

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์ ATPase

เอนไซม์ ATPase (Adenosine Triphosphatase) จัดอยู่ในกลุ่ม (Family) เอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายและสังเคราะห์ ATP ทำหน้าที่เป็นตัวขับเคลื่อนประจุ (Ion Pump) สามารถพบได้ในอาร์เคีย (Archaea) ยูแบคทีเรีย (Eubacteria) สิ่งมีชีวิตยูแคริโอตชั้นต่ำ (Simple Eukaryote) เช่น ยีสต์ เป็นต้น และสิ่งมีชีวิตยูแคริโอตชั้นสูง (Higher Eukaryote) ได้แก่ พืชและสัตว์ กลุ่มของตัวขับเคลื่อนประจุนี้สามารถแบ่งออกได้ทั้งหมด 3 กลุ่มย่อย (Sub-Family) ได้แก่ F-ATPase (ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์ ATP) V-ATPase (ทำหน้าที่เป็นตัวขับเคลื่อนโปรตอนจากกระบวนการสลาย ATP) และ A-ATPase พบในอาร์เคีย (ซึ่งอาจมีหน้าที่ในกระบวนการสลายหรือสังเคราะห์ ATP อย่างใดอย่างหนึ่ง) กลุ่มย่อยทั้ง 3 กลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กันเชิงวิวัฒนาการและเชื่อว่าทั้งสามกลุ่มมีบรรพบุรุษร่วมกัน โกการ์เทน, คีบาค, ดิททริช, เทซ, โบว์แมน, โบว์แมน, มาโนลสัน, พูล, เดท, โอชิมะ, โคโนชิ, เดนดาและโยชิคา (Gogarten, Kibak, Ditttrich, Taiz, Bowman, Bowman, Manolson, Poole, Date, Oshima, Konishi, Denda and Yoshida.1989 : 6662) เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ทั้งสามชนิดและลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแต่ละหน่วยในเอนไซม์แต่ละชนิดซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงในกระบวนการสลายและสังเคราะห์ ATP รวมทั้งการขนส่งประจุ (Ion Transport) มีความคล้ายคลึงกันอย่างมาก นอกจากนี้อาจพบเอนไซม์ A/V-ATPase ได้ในแบคทีเรียซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์ A-ATPase แต่มีหน้าที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ V-ATPase คือเป็นตัวขับเคลื่อนโปรตอนในกระบวนการสลาย ATP เท่านั้น (Wilkins, Zhang and Zheng. 2005 : 109)

2.2 เอนไซม์ V-ATPase

เอนไซม์ Vacuolar H^+ -Transporting Adenosine Triphosphatase เป็นโปรตีนเชิงซ้อน (Protein Complex) ขนาดใหญ่ที่มีหลายหน่วยย่อย พบได้ในระบบเยื่อหุ้มภายในเซลล์ (Endomembrane System) ของสิ่งมีชีวิตยูแคริโอต และในเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโพรแคริโอต การทำหน้าที่ของเอนไซม์ V-ATPase ในการขับเคลื่อนโปรตอนมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการต่างๆ ทั้งภายในเซลล์และระหว่างเซลล์ที่มีชีวิต นิชิและฟอร์แกค (Nishi and Forgac.

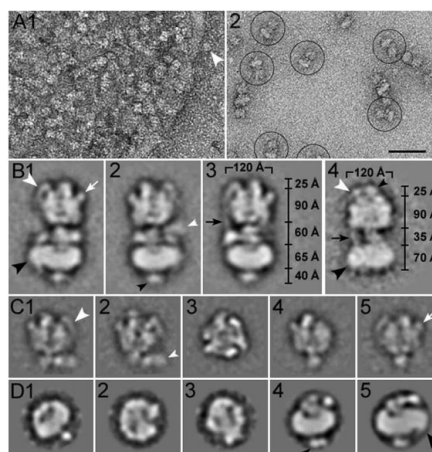
2002 : 94-103) ประกอบด้วยการนำสารเข้าสู่เซลล์โดยอาศัย Receptor-Mediated Endocytosis การรักษาความเป็นกรดด่าง (pH Maintenance) การเก็บสารตัวกลาง (Metabolite) ต่างๆ และการหลั่งสารสื่อประสาท (Neurotransmitter Release) (Futai, Oka, Sun-Wada, Moriyama, Kanazawa and Wada. 2000 : 107-116)

2.3 โครงสร้างของเอนไซม์ V-ATPase

ภาพถ่ายเอนไซม์ V-ATPase จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ภาพที่ 1) และการใช้คอมพิวเตอร์ช่วยในการวิเคราะห์ภาพโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ศึกษาทางด้านชีวเคมีรวมทั้งความคล้ายคลึงกันกับเอนไซม์ F-ATPase ทำให้สามารถสร้างแบบจำลองโครงสร้างของเอนไซม์ V-ATPase ได้ โดยพบว่าโครงสร้างโดยรวมมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของเอนไซม์ F-ATPase คือมีตำแหน่งที่อยู่ภายนอกเยื่อหุ้ม เรียกว่า V_1 และตำแหน่งที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้ม เรียกว่า V_0 ทั้งสองตำแหน่งเชื่อมต่อกันโดย Stalk ซึ่งประกอบด้วยโพลีเปปไทด์จำนวนมาก (Wilkins, Zhang and Zheng. 2005 : 109-126) (ภาพที่ 2)

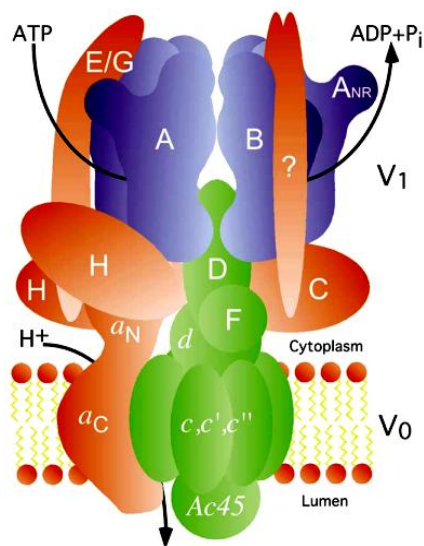
เอนไซม์ V-ATPase มีหน่วยย่อย (Subunit) อย่างน้อย 13 หน่วยที่แตกต่างกันและมีมวลโมเลกุลสัมพัทธ์ (Relative Molecular Mass) อยู่ในช่วง 12-100 kDa ในตำแหน่ง V_1 ประกอบด้วยหน่วยย่อย 8 หน่วย ได้แก่ A, B, C, D, E, F, G และ H ทำหน้าที่หลักในกระบวนการสลาย ATP ส่วนตำแหน่ง V_0 ประกอบด้วยหน่วยย่อยอีก 5 หน่วย ได้แก่ a, c, c', c'' และ d ทำหน้าที่ในกระบวนการเคลื่อนย้ายโปรตอน (Proton Transport) กาซิโอลา, ปาล์มเกรนและชูมาเชอร์ (Gaxiola, Palmgren and Schumacher. 2007: 2204-2214) ในสิ่งมีชีวิตยูแคริโอตทุกชนิดมีโครงสร้างและหน้าที่ของหน่วยย่อยเหล่านี้คล้ายคลึงกัน มวลโมเลกุลทั้งหมดของสารเชิงซ้อนนี้มีค่าประมาณ 900 kDa โดยสัดส่วนของหน่วยย่อยแต่ละหน่วยในเอนไซม์ V-ATPase จาก Clathrin Coated Vesicle ของสมองวัว พบว่า ตำแหน่ง V_1 มีสัดส่วนเป็น $A_3B_3CDEFG_2H_2$ และตำแหน่ง V_0 มีสัดส่วนเป็น $a(c, c')_{4-5} c''d$ (Xu, Vasilyeva and Forgac. 1999 : 28909-28915)

นอกจากนี้ตำแหน่ง V_0 มีส่วนที่เรียกว่า Ac45 (ภาพที่ 3) ซึ่งพบได้ในเอนไซม์ในเนื้อเยื่อบางชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Supek, Supekova, Mandiyan, Pan, Nelson and Nelson., 1994:24103)



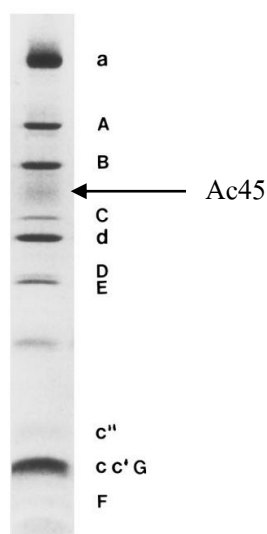
ภาพที่ 1 เอนไซม์ V-ATPase ของสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
 (A1) แวคิวโอลของยีสต์ (A2)V-ATPase จากสมองวัวในสารซักฟอก (B1-3)
 V-ATPase จากสมองวัว (B4) F_1F_0 – ATP Synthase จาก *E.coli* (C) V_1 -ATPase
 ของยีสต์ (D) V_0 -ATPase ของวัว

