri *et al.*, 2004a, 2004b, 2006; Siruntawineti *et al.*, 2004b)

เมื่อได้เป็นผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แคปซูล ซึ่งเป็นผลผลิตจากงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีการประชาสัมพันธ์ผลิตภัณฑ์ฯ โดยความอนุเคราะห์จากฝ่ายประชาสัมพันธ์ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ไปยังสื่อสิ่งพิมพ์ สื่อวิทยุ และสื่อ

โทรทัศน์ ได้มีผู้บริโภคจำนวนมากให้ความสนใจแสดงความจำนงเพื่อขอบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าว และจากการสอบถามและเก็บข้อมูลก่อนและหลังการบริโภคผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้จากผู้บริโภคที่มีปัญหาสุขภาพกลุ่มต่างๆ พบผลสัมฤทธิ์ที่ดีของเลือดจระเข้แห่งในกลุ่มผู้บริโภคที่เป็นโรคสำคัญหลายโรค ทั้งในกลุ่มโรคไม่ติดเชื้อ (เช่น โรคโลหิตจาง โรคภูมิแพ้ที่มีอาการหอบเหนื่อย โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง/ต่ำ) และกลุ่มโรคติดเชื้อ (เช่น โรคเอดส์) ซึ่งการประเมินนี้ได้พิจารณาร่วมกับผลข้อมูลทางการแพทย์ของผู้บริโภคซึ่งเป็นผู้ป่วยมีอยู่และอนุญาตให้รับทราบ จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการบริโภคผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แคปซูล

จากผลงานวิจัยต่างๆ ในการใช้ประโยชน์จากเลือดจระเข้ดังกล่าว และข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากผู้บริโภคผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้ ทำให้เกิดโจทย์การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาและใช้ประโยชน์เลือดจระเข้เพิ่มมากขึ้น แต่การตอบโจทย์วิจัยเหล่านี้ยังไม่ชัดเจน เนื่องจากการขาดความรู้พื้นฐานจากงานวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในเลือดจระเข้พันธุ์ไทย รวมถึงส่วนต่างๆ ที่แยกจากเลือด ซึ่งไม่เคยมีการศึกษาอย่างจริงจังมาก่อน อีกทั้งจระเข้ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้เป็นจระเข้สายพันธุ์ไทย เราจึงเห็นความสำคัญในการศึกษาวิจัยฯ ก่อนที่นักวิจัยต่างชาติจะเข้ามาศึกษาและใช้ประโยชน์ ผลจากการศึกษาวิจัยนี้สามารถบ่งบอกเอกลักษณ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ โดยเฉพาะสารอินทรีย์ในกลุ่มของโปรตีนของเลือดจระเข้หรือจากส่วนแยกต่างๆ โครงการวิจัยนี้มีระยะเวลา 3 ปี รายงานการวิจัยนี้เป็นผลที่ได้ต่อเนื่องจากการศึกษาวิจัยของโครงการวิจัยฯ ในปี 1 โดยศึกษาส่วนที่เป็นโปรตีนและเพปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญ ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกลุ่มสารอินทรีย์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย โดยคาดว่าผลจากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์นำไปสู่การศึกษาขั้นสูง การประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ จากเลือดจระเข้ ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนเชื่อมโยงกับโครงการวิจัยย่อยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกันเลือดจระเข้ของแผนการวิจัยนี้

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เลือดมีหน้าที่หลายอย่าง ได้แก่ 1) การนำส่งออกซิเจน สารอาหาร และของเสีย 2) การควบคุม pH อุณหภูมิ และออสโมซิส (osmosis) 3) การแข็งตัวของเลือด และ 4) กระบวนการต่างๆ ของภูมิคุ้มกันร่างกาย โปรตีนจำนวนมากที่พบอยู่ในเลือดมีบทบาทสำคัญในหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าว โปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในเลือดรวมถึง โปรตีนที่มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ เป็นผลมาจากการหลั่งสารออกนอกเซลล์ หรือการตายของเซลล์ เลือดประกอบด้วยสองส่วนที่สำคัญคือ น้ำเลือด (plasma/serum) และเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ (blood cells) ซึ่งทั้งสองแตกต่างกันด้วยคุณสมบัติทางเทคนิค และองค์ประกอบทางเคมี การใช้ประโยชน์จากเลือดนั้นพบว่า มนุษย์ใช้เลือดสุกรมากที่สุด โดยจากรายงานการศึกษาในเลือดสุกรซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในกระบวนการเนื้อต่างๆ พบว่าในน้ำเลือดมี

โปรตีนน้อยและมีน้ำมากกว่าในส่วนของเซลล์เม็ดเลือด แต่โปรตีนที่พบในน้ำเลือดส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย (Petczyn'ska and Libelt, 1999) ในเลือดครบของลูกวัวมีโปรตีนมากและน้ำน้อยกว่าในวัวที่โตเต็มที่ ในน้ำเลือดลูกวัวประกอบด้วยน้ำมากกว่าในวัว แต่มีปริมาณโปรตีนที่ไม่แตกต่างกัน ในเม็ดเลือดแดงของลูกวัวมีโปรตีนน้อยและน้ำมากกว่า ถ้าไม่คำนึงถึงอายุในส่วนน้ำเลือดวัวมีโปรตีนน้อยกว่าเป็น 4 เท่า และมีน้ำมากกว่าประมาณ 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับส่วนของเม็ดเลือดแดง โปรตีนที่พบในน้ำเลือดของทั้งสองประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกายสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำเลือดของลูกวัวและวัวจึงเป็นสารเสริมที่ดีของผลิตภัณฑ์เนื้อ (Betkot, 2001) ในเลือดครบของไก่มีโปรตีนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับในสุกร หรือลูกวัว แต่ไม่แตกต่างกับในวัว โดยในน้ำเลือดไก่มีโปรตีนน้อยและมีน้ำมากกว่าในสัตว์ดังกล่าว ในส่วนของเม็ดเลือดแดงของไก่และสุกรมีโปรตีนไม่แตกต่างกัน โดยมีโปรตีนและไขมันมากกว่าน้ำน้อยกว่าในลูกวัวและวัว ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในน้ำเลือดไก่ใกล้เคียงกับในวัว แต่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับในสุกร ในเม็ดเลือดแดงของไก่มีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงที่สุด คุณค่าทางโภชนาการของน้ำเลือดไก่มีค่าสูงใกล้เคียงกับในวัว และมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับในสุกร (Betkot & Petczynska Libelt, 2002)

การศึกษา น้ำเลือด (ซีรัม) ของอัลลิเกเตอร์ (*Alligator mississippiensis*) ซึ่งเป็นจระเข้ที่พบได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 16 ชนิด ได้แก่ *Klebsiella oxytoca* (49131), *Providencia stuartii* (33672), *Escherichia coliform* (25922), *Proteus mirabilis* (43607), *Enterobacter aerogenes* (49469), *Salmonella typhimurium* (14028), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Citrobacter freundii* (C109820), *Shigella sonnei* (25931), *Shigella dysenterae* (13313), *Salmonella poona* (4840), *Yersenia enterocolitica* (9610), *Staphylococcus pyrogenes* (19615), *Streptococcus epidermitis* (19615), *Staphylococcus aureus* (6538), and *Enterococcus faecalis* (29212) แต่เมื่อนำน้ำเลือดของอัลลิเกเตอร์มาบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่าน้ำเลือดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ และสารโปรตีนบางชนิดที่มีชื่อว่า คอมพลีเมนต์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่เกิด สามารถถูกทำลายที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เวลานาน 30 นาที และจากผลการทดสอบทางภูมิคุ้มกันโดยใช้แอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ของคน จึงสรุปผลได้ว่าคอมพลีเมนต์ในน้ำเลือดของอัลลิเกเตอร์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ และพบว่าน้ำเลือดของอัลลิเกเตอร์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำเลือดของมนุษย์ โดยที่น้ำเลือดของอัลลิเกเตอร์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 100% ในขณะที่น้ำเลือดของมนุษย์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เพียง 35% (Merchant et al., 2003)

การออกฤทธิ์ต้านจุลชีพที่พบในเลือดจระเข้หลายๆ ชนิดพันธุ์ เช่น ในปี ค. ศ. 1999 Shaharbanay และคณะ ได้รายงานผลการศึกษาศาสตร์จากเลือดจระเข้แม่น้ำไนล์ (Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*) มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ชนิดต่างๆ และจากรายงานการศึกษาจำนวนมากทางห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่า ซีรัมของอัลลิเกเตอร์ (*Alligator mississippiensis*) ซึ่งเป็นจระเข้ที่มีถิ่นกำเนิดและพบมากในประเทศอเมริกา แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Merchant *et al.*, 2003, 2005b) ฤทธิ์ต้านโพรโทซัว (Merchant *et al.*, 2004) และฤทธิ์ต้านไวรัส (Merchant *et al.*, 2005a) เช่นเดียวกับที่มีรายงานฤทธิ์ต้านจุลชีพในซีรัมของจระเข้พันธุ์ไทย (*C. siamensis*) (Siruntawineti *et al.*, 2004) และโคแมน (*Caiman latirostris*) ซึ่งเป็นจระเข้ที่มีถิ่นกำเนิดและพบมากในประเทศแถบแอฟริกา (Merchant *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า ในซีรัมของอัลลิเกเตอร์มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งสามารถลดอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียนี้ได้เป็น 10 เท่า และมีขอบเขตของการออกฤทธิ์ที่มากกว่าในแบคทีเรีย เมื่อเทียบกับซีรัมของคน ฤทธิ์เหล่านี้จะลดลงเมื่อมีการบ่มซีรัมด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease) ก่อนการทดสอบ แสดงให้เห็นว่าลักษณะการทำงานของสารจำพวกโปรตีน และเมื่อทำการบ่มซีรัมที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ในการทำลายฤทธิ์การทำงานของคอมพลีเมนต์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด สามารถทำลายฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบได้เช่นกัน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของซีรัมอัลลิเกเตอร์เกิดขึ้นได้รวดเร็วในหลอดทดลอง ภายในเวลา 5 นาที และมีฤทธิ์สูงสุดที่เวลา 20 นาที และมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ ซึ่งการแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีน้อยลงเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และแสดงสมมุติฐานถึงคุณสมบัติของซีรัมอัลลิเกเตอร์ในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย น่าจะเกิดจากการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ (Merchant *et al.*, 2003) ซึ่งรายงานนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยในซีรัมของจระเข้พันธุ์ไทย (วิน และคณะ, 2546 ; Siruntawineti *et al.*, 2003, 2004)

ในปี ค.ศ. 2010 Leelawongtawon *et al.* ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากเลือดจระเข้พันธุ์ไทย ทดสอบความไว และหาค่า MIC ของเลือดแห้ง ซีรัมสด และซีรัมแห้ง จากจระเข้ กับแบคทีเรียและเชื้อราสายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 9 สายพันธุ์ และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ รวมทั้งเชื้อราที่แยกได้จากผู้ป่วย 1 สายพันธุ์ ด้วยวิธี broth microdilution และ resazurin microtiter plate assay พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. typhimurium* ATCC 13311 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ในซีรัมสด 80 mg/ml (Fresh serum; FS) คิดเป็นร้อยละ 23.30, 10.00, 40.00, 70.00 และ 86.67 ตามลำดับ และซีรัมแห้ง 100 mg/ml (Freeze dried serum; FDS) คิดเป็นร้อยละ 30.00, 10.00, 43.33, 76.67 และ 90.00 ตามลำดับ โดย MIC/ MBC อยู่ระหว่าง 12.50-100.00 mg/ml และ 25.00-100.00 mg/ml

ตามลำดับ โดยมี cefazolin หรือ ceftaxidime เป็นสารควบคุม ซึ่งให้ค่า MIC/MBC ต่อแบคทีเรีย ทั้ง 5 สายพันธุ์ระหว่าง 0.97-31.25 mg/ml/1.95-62.50 mg/ml และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ รา เช่น *C. neoformans* ATCC 250309 และ *A. niger* ของ FS คิดเป็นร้อยละ 90.00 และ 80.00 ตามลำดับ และ FDS คิดเป็นร้อยละ 100.00 และ 83.33 ตามลำดับ โดย MIC อยู่ระหว่าง 25.00-100.00 mg/ml โดยมี amphotericin B เป็นสารควบคุมซึ่งให้ค่า MIC 3.90 -7.81 mg/ml แต่อย่างไรก็ตามไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในเลือดครบแห่ง 100 mg/ml (freeze dried whole blood; FDWB) และไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและฤทธิ์ฆ่าเชื้อราทั้งใน FS และ FDS รายงานนี้แสดงให้เห็นว่า FS และ FDS มีศักยภาพในการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดได้ (Leelawongtawon *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในพลาสมาของจระเข้พันธุ์ไทยต่อเชื้อก่อโรคจำนวน 6 สายพันธุ์ของเชื้ออ้างอิง ซึ่งสามารถยับยั้งการเติบโต 40% ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus epidermidis*, และจาก 4 สายพันธุ์ของเชื้อที่แยกจากตัวอย่างทางคลินิก ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, และ *Vibrio cholerae* และสามารถยับยั้งการเติบโตมากกว่า 80% จากสายพันธุ์อ้างอิงคือ *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, และ *Staphylococcus epidermidis* และจากตัวอย่างทางคลินิกคือ *Salmonella typhi* และ *Vibrio cholerae* (Kommanee *et al.*, 2012).