(ที่มา : Wilkens, Zhang and Zheng. 2005 : 115)



ภาพที่ 2 แบบจำลองโครงสร้างของ V-ATPase

(ที่มา : Wilkens, Zhang and Zheng. 2005 : 112)



ภาพที่ 3 องค์ประกอบของเอนไซม์ V-ATPase แยกจาก Bovine Chromaffin Granule ด้วยเทคนิค Electrophoresis บนเจล Polyacrylamide ย้อมด้วย Coomassie Blue (หน่วยย่อย Ac45 ปรากฏเป็นแถบสีจางอยู่ระหว่างหน่วยย่อย B และ C)
(ที่มา : Nelson and Harvey. 1999 : 370)

2.4 กลไกการทำงานของเอนไซม์ V-ATPase

เอนไซม์ V-ATPase ประกอบด้วยตำแหน่ง V_1 ซึ่งมีหน่วยย่อย 8 หน่วย และตำแหน่ง V_0 ซึ่งมีหน่วยย่อย 5 หน่วย (ตารางที่ 1) ได้แก่

2.4.1 หน่วยย่อยของตำแหน่ง V_1

ตำแหน่ง V_1 มีหน่วยย่อยที่สำคัญ ได้แก่ A, B, C, D, E, F, G และ H มีลักษณะที่สำคัญ ดังนี้

2.4.1.1 หน่วยย่อย A

หน่วยย่อย A ของเอนไซม์ V-ATPase ในพืชมีลำดับเหมือนกันกับหน่วยย่อย β ของเอนไซม์ F-ATPase อย่างมาก มวลโมเลกุลซึ่งคำนวณจากลำดับกรดอะมิโนมีค่าอยู่ในช่วง 68.5 – 68.8 kDa แล้วแต่ชนิดของพืช จากการศึกษายีน *VMA1* ในยีสต์พบว่ามีลำดับเบสคล้ายคลึงกันกับหน่วยย่อย A ของเอนไซม์ V-ATPase ถ้าหาก Nucleotide-Binding Site ของหน่วยย่อย A จับกับ 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole (NBD-Cl), *N*-Ethylmaleimide (NEM) หรือ Fluorescein-5'-Isothiocyanate (FITC) แล้ว เอนไซม์ V-ATPase จะถูกยับยั้งกิจกรรมใน

กระบวนการสลาย ATP ดังนั้นหน่วยย่อย A จึงเป็นเสมือน Catalytic Subunit ของเอนไซม์ V-ATPase

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของหน่วยย่อยในเอนไซม์ V-ATPase

หน่วยย่อย	ยีนในยีสต์	หน้าที่	มวลโมเลกุล (kDa)		
			ยีสต์	Coated Vesicle	<i>Arabidopsis</i>
A	<i>VMA1</i>	Catalytic ATP-Binding	68	68	68
B	<i>VMA2</i>	Non-Catalytic ATP-Binding	58	57	54
C	<i>VMA5</i>	V ₁ Stability, Activity	44	44	42
D	<i>VMA8</i>	Central Stalk, Coupling	29	28	29
E	<i>VMA4</i>	Peripheral or Central Stalk	26	26	26
F	<i>VMA7</i>	Bridge V ₁ -V ₀ Contacts	13	13	14
G	<i>VMA10</i>	Coupling V ₁ and V ₀	13	14	12
H	<i>VMA13</i>	Regulatory	54	54	50
a	<i>VPH1/STV1</i>	Coupling, assembly	96	96	89-95
c	<i>VMA3</i>	Proton Translocation	16	16	16
c'	<i>VMA11</i>	Proton Translocation	17	17	-
c''	<i>VMA16</i>	Proteolipid Similar to c	23	19	18
M9, e	<i>VMA9</i>	-	9	-	~8
d	<i>VMA6</i>	V ₀ Assembly, Stability	40	38	40
Ac45		-	-	45	-

(ที่มา: Sze, Schumacher, Müller, Padmanaban and Taiz. 2002: 157-161)

2.4.1.2 หน่วยย่อย B

หน่วยย่อย B ของเอนไซม์ V-ATPase ในพืชมีลำดับเหมือนกันกับหน่วยย่อย β ของเอนไซม์ F-ATPase มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 53.7 – 54.7 kDa จากการศึกษาใน *VMA2* ในยีสต์พบว่ามีลำดับเบสคล้ายกับหน่วยย่อย B ของเอนไซม์ V-ATPase ถ้าหาก Nucleotide-Binding Site ของหน่วยย่อย B จับกับ 3-*O*-(5-Benzoyl) Benzoyl-adenosine-5'-Triphosphate (BzATP) แล้วไม่มีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ V-ATPase ในกระบวนการสลาย ATP เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าหน่วยย่อย B เป็น Non-Catalytic Subunit ของเอนไซม์ V-ATPase

2.4.1.3 หน่วยย่อย C

หน่วยย่อย C มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 37-52 kDa ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด แต่อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Stabilization ของตำแหน่ง V_1 จากการโคลนหน่วยย่อย C ของเอนไซม์ V-ATPase ใน *Hordeum vulgare* และ *Arabidopsis thaliana* แสดงให้เห็นว่ามีลำดับเบสเหมือนกันกับยีน *VMA5* ในยีสต์

2.4.1.4 หน่วยย่อย D

จากการโคลนหน่วยย่อย D ของเอนไซม์ V-ATPase ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *VMA8* ใน *Arabidopsis thaliana* พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 29.1 kDa และจากการวิเคราะห์หน่วยย่อย D พบว่ามีโครงสร้างที่คล้ายกับหน่วยย่อย γ ของเอนไซม์ F-ATPase ดังนั้นหน่วยย่อย D อาจเกี่ยวข้องกับการเชื่อมต่อกันระหว่างตำแหน่ง V_0 กับหน่วยย่อยส่วนหัวของตำแหน่ง V_1 และอาจมีส่วนร่วมในการควบคู่ (Coupling) ของปฏิกิริยาการสลาย ATP และการขนส่งโปรตอน

2.4.1.5 หน่วยย่อย E

จากการโคลนหน่วยย่อย E จากพืชหลายชนิด พบว่ามีลำดับเบสคล้ายคลึงกันกับยีน *VMA4* ในยีสต์ มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 26.2 – 27.1 kDa แล้วแต่ชนิดของพืช ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด

2.4.1.6 หน่วยย่อย F

จากการศึกษาพบว่ามีลำดับเบสคล้ายคลึงกันกับยีน *VMA7* ของยีสต์ โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 13 kDa แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามจากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ V-ATPase โดย Antibody ที่จำเพาะกับหน่วยย่อย F บ่งชี้ได้ว่าหน่วยย่อยนี้มีความคล้ายคลึงกันกับหน่วยย่อย δ ของเอนไซม์ F-ATPase

2.4.1.7 หน่วยย่อย G

จากการโคลนหน่วยย่อย G ของเอนไซม์ V-ATPase ในพืช 2 ชนิด ซึ่งมีลำดับเบสคล้ายคลึงกันกับยีน *VMA10* ของยีสต์ พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 12.5 kDa หน่วยย่อย G

มีลำดับคล้ายกันกับหน่วยย่อย b ของเอนไซม์ F-ATPase ถึงแม้จะมีลำดับสั้นกว่าและไม่มี Transmembrane Domain ตรงตำแหน่ง N-terminus ที่ชัดเจน ถ้าเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับ F-ATPase หน่วยย่อย G จัดเป็นหน่วยย่อยที่ดีสำหรับตำแหน่งแกนของเอนไซม์ V-ATPase ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมของปฏิกิริยาการสลาย ATP และการขนส่งโปรตอน

2.4.1.8 หน่วยย่อย H

จากการศึกษาหน่วยย่อย H ใน Clathrin-Coated Vesicle พบว่ามีลำดับเบสคล้ายคลึงกับยีน *VMA13* ในยีสต์ ทำหน้าที่ในการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์และการสื่อสารระหว่างเอนไซม์กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์