การศึกษาซีรัมจากจระเข้หลายสายพันธุ์พบฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิด ซึ่งมีการสมมุติฐานว่าเป็นผลมาจากฤทธิ์ของคอมพลิเมนต์ในซีรัม เนื่องจากคอมพลิเมนต์มีหลายบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่ซีรัมของจระเข้ จะสามารถกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของมาโครฟาจ ซึ่งต่อมา Aree *et al.* (2012) ได้แสดงให้เห็นฤทธิ์ของเลือดจระเข้ ในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการกลืนกิน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดโรค ในกรณีที่ต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน โดยได้ทดสอบฤทธิ์ของซีรัมจากจระเข้พันธุ์ไทยในการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการกลืนกินของมาโครฟาจ ตลอดจนถึงศึกษาความเกี่ยวข้องของคอมพลิเมนต์ในกระบวนการนี้ พบว่าซีรัมจากจระเข้ (fresh serum, FS) สามารถทำให้มาโครฟาจเพิ่มประสิทธิภาพ การกลืนกินแบคทีเรียทั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกิน *E. coli* ได้ดีกว่า *S. aureus* นอกจากนี้ตัวอย่างเลือดจระเข้ประเภทอื่นๆ ได้แก่ freeze dried serum (DS) และ freeze dried whole blood (DWB) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของมาโครฟาจได้เช่นกัน แต่ฤทธิ์ของ DWB ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของมาโครฟาจน้อยกว่าฤทธิ์ของ FS และ DS ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ดังกล่าวเป็นผลจากสารที่มีอยู่ในซีรัม โดยเมื่อให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับ

ซีรัม พบว่าฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินลดลงอย่างมาก ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าคอมพลิเมนต์มีบทบาทในกระบวนการนี้

ฤทธิ์ต้านโพโรโทซัว *Naegleria gruberi* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ของ 25% ซีรัมอัลลิเกเตอร์ และถ้าใช้ซีรัมที่ไม่ได้เจือจาง โพโรโทซัวสามารถรอดชีวิตได้เพียง 16% และพบมีอัตราการรอดที่สูงหากโพโรโทซัวมีความหนาแน่นสูง ฤทธิ์ต้านโพโรโทซัวมีขอบเขตของการออกฤทธิ์ที่กว้างโดยสามารถออกฤทธิ์ต่อ *Naegleria* 3 สายพันธุ์ และ *Acanthamoeba* 4 สายพันธุ์ ซึ่งโพโรโทซัวเหล่านี้มีรายงานการต้านต่อฤทธิ์ทำลายเซลล์ของคอมพลิเมนต์ของคน ฤทธิ์ต้านโพโรโทซัวนี้เกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิ 15 - 30 องศาเซลเซียส สามารถทำลายการออกฤทธิ์ด้วยความร้อนและมีคุณสมบัติเป็นสารโปรตีน ถูกยับยั้งการทำงานด้วยกรดอีทิลีนไดเอมีนที่ทราอซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ซึ่งทำให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ต้องการไอออนโลหะไดวาเลนต์ในการเกิดปฏิกิริยา และมีสมมุติฐานว่าคุณสมบัติของการออกฤทธิ์ต้านโพโรโทซัวของซีรัมอัลลิเกเตอร์น่าจะเกิดจากการทำงานของระบบคอมพลิเมนต์เช่นกัน (Merchant *et al.*, 2004)

นอกจากนี้ยังพบการออกฤทธิ์ต้านไวรัสในซีรัมอัลลิเกเตอร์ โดยการทดสอบในระดับเซลล์ของไวรัส 3 ชนิดที่มีส่วนห่อหุ้ม (enveloped virus) ได้แก่ Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-I), West Nile virus (WNV) และ Herpes simplex virus type I (HSV-I) โดยมีความเข้มข้นในการยับยั้งไวรัสได้ 50% (IC50) ที่ความเข้มข้นของซีรัมเป็น 0.9%, 4.3% และ 3.4% ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของซีรัมในการลดการรอดชีวิตลง 50% (TC50) ต่อไวรัส HIV-I, WNV และ HSV-I เป็น 32.8%, 36.3% และ 39.1% ตามลำดับ การออกฤทธิ์ต้านไวรัส HIV-I ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน ซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของคอมพลิเมนต์ ในขณะที่การออกฤทธิ์ต้านไวรัส WNV และ HSV-I ทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนแสดงให้เห็นถึงกลไกในการออกฤทธิ์ต้านไวรัสแบบอื่นๆ ในซีรัมของอัลลิเกเตอร์ (Merchant *et al.*, 2005a) ผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าอัลลิเกเตอร์ ซึ่งเป็นสัตว์ดึกดำบรรพ์พวกเดียวกับจระเข้มีภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติที่มีมาแต่กำเนิดที่มีศักยภาพสูงในการทำลายไวรัสต่างๆ การออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ปรสิตรวมถึงไวรัส HIV-I ของอัลลิเกเตอร์มาจากการทำงานของระบบคอมพลิเมนต์ในซีรัมที่มีวิวัฒนาการมาอย่างยาวนาน

การศึกษาชั้นลึกในส่วนที่เกี่ยวข้องกับคอมพลิเมนต์ของซีรัมอัลลิเกเตอร์พบว่าการทำงานหลักน่าจะเกิดจาก alternate pathway และเมื่อทดสอบซีรัมอัลลิเกเตอร์ด้วยแอนติบอดีต่อ C3 ของคนพบการแสดงความเป็นแอนติเจนของโปรตีนที่คล้ายกับ C3 ของคน และเมื่อทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis พบว่าซีรัมโปรตีนของอัลลิเกเตอร์มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ C3 ชนิดอัลฟาและบีตาของคน ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของแกะแตกได้ในเวลาที่รวดเร็ว และมีเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิ 15 - 30 องศาเซลเซียส ผลของการวิจัยนี้สนับสนุนสมมุติฐานการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของซีรัมอัลลิเกเตอร์เกี่ยวข้องกับการทำงานของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ที่อาศัยสารน้ำ (humoral immune response) คล้ายกับที่เกิดขึ้นในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Merchant *et al.*, 2005b) ซึ่งต้องการไอออนโลหะไอวาเลนต์คือ Ca^{2+} และ/หรือ Mg^{2+} ในทำปฏิกิริยาให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงแก่ (Merchant *et al.*, 2005c) จระเข้ น้ำจืดออสเตรเลีย (*C. johnstoni*) และจระเข้ น้ำเค็ม (*C. porosus*) มีการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์แบบ alternate pathway เช่นเดียวกับในอัลลิเกเตอร์

เพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) ถูกสกัดจากเม็ดเลือดขาวของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตต่างๆ (Yeaman and Yount, 2003) โดยทั่วไปธรรมชาติของเพปไทด์ต้านจุลชีพมีความเป็นประจุบวกเพื่อที่จะสามารถเกิดอันตรกิริยากับฟอสโฟลิปิดที่มีประจุลบได้ เพปไทด์นี้อาจมีลักษณะเป็น amphipathic ทำให้มันสามารถเกิดอันตรกิริยากับส่วนใน (interior hydrophobic portions) ของเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อตัวเป็นรูต่างๆ ที่เยื่อได้ การแสดงออกของเพปไทด์เหล่านี้เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อที่มีอันตรกิริยากับสิ่งแวดล้อม เช่น ปาก เยื่ออุ้งฉี่ ท่อทางเดินของอวัยวะสืบพันธุ์ และในเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดขาวสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้หลายชนิดที่มีขอบเขตศักยภาพในการต่อต้านที่สูง ได้แก่ nitrous oxide, hydrogen peroxide และ cationic antimicrobial peptides (Ganz and Lehrer, 2001) คุณสมบัติในการต้านจุลชีพของเม็ดเลือดขาวมีบทบาทที่สำคัญสำหรับภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดต่อการติดเชื้อที่เกิดภายนอกในระบบไหลเวียนเลือด เม็ดเลือดขาวต่างๆ จะเคลื่อนย้ายตัวเองไปยังบริเวณที่มีการติดเชื้อ เกิดการแตกของแกรนูโลเพื่อปล่อยสารต่อต้านจุลชีพที่ได้กล่าวข้างต้น ไปยังที่ที่มีการรุกรานจากเชื้อโรคในลักษณะแบบไม่จำเพาะ มีรายงานการพบเพปไทด์ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพในผิวหนัง (Lorin *et al.*, 2005) เม็ดเลือดขาวของคน (Garcia *et al.*, 2001) และ เม็ดเลือดขาวของแพะ/แกะ (Shamova *et al.*, 1999)

ในปี ค. ศ. 2006 Merchant *et al.* ได้รายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากเม็ดเลือดขาวของอัลลิเกเตอร์ () มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ซึ่งฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ เหล่านี้เกิดจากเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความเป็นประจุบวก (cationic antimicrobial peptides) การศึกษานี้แยกเม็ดเลือดขาวออกจากเลือดครบของอัลลิเกเตอร์ป่า สกัดเม็ดเลือดขาวด้วยสารที่กรดความเข้มข้นต่างๆ ผ่านขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงและกรองที่มีความละเอียดสูงมาก จนได้สารที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 1-10 kDa ฤทธิ์ต้านจุลชีพเหล่านี้มีคุณสมบัติไวต่อโปรติเอส ทนต่อความร้อน และละลายได้ในสารละลายกรด สาร EDTA ความเข้มข้นสูงไม่มีผลการเกิดปฏิกิริยา การแสดงออกของเพปไทด์ต่างๆ ที่ได้จากเม็ดเลือดขาวของอัลลิเกเตอร์นี้มีความสำคัญต่อการนำไปใช้เป็นสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ทางคลินิกต่อไป สำหรับจระเข้พันธุ์ไทยได้มีรายงานการศึกษา (สุวิทย์ และ สมปอง, 2550) ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดเม็ดเลือดขาว โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด และเชื้อรา 1 ชนิด คือ *Candida albican* เมื่อแยกบริสุทธิ์สารสกัดด้วยเทคนิค FPLC โดย Anion exchange column chromatography และนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค High

performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้พันธุ์ไทยน่าจะ มีโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการทำละลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา ได้อย่างจำเพาะ

โปรตีโอมิกส์ (Proteomics) เป็นการวิจัยสาขาหนึ่งที่มีขึ้นเพื่ออธิบายปรากฏการณ์ทางชีวภาพในแง่ของการเปลี่ยนแปลงต่างๆ เชิงคุณภาพ และ/หรือเชิงปริมาณ ในเซลล์ชนิดต่างๆ และ วัสดุทางชีวภาพที่อยู่ภายนอกเซลล์ การพัฒนาศาสตร์ทางด้านโปรตีโอมิกส์มีเพิ่มมากขึ้นจากเทคนิคในการขนส่งโปรตีนหรือเปปไทด์เข้าไปในสภาวะของแก๊ส (gas-phase) หรือเข้าไปในสิ่งแวดล้อมที่ปราศจากตัวทำละลาย (solvent-free environment) ไม่มีการแตกหักของโปรตีน หรือเปปไทด์ ผนวกกับเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry, MS) ทำให้เกิดการตรวจวัดที่แม่นยำของ น้ำหนักโปรตีน หรือเปปไทด์ และคุณสมบัติในการลำดับการเรียงตัวที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ (MS/MS) การตรวจหาเครื่องหมายทางชีวภาพ (biomarker) ในสารน้ำของร่างกายมีประโยชน์ในการ บ่งบอกถึงสภาวะของสิ่งมีชีวิต การเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายทั้งในสภาวะปกติและสภาวะที่ผิดปกติ ต่างๆ ซีรัมและน้ำไขสันหลังเป็นสารน้ำที่สำคัญในร่างกายของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ประกอบด้วย อัลบูมิน (albumin) และแอนติบอดี (antibodies) ประมาณ 90% ของโปรตีนรวมในซีรัม และ น้ำไขสันหลัง (Dekker, 2007) การเก็บตัวอย่างเลือดมีความง่ายต่อการเก็บและทางจิตวิทยาเมื่อ เทียบกับตัวอย่างอื่นๆ เช่น อุจจาระ ตัวอย่างจากเลือดมีความเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่า เมื่อเทียบกับ น้ำลาย หรือน้ำปัสสาวะ เลือดจึงเป็นแหล่งของตัวอย่างทางชีวภาพที่นิยมนำมาศึกษาทางด้านโปรตี โอมิกส์ การศึกษาชนิดของโปรตีนในเลือดเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะโปรตีน หรือเปปไทด์บ่งชี้ ที่เป็น Biomarker (Ward and Anderson, 1996) โดยปกติโปรตีนหรือเปปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญมักมี ขนาดน้อยกว่า 15,000 Da ในการศึกษาด้านโปรตีโอมิกส์ (Proteomic analysis) (Tirumalai *et al.*, 2003) โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเหล่านี้จะถูกนำมาทำการศึกษาด้วยวิธีการ Two-dimensional gel electrophoresis ควบคู่กันกับการใช้ MS ในการช่วยในการวิเคราะห์ระบุชนิด ของโปรตีนโมเลกุลต่ำเหล่านั้น (Kantor, 2002)

จากการสืบค้นข้อมูลสิทธิบัตรพบสิทธิบัตรเรื่องการใส่เปปไทด์จากสัตว์เลื้อยคลานเพื่อ การรักษาโรคติดเชื้อ (Hoffman and Binah: United States Patent 5380664/ International Patent WO9917785, 1999) ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากส่วนของฮีโมโกลบินจากเม็ดเลือดแดงของ สัตว์เลื้อยคลาน โดยเฉพาะในอัลลิเกเตอร์ ฮีโมโกลบิน ประกอบด้วย 4 สายของพอลิเปปไทด์ และ 4 heme prosthetic group ซึ่งมีธาตุเหล็กในสถานะ ferrous เป็นองค์ประกอบอยู่ใน โปรตีน กลอบิน (globin) 2 สาย ฮีโมโกลบินของสัตว์เลื้อยคลานพวกเต่า (Chelonia) จระเข้ (Crocodilia) และงู (Squamata) มีโครงสร้างที่จำเพาะ ฮีโมโกลบินของจระเข้และอัลลิเกเตอร์มีความพิเศษในการ ไม่ตอบสนองต่อสารอินทรีย์ฟอสเฟต แต่มีการควบคุมการทำงานหลักโดยไบคาร์บอเนตไอออน

(bicarbonate ion) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกับออกซิเจนลดลง สิทธิบัตรนี้เกี่ยวข้องกับวิธีฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราด้วยฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ได้จาก reptilian hemoglobin protein, ชิ้นส่วนของฮีโมโกลบินโปรตีนหรือเพปไทด์ สายของฮีโมโกลบินที่ปราศจากฮีม (heme free hemoglobin chains) หรือชิ้นส่วนของโปรตีนหรือเพปไทด์ผสมของสารดังกล่าว

สิทธิบัตรฤทธิ์ต้านเนื้องอกจากซีรัมของสัตว์เลื้อยคลาน (Binah *et al.*: United States Patent 20040247589, 2004) เป็นการใช้อยุทธศาสตร์จากฤทธิ์ต้านเนื้องอกในซีรัมของสัตว์เลื้อยคลาน โดยเฉพาะในอัลลิเกเตอร์หรือจระเข้ องค์ประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ในโปรตีนหรือเพปไทด์ของซีรัมที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์เนื้องอกจากสัตว์เลื้อยคลานด้วยน้ำนมที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ที่ปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ส่วนแยกที่มีฤทธิ์จากซีรัมไม่แสดงความเป็นพิษในสัตว์เลื้อยคลานด้วยน้ำนมที่สุขภาพดี สารออกฤทธิ์ต้านเนื้องอกนี้อาจใช้ในการป้องกัน การเฝ้าสังเกต และการบำบัดรักษาเนื้องอกหรือมะเร็ง

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากปีที่ 1 ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยแผนงานสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อแก้ปัญหาสำคัญของชาติอย่างสมดุลและยั่งยืน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ซึ่งดำเนินการต่อในข้อ 3.2 การทดลองที่ 2

1. การกำหนดพื้นที่ ประชากรตัวอย่าง การสุ่มตัวอย่าง การเก็บข้อมูล

กำหนดพื้นที่แยกตามการเพาะเลี้ยงจากภาคต่างๆ ของไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยใช้ตัวอย่างจระเข้พันธุ์ไทย (*C. siamensis*) อายุ 2-4 ปี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะนำมาฆ่าและที่หน่วยงานเอกชนที่เพาะเลี้ยงจระเข้ ณ รุ่งทวีชัยฟาร์ม 31 หมู่ 9 ต.สามง่าม อ.ดอนตูม จ. นครปฐม

เก็บข้อมูลจระเข้ที่สำคัญ ได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนัก ความยาวจากจมูกถึงหาง และข้อมูลการเลี้ยงจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจระเข้

2. ตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ใช้ในการวิจัย

2.1 การเจาะเก็บเลือดจระเข้

ทำการเจาะเลือดจระเข้ที่บริเวณแอ่งเลือดดำ หลังกระดูกศรีษะ (anterior dorsal sinus) โดยใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาด 18G ความยาว 1 ½ นิ้ว ปริมาณการเจาะเก็บเลือดจระเข้ขึ้นอยู่กับการศึกษาดังกล่าวต่อไป ดังนี้

2.2 การเตรียมตัวอย่าง

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้และส่วนต่าง ๆ

ได้แก่ เลือดครบจระเข้ (Whole blood) ส่วนซีรัม (น้ำเลือด) จระเข้ ที่ผ่านการทำ Freeze dry จากจระเข้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยการเจาะเลือดจระเข้ในแต่ละภาคจำนวน 60 ตัว (เพศผู้ 30 ตัว เพศเมีย 30 ตัว) ปริมาณ 110 มิลลิลิตร ต่อตัว

2.2.1.1 เลือดครบจระเข้ ทำการรวมเลือดครบจากเลือดจระเข้ 50 มิลลิลิตร ต่อตัว จระเข้ ใส่ลงในขวดเก็บเลือด ผสมเลือดให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน นำมาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นนำมาผ่านการทำการระเหิดแห้งภายใต้ความเย็น (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA) ณ ห้องหุ่นส่วนจำกัด วานิชไทย ห้อง 602 ชั้น 6 อาคารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แล้วเก็บรักษาสภาพเลือดครบจระเข้แห้งที่ได้ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4-5^{\circ}\text{C}$ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.1.2 ซีรัมจระเข้ นำตัวอย่างเลือดจระเข้ 54 มิลลิลิตร ต่อตัว ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีตัวเร่งการแข็งตัว (Serum clot Activator) (VACUETTE, greiner bio-one, บริษัทกรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด) หลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอดต่อตัว ผสมเลือดในแต่ละหลอดให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม และเม็ดเลือดออกจากกัน โดยใช้ความเร็วของการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนซีรัมด้านบนรวมใส่ในขวดเก็บเลือด นำมาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นนำมาผ่านการ Freeze dry เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวข้างต้น แล้วเก็บรักษาซีรัมแห้งที่ได้ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4-5^{\circ}\text{C}$ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย

ได้แก่ เลือดครบจระเข้ ซีรัมจระเข้ และส่วนเม็ดเลือด (Blood cell fraction) ที่ไม่ผ่านกระบวนการระเหิดแห้งภายใต้ความเย็นจัด (Freeze dry) และที่ผ่านการทำ Freeze dry จากจระเข้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยการเจาะเลือดจระเข้ในแต่ละภาคจำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ต่อตัว

2.2.2.1 เลือดครบจระเข้ นำเลือดจระเข้ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microtube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นนำ microtube หนึ่งหลอดมาผ่านการทำการระเหิดแห้งภายใต้ความเย็น (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA) แล้วเก็บรักษาสภาพเลือดครบจระเข้แห้งที่ได้ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4-5^{\circ}\text{C}$ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.1.2 ซีรัมจระเข้ นำตัวอย่างเลือดจระเข้ ปริมาณ 18 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีตัวเร่งการแข็งตัว (Serum clot Activator) (VACUETTE, greiner bio-one, บริษัทกรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด) จำนวน 2 หลอด หลอดละ 9 มิลลิลิตร ผสมเลือดในแต่ละหลอดให้เข้ากัน แล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม และเม็ดเลือดออกจากกัน โดยใช้ความเร็วของการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนซีรัมด้านบนใส่ใน microtube หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำมาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำ microtube จำนวนครึ่งหนึ่ง มาผ่านการ Freeze dry เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวข้างต้น แล้วเก็บรักษาซีรัมแห้งที่ได้ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.1.3 ส่วนเม็ดเลือด (Blood cell fraction) ล้างส่วนของเม็ดเลือดที่เหลือจากการแยกซีรัมในข้อ 2.2.1.2 ออกด้วยสารละลาย normal saline (0.75% NaCl) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำหลอดทดลองที่ผ่านการล้างดังกล่าวแล้วมาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C

3. วิธีวิเคราะห์

3.1 การทดลองที่ 1: การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้และส่วนต่าง ๆ โดยวิธีมาตรฐาน ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด กรุงเทพฯ (สำหรับการทดสอบหาชนิดของกรดอะมิโนในเลือดครบของจระเข้)

3.1.1 สารอินทรีย์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด น้ำตาล โปรตีน (แพคเตอร์ 6.25) ไขมันทั้งหมด ไขมันอิ่มตัว โคเลสเตอรอล (โดยใช้วิธีทดสอบตามหลักการของ Thai Compendium of methods for food analysis, 1st ed. 2003) (ตารางที่ 1) และการทดสอบหาชนิดของกรดอะมิโนในเลือดครบของจระเข้ โดยใช้วิธี Gas Chromatography/ HPLC (In house method based on AOAC (2005), 994.12)

3.1.2 สารอนินทรีย์ ได้แก่ น้ำ เถ้า โซเดียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส คลอไรด์ แคลเซียม แมกนีเซียม วิตามินเอ วิตามินบี1, บี6, บี12 วิตามินซี (โดยใช้วิธีทดสอบตามหลักการของ Thai Compendium of methods for food analysis, 1st ed. 2003) โลหะหนัก (เหล็ก ตะกั่ว สารหนู) และสารต้านอนุมูลอิสระ (BHA BHT TBHQ) (โดยใช้วิธีทดสอบตามหลักการของ T-CM-037 Based on Food Chemistry, 2000)

3.2 การทดลองที่ 2: การศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (ปีที่ 1 - 3)

โดยใช้การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคทางชีวเคมี และวิธีทางโปรตีโอมิกส์ในการระบุชนิดของโปรตีนและเพปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญและแสดงออกในเลือดจระเข้พันธุ์ไทย โดยเทคนิค 2-Dimensional electrophoresis และตรวจหาชนิดของโปรตีนในเลือดจระเข้ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS หรือ LC MS/MS

การวิจัยในปีที่ 1 เป็นการศึกษารูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้พันธุ์ไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับการต่อยอดในการศึกษาวิจัยปีที่ 2-3 เกี่ยวกับโปรตีนและเพปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย

การวิจัยในปีที่ 2 - 3 เป็นการศึกษาโปรตีนและเพปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (ปีที่ 2 ตัวอย่างจากส่วนของซีรัม และปีที่ 3 ตัวอย่างจากส่วนของเม็ดเลือด)

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.2.1.1 เลือดจระเข้

-นำตัวอย่างเลือดจระเข้ (WB) และเลือดจระเข้แห้ง (WB-FD) ที่ได้จากข้อ 2.2.1.1 มาตั้งทิ้งไว้ในกล่องน้ำแข็ง

-ละลายตัวอย่าง WB-FD ด้วยด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ (sterile double distilled water) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

-ทำการสกัดโปรตีนโดยใช้สารละลายสกัด (Extraction solution) ที่มีองค์ประกอบของ 2% (w/v) SDS, 0.1 M DTT, 60 mM Tris-HCl, pH 7.5

-ทำให้การโฮโมจิไนซ์ (Homogenization) ตัวอย่างทั้งสองแบบ ด้วยเครื่อง Homogenizer (Omni,) ที่ความเร็วต่ำ เป็นเวลา 30 วินาที