2.4.2 หน่วยย่อยตำแหน่ง V_0

ตำแหน่ง V_0 มีหน่วยย่อย 5 หน่วย ได้แก่ a, c, c', c'' และ d มีลักษณะสำคัญ ดังนี้

2.4.2.1 หน่วยย่อย a

หน่วยย่อย a มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 95 – 115 kDa ประกอบด้วย NH₂-Terminal Hydrophilic Domain (a₁) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 kDa และ COOH-Terminal Hydrophobic Domain ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 kDa จากการศึกษหน่วยย่อย a ยังไม่สามารถระบุได้ว่ามีลำดับเบสสอดคล้องกันกับยีน *VP1* และ *STV1* ในยีสต์ เนื่องจากมีลำดับเบสที่ไม่คล้ายคลึงกันกับยีนของเอนไซม์ F-ATPase หน้าที่ของหน่วยย่อยนี้อาจเกี่ยวข้องกับการประกอบตัวของเอนไซม์ V-ATPase (V-ATPase Assembly) หรือการสร้างเป้าหมาย (Targeting) ของเอนไซม์ V-ATPase ไปยังแวคิวโอล

2.4.2.2 หน่วยย่อย c

จากการศึกษายีนหน่วยย่อย c ของเอนไซม์ V-ATPase ในต่อมหมวกไตส่วนกลางของวัว (Bovine Adrenal Medulla) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 16 kDa มีลำดับเบสของยีนคล้ายคลึงกับยีน *VMA3* ในยีสต์ และหน่วยย่อย c ของเอนไซม์ F-ATPase จัดเป็นองค์ประกอบหลักของตำแหน่ง V_0 ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการขนส่งโปรตอน

2.4.2.3 หน่วยย่อย c' และ c''

จัดเป็น Proteolipid ของเอนไซม์ V-ATPase จากการศึกษเอนไซม์ V-ATPase ในยีสต์ พบว่ายีน *VMA11* และ *VMA16* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Proteolipid ดังกล่าวตามลำดับ Proteolipid เหล่านี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายโปรตอน (Proton Translocation)

2.4.2.4 หน่วยย่อย d

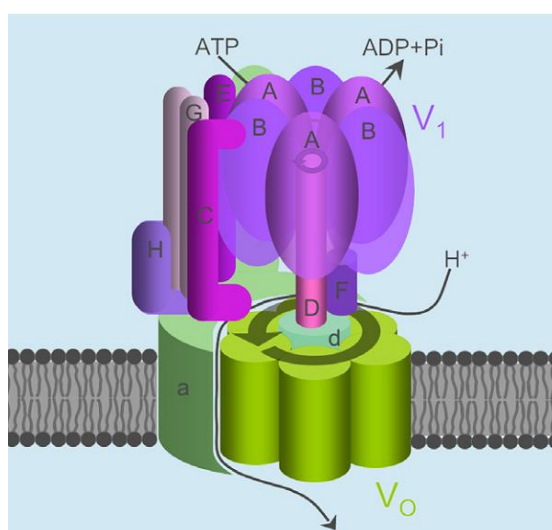
หน่วยย่อย d มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 32 – 36 kDa เป็นองค์ประกอบของตำแหน่ง V_0 ของเอนไซม์ V-ATPase ในพืชหลายชนิด มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันกับยีน *VM46* ในยีสต์ ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด

จากการศึกษาโดยเทคนิคการติดฉลาก (Labeling) การเปลี่ยนแปลงยีน (Mutagenesis) และการศึกษาแบบจำลอง (Modeling Study) ของเอนไซม์ V-ATPase พบว่าการจับของ ATP (ATP-Binding) การเกิดปฏิกิริยา Catalysis และการทำหน้าที่ร่วมกัน (Cooperativity) ของแต่ละหน่วยย่อยมีกลไกคล้ายกับในเอนไซม์ F-ATPase อย่างไรก็ตามเอนไซม์ F-ATPase ทำหน้าที่เกี่ยวข้องทั้งในกระบวนการสังเคราะห์และสลาย ATP ซึ่งจะไปขับเคลื่อนโปรตอนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ในขณะที่เอนไซม์ V-ATPase ทำหน้าที่เกี่ยวข้องเฉพาะกระบวนการสลาย ATP เท่านั้น (MacLeod, Vasilyeva, Merdek, Vogel and Forgac., 1999: 32872)

จากแบบจำลองกลไกที่เกิดขึ้นของการทำหน้าที่ของเอนไซม์ V-ATPase (ภาพที่ 4) พบว่าพลังงานอิสระจากกระบวนการสลาย ATP ซึ่งเกิดขึ้นที่หน่วยย่อย A บนตำแหน่ง V_1 จะผลักดันให้เกิดการหมุนของ Rotor Domain ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย D และ F รวมทั้งหน่วยย่อย d และ Proteolipid Ring (c, c', c'') ส่วนการเคลื่อนย้ายโปรตอนเกิดขึ้นบริเวณร่วมระหว่างเชือกหุ้มในหน่วยย่อย a บนตำแหน่ง V_0 และ Side Chain ของกรดกลูตามิกในหน่วยย่อย c, c' และ c'' สำหรับการหมุนของ Rotor Domain ในระหว่างการทำงานของเอนไซม์ V-ATPase มีลักษณะคล้ายคลึงกับส่วนขับเคลื่อน (Motor) ของเอนไซม์ F-ATPase โดยจะถูกขัดขวางด้วย Stalk Domain รอบนอกซึ่งเชื่อมต่อกับตำแหน่ง V_1 กับเชือกหุ้ม ปัจจุบันเชื่อว่าตำแหน่งนี้เกิดจากหน่วยย่อย C, E, G และ H ของตำแหน่ง V_1 และหน่วยย่อย a ของตำแหน่ง V_0

เอนไซม์ V-ATPase มี Ion Binding Site อยู่บน Proteolipid Ring 5-7 ตำแหน่ง ในขณะที่เอนไซม์ F-ATPase มีอยู่ 10-14 ตำแหน่ง ดังนั้นจำนวนประจุที่ถูกขับเคลื่อนต่อกระบวนการสลาย ATP ของเอนไซม์ V-ATPase จึงอยู่ที่ประมาณ 2 ประจุ และของเอนไซม์ F-ATPase อยู่ที่ 4 ประจุ การขับเคลื่อนโปรตอนของเอนไซม์ V-ATPase อาจสิ้นเปลืองมากกว่า แต่ในทางกลับกันเอนไซม์ V-ATPase ก็สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วง Gradient ที่กว้างขึ้น โดยพบว่าเมื่อค่าเฉลี่ย pH Gradient ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ V-ATPase อยู่ระหว่าง 1-2 เช่น ในส่วนของแควิวโอลของ *Neurospora* (pH ในแควิวโอล เท่ากับ 6 และ pH ในไซโทพลาซึม เท่ากับ 7.2) สามารถวัดค่า Gradient ที่สูงขึ้นในบางระบบ หรือในทางเดินอาหารของตัวอ่อน *Manduca sexta* ซึ่งเลี้ยงไว้พบว่าตัวขับเคลื่อนโปรตอนในแควิวโอลร่วมกับ H^+/K^+ Antiporter นำไปสู่การสร้างน้ำย่อย ซึ่งมี pH ประมาณ 12 ซึ่งจัดว่าเป็นค่าที่สูงที่สุดค่าหนึ่งที่วัดได้ในสิ่งมีชีวิต ในทางกลับกันพบว่า

เอนไซม์ V-ATPase ร่วมกับ V-PPase ในสั้ม สามารถลดค่า pH ของแวคิวโอลลงถึง 2.2 นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ V-ATPase ในเซลล์บางชนิดทำให้ความเข้มข้นของ H^+ สูงขึ้นถึง 0.8 mol/l (สอดคล้องกับค่า pH 0.1) ดังนั้นช่วงที่เอนไซม์ V-ATPase สามารถทำงานได้จึงขยายมากเกือบถึง 12 ชั้นของความเข้มข้นของโปรตอน (Wilkins, Zhang and Zheng. 2005 : 109)



ภาพที่ 4 แบบจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์ V-ATPase
(ที่มา : Gaxiola, Palmgren and Schumacher. 2007: 2208)