-ภายหลังจากการโฮโมจิไนซ์ นำตัวอย่างที่ได้ ไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการโฮโมจิไนซ์ครั้งที่สอง ขณะตัวอย่างอุ่น ที่ความเร็วต่ำ เป็นเวลา 15 วินาที

-นำตัวอย่าง-WB และ WB-FD มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (MIKRO22, Hettich, Germany) ที่ความเร็ว 20,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนมาใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2.1.2 ซีรัมจระเข้

-นำตัวอย่างซีรัมจระเข้ (S) และซีรัมจระเข้แห้ง (S-FD) ที่ได้จากข้อ 2.2.1.2 มาตั้งทิ้งไว้ในกล่องน้ำแข็ง

-ละลายตัวอย่าง-S-FD ด้วยด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ (sterile double distilled water) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

-ผสมตัวอย่าง S ให้เข้ากัน และนำตัวอย่าง-S และ S-FD มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (MIKRO22, Hettich, Germany) ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนมาใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2.1.3 ส่วนเม็ดเลือดกระเซ้

-นำตัวอย่างส่วนเม็ดเลือดกระเซ้ (BC) มา 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอด microtube เติมสารละลายสกัด (Extraction solution) เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้น Homogenization 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 ดูดของเหลวส่วนบนจากตัวอย่างที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยงมาใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2.2 การหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างจากข้อ 3.2.1

ตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, USA) เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานมาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Lamda 25 UV/ VIS Spectrometer, Perkin Elmer, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง

3.2.3 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนเพื่อการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้า

จากข้อ 3.2.2 เมื่อทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการศึกษาแล้ว นำโปรตีนตัวอย่างของสัตว์ (ปริมาณของโปรตีน 20 ไมโครกรัม) และโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio-Rad Laboratories, USA) มาเจือจางด้วย SDS non-reducing sample buffer หรือ SDS reducing sample buffer ซึ่งมีเมอร์แคปโทเอทานอล (mercaptoethanol) เป็นสารรีดิวซ์ เพื่อให้โปรตีนอยู่ในสถานะที่ไม่มีสารรีดิวซ์ และในสถานะที่มีสารรีดิวซ์ตามลำดับ โดยใช้ปริมาตรเป็นครึ่งหนึ่งจากปริมาตรของโปรตีนตัวอย่างของสัตว์ และโปรตีนมาตรฐาน ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ นำตัวอย่างโปรตีนที่มีส่วนผสมของ SDS reducing sample buffer มาตามในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3.2.4 การเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้าโดยใช้เจลเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ (SDS-PAGE)

โดยใช้ความเข้มข้นของเจลส่วนแยก (separating gel) ที่ 10% และเจลส่วนบน (stacking gel) ที่ 4.5% โดยใช้ชุดแผ่นแก้ว และchamber (miniPAGE Chamber AE-6530, ATTO Corporation, Japan) ทำให้เกิดการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้า โดยใช้เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

(electrophoresis power supply: EPS 301, Amersham Bioscience, Sweden) ปรับกระแสไฟฟ้าให้คงที่ที่ 40 มิลลิแอมแปร์ (ต่อสองชุดของชุดแผ่นแก้ว) ความต่างศักย์ 250 โวลต์

3.2.5 การย้อมสีเจลและการตรวจวิเคราะห์แถบโปรตีน

ย้อมสีเจลที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยสี Coomassie Brilliant Blue (CBB) ประมาณ 30 นาที โดยเขย่าเบาๆ ด้วยเครื่อง Rotary shaker (3D Rocking Platform STR9, Stuart Scientific Co. Ltd., UK) ล้างสีย้อมออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วแช่แผ่นเจลในสารละลายล้างสี (destained solution) ล้างสารละลายสีออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วแช่แผ่นเจลไว้ในน้ำกลั่นบันทึกผลรูปแบบโปรตีนบนแผ่นเจล โดยใช้เครื่อง gel document system (Gel Doc XR System, BioRad., USA) วิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีน หาค่าของน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนบันทึกตำแหน่งและคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนนั้นๆ กับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้ Quantity One 1-D Analysis Software. (BioRad, USA)

3.2.6 การศึกษาโปรตีนและเพปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญของซีรัมจระเข้พันธุ์ไทย (ปีที่ 2)

นำตัวอย่างซีรัมจระเข้ ที่เตรียมตามข้อ 3.2.1.2 ได้แก่ ตัวอย่างซีรัมจระเข้ (S) และซีรัมจระเข้แห้ง (S-FD) ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซึ่งได้ผสมตัวอย่างแต่ละชนิดให้เข้ากัน และนำตัวอย่างดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (MIKRO22, Hettich, Germany) ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนมาใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2.6.1 การคัดแยกส่วนโปรตีนหรือเพปไทด์บ่งชี้ในซีรัมจระเข้พันธุ์ไทยที่ต้องการศึกษา

โดยใช้วิธีการ ProteoPrep[®] Blue Albumin and IgG Depletion Kit (Sigma - Aldrich, USA) ประกอบด้วย spin columns, collection tubes และสารละลายต่างๆ ดังนี้

- ProteoPrep[®] Blue Albumin and IgG Depletion Medium, 10 ml
- ProteoPrep[®] Blue Equilibration buffer
- Protein Extraction reagent Type 4

ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ คือ

- การเตรียมสารละลายดังกล่าว ก่อนดำเนินการสกัดแยกโปรตีนในซีรัม
- การปรับสภาพคอลัมน์ (Column Equilibration) โดยการปรับสภาพของ ProteoPrep[®] Blue Albumin and IgG Depletion Medium ลงใน spin column ที่ด้านล่างมี collection tube อยู่ แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm (8,000 X g) เป็นเวลา 5 - 10 วินาที

แล้วดูด ProteoPrep[®] Blue Equilibration buffer 400 uL ใส่ลงใน spin column ที่ด้านล่างมี collection tube อยู่ แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 - 10 วินาที จากนั้นนำ buffer ใน collection tube ที่ทิ้งไป แล้วนำ spin column ใส่ลงใน collection tube เดิม ในขั้นสุดท้ายดูด ProteoPrep[®] Blue Equilibration buffer 400 uL ใส่ลงใน spin column แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 20 - 40 วินาที จากนั้นนำ buffer ใน collection tube ที่ทิ้งไป แล้วนำ spin column ใส่ลงใน collection tube ใหม่

- การกำจัด Albumin และ Ig G ออกจากซีรัม (Serum Depletion of Albumin and Ig G) โดยใส่ซีรัมปริมาตร 25 - 100 uL ใส่ลงในด้านบน packed medium bed ของ spin column แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 - 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายที่ได้อยู่ใน collection tube มาใส่ใน spin column อีกครั้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 - 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที สารละลายที่ผ่านการกรอง (*first eluate*) อยู่ใน collection tube และเก็บรวมกับ the first wash step ซึ่งได้จากการล้างโปรตีน (unbound proteins) ที่ยังคงเหลือใน spin column โดยใส่ 100 uL ของ Equilibration buffer ลงในด้านบน packed medium bed ของ spin column ที่ด้านล่างมี collection tube เดิมอยู่ แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายที่ผ่านการกรองครั้งที่สอง นี้รวมกับ *first eluate* ทำการล้างครั้งที่สอง โดยนำ spin column ใส่ใน collection tube ที่ใช้ใน Column Equilibration แล้วเติม 150 uL ของ Equilibration buffer ลงในด้านบน packed medium แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนสารละลายที่ได้นี้ไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

- การเก็บ the albumin/IgG depleted serum ดังกล่าวที่ อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการศึกษา SDS-PAGE และ two dimensional electrophoresis (2DE) ต่อไป

3.2.6.2 การแยกโปรตีนหรือเปปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญในซีรัมจะเข้พันธุไทยด้วยวิธี 2DE

เพื่อศึกษาโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และพบในปริมาณน้อย ซึ่งถือว่าเป็นโปรตีนบ่งชี้ที่สำคัญในด้านโปรตีโอมิกส์ (โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 Da) ที่ได้จากข้อ 3.2.6.1 โดยใช้วิธี Two-dimensional (2D-) electrophoresis, 2DE ตามวิธีการของ Simson (Simpson, 2003) ทำการตรวจดูรูปแบบและลักษณะจำเพาะของโปรตีนทั้งหมดในเจล 2DE ซึ่งในการศึกษานี้ใช้หลักการของ Isoelectric focusing (IEF) บน polyacrylamide gel ในระนาบแรก ซึ่งอาศัยหลักการ Immobilized pH-gradients (IPG) จาก ZOOM[®] IPGRunner System (Invitrogen life technologies, USA) ร่วมกับเทคนิค SDS-PAGE ในระนาบที่สอง

การแยกโปรตีนในระนาบที่ 1

โดยใช้ IPG gel strip และ Isoelectric focusing (IEF) electrophoresis จาก ZOOM[®] IPGRunner System

1) การเตรียมตัวอย่าง สำหรับ ZOOM[®] IPG Strip Rehydration

1.1) เตรียมตัวอย่าง (albumin/IgG depleted serum) ที่ได้จากข้อ

3.2.6.1 ความเข้มข้น 50 ug ลงใน sample rehydration buffer ปริมาตร 160 - 200 uL

1.2) จัดเตรียม ZOOM[®] IPGRunner cassette โดยให้หลุมที่จะใส่ตัวอย่าง (Sample loading wells) อยู่ด้านบน ใส่ชิ้นอุปกรณ์สำหรับใส่ตัวอย่าง (sample loading devices) บริเวณด้านบนและล่างของ cassette

1.3) ใส่ rehydration buffer ที่มีโปรตีน albumin/IgG depleted serum (ข้อ 1.1)) ลงไปที่ Sample loading wells ด้านขอมบน (cathode end) ของ ZOOM[®] IPGRunner cassette

1.4) ดึงแผ่นใสปิด ZOOM strip (pH 3-10 or 4-7; 7 cm) ที่ the basic end (-) ออก โดยใช้ปากคีบดึงแผ่นปิดออก

1.5) ค่อยๆ เลื่อน strip ด้านเจลอยู่ด้านบน หรือด้าน the acidic end (+) ลงไปใน Sample loading well ที่บริเวณด้านปลายบน จนสัมผัสปลายสุดของช่อง (ระวังอย่าให้มีฟองขนาดใหญ่ระหว่างดำเนินการ)

1.6) ทำซ้ำ ข้อ 1.4) – 1.5) สำหรับหลุมที่มีตัวอย่างอยู่ (ถ้าหลุมไหนไม่ได้ใช้สามารถวางไว้ได้)

1.7) ปิด loading wells ทั้งสองด้านของ ZOOM[®] IPGRunner cassette ด้วยแผ่นสติ๊กเกอร์ สีม่วง (sealing tape)

1.8) Rehydrate ZOOM strip (s) นาน 8-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

2) การดำเนินการ Performing Isoelectric Focusing

2.1) จากข้อ 1.8) ให้ลอก sealing tape ออก และดึง Sample loading device ที่ปลายทั้งสองด้านของ cassette ออก

2.2) ทำเครื่องหมายเป็นจุดสังเกต แล้ววาง Electrode wick ที่ปลายทั้งสองด้านของ ZOOM[®] IPGRunner cassette

2.3) เติม 600 uL ของ diluted Cathode (ด้านบน) หรือ Anode (ด้านล่าง) Buffer (1/100 dilution of stock cathode and anode buffer) ที่บริเวณ Electrode wick และขั้วของเหลวส่วนเกินออก

2.4) เลื่อน cassette ไปยังตำแหน่งใน ZOOM[®] IPGRunner core ทำให้ Electrode wicks สัมผัสกับ Electrode ของ ZOOM[®] IPGRunner core

2.5) ทำซ้ำในข้อ 2.4) หากมี ZOOM[®] IPGRunner cassette อันที่สอง หรือใช้ Buffer dam ลงแทนตำแหน่งดังกล่าว

2.6) เคลื่อนย้าย ZOOM[®] IPGRunner core/ ZOOM[®] IPGRunner cassettes หรือ Buffer dam เข้าไปใน Mini-cell chamber ของ ZOOM[®] IPGRunner

2.7) สอดตัวดันแผ่นเจล (Gel tension wedge) เข้าไปยัง Mini-cell หลัง ZOOM[®] IPGRunner core

2.8) ดึงก้านของตัวดัน ตรงไปยังด้านหน้าของ ZOOM[®] IPGRunner Mini-cell จนถึงตำแหน่งที่พอดี

2.9) เติม deionized water ลงใน outer chamber ของ Mini-cell (ตรวจสอบอย่าให้การรั่วของน้ำไปยังส่วน inner core)