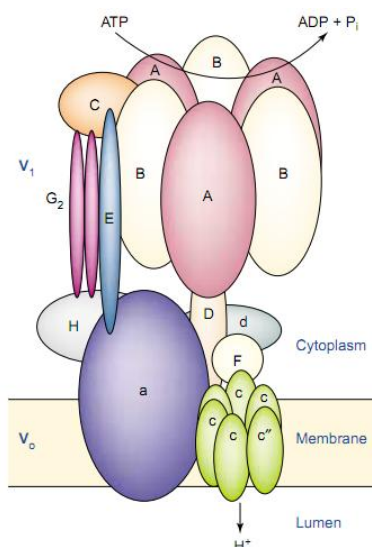
2.5 เอนไซม์ V-ATPase ในสัตว์

ในสิ่งมีชีวิตยูแคริโอตชั้นสูงสามารถพบเอนไซม์ V-ATPase ได้ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีขั้ว เช่น เซลล์ทำลายกระดูก (Osteoclast) เซลล์เยื่อบุผิวไต (Renal Epithelial Cell) เซลล์เยื่อบุผิวแมลง (Insect Epithelial Cell) เซลล์ผิวหนังของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Amphibian Skin Cell) เป็นต้น โดยจะทำหน้าที่ขับเคลื่อนโปรตอนออกภายนอกเซลล์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ช่องว่างระหว่างผิวกระดูก (Bone Surface) และเยื่อหุ้มเซลล์ทำลายกระดูกมีความเป็นกรดสูงขึ้น ซึ่งจัดเป็นกลไกสำคัญในการสลายกระดูกเก่าและการสร้างกระดูกใหม่ (Bone Remodeling) นอกจากนี้เอนไซม์ V-ATPase ในเยื่อหุ้มของ Renal Intercalated Cell ยังทำหน้าที่ลดความเป็นกรดในเลือดได้อีกด้วย สำหรับกรณีที่ขาดเอนไซม์ V-ATPase ในเซลล์ทำลายกระดูกอาจทำให้เกิดภาวะ Osteoporosis หรือในไตอาจทำให้เกิดภาวะ Renal Tubular Acidosis ได้ เนลสันและฮาร์วีย์ (Nelson and Harvey. 1999 : 361-379)

2.6 เอนไซม์ V-ATPase ในพืช

การเจริญเติบโตของพืชขึ้นอยู่กับกระบวนการนำเข้า (Uptake) การเคลื่อนย้าย (Translocation) และการแยกประเภท (Sorting) สารอาหารที่จำเป็นรวมทั้งสารตัวกลางต่างๆ ไปยังอวัยวะ เซลล์ และองค์ประกอบที่เป็นหน่วยย่อยของเซลล์ที่จำเพาะต่างๆ นอกจากนี้เพื่อการอยู่รอดของพืชแล้ว พืชจำเป็นต้องปรับตัวให้ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม เช่น โลหะที่เป็นพิษ หรือปริมาณเกลือที่สูงเกินไป เป็นต้น ถ้าหากไม่มีแรงขับเคลื่อนโปรตอนปฐมภูมิ (Primary Proton Motive Force) กระตุ้นตัวพาควบคู่ (Coupled Carriers) หรือช่องประจุ (Ion Channel) แล้ว การขนส่งสารรวมทั้งการมีชีวิตของเซลล์ก็จะสิ้นสุดลงทันที อย่างไรก็ตามยังไม่มีความเข้าใจว่าตัวขับเคลื่อนโปรตอนมีการรวมตัวเป็นเครือข่ายในการส่งสัญญาณ (Signal Transduction Network) เพื่อควบคุมการเติบโตและการปรับตัวได้อย่างไร จากความสำเร็จในการศึกษาจีโนมของ *Arabidopsis thaliana* ทำให้ทราบว่าตัวขับเคลื่อนโปรตอนที่มีอยู่จำนวนมากนั้นมีความจำเป็นสำหรับวัฏจักรชีวิตของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงอย่างยิ่ง และจากการศึกษาตัวขับเคลื่อนโปรตอนในพืช พบว่าเอนไซม์ V-ATPase (ภาพที่ 5) เป็นตัวหนึ่งที่มีองค์ประกอบซับซ้อนที่สุด (Sze et al. 2002 : 157-161)

ในพืชสามารถพบเอนไซม์ V-ATPase ได้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โทโนพลาสต์ของแวคิวโอล และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ต่างๆ ได้แก่ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER) กอลจิบอดี แวกิวโอลขนาดเล็ก และเวซิเคิล (Vesicle) หน้าที่หลักของเอนไซม์ V-ATPase คือการขับเคลื่อนโปรตอนออกนอกเซลล์ บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และขับเคลื่อนโปรตอนเข้าสู่แวคิวโอลและออร์แกเนลล์ (Organelle) อื่นๆ ทำให้ภายในออร์แกเนลล์เหล่านั้นมีความเป็นกรดสูงขึ้น จึงเกิดพลังงานสำหรับใช้ขนส่งประจุ (เช่น Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+} เป็นต้น) และสารตัวกลางต่างๆ (เช่น กลูโคส Malate^{2-} เป็นต้น) ผ่านเข้าออกภายในออร์แกเนลล์ ค่า pH ระดับประจุและศักย์ออสโมติก (Osmotic Potential) ภายในจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงและส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น กระบวนการคัดแยกโปรตีน (Protein Sorting) การเติบโต (Growth) และการส่งสัญญาณของเซลล์คุม (Guard Cell Signaling) เป็นต้น (Martinolia, Maeshima and Neuhaus. 2007 : 83-102)



ภาพที่ 5 แบบจำลองโครงสร้างของ V-ATPase ในพืช
(ที่มา : Sze, et al. 2002 : 159)

2.7 V-ATPase Subunit G

Subunit G ของ V-ATPase เป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างโดเมน V0 และ V1 รอคิว, ทัวร์แนร์, สปอนนาสกี, โรสซิกโนลและโดวมัส (Rouquie, Tournaire, Szponarski, Rossignol and Doumas. 1998 : 287-292)โคลน Subunit G ของเอนไซม์ V-ATPase ในยาสูบ ซึ่งมีลำดับเบสคล้ายคลึงกันกับ ยีน *VMA10* ของยีสต์ พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 12.5 กิโลดาลตัน subunit G มีลำดับคล้ายคลึงกับ Subunit b ของเอนไซม์ F-ATPase ถ้าเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับ F-ATPase subunit G จัดเป็นหน่วยย่อยที่สำคัญสำหรับตำแหน่ง Stalk ของเอนไซม์ V-ATPase ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมของปฏิกิริยาการสลาย ATP และการขนส่งโปรตอน Sze, et al. (2002 : 157-161) ศึกษาในยีนที่ Encode ให้โปรตีน V-ATPase ของแต่ละหน่วยย่อยใน *Arabidopsis thaliana* ซึ่ง Subunit G มี 3 subunit คือ G1 G2 และ G3 โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 12,396 11,741 และ 12,115 ดาลตันตามลำดับ ซึ่งยีนที่ Encode ให้ Subunit G1 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3 และยีนที่ Encode ให้ Subunit G2 G3 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ของ *Arabidopsis thaliana*

Pluang Suwanmanee, Wanphen Nanthanuwat and Waraporn Kun-ngeon (2013: 181-182) วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *V-ATPase G Subunit* ในยางพาราพบว่า มีขนาด 642 คู่เบส (ภาพที่ 6)ส่วนของ 5'-Untranslate Region มีขนาด 102 คู่เบส ส่วนของ Coding Region มีขนาด 330 คู่เบสและ ส่วนของ 3'-Untranslate Region มีขนาด 210 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน

โน 110 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุล 12.35 กิโลดาลตัน (kDa) และค่า pI (Isoelectric point) 6.38 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *HbV-ATPase Subunit G* กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ พบว่า ส่วน N-Terminal ของโปรตีน *V-ATPase Subunit G* มี Conserved Amino Acid มากกว่าส่วนของ C-Terminal (ภาพที่ 7) และโครงสร้างสามมิติของโปรตีน *HbV-ATPase Subunit G* มีค่า Identity 30.77 % กับ *V-ATPase* จากยีสต์ (ภาพที่ 8)

จากการโคลนยีน *V-ATPase Subunit G* จากใบยาสูบเข้าสู่ pET-3c แล้วถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* BL21 (DE3) โดยเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.4 mM แล้วทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งโปรตีนที่เตรียมได้มีขนาด 13 kDa จากนั้นนำโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ไปผสมกับ Freund's Adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย เป็นเวลา 1 -2 เดือนและทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค Western Blot พบว่า มีการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อโปรตีน *V-ATPase Subunit G* ของโทโนพลาสติก (Rouquié, Tournaire-Roux, Szponarski, Rossignol and Doumas. 1998: 287-292)

```

5'-ctaatacgactcactatagggcaagcagtggtatcaacgcag 42
agtacgcggggagatctttgaacccaacacaaatccgcttcttttagaaattcctggaaga 102
atg gattccaacaggggtcagaatggaattcaactcctgctagctgcagaacaggaagct 162
M D S N R G Q N G I Q L L L A A E Q E A
Cagcacattgtcaatgctgctaggaatgcaaaatggctagattgaaacaggccaaggaa 222
Q H I V N A A R N A K M A R L K Q A K E
Gaggctgaaaaggatattgctgaattccgtgcccataatggaagctgagttccagaggaag 282
E A E K D I A E F R A H M E A E F Q R K
Gttgcagagagtagcggggactctggtgctaatgtgaagcggcttgagcaagaaacggag 342
V A E S S G D S G A N V K R L E Q E T E
Gcaaagattcatcacctcgagatagaggcagcaagaatatctcacgatgtggtacatatg 402
A K I H H L E I E A A R I S H D V V H M
cttctgaagcatgtgactacagtgaagaac tag gaccttgctagcctaagacagcaaacg 462
L L K H V T T V K N -
Cttttaaacgctatttttctgcatgtgccattttgatttgaaattggtgtggtggcttggt 522
Gagagtgcattgtattacagttttctctagtaatatattataattgtattgtttgattatg 582
ttcctttaagaaataaattagccctaacattatacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 642

```

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *V-ATPase Subunit G* จากยางพารา (ลำดับกรดอะมิโนอยู่ล่่างลำดับนิวคลีโอไทด์) และตำแหน่ง Polyadenylation Site (ขีดเส้นใต้)

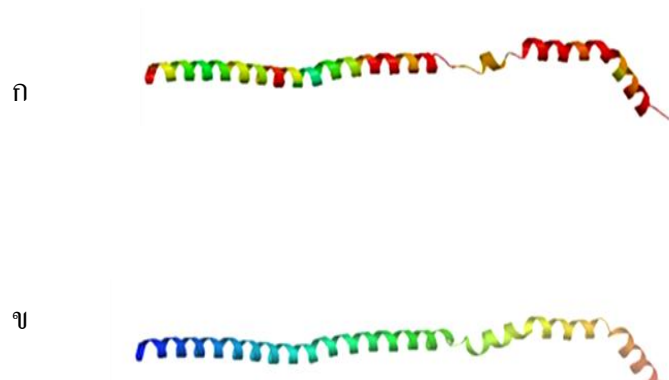
(ที่มา : Pluang Suwanmanee, Wanphen Nanthanuwat and Waraporn Kun-ngeon. 2013:182)

Jatropha	MDANRGQNGI	QLLLAAEQEA	QHIVNAARSA	KMARLKQAKE	EAEKDIAEFR	AHVEAQFQRK	60
Ricinus	MDSNRGQNGI	QLLLAAEQEA	QHIVNAARSQ	KMARLKQAKE	EAEKDIAEFR	AHMEAEFQRK	60
Populus	MEANRGQNGI	QLLLAAEQEA	QHIVNAARNE	KMARLKQAKE	EADKEIAEFR	AQMEAEFQRK	60
Vitis	MESSRGPGGI	QQLLAAEQEA	QHIVNAARSA	KMARLKQAKE	EAEKEIAAYR	AQVELEFQKK	60
Hevea	MDSNRGQNGI	QLLLAAEQEA	QHIVNAARNA	KMARLKQAKE	EAEKDIAEFR	AHMEAEFQRK	60
Nicotiana	MASSSGQNGI	QLLLAAEQEA	QHIVNARTAA	KQARLKQAKE	EAEKEIAEFR	AYMEAEFQRK	60
Rattus	MASQS--QGI	QQLLQAEKRA	AEKVADARKR	KARRLKQAKE	EAEQMEVEQYR	REREQEFQSK	58
Manduca	MASQT--HGI	QQLLAAEKRA	AEKVSEARKR	KAKRLKQAKE	EAEQDEVEKYR	QERERQFKEF	58
Saccharomy	--MSQKNST	ATLLQAEKEA	HEIVSKARKY	RQDKLKQAKT	DAAKEIDSYSK	IQDKDELKEF	57

Jatropha	VAESSGDSGA	NVKRLEQETE	TKIHHLKTEA	SRISHDVMHM	LLKHVTTVKN	-----	110
Ricinus	VAESSGDSGA	NVKRLEQETD	TKIHHLKIEA	SRISYDVMQM	LLKHVTSVKN	-----	110
Populus	LAESSGDSGA	NVKRLEQETE	AKIGHLKKEA	ARISHDVMQM	LLKHVTTVKN	-----	110
Vitis	LAESSGDSGA	NVKRLEQETQ	AKIHHLKTEA	GRISHDVMHM	LLKHVTTVKN	-----	110
Hevea	VAESSGDSGA	NVKRLEQETE	AKIHHLKIEA	ARISHDVMHM	LLKHVTTVKN	-----	110
Nicotiana	LEQTSGDSGA	NVKRLEQETD	AKIEHLKTEA	ERVSPDVMQM	LLRHVTTVKN	-----	110
Rattus	QQAAMGSQGN	LSAEVEQATR	RQVQGMQSSQ	QRNRERMLTQ	LLGMVCDVRP	QVHPNYRITV	118
Manduca	EAKHMGTRG	VAAKIDAETR	IKIDEMNKMV	QTQKEAVIKD	VLNLVYDIKP	ELHINRNVV-	117
Saccharomy	EQKNAGVGGE	LEKKAEAGVQ	GELAEIKKIA	EKKKDDVMKI	LIETVLIKPSA	EVHINAL---	114

ภาพที่ 7 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *V-ATPase Subunit G* กับ *Jatropha* , *Ricinus*, *Populus*, *Vitis*, *Nicotiana*, *Rattus*, *Manduca* and *Saccharomyces*

(ที่มา : Pluang Suwanmanee, Wanphen Nanthanuwat and Waraporn Kun-ngeon. 2013:182)



ภาพที่ 8 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน V-ATPase Subunit G ก. ยางพารา ข. ยีสต์

(ที่มา : Pluang Suwanmanee, Wanphen Nanthanuwat and Waraporn Kun-ngeon. 2013: 182)

2.8 เทคนิค Electrophoresis

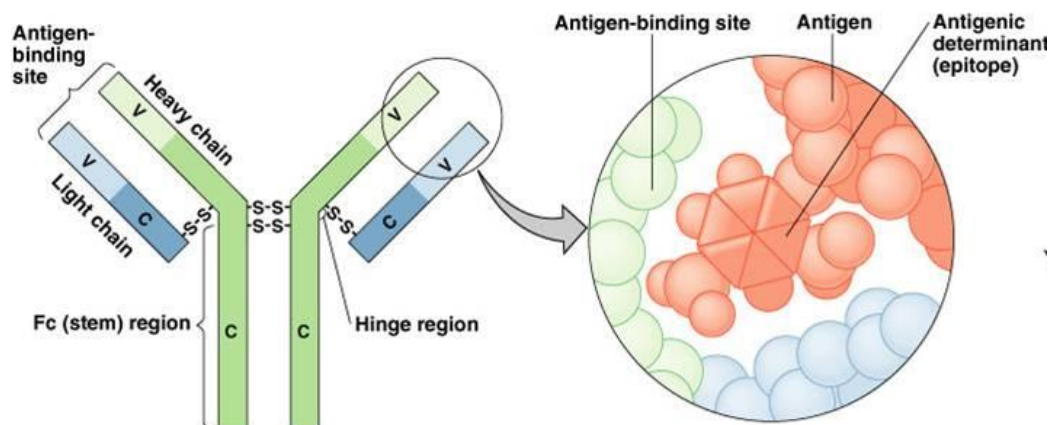
ในการวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของโปรตีนมีความสำคัญต่อการผลิตวัคซีน เนื่องจากต้องมีการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนในขั้นตอนการแยกสกัด วิธีการวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของโปรตีน คือ วิธี Electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและมีความไวสูง เป็นการแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าเพื่อเปรียบเทียบและวิเคราะห์รูปแบบของตัวอย่างโปรตีน ที่มาจากแหล่งต่างๆ ตรวจสอบความผิดปกติของโปรตีนที่อาจเกิดจากการผ่าเหล่า การแยะและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนวิทยาภูมิคุ้มกัน และตรวจหาขนาดของโปรตีน สำหรับในการวิจัยครั้งนี้จะกล่าวถึง Sodium Dodecyl Sulfate–Poly Acrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE) เป็นการแยกโปรตีนโดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์จะเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกันของโมเลกุลเดี่ยว(Monomer) ของอะคริลาไมด์ จนได้เป็นสายโซ่ยาวและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์(Covalent Bond) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ คือ N, N-Methylene Bisacrylamide ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Ammonium Persulfate และ N, N, N', N'-Tetramethylene Diamine (TEMED) จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจาก Persulfate ทำให้เกิด Polymerization ขึ้น จากปฏิกิริยานี้ทำให้โครงสร้างมีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งรูพรุนของเจลโพลีอะคริลาไมด์ นี้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ ในส่วนผสมของเจล ถ้าอะคริลาไมด์มีความเข้มข้นต่ำ ขนาดรูพรุนจะใหญ่ ซึ่งเหมาะแก่การแยกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ เจลโพลีอะคริลาไมด์ให้สูงขึ้นขนาดรูพรุนจะเล็กลงเหมาะแก่การแยกโปรตีนขนาดเล็ก การแยกโปรตีนส่วนใหญ่ใช้เจลที่มีความเข้มข้นของ อะคริลาไมด์อยู่ในช่วงร้อยละ 5-15 ในการแยกโปรตีนด้วย อะคริลาไมด์มี 2 ประเภท คือ ประเภทที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (Non-Denaturing Gel หรือ Native Gel Electrophoresis) วิธีนี้โปรตีนจะอยู่ในสภาพธรรมชาติ โปรตีนที่แยกมาได้สามารถนำไปตรวจหา Activity ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปร่าง ขนาด หรือประจุของโปรตีนได้ และประเภทที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ โปรตีนที่แยกได้ไม่สามารถนำมาทดสอบหา Activity ได้ แต่บอกน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ต่างกันได้ วิธีนี้จึงนำมาใช้ในการตรวจหาความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีน รวมทั้งสามารถนำไปตรวจหาคุณสมบัติของโปรตีนทางอิมมูโนวิทยา โดยวิธีการทำ Western Blot สำหรับการแยกโปรตีนในวิธีนี้ได้แก่ SDS-PAGE ซึ่ง SDS เป็นสาร Detergent ทำให้โปรตีนเสียสภาพเปลี่ยนสภาพจากทรงกลม (Globular) ไปอยู่ในสภาพเหยียตรง โดย SDS มีประจุเป็นลบจะไปเกาะกับโปรตีน ทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ ซึ่ง SDS จะจับกับโปรตีนในอัตราส่วนน้ำหนักคงที่ (1.4 กรัมของ SDS ต่อโพลีเพปไทด์ 1 กรัม) ทำให้โปรตีนทุกชนิดมีค่าความหนาแน่นของประจุน้ำหนักโปรตีนเท่ากัน ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนจึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล โดยจะเป็นการเคลื่อนที่จากขั้วไฟฟ้าลบไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกในอัตราส่วนผกผันกับ