2.10) ประกอบส่วนบนของ ZOOM[®] IPGRunner core ด้วย ZOOM[®] IPGRunner Cell Lid

2.11) ต่อสาย electrode ไปยัง power supply ตรวจสอบซ้ำให้ถูกต้อง ปรับค่ากระแส และความต้านทานไฟฟ้า เป็น 200V 4mA 4W 10 นาที/ 450V 3mA 4W 10 นาที/ 750V 2mA 4W 10 นาที/ 1000V 1mA 4W 10 นาที/ 2000V 1mA 4W 2 ชั่วโมง และ ดำเนินการ Isoelectric Focusing

2.12) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการดังกล่าว ให้นำ ทำการ IPG strip equilibration ใน Reducing buffer ก่อนนำไปดำเนินการแยกโปรตีนในระนาบที่ 2

3) การดำเนินการ ZOOM[®] IPG Strip Equilibration

3.1) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ IEF แล้ว ให้เอา Protective plastic cover ของ ZOOM[®] IPGRunner cassette ออก แล้วใส่ลงใน ZOOM[®] equilibration tray แทน

3.2) บ่ม IPG strip (s) ใน Reducing solution (500 uL Sample Reducing Agent (10X) + 4.5 L ของ 4X SDS sample buffer) เป็นเวลา 15-30 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า โดยให้เกิดการเขย่าแบบเบาๆ

3.3) ทิ้งและกำจัด Reducing solution

การแยกโปรตีนในระนาบที่ 2

โดยใช้หลักการของ SDS-PAGE ตามวิธีการข้อ 3.2.4 ที่ความเข้มข้นของเจลส่วนแยก (separating gel) ที่ 10% และเจลส่วนบน (stacking gel) ที่ 4.5% โดยใช้ชุดแผ่นแก้ว และ chamber (miniPAGE Chamber AE-6530, (ATTO Corporation, Japan) ทั้งนี้ให้เคลื่อนย้าย

Zoom strip ไปยัง stacking gel ที่ผิวของเจลเรียบ ด้วยปากคีบ วาง strip ให้แนบกับผิวเจล ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ใส่ SDS-PAGE Molecular Weight Standards ที่หลุมตัวอย่างด้านข้าง เมื่อ SDS-PAGE เสร็จแล้ว ทำการย้อมสี ตามข้อที่ 3.2.5

การวิเคราะห์เจล (Gel analysis)

บันทึกจุดโปรตีนต่างๆ (protein spots) บนแผ่นเจล โดยใช้เครื่อง gel document system (Gel Doc XR System, BioRad., USA) วิเคราะห์หาค่าของน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน บันทึกตำแหน่งและคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนนั้นๆ กับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้ 2D gel image analysis software (Syngene, USA)

3.2.6.3 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน (Protein identification)

โดยนำน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของโปรตีนที่ปรากฏในเจลจาก 2DE ข้อ 3.2.6.2 ไปเปรียบเทียบกับลักษณะรูปแบบของจุดโปรตีนกับฐานข้อมูลของโปรตีนมาตรฐาน ด้วยเครื่องมือ Mass spectrometer ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS อย่างไรก็ตามโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยบางตัวที่มีปริมาณน้อยมากไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วย เทคนิค MALDI-TOF MS จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่มีความละเอียดถูกต้องแม่นยำที่สูงขึ้น ด้วยการใช้เครื่องมือ LC-MS MS ต่อไป

1) การตัดจุดโปรตีนออกจากเจล (spot cutting)

จากผลของการวิเคราะห์เจล ประเมินจุดโปรตีนที่น่าจะเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญในซีรัมจะเข้าพันธุไทย เพื่อให้วิเคราะห์ได้ถึงชนิดของโปรตีน จึงทำการตัดจุดโปรตีนที่สนใจออกจากเจล โดยใช้ปิเปตทิป (pipette tip) ขนาด 1000 uL ที่ตัดปลายให้มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แล้วใช้ปลายทิปนี้กดลงไปบนเจลบริเวณจุดโปรตีนที่ต้องการให้เนื้อเจลขาดออกจากกัน แล้วดูดเนื้อเจลขึ้นมา นำไปใส่ในหลอดน้ำกลั่นที่เตรียมไว้

2) การย่อยโปรตีนในเจล (In gel digestion)

ทำการย่อยเนื้อเจลที่มีจุดโปรตีนที่สนใจอยู่ ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนของสายเปปไทด์ (peptide fragments) ที่มีจำนวนและขนาดที่ต่างกันไป แล้วสกัดแยกเปปไทด์ขนาดต่างๆ ออกจากเจล เพื่อวิเคราะห์ชนิดต่อไป

3) การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (MS analysis)

เปปไทด์ที่ถูกสกัดแยกออกมาจากเจลดังกล่าวข้างต้น จะถูกนำเข้าสู่เครื่อง Mass spectrometer (MALDI-TOF/TOF; ultrafleXtreme® (Bruker Daltonic, Vienna, Austria) หรือ LC-MS/MS); LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, USA) เพื่อให้เกิด

การแตกตัวเป็นไอออนขนาดต่างๆ กัน บันทึกผลของแมสสเปกตรัม (mass spectrum) นำข้อมูล (Peptide mass fingerprinting) ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน MASCOT เพื่อหาชนิดของโปรตีน

ผลการวิจัย และอภิปรายวิจารณ์ผล

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาคือเนื่องมาจากปีที่ 1 ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยแผนงานสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อแก้ปัญหาสำคัญของชาติอย่างสมดุลและยั่งยืน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ซึ่งมีผลการวิจัยในปีที่ 1 เกี่ยวข้องกับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ โดยเฉพาะสารอินทรีย์ในกลุ่มของโปรตีนของเลือดจระเข้หรือจากส่วนแยกต่างๆ โดยเจาะเก็บเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) อายุ 2-4 ปี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากภาคกลาง (นครปฐม) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา) และภาคใต้ (ปัตตานี) จำนวนภาคละ 60 ตัว (เพศผู้ 30 ตัว เพศเมีย 30 ตัว) ปริมาณ 110 มิลลิลิตร ต่อตัว เตรียมตัวอย่าง (เลือดครบ และส่วนซีรัม) ที่ผ่านการทำ Freeze dry ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด น้ำตาลโปรตีน (แพลคเตอร์ 6.25) ไขมันทั้งหมด ไขมันอิ่มตัว โคเลสเตอรอล (โดยใช้วิธีทดสอบตามหลักการของ Thai Compendium of methods for food analysis, 1st ed. 2003) และการทดสอบหาชนิดของกรดอะมิโนในเลือดครบของจระเข้ฯ โดยใช้วิธี Gas Chromatography/ HPLC (In house method based on AOAC (2005), 994.12) สารอินทรีย์ ได้แก่ น้ำ เกลือ โซเดียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส คลอไรด์ แคลเซียม แมกนีเซียม วิตามินเอ วิตามินบี1, บี6, บี12 วิตามินซี (โดยใช้วิธีทดสอบตามหลักการของ Thai Compendium of methods for food analysis, 1st ed. 2003) โลหะหนัก (เหล็ก ตะกั่ว สารหนู) และสารต้านอนุมูลอิสระ (BHA BHT TBHQ) (โดยใช้วิธีทดสอบตามหลักการของ T-CM-037 Based on Food Chemistry, 2000) จากการศึกษาพบว่า ในเลือดครบโปรตีนมีปริมาณมากที่สุด (87.4 g/100g) รองลงมาคือ ไขมัน (2.4 g/100g) และคาร์โบไฮเดรต (0.6 g/100g) ส่วนในซีรัมพบมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ปริมาณ 69.0, 8.2 และ 6.9 g/100g ตามลำดับ โดยในเลือดครบมีโปรตีน ฟอสฟอรัส (547.0 mg/100g) และเหล็ก (132.1 mg/100g) มากกว่าในซีรัม ในเลือดจระเข้ (เลือดครบ, ซีรัม) วิตามินที่พบปริมาณมากที่สุดได้แก่ วิตามินซี (10.88, 8.66 mg/100g) รองลงมา คือ วิตามินบี2 (0.29, 0.50 mg/100g) , วิตามินบี6 (0.23, 0.23 mg/100g) วิตามินบี1 (0.11, 0.04 mg/100g) และ วิตามินบี12 (0.10, < 0.10 mg/100g) ตามลำดับ วิตามินที่พบปริมาณน้อยที่สุดคือ วิตามินเอ (661.15 ug/100g) ซึ่งพบในส่วนของซีรัมมีปริมาณของวิตามินเอมากกว่าในเลือดครบเกือบห้าเท่า องค์ประกอบทางเคมีในเลือดจระเข้ ที่ถูกเพาะเลี้ยงในภาคต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันเด่นชัด กรดอะมิโนที่พบปริมาณมากที่สุด 5 อันดับแรก

ได้แก่ Glutamic acid (9960.25 mg/100g), Leucine (7761.15 mg/100g), Aspartic acid (7538.34 mg/100g), Lysine (7508.79 mg/100g) และ Alanine (5442.63 mg/100g) ตามลำดับ กรดอะมิโนที่พบปริมาณน้อยที่สุด 3 อันดับสุดท้าย ได้แก่ Tryptophan (1006.58 mg/100g), Methionine (1197.69 mg/100g) และ Isoleucine (2054.58 mg/100g) ตามลำดับ การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในภาวะที่มีเมอร์แคปโทเอทานอลเป็นสารรีดิวซ์ ที่ 10% (w/v) separating gel ของตัวอย่างจากจระเข้เพศผู้ และจระเข้เพศเมีย ในส่วนเม็ดเลือด เลือดครบ ซีรัม และตัวอย่างเลือดครบและซีรัมผ่านกระบวนการทำแห้งฟรีซดราย (Freeze dry) พบว่ารูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้ไม่แตกต่างกันตามเพศ กระบวนการทำแห้ง และแหล่งเมื่อเปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยง พบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้ จากตัวอย่างเลือดจระเข้ส่วนที่ต่างกักัน (เลือดครบ ซีรัม และส่วนเม็ดเลือด) โดยโปรตีนจากตัวอย่างเลือดครบ (WB) พบ 7 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 119, 91, 67, 62, 59, 45 kDa และ 25 kDa ตามลำดับ โปรตีนจากซีรัม (S) แยกได้เป็น 6 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 225, 121, 67, 62, 45 และ 25 kDa ตามลำดับ โปรตีนจากส่วนเม็ดเลือด (BC) แยกได้เป็น 2 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 45 และ 25 kDa แถบโปรตีนที่เข้มกว่าที่สุดคือ แถบโปรตีนแอลบูมิน (albumin) ที่น้ำหนักโมเลกุล 67 kDa

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาต่อในส่วนขององค์ประกอบโปรตีน เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนและเปปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (การศึกษาวิจัยปีที่ 2-3) วิเคราะห์โดยใช้หลักการของโปรตีโอมิกส์ (การทดลองที่ 2) ซึ่งแต่เดิมในปีที่ 2 ได้ออกแบบการวิจัยเพื่อศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคทางชีวเคมี และวิธีทางโปรตีโอมิกส์ในการระบุชนิดของโปรตีนและเปปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญและแสดงออกในเลือดจระเข้พันธุ์ไทย โดยตรวจหาชนิดของโปรตีนในเลือดจระเข้ด้วยเทคนิค 2-Dimensional electrophoresis และ MALDI-TOF MS และในปีที่ 3 จะดำเนินการวิเคราะห์ตรวจสอบโปรตีนและเปปไทด์ที่ได้จากการทดลองที่ 2 ปีที่ 2 โดยใช้เทคโนโลยีสารสนเทศทางชีวภาพ (Bioinformatics) และทำนายคุณสมบัติของโปรตีนและเปปไทด์จากฐานข้อมูล ทั้งนี้ได้แยกวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดจระเข้พันธุ์ไทยเป็น 2 ส่วนคือ ตัวอย่างจากน้ำเลือด (ซีรัม) จระเข้ และตัวอย่างจากเม็ดเลือด