ค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้ จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว นอกจากนี้การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน สำหรับวิธีการ SDS-PAGE ต้องทำโปรตีนตัวอย่างให้เสียสภาพโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-5 นาที ในสารละลายที่มี SDS มากเกินพอและมีสารประเภทไทออล(Thiol) เป็นองค์ประกอบเช่น B-Mercaptoethanol เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน ซึ่งในภาวะนี้โปรตีนจะจับกับ SDS ในอัตราส่วนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนใส่ในแท่งช่องของแผ่นเจล และนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งทั้งเจลและ Buffer ที่ใช้ในการแยกมี SDS เป็นองค์ประกอบอยู่ (สายทิพย์ ชาปาวี. 2555: 19-22)

2.9 หลักการโพลีโคลนอลแอนติบอดี

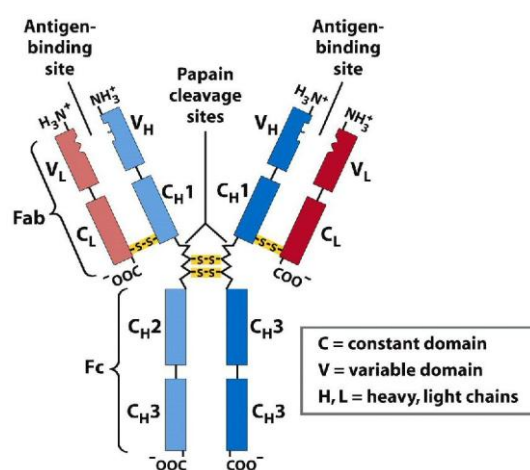
แอนติบอดี (Antibody, Ab) หรือ อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin, Ig) เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ชนิด Globulin ในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูงอื่นๆสร้างขึ้น มีหน้าที่เกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เรียกรวมนๆว่า Immunoglobulin (Ig) มีทั้งหมด 5 Classes คือ IgG, IgA, IgM, IgD, IgE แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะของมันคือ แอนติเจน การเพิ่มปริมาณแอนติบอดีที่สนใจสามารถทำได้โดยฉีดโปรตีนหรือเส้นเปปไทด์ ซึ่งเรียกว่า “แอนติเจน” เข้าไปในสิ่งมีชีวิต เช่น หนู กระต่าย แพะ หรือ แกะ เป็นต้น แอนติเจนเป็นสิ่งแปลกปลอมที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้และตำแหน่งบนแอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้นเรียกว่า อีพิโทป (Epitope)(ภาพที่ 9) ต่อมาระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์จะสร้างแอนติบอดีตอบสนองอย่างจำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป

โครงสร้างโมเลกุลของ Ig อยู่ในรูปตัววาย (Y Shape) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 เส้น(ภาพที่ 10) คือ Heavy Chain (H-Chain) 2 เส้นมี 4 โดเมน คือ VH CH1 CH2 และ CH3 มีกรดอะมิโนประมาณ 440 กรดอะมิโน(สีฟ้า) และ Light Chain (L-Chain) 2 เส้นมี 2 โดเมน คือ VL และ CL มีกรดอะมิโนประมาณ 220 กรดอะมิโน (สีแดง) (Mayer.Retrieved August 10, 2012, from <http://pathmicro.med.sc.edu>) ที่ต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และภายในสายเพปไทด์มี Intrachain Disulfide Bond และ Noncovalent Bond อื่นๆซึ่งทำให้โมเลกุล Ig เกิดการพับงอและบิดเป็นห่วง (Loop) แบบสามมิติ ซึ่งมีความสำคัญต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของ Ig แต่ละชนิดเป็นอย่างยิ่ง



ภาพที่ 9 ตำแหน่งของอีพิโทป

(ที่มา : Mayer. Retrieve August 10, 2012, from <http://faculty.irsc.edu>)



ภาพที่ 10 โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน

(ที่มา : W.H.Freeman. Retrieve August 10, 2012, from <http://chemistry.umeche.maine.edu>)

Ig โดยทั่วไปแล้วเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่รับรู้และทำปฏิกิริยากับแอนติเจน มีคุณสมบัติเป็น ไกลโคโปรตีน (82-96% เป็นพอลิเพปไทด์ และเป็นคาร์โบไฮเดรต 4-18%) ซึ่งลิพิดและพลาสมาเซลล์สร้างขึ้น เพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นของแอนติเจน ส่วนใหญ่จะพบ Ig ในเลือดและสิ่งคัดหลั่งต่างๆ เช่น น้ำนม น้ำมูก น้ำลาย เป็นแอนติบอดีคอยดักจับสิ่งแปลกปลอม สำหรับ Ig ใน

สิ่งคัดหลั่งนั้นช่วยในการป้องกันเชื้อบุผิวของระบบท่อต่างๆ ซึ่งคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์และชีวภาพของ Immunoglobulin แต่ละชนิดเป็นดังนี้ (ฤทัย สกฤตแรมรุ่ง. 2539 : 32-35)

2.9.1 IgG เป็น Ig ที่มีมากที่สุดในซีรัม (80-85%) มีความสำคัญในการคุ้มกันร่างกายมากที่สุด สามารถผ่านรกได้ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อย IgG มีขนาดเล็กที่สุดเมื่อเทียบกับ Ig ตัวอื่นๆ และเป็นโปรตีนที่เคลื่อนที่ช้าที่สุดในสนามไฟฟ้า

2.9.2 IgA เป็น Ig ที่พบมากในซีรัมรองจาก IgG ส่วนใหญ่ IgA จะอยู่ในสิ่งคัดหลั่ง ทำหน้าที่ในการป้องกันเชื้อบุผิวของระบบท่อต่างๆ พบมากในน้ำนมครั้งแรกของมารดาที่เรียกว่า Colostrums ซึ่งช่วยในการถ่ายทอดความต้านทานโรคให้ทารกที่ดื่มนมมารดา นอกจากนี้ IgA พบได้ในน้ำตา น้ำลายและสิ่งคัดหลั่งจากทางเดินอาหาร

2.9.3 IgM เป็น Ig ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุล 900,000 หรือมากกว่า ประกอบด้วยหน่วยพื้นฐาน 5 หน่วย ต่อกันด้วย J Chain มี Antigen Binding Site ได้ 10 ตำแหน่ง เป็น Ig ตัวแรกที่ร่างกายสร้างภายหลังการกระตุ้นของแอนติเจน IgM สามารถตกตะกอนและจับกลุ่มแอนติเจนได้ดี

2.9.4 IgD เป็น Ig ที่พบน้อยมากในเลือด (ซึ่งรองจาก IgE) พบมากอยู่บนผิวของลิมโฟไซต์ โดยเฉพาะในทารกแรกเกิด ทำหน้าที่เป็นตัวรับรู้ (Receptor) แอนติเจนของลิมโฟไซต์

2.9.5 IgE เป็น Ig ที่พบน้อยที่สุดในเลือดและมีอายุคงอยู่ต่ำที่สุด IgE เป็นแอนติบอดีที่สำคัญในการต่อต้านปรสิตต่างๆและเป็นส่วนหนึ่งของ Secretory Immunoglobulin ในระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร

2.10 ขั้นตอนในการรับรู้แอนติเจนและการเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดกระบวนการต่างๆของระบบภูมิคุ้มกันที่จะรับรู้และตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น กระบวนการเหล่านี้แบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ตามลำดับ (ฤทัย สกฤตแรมรุ่ง. 2539: 17-21)

2.10.1 Afferent (Sensitization) Phase

ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นตั้งแต่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกเสนอให้กับลิมโฟไซต์ที่รับรู้ต่อแอนติเจนนั้น การที่แอนติเจนจะกระตุ้น T หรือ B Lymphocytes ได้จะต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงโดย Macrophage ก่อน แอนติเจนอาจสัมผัสกับ Macrophage ซึ่งเดินทางผ่านในบริเวณที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย หรือแอนติเจนอาจถูกดูดซึมผ่านทางกระแสเลือดเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง แล้วสัมผัสกับ Macrophage ที่อยู่ในต่อมน้ำเหลือง โดยปกติแล้ว Macrophage จะจับกินแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกาย ย่อยแอนติเจนให้เป็นชิ้นเล็กๆแต่มีคุณสมบัติในการเป็น Immunogen สูง

ซึ่งจะเกาะอยู่บนผิวของ Macrophage ในบางครั้งเซลล์ที่คล้ายกับ Macrophage แต่ไม่สามารถจับกิน สิ่งแปลกปลอม อาจมีแอนติเจนเกาะติดอยู่บนผิวเซลล์ แล้วส่งแอนติเจนให้กับ T Lymphocyte จะรับรู้แอนติเจนที่เกาะอยู่บนผิวของ Macrophage ร่วมไปกับ Major Histocompatibility Complex (MHC) บนผิวของ Macrophage การร่วมมือกันระหว่าง Macrophage และ T Lymphocyte อาจเกิด จากเซลล์ทั้งสองมาอยู่ใกล้กัน หรือเกิดจาก Macrophage จะหลั่ง Soluble Mediator ที่มีรื่มีมีการ ทำงานในระยะไกล ซึ่งเรียกว่า Interleukin-1 ที่กระตุ้นให้มีการแบ่งตัวของ T Lymphocyte การ กระตุ้น T Lymphocyte เกือบทุกชนิด ยกเว้น Suppressor T Cell ที่ต้องอาศัย Macrophage ในการ ดัดแปลงแอนติเจน แต่ถ้าแอนติเจนนั้นไม่ผ่านกระบวนการ Processing ของ Macrophage แอนติเจนนั้นจะไม่กระตุ้น T Lymphocyte และในทางกลับกันอาจทำให้เกิดภาวะไม่ตอบสนองทาง ภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนนั้น นอกจากนั้นการกระตุ้น Suppressor T cell ไม่ต้องการ Macrophage ส่วน การสร้างแอนติบอดีต่อ T-Independent Antigen นอกจากจะไม่ต้องการอาศัย T Lymphocyte ในการ ช่วย B Lymphocyte สร้างแอนติบอดีแล้วยังไม่ต้องการอาศัย Macrophage ด้วย โดยที่แอนติเจนจะไป กระตุ้น B Lymphocyte ที่มี Receptor ที่ผิวซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนนั้น เรียกว่า First Signal ประกอบ กับการได้รับ Mitogenic Signal เรียกว่า Second Signal ที่มีคุณสมบัติประจำตัวของ T-Independent Antigens ทั่วๆไป จะทำให้ B Lymphocyte นั้นแบ่งตัวและกลายเป็น Plasma Cell เพื่อสร้าง แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นได้

2.10.2 Central Phase

ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นที่ต่อมน้ำเหลืองหรือม้าม เป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่าง Macrophage T และ B Lymphocytes ที่รับรู้ต่อแอนติเจนนั้นๆ ปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ต่างๆ เหล่านี้ นำไปสู่การแสดงออกของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การติดต่อกันหรือประสานงานกันของเซลล์ เหล่านี้ยุ่งยากมาก โดยเฉพาะระหว่าง Lymphocyte ชนิดต่างๆด้วยตนเอง การประสานงานกันอาจ เกิดจากการที่เซลล์มาอยู่ใกล้กันโดยตรง

2.10.3 Efferent (Effector, Elicitation) Phase

เป็นขั้นตอนสุดท้ายในการแสดงออกต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยการที่ B Cell ถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็น Plasma Cell เพื่อสร้างแอนติบอดี และแอนติบอดีไปทำหน้าที่ทาง ภูมิคุ้มกันต่อไปเช่น กำจัดแอนติเจนที่เข้ามาโดยอาจมีการกระตุ้น Complement ซึ่งจะทำให้ ประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมดีขึ้น แต่ในขณะเดียวกันทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ข้างเคียงขึ้นมาได้ การตอบสนองอาจเป็นการแสดงออกของ Sensitized T Cell ที่เปลี่ยนแปลงไป เป็น Cytotoxic T Cell เพื่อทำลายแอนติเจนหรือเซลล์เป้าหมายโดยตรง หรือหลั่งสาร Lymphokines ไปกระตุ้น Macrophage และเซลล์อื่นๆเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น

2.11 ชนิดของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอาจเป็นการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนโดยตรง เป็นการตอบสนองที่เรียกว่า Humoral Immune Response (HIR) หรือโดยการเกิด Sensitized T Cell ต่อแอนติเจนนั้น เรียกว่า Cell-Mediated Immune Response (CMIR) แอนติเจนหนึ่งๆอาจกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งหรืออาจเกิดการตอบสนองทั้งสองแบบพร้อมกันทีเดียว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและทางเข้าของแอนติเจนนั้นๆ เช่นถ้าแอนติเจนนั้นเป็น Contact Sensitizer และเข้าสู่ร่างกายโดยการทาที่ผิวหนังการตอบสนองส่วนใหญ่เป็นแบบ CMIR แต่ถ้าแอนติเจนนั้นเป็นเกสรหญ้า หรือฝุ่นละอองที่เข้าสู่ร่างกายทางทางเดินหายใจ จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองแบบ HIR มากกว่า การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งสองแบบนี้มีลักษณะที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่าง HIR กับ CMIR

ข้อเปรียบเทียบ	Humoral Immune Response (HIR)	Cell-Mediated Immune Response (CMIR)
ทางเข้าสู่ร่างกายของแอนติเจน	โดยการฉีดหรือทางเยื่อผิวหนัง	โดยการทาที่ผิวหนังหรือฉีด intradermal สำหรับการฉีดเข้าเส้นเลือดไม่ทำให้เกิด CMIR
Adjuvants	Incomplete Freund's Adjuvant	Complete Freund's Adjuvant
Lag Period ในการตอบสนอง	ยาวกว่า 7-10 วัน	สั้นกว่า 5-7 วัน
แบบปฏิกิริยาภูมิ		
Effector Cell	B lymphocyte	T lymphocyte
Effector Molecule	Antibodies	Lymphokines
Effect of Thymectomy	มีผลในกรณี Dependent Antigen	มีผล
Effector of Bursectomy	มีผล	ไม่มีผล
การถ่ายทอดด้วยซีรัม	ได้	ไม่ได้
การถ่ายทอดด้วย T cell	ไม่ได้	ได้
ลำดับก่อนหลังในสายวิวัฒนาการ	เกิดทีหลัง	เกิดขึ้นก่อน
Accessory Molecule/Cell	Complement/Neutrophil	Monokine/Macrophage

2.12 Adjuvants

เป็นสารที่ฉีดเข้าไปพร้อมกับแอนติเจนเพื่อให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนนั้นเพิ่มขึ้น Adjuvants มีหลายชนิด ดังนี้

2.10.1 Lipids ได้แก่ Water in Oil Emulsions (Incomplete Freund's Adjuvant), Mineral Oil, Metabolizable Peanut Oil (Adjuvant 65)

2.10.2 Bacterial Products ได้แก่ Complete Freund's Adjuvant, BCG Vaccine, *Corynebacterium parvum*, Bacterial Lipopolysaccharides (Endotoxin), *Bordetella pertussis*

2.10.3 Insoluble Particles ได้แก่ Aluminium Salts, Bentonite, Carbon Particles

2.10.4 Miscellaneous ได้แก่ Synthetic Polynucleotides, Ribosomal RNA Fractions, Helminths or Helminth Extracts

Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) จะเพิ่มการสร้างแอนติบอดี ส่วน Complete Freund's Adjuvant (CFA) และ BCG Vaccine จะเพิ่ม Cell-Mediated Immune Responses (CMIR) ในขณะที่ *Bordetella pertussis* กับ Helminth Extracts จะเพิ่ม IgE Response และทำให้สัตว์ทดลองไวต่อฤทธิ์ของ Histamine และ Serotonin มากขึ้น

2.13 กลไกการออกฤทธิ์ของ Adjuvant

การออกฤทธิ์ของ Adjuvant เป็นดังนี้

2.13.1 ลดการแทรกซึม การแพร่กระจาย และการทำลายของแอนติเจน ทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้น

2.13.2 ทำให้เกิดการอักเสบในบริเวณที่ฉีดแอนติเจนที่ผสมกับ Adjuvant ซึ่งฟาโกไซต์และลิมโฟไซต์มาอยู่ในบริเวณนั้นมากขึ้น ทำให้แอนติเจนสัมผัสกับฟาโกไซต์ และส่งต่อไปกระตุ้นลิมโฟไซต์ได้ดีขึ้น

2.13.3 ทำให้กระตุ้นและเพิ่มการทำงานของฟาโกไซต์ ในบริเวณนั้น

2.13.4 กระตุ้น Reticuloendothelial System โดยทั่วไป และกระตุ้นลิมโฟไซต์ ให้มีการแบ่งตัวและ Differentiation

2.13.5 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจน ทำให้ Immunogenic เพิ่มขึ้น

Adjuvant มีประโยชน์มากในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่มีชีวิต ส่วนวัคซีนที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Live Vaccine) ไม่มีความจำเป็นจะต้องใช้ Adjuvant เพราะจุลินทรีย์ในวัคซีนสามารถแบ่งตัวในร่างกาย ทำให้มีปริมาณมากและยังสามารถ Invade Tissue ได้นอกจากนี้ Adjuvant ชนิด Bacterial Products ถูกนำมาใช้มากใน Tumor

Immunotherapy โดยทำให้ CMIR เพิ่มขึ้นในเซลล์ทั่วไปและเซลล์มะเร็ง ผลที่ได้จะขึ้นอยู่กับมะเร็งที่รักษาและชนิดของ Bacterial Products ที่ใช้

2.14 คุณสมบัติของสารที่จะเป็นแอนติเจน

2.14.1 ขนาด สารที่มีขนาดใหญ่จะเป็นแอนติเจนที่ดี ถ้าขนาดยิ่งใหญ่จะยิ่งกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้มาก โดยทั่วไปแล้ว แอนติเจนที่สมบูรณ์มีน้ำหนักโมเลกุล 10,000 ขึ้นไป

2.14.2 โครงสร้าง แอนติเจนที่มีโครงสร้างสามมิติ (Tertiary Structure) ที่สลับซับซ้อนจะเป็นแอนติเจนที่ดี

2.14.3 ความห่างกันทางเผ่าพันธุ์ระหว่างผู้ที่ได้รับแอนติเจนกับแหล่งที่มาของแอนติเจนนั้น ถ้ายิ่งไกลกัน สารนั้นจะยิ่งเป็นแอนติเจนที่ดีในผู้รับ เช่น อัลบูมินของวัวจะไม่ใช่แอนติเจนที่ดีให้กับวัว แต่จะเป็นแอนติเจนที่ดีให้กับกระต่าย ซึ่งจะเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่าจะให้กับแกะหรือแพะ เพราะแกะหรือแพะมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับวัวมากกว่ากระต่าย

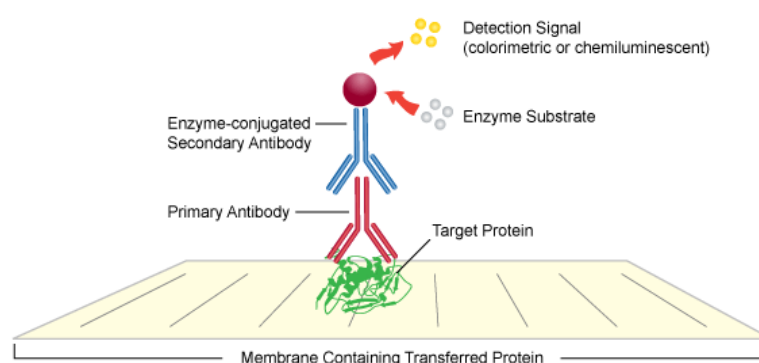
2.14.4 วิธีการให้แอนติเจน ถ้าให้แอนติเจนร่วมกับสารบางอย่างที่สามารถเก็บกักแอนติเจนไว้ได้นานๆ เช่น Adjuvant จะทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มากและยาวนาน นอกจากนี้ทางเข้าของแอนติเจน เช่น ฉีดเข้าทางชั้นของผิวหนัง ฉีดเข้าเส้นเลือด ช่องท้อง หรือโดยการทาที่ผิวหนัง สูดดม หรือรับประทาน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นนั้นดีหรือไม่

2.14.5 องค์ประกอบทางพันธุกรรม สารหนึ่งอาจเป็นแอนติเจนที่ดีในสัตว์ชนิดหนึ่ง แต่ไม่อาจกระตุ้นให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอะไรเลยในสัตว์อีกชนิดหนึ่ง หรือแม้สัตว์ชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันหรือต่างตัวกัน

2.15 เทคนิค Western Blot

Western Blot เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่จำเพาะ ด้วยการสกัดตัวอย่างเนื้อเยื่อนั้นโดยใช้หลักการของ Gel Electrophoresis ใช้แยกได้ทั้ง Native Protein และ Denatured Protein โดยขึ้นอยู่กับขนาด ความเป็นประจุ ความยาวของสายโพลีเพปไทด์ ต่อมาโปรตีนจะถูก Transfer ไปยัง Nitrocellulose Membrane แล้วตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนเป้าหมาย ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลักๆ คือ ขั้นตอนที่หนึ่งเป็นการเตรียมเนื้อเยื่อหรือโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการ (Sample Preparation) สำหรับขั้นตอนที่สองเป็นการแยกโปรตีนตัวอย่างตามขนาดของโปรตีน (Molecular Weight) เจลที่ใช้สำหรับการแยกโปรตีนใช้ Sodium Dodecyl

Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ในขั้นตอนที่สามเป็นการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Protein Transfer) จากนั้นในขั้นตอนที่สี่จะเป็นการ Blocking เพื่อป้องกันการเกิด Non-Specific โปรตีนอื่นๆเข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน หลังจากย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนแล้ว จากนั้นในขั้นตอนที่ห้า เป็นการติดตามผล (Detection) ในขั้นตอนการติดตามผลนั้นจะมีการ Probe เมมเบรนเพื่อหาโปรตีนที่สนใจด้วยแอนติบอดีซึ่งอาจมีการลิงค์ด้วยเอนไซม์ หรือสารเรืองแสงอื่น และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้มีสีเกิดขึ้นหรือมีการเปล่งแสงออกมา สำหรับในขั้นตอนสุดท้ายนั้น เป็นการวิเคราะห์ผล (Analysis) หลังจากทำการบ่มแผ่นเมมเบรนด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแล้ว จากนั้นจะเป็นวิธีการติดตามว่าแอนติบอดีไปเกาะกับโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งใดซึ่งการติดต่อวิเคราะห์ผลก็ขึ้นอยู่กับว่าแอนติบอดีที่ใช้ ติดตามผลด้วยสารอะไร (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 การตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Western Blot

(ที่มา: Leinco. Retrieve August 10, 2012, from <http://www.leinco.com>)

2.16 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor) ของคนใน *E.coli* BL21 DE3 พบว่า ยีน Apaf-1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 825 กรดอะมิโน เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะต่างๆ ที่เหมาะต่อการเกิด Soluble Protein แต่รีคอมบิแนนท์โปรตีน ยังคงอยู่ใน Inclusion Body เช่นเดียวกัน (Rao, Gullipalli and Bhuyan. 2009: 53-60)

ริซซง, คุยแฟง, เซียหยวน, เวยมินและซีหยี (Rizhong, Cuifang, Xiaoyuan, Weimin, and Zhiyi. 2009: 602-607) โคลนยีน V-PPase จากยางพารา เข้าสู่ pET 22b แล้วถ่ายเข้าสู่ *E.coli* BL21 (DE3) ใช้ IPTG ชักนํ้าให้มีการสร้างโปรตีน V-PPase แยกโปรตีน V-PPase โดยวิธีการ SDS-PAGE ตัดแถบโปรตีนไปบดในไนโตรเจน แล้วนำโปรตีนดังกล่าวไปฉีดกระด่ายพบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อโปรตีน V-PPase จากยางพารา

รอควีและคณะ(Rouquié