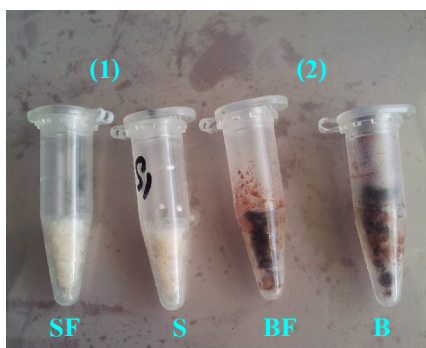
เนื่องจากโครงการวิจัยของปีที่ 2 นี้ ได้รับการพิจารณารับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจาก วช. ประจำปีงบประมาณ 2554 และได้ทำสัญญารับทุนอุดหนุนการวิจัย สัญญาเลขที่ ภค/ 2554-171 เมื่อวันที่ 26 ตุลาคม 2554 และทาง วช. ได้ส่งคู่มือรับทุนอุดหนุนการวิจัย มาให้ทราบตามหนังสือที่ วช. 005/12968 ลงวันที่ 7 ธันวาคม 2554 แล้วนั้น แต่ตั้งแต่ปลายเดือนตุลาคม ถึงเดือน ธันวาคม 2554 เกิดเหตุการณ์มหาอุทกภัยที่เกิดขึ้นในภาคกลางของประเทศไทย รวมถึงการเกิดน้ำท่วมสูงเต็มพื้นที่ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ส่งผลกระทบต่อการทำการวิจัยของโครงการวิจัยฯ ซึ่งต่อมา วช. ได้ปรับเพิ่มระยะเวลาทำการวิจัยออกไปอีก 3 เดือน และในระหว่าง

ดำเนินการวิจัยคณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการได้ให้คำแนะนำที่ดี พร้อมให้ความเห็นเพิ่มเติม ดังนั้น เพื่อให้การดำเนินการได้ผลการวิจัยที่ดี สอดคล้องกับการชดเชยเวลาในการฟื้นฟูความเสียหายทางกายภาพของสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีบางส่วน จึงมีการปรับแผนงานวิจัยฯ ของการศึกษานี้ โดยการวิจัยในปีที่ 2 - 3 ที่ได้วางแผนไว้สำหรับการศึกษาโปรตีนและเพปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญของเลือดจระเข้พันธุ์ไทยนั้น ในการศึกษารั้งนี้ (ปีที่ 2) ได้ทำการศึกษาเฉพาะตัวอย่างจากส่วนของซีรัม โดยใช้เทคนิค 2-Dimentional electrophoresis และตรวจหาชนิดของโปรตีนในเลือดจระเข้ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS หรือ LC MS/MS

จากการดำเนินการในช่วงแรก ได้เตรียมตัวอย่างจากเลือดจระเข้เพื่อการสกัดแยกโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย 2 แบบ คือ

1) ส่วนซีรัมจระเข้ โดยนำตัวอย่างเลือดครบจระเข้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม และเม็ดเลือดออกจากกัน นำส่วนหนึ่งของซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (ตัวอย่าง “S”) อีกส่วนนำมาผ่านการทำ Freeze dry แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4-5^{\circ}\text{C}$ (ตัวอย่าง “SF”)

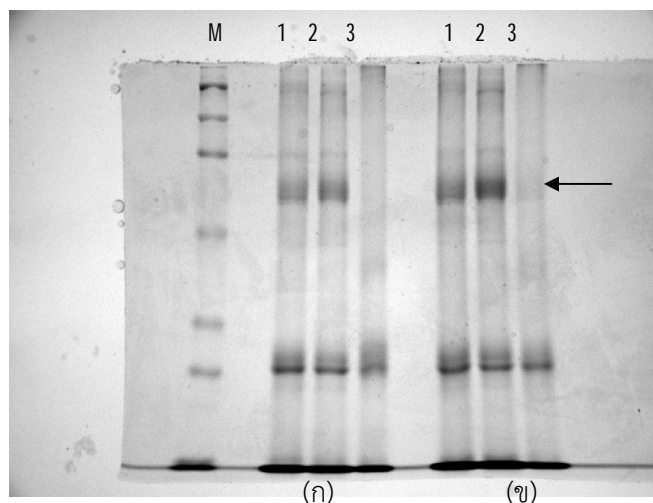
2) ส่วนเม็ดเลือดจระเข้ โดยแยกส่วนซีรัมออกดังกล่าวแล้ว นำส่วนหนึ่งของเม็ดเลือดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (ตัวอย่าง “B”) อีกส่วนนำมาผ่านการทำ Freeze dry แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4-5^{\circ}\text{C}$ (ตัวอย่าง “BF”)



ภาพที่ 1 ตัวอย่างจากเลือดจระเข้พันธุ์ไทย 2 แบบ คือ (1) ส่วนซีรัมจระเข้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (S) และผ่านการทำ Freeze dry (SF) (2) ส่วนเม็ดเลือดจระเข้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (B) ที่นำมาผ่านการทำ Freeze dry (BF)

เมื่อนำโปรตีนมาละลาย แล้วศึกษาด้วย One-dimentional electrophoresis (ภาพที่ 1) โดยใช้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) จากภาพ จะเห็นว่ากระบวนการ

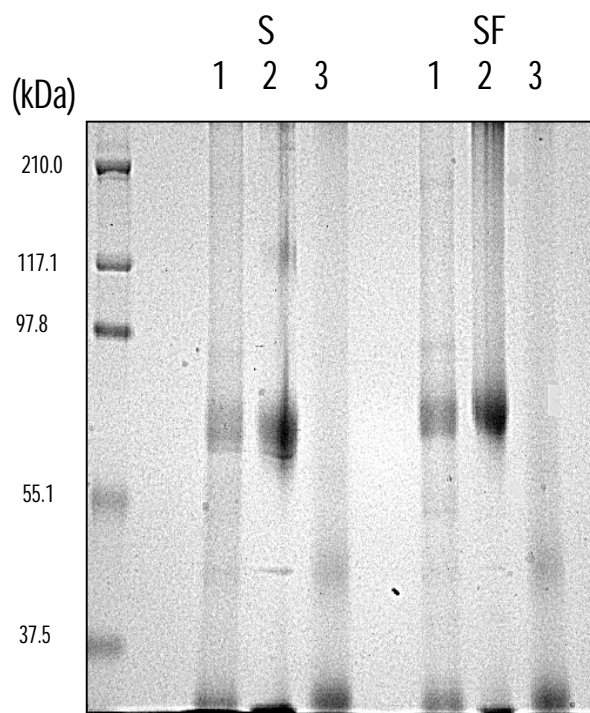
เก็บรักษาตัวอย่างโปรตีน ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 (ภาพที่ 1ก) และที่นำมาผ่านกระบวนการทำระเหิดแห้ง (ภาพที่ 1ข) ไม่มีผลต่อรูปแบบของโปรตีน โปรตีนส่วนซีรัม (ภาพที่ 1, No. 1,2) แยกได้เป็น 6 แถบ และโปรตีนส่วนของเม็ดเลือด (ภาพที่ 1, No. 3) แยกได้เป็น 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45 และ 25 kDa ไม่พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่และมีปริมาณมาก เช่น อัลบูมิน (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 2 รูปแบบของโปรตีนจากกระแสซุ่มไทย ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 (ก) และที่ผ่านกระบวนการทำระเหิดแห้ง (ข) โดยเป็นส่วนของซีรัม S, SF (1,2) และส่วนของเม็ดเลือด B, BF (3) เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) โดยที่ Lane M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker, Mr)

1. การคัดแยกส่วนโปรตีนหรือเปปไทด์บ่งชี้ในซีรัมกระแสซุ่มไทยที่ต้องการศึกษา

โปรตีนที่อยู่ในซีรัมของเลือดจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า โปรตีนบ่งชี้ที่สำคัญในด้านโปรตีโอมิกส์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและพบในปริมาณน้อย ดังนั้นจึงมีการสกัดแยกออกจากโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่และมีปริมาณมาก เช่น อัลบูมิน ออกไปก่อน ในการศึกษาซีรัมของการวิจัยนี้ จึงมีกระบวนการกำจัดอัลบูมินเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยใช้วิธีการ ProteoPrep[®] Blue Albumin and IgG Depletion Kit (Sigma - Aldrich, USA) แต่การศึกษานี้เป็นตัวอย่างจากซีรัมกระแสซุ่มน้ำจืดซุ่มไทย ซึ่งมีองค์ประกอบในน้ำเลือดที่แตกต่างไปจากของมนุษย์ ทำให้การการสกัดแยกออกจากโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่และมีปริมาณมากออกไปได้น้อย ยังคงเหลือโปรตีนขนาดใหญ่อยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างก่อนการคัดแยกโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 3 และพบผลที่ไม่แตกต่างกันของตัวอย่างจากส่วนซีรัมกระแสซุ่มที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C (S) และซีรัมที่ผ่านการทำ Freeze dry (SF)

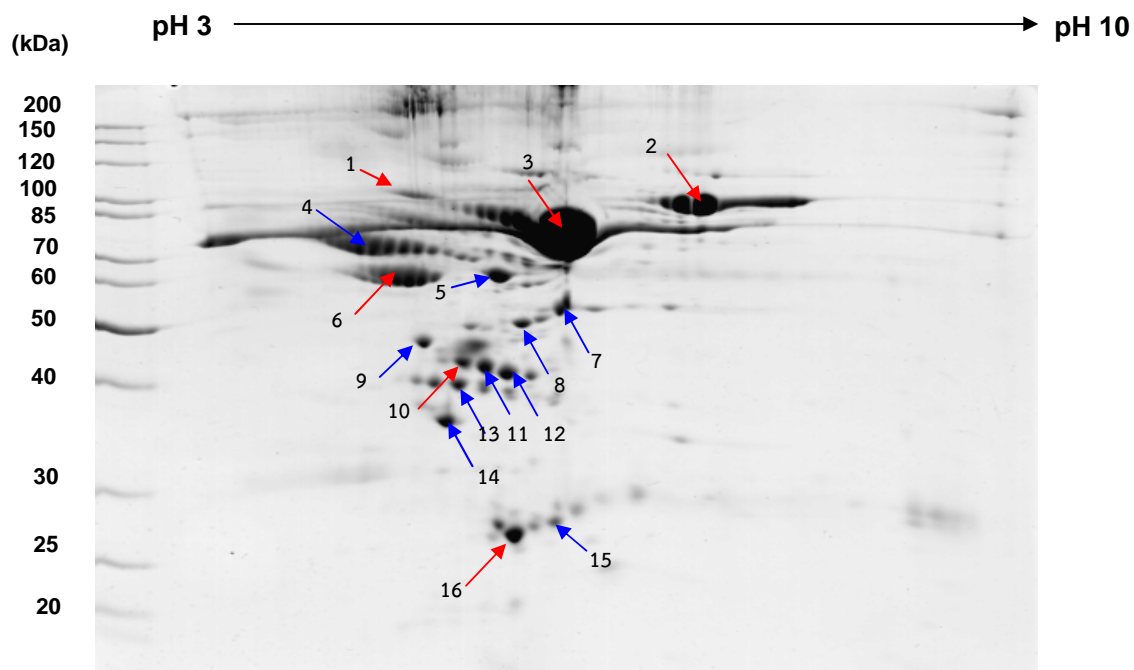


ภาพที่ 3 รูปแบบของโปรตีนจากส่วนซีรัมจะแช่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (S) และซีรัมที่ผ่านการทำ Freeze dry (SF) เมื่อ 1) เป็นซีรัมก่อนการตัดแยกโปรตีน 2) โปรตีนที่ได้จากการกำจัด Albumin และ Ig G ออกจากซีรัม 3) โปรตีนจากการล้างโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ บน SDS-PAGE เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) โดย Mr คือ โปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker) ซึ่งแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa)

2. การแยกโปรตีนหรือเปปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญในซีรัมจะแช่พันธุ์ไทยด้วยวิธี 2DE

เมื่อดำเนินการแยกโปรตีนในซีรัมจะแช่พันธุ์ไทยจากตัวอย่างที่ได้จากการตัดแยกส่วนโปรตีน ด้วย 2DE การกระจายตัวของจุดโปรตีนต่างๆ บน 2DE ถูกตรวจสอบด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (image analysis software) โดยพบ 90 จุดโปรตีน ในช่วง $20 - 200$ kDa ที่ pI 3 – 10 (ภาพที่ 4) รูปแบบทางโปรติโอมิกส์ของซีรัมจะแช่พันธุ์ไทย แสดงดังภาพที่ 4 ซึ่งเมื่อคิดจากค่า pI พบ 30 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นกรด (acidic) 45 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นกลาง (neutral) 15 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นเบส (basic) จากจุดโปรตีนทั้งหมดนี้ 16 จุดโปรตีนที่ย้อมติดสีมาก ถูกนำไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน ด้วยหลักการ MALDI-TOF/MS โปรตีนแต่ละจุดถูกวิเคราะห์หามวลโมเลกุล

(molecular mass), accession number, pI, sequence coverage, MASCOT score และ number of peptide matches รายละเอียดตามตารางที่ 1



ภาพที่ 4 รูปแบบโปรตีนที่พบจากผล Two dimensional gel electrophoresis ของซีรัมจระเข้พันธุ์ไทย โดยใช้ 400 μg ของซีรัมโปรตีน ดำเนินการแยกโปรตีนในระนาบแรกด้วย IEF . ใช้ strip ขนาด 7 เซนติเมตร (pH 3 – 10) ตามด้วยการแยกโปรตีนในระนาบสองด้วย 10% SDS-PAGE ย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue (CBB) จุดโปรตีนต่างๆ จากเจลที่ถูกย้อมสีถูกตัดออกไป และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน เพื่อทำการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนโดย MALDI-TOF/MS

ตารางที่ 1 รายการของโปรตีนที่ถูกวิเคราะห์จากซีรัมจระเข้พันธุ์ไทย โดยใช้ 2DE ตามด้วย MALDI-TOF/MS

Spot	Protein identified	Accession No.	kDa/pi	Theoretical/ Experimental	Score	Peptides matched	Sequence coverage
1	Ceruloplasmin	EMP38009	110/4.80	75/9.1	155	6	7
2	Transferrin	ADZ05535	95/7.70	68/10.3	140	8	7
3	Albumin	EMP30485	70/6.46	68/5.0	220	3	9
4	Serpin B10	EMP36652	68/3.90	59/4.5	120	2	4
5	Anti-thrombin	AAL60466	56/5.45	58/7.0	57	1	1
6	Alpha-1-antiproteinase	EMP32400	58/4.20	59/9.9	34	2	2
7	Albumin	AAA63473	54/6.39	46/5.5	27	2	0
8	Albumin	CAA55333	52/5.88	22/7.1	34	2	0
9	Complement	AFN54473	48/4.66	25/4.2	178	2	5
10	Haptoglobin	AAA37778	45/5.15	22/10.00	99	2	2
11	Haptoglobin	AAA37779	43/5.27	46/6.1	76	1	1
12	Haptoglobin	AAB65440	42/5.33	43/8.5	38	1	4
13	Complement	EMP37270	40/5.11	18/4.50	78	2	3
14	Transthyretin	NP001081348	38/4.98	14/5.2	120	3	4
15	Complement component 3 precursor	4557385	28/6.22	12/4.3	130	4	4
16	Ig L-chains	B46518	27/5.46	16/6.4	66	1	6

การศึกษาทางโปรตีโอมิกส์ในสารน้ำที่ได้จากสัตว์ มีการศึกษามากในมนุษย์ เช่น เลือด ซีรัม พลาสมา เม็ดเลือดแดง น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำเชื้อ ฯลฯ เพื่อประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นหลัก สำหรับการศึกษา ในสัตว์นั้น นิยมศึกษาในสัตว์ที่เกี่ยวข้องกับปศุสัตว์ที่สำคัญ เช่น ไก่ เป็ด หมู วัว ปลา กุ้ง ฯลฯ ส่วนการศึกษาโปรตีนและเปปไทด์ในจระเข้ยังมีน้อยมาก โดยในปี ค.ศ. 2010 Darville และคณะ ได้วิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ในเม็ดเลือดขาวของจระเข้อเมริกาหรืออัลลิเกเตอร์ (*Alligator mississippiensis*) โดยใช้เทคนิค MS ร่วมกับ gel electrophoresis และ liquid chromatography เพื่อตรวจหาลำดับของเปปไทด์จากเม็ดเลือดขาวของอัลลิเกเตอร์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานเริ่มต้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของอัลลิเกเตอร์ โปรตีนที่ได้จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวถูกแยกโดยใช้ 2DE และตัดแถบย่อยและวิเคราะห์ด้วย online nano-LC MS/MS เพื่อสร้างลำดับของเปปไทด์ ใช้ในการตรวจหาโปรตีนและคุณสมบัติการทำหน้าที่ของโปรตีนจากการจับคู่ของสองเปปไทด์หรือมากกว่า จากโปรตีนเดียวกัน ด้วยการค้นหาจากฐานข้อมูล NCBI

โดยใช้ MASCOT และ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) มีการตรวจ 43 โปรตีน ซึ่งมีการแสดงลำดับโปรตีนคล้ายกับโปรตีนที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโครงร่าง (cytoskeleton system) มากที่สุด โปรตีนเหล่านี้ใช้ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell mobility) และกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เปปไทด์อื่นๆ อีกหลายตัวเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในหน้าที่ภูมิคุ้มกัน ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 ได้ใช้ MS ร่วมกับ de novo sequencing ในการตรวจหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนแลคติน (Lectin) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 35 kDa แยกได้จากซีรัมของอัลลิเกเตอร์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน สามารถจับกับน้ำตาลแมนโนส (Mannose) ใช้การตรวจหา Protein N-terminal sequence ด้วย Edman degradation และย่อยให้ได้ชิ้นส่วนเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ protease เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC MS/MS) มีการสร้าง De novo sequencing ด้วย โปรแกรม MASCOT Distiller และ PEAKS ทำการตรวจหา homologous peptides จากฐานข้อมูล NCBI ด้วย MASCOT และ BLAST การวิเคราะห์โปรตีนด้วย MS ชี้ให้เห็นการจับกันแบบ monomer และ dimer ในสถานะ *in vitro* โปรตีน 35 kDa ที่แยกได้หาลำดับกรดอะมิโนได้ 98% และพบมี 31 กรดอะมิโน และ 9 หน่วยของ cysteine และถูกวิเคราะห์เป็น Lectin ที่พบในอัลลิเกเตอร์ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DIALIGN และ Clustal W พบมีความคล้ายกัน 58% และ 59% กับ Intelectin-1 ของคนและหนูเม้าส์ นอกจากนี้พบว่า Lectin ของอัลลิเกเตอร์ มีการจับกับ mannann และ mannose ได้อย่างแข็งแรง (Darville *et al.*, 2012)

ในระแค้นพันธุ์ไทย (Siamese Crocodile, *Crocodylus siamensis*) พบมีการศึกษาทางโปรตีโอมิกส์ในสารสกัดจากเม็ดเลือดขาวจระเข้ ซึ่งให้ความสนใจในสารต้านจุลชีพที่ผลิตมาจากเม็ดเลือดขาว เช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาวิจัยในเม็ดเลือดขาวของอัลลิเกเตอร์ (Merchant *et al.*, 2006) สารต้านจุลชีพ (antimicrobial substances) พบได้ในซีรัม และพลาสมาของจระเข้พันธุ์ไทย ซึ่งคล้ายกับในอัลลิเกเตอร์ที่สารสกัดจากเม็ดเลือดขาวสามารถทำลายเชื้อจุลชีพที่สำคัญได้ (Pata *et al.* 2011) นอกจากนี้ยังพบมีการศึกษาทางโปรตีโอมิกส์ในตัวอย่างไขขาวจระเข้ เปรียบเทียบกับไขขาวของสัตว์อื่นๆ อีก 4 ชนิด โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry และ LC/MS-MS analysis ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเปปไทด์จากฐานข้อมูลพบว่าไขของสัตว์เลี้ยงคาน ประกอบด้วยโปรตีน 7 กลุ่ม เช่น serpine, trans-ferrin precursor/iron binding protein, lysozyme C, teneurin-2 (fragment), interferon-induced GTP-binding protein Mx, succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit และ olfactory receptor 46 (Prajamban *et al.*, 2012)

สารน้ำในร่างกาย เช่น ซีรัม พลาสมา และน้ำปัสสาวะ เป็นตัวอย่างทางชีวภาพที่เก็บได้สะดวก สามารถเก็บได้เป็นลำดับ มีวัตถุประสงค์ในการวินิจฉัย และติดตามการดำเนินไปของโรค

การเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีน เช่นเดียวกับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงระดับของสารน้ำมีความสำคัญต่อการวินิจฉัย การทำนาย และการรักษาโรค โปรตีนในซีรัมและพลาสมาของมนุษย์ถูกเชื่อมโยงกับการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ (Lista *et al.*, 2013) สำหรับในสัตว์นั้นการวิเคราะห์และคุณลักษณะของซีรัมโปรตีนโอมยังคงไม่ชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลทางจีโนมยังไม่สมบูรณ์ มีรายงานการศึกษาจำนวนหนึ่งที่ทำให้คุณลักษณะของซีรัมโปรตีนโอมของม้า (Miller *et al.*, 2004) และไก่ (Huang *et al.*, 2006) และ (Chiaradia *et al.*, 2012) หมูแรท (Yamada *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามก่อนหน้านี้การศึกษาเกี่ยวกับซีรัมโปรตีนโอมของจระเข้พันธุ์ไทยยังไม่มียางานมาก่อน

จากผลการศึกษาแสดงมากกว่า 20 โปรตีน มีการแสดงออกเป็นจุดโปรตีนหลายๆ จุดในผล 2DE ของซีรัมจระเข้พันธุ์ไทย แสดงให้เห็นถึงไอโซฟอร์ม (isoforms) ชั้นส่วนของโปรตีนเดียวกัน (เช่น Albumin, Haptoglobin) โปรตีนหลักเหล่านี้ เช่น Albumin, Transferrin, Serpin B10 และ Alpha-1-antiproteinase โปรตีนที่รองลงมา ได้แก่ Complement, Haptoglobins, Transthyretin และ Ig light (L) chains (ภาพที่ 4 และตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ตรวจสอบโปรตีนและเปปไทด์ที่ได้จากการศึกษานี้ เพื่อทำนายคุณสมบัติของจากฐานข้อมูลโดยใช้เทคโนโลยีสารสนเทศทางชีวภาพ (Bioinformatics) ต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาโปรตีนโอมิกของซีรัมจระเข้พันธุ์ไทย การแยกอัลบูมิน และ Ig G ออกจากซีรัมจระเข้ทำได้ไม่หมด ซึ่งโปรตีนที่เหลือถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแบบสองมิติ (2DE) พบ 90 จุดโปรตีนในช่วง 20 – 200 kDa ที่ pI 3 – 10 (30 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นกรด (acidic) 45 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นกลาง (neutral) 15 จุดโปรตีน อยู่ในช่วงเป็นเบส (basic)) จุดโปรตีนทั้งหมด 16 จุดโปรตีนถูกวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน ด้วยหลักการ MALDI-TOF/MS ผลการศึกษาเหล่านี้เป็นข้อมูลเอกลักษณ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทยในด้านโปรตีนโอมของซีรัมจระเข้พันธุ์ไทย

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาที่ได้ปรับการดำเนินการทดลองให้สอดคล้องกับสถานการณ์อุทกภัยที่เข้ามาในพื้นที่ทำวิจัย ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานของซีรัมโปรตีนโอมเท่านั้น และควรมีการศึกษาในส่วนของเม็ดเลือดต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลครบองค์ประกอบของเลือดจระเข้
2. สำหรับในการศึกษานี้ใช้การคัดแยกส่วนโปรตีนหรือเปปไทด์บ่งชี้ในซีรัมจระเข้พันธุ์ไทยที่ต้องการศึกษา โดยการกำจัด albumin และ immunoglobulin ซึ่งอาศัยชุดการทดสอบที่ใช้กับซีรัมของมนุษย์ ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ไม่มีความจำเพาะในการจับกับโปรตีนโมเลกุลใหญ่

ของซีรัมระยะเช้าซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลาน ดังนั้นจึงควรเพิ่มศักยภาพการกำจัดซีรัมโปรตีนโมเลกุลใหญ่อื่นๆ โดยใช้วิธีการทางชีวเคมีอื่นเพิ่มเติม เช่น free-flow electrophoresis, Liquid chromatography ฯลฯ

3. ในการแยกโปรตีนหรือเปปไทด์บ่งชี้ในซีรัมระยะเช้าพันธุ์ไทย ด้วย 2DE ควรมีการใช้ IPG gel strip ที่มีช่วง pH gradient ที่แคบลง เช่น pH 4 – 7 เพิ่มเติม เพื่อให้ได้จุดโปรตีนที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

4. ควรมีการศึกษาเพื่อระบุชนิดที่ชัดเจนของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่สำคัญ หรือน่าสนใจ โดยอาศัยหลักการของ Immunoblotting

5. ส่งเสริม หรือเพิ่มการศึกษาทางด้านจีโนมของระยะเช้าพันธุ์ไทยให้มากขึ้น เพื่อให้ได้ฐานข้อมูลการวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศ (Bioinformatic) ของโปรตีนในเลือดระยะเช้าที่ชัดเจนมากขึ้น

6. ควรมีการวิเคราะห์ตรวจสอบโปรตีนและเปปไทด์ที่ได้จากการศึกษานี้ เพื่อทำนายคุณสมบัติของจากฐานข้อมูล โดยใช้เทคโนโลยีสารสนเทศทางชีวภาพ (Bioinformatics) ต่อไป

บรรณานุกรม (Bibliography)

- จินดาวรรณ สิริันทวิเนติ วินเขยชมศรี และบุญเกื้อ วัชรเสถียร. 2549. การใช้เอสดีเอส-พอลิอะครีลาไมล์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเพื่อศึกษาซีรัมโปรตีนจากจระเข้พันธุ์ไทย หนูvistาร์ และคน. *วารสารเทคนิคการแพทย์* 34(1). หน้า 1444-1455
- ชยันต์ พิเชียรสุนทร และวิเชียร จีรวงส์. *คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม 3: เครื่องยาสัตว์วัตถุ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อมรินทร์, 2546 : 150-167.
- วิน เขยชมศรี จินดาวรรณ สิริันทวิเนติ บุญเกื้อ วัชรเสถียร มณี ต้นตี่รุ่งกิจ สุดาวรรณ เขยชมศรี ยศพงษ์ เต็มศิริพงศ์ และเริงฤทธิ์ สัปพัน. 2546. ประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด*. 15 (ฉบับเพิ่มเติมที่ 1). S120.
- สุวิทย์ รักษมณี และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*). *รายงานการวิจัยโครงการอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาตรี ประจำปี 2549*. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม.
- Aree, K., Siruntawineti, J. and Chaeychomsri, W. 2012. *Crocodylus siamensis* Serum and Macrophage Phagocytic Activity. *J Med Assoc Thai* 94 (Suppl. 7) : S131-S138.
- Betkot, Z. 2001. The nutritional value of cattle blood. *Medycyna Weterynaryjna* 57 (6) : 412-414.
- Betkot, Z. 2001. The nutritional value of cattle blood. *Medycyna Weterynaryjna* 57 (6) : 412-414.
- Betkot, Z. and Petczyn'ska, E. 2002. Eating value of chicken blood. *Medycyna Weterynaryjna* 58 (3) : 208-210.
- Binah, O., Ciechanover, A. and Maor, G. Anti-tumor activity from reptile serum. *United States Patent* 20040247589. December 2004.
- Binah, O., Ciechanover, A. and Maor, G. Anti-tumor activity from reptile serum. *United States Patent* 20040247589. December 2004.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72 : 248-254.

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72 : 248-254.
- Calder, P. C., Kew, S. 2002. The immune system: a target for functional foods?. *Br. J. Nutr.* 88 Suppl 2: S165-77.
- Calder, P. C., Kew, S. 2002. The immune system: a target for functional foods?. *Br. J. Nutr.* 88 Suppl 2: S165-77.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetti, J., Pokharatsiri, A., Vajarasathira, B., Chitchuankij, N. and Temsiripong, Y. 2004b. Effects of Crocodile Blood Consumption on Biochemical Changes in Wistar Rats. In: *Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand*. 19-21 October, 2004. Bangkok.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetti, J., Pokharatsiri, A., Vajarasathira, B., Chitchuankij, N. and Temsiripong, Y. 2004b. Effects of Crocodile Blood Consumption on Biochemical Changes in Wistar Rats. In: *Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand*. 19-21 October, 2004. Bangkok.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetti, J., Vajarasathira, B. and Temsiripong, Y. 2006. Safety Evaluation of Crocodile Blood Diet. In: *Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*. 10-12 October, 2006. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetti, J., Vajarasathira, B. and Temsiripong, Y. 2006. Safety Evaluation of Crocodile Blood Diet. In: *Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*. 10-12 October, 2006. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetti, J., Vajarasathira, B., Komoljindakul, K., Ong-aat, T. and Temsiripong, Y. 2004a. Intestinal Parasites of Freshwater Crocodile, *Crocodylus siamensis*, in Thailand. In: *Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group*. 24-29 May, 2004. Darwin Australia.
- Chaeychomsri, W., Siruntawinetti, J., Vajarasathira, B., Komoljindakul, K., Ong-aat, T. and Temsiripong, Y. 2004a. Intestinal Parasites of Freshwater Crocodile, *Crocodylus siamensis*, in Thailand. In: *Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group*. 24-29 May, 2004. Darwin Australia.

- Chiaradia, E., Avellini, L., Tartaglia, M., Gaiti, A., Just, I, Scoppetta, F., Czentnar, Z and Pich, A. 2012. Proteomic evaluation of sheep serum proteins. *BMC Vet. Res.* 8 : 66.
- Darville, L. N. F., Merchant, M. E., Hasan, A. and Murray, K. K. 2010. Proteome analysis of the leukocytes from the American alligator (*Alligator mississippiensis*) using mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 5: 308–316.
- Darville, L. N. F., Merchant, M. E., Maccha, V., Reddy, V., Siddavarapu, V. R., Hasan, A. and Murray, K. K. 2012. Isolation and determination of the primary structure of a lectin protein from the serum of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161: 161-169.
- Dekker, L. J. M. 2007. Proteomics of body fluids. Gildeprint Drukkerijen, Enschede, Netherlands
- Flajnik, M. F. and L. Du Pasquier. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line. *Trends in Immunology*. 25 (12): 640-644.
- Ganz, T. and Lehrer, R. 2001. Antimicrobial peptides in innate immunity. In: *Development of novel antimicrobial agents, emerging strategies*. Horizon Scientific Press : UK, pp. 138-147.
- Garcia, J., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F., Kluver, E., Andermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R. and Forssmann, W. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB. J.* 10 : 1819-1821.
- Hartmann, R. and Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotech.* 18 : 163-169.
- Hoffman, B. F. and Binah, O. Reptilian-derived peptides for the treatment of microbial infection. *United States Patent 5380664/ International patent WO9917785*. July 1999.
- Huang, S. Y., Lin, J. H., Chen, Y. H., Chuang, C. K., Chiu, Y. F., Chen, M. Y., Chen, H. H. and Lee, W. C. 2006. Analysis of chicken serum proteome and differential protein

- expression during development in single-comb White Leghorn hens. *Proteomics* 6 : 2217-2224.
- Ji, H., Reid, G. E., Moritz, R. L., Edds, J. S., Burgess, A. W. and Simpson, R. J. 1997. A two-dimensional gel database of human colon carcinoma proteins. *Electrophoresis* 18:605-613.
- Kantor, A. B. 2002. Comprehensive phenotyping and biological marker discovery. *Dis. Marker*. 18: 91-97.
- Kommanee, J., Preecharram, S., Daduang, S., Temsiripong, Y., Dhiravisit, A., Yamada, Y and Thammasirirak, S. 2012. Antibacterial activity of plasma from crocodile (*Crocodylus siamensis*) against pathogenic bacteria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11: 22.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leelawongtawon, R., Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W. and Sattaponpan, C. 2010. Antibacterial and Antifungal Activities from Siamese Crocodile Blood. *J Med Assoc Thai* 93 (Suppl. 7) : S1-S7.
- Lista, S., Faltraco, F., Prvulovic, P. And Harald Hampe. 2013. Blood and plasma-based proteomic biomarker research in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 101 – 102: 1-17.
- Lorin, C., Saidi, H., Belaid, A., Zairi, A., Baleux, F., Hocini, H., Belec, L., Hani, K. and Tangy, F. 2005. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology* 334 : 264-275.
- Maggini, S., Wintergerst, E.S., Beveridge, S. and Hornig, D. H. 2007. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br. J. Nutr.* 98 Suppl 1: S29-35.
- Manso, M. A., Leonil, J., Jan, G. and Gagnaire, V. 2005. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. *Int.Dair.* 15 : 845-855.
- Merchant, M. E., Leger, N., Jerkins, E., Mills, K., Pallansch, M. B., Paulman, R. L. and Ptak, R. 2006. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from

- of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet Immun. Immuno.* 110 : 221-228.
- Merchant, M. E., Pallansch, M., Paulman, R. L., Wells, J. B., Nalca, A. and Ptak, R.. 2005a. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antiv. Res.* 66 : 35-38.
- Merchant, M. E., Roche, C., Elsey, R. M. and Prudhomme, J. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physio. B.* 136 : 505-513.
- Merchant, M. E., Roche, C., Thibodeaux, D. M. and Elsey, R. 2005b. Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physio. B.* 141 : 281-288.
- Merchant, M. E., Thibodeaux, D., Loubser, K. and Elsey, R. M. 2004. Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Parasit.* 90 : 1480-1483.
- Merchant, M. E., Verret, B. and Elsey, R. M. 2005c. Role of divalent metal ions in serum complement activity of the the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physio. B.* 141 : 289-293.
- Miller, I., Friedlein, A., Tsangaris, G., maris, A., Fountoulakis, M. and Gemeiner, M. 2004. The serum proteome of *Equus caballus*. *Proteomics* 4 : 3227-3234.
- Pata, S., Yaraksa, N., Daduang, S., Svasti, J., Araki, T. and Thammasirirak, S. 2011. Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrocine from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *Develop Com Immuno* 35 : 545 – 553.
- Perutz, M. F., Bauer, C., Gros, G., Leclercq, F., Vandecasserie, C., Schnek, A. G., Braunitzer, G., Friday, A. E. and Joysey, K. A. 1981. Allosteric Regulation of Crocodilian Haemoglobin. *Nature* 291, 682-684
- Petczyn'ska, E. and Libelt, K. 1999. The biological value of slaughter-animals blood. *Medycyna Weterynaryjna* 55 (9) : 600-601.
- Prajanban, B., Shawsuan, L., Daduang, S., Kommanee, J., Roytrakul, S., Dhiravisit, A. and Thammasirirak, S. 2012. Identification of five reptile egg whites protein

- using MALDI-TOF mass spectrometry and LC/MS-MS analysis. *J Proteomics* 75 : 1940 – 1959.
- Rumore, M. M. 1993. Vitamin A as an immunomodulating agent. *Clin Pharm.* 12 (7): 506-14.
- Shaharbanay, M., Gollop, N., Ravin, S., Golomb, E., Demarco, L., Ferriera, P., Boson, W. and Friedman, E. 1999. Naturally occurring antibacterial activities of avian and crocodile tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* 44 : 416-418.
- Shamova, O., Brogden, K., Zhoa, C., Nguyen, T. and Kokryako, V. L. 1999. Purification and properties of praline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocyte. *Infect. Immun.* 67 : 4106-4111.
- Simpson, R. J. *Proteins and Proteomics: A laboratory manual. Preparative two-dimension gel electrophoresis with immobilized pH gradients.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour : New York.
- Siruntawinetti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B., Tuntirungkij, M. and Temsiripong, Y. 2003. Complement Activity of Thai Freshwater Crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. In: *Proceeding of the 29th Congress on Science and Technology of Thailand.* 20-22 October, 2003. Khon Kaen.
- Siruntawinetti, J., Chaeychomsri, W., Pokharatsiri, A., Vajarasathira, B., Chitchuankij, N. and Temsiripong, Y. 2004c. Crocodile Blood as Food Supplement: Its Effects on Hematological Values in Wistar Rats. In: *Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand.* 19-21 October, 2004. Bangkok.
- Siruntawinetti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B. and Temsiripong, Y. 2005. Evidence for Primary Immune Response to *Salmonella paratyphi A* in Wistar Rats after Feeding by crocodile Blood. In: *Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand.* 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima.
- Siruntawinetti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B. and Temsiripong, Y. 2006. Development and Evaluation of Dried Siamese Crocodile Blood Product. In: *Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.* 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

- Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B., Ong-aat, T. and Y. Temsiripong. 2004a. Efficacy of Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Serum on Bacterial Growth Inhibition. In: *Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group*. 24–29 May 2004, Darwin Australia.
- Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B., Ritwichai, A., Ong-aat, T. and Temsiripong, Y. 2004b. Blood Parasites of *Crocodylus siamensis* in Thailand. In: *Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group*. 24–29 May 2004, Darwin Australia.
- Tirumalai, R. S., Chan, K. C., Prieto, D. A., Issaq H. J. and Corads, T. P. 2003. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 2: 1096-1103.
- Ward, J. B. and Anderson, R. E. 1996. Identification of needs in biomarker research. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl 5): 895-900.
- Wintergerst, E. S., Maggini, S. and Hornig, D. H. 2006. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann. Nutr. Metab.* 50 (2): 85-94.
- Yamada, M., Satoh, M., Seimiya, M., Sogawa, K., Itoga, S., Tomonaga, T. and Fumio Nomura. 2013. Combined proteomic analysis of liver tissue and serum in Chronically Alcohol-Fed Rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 37, No S1 : E79–E87.
- Yeaman, M. and Yount, N. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55 : 27-55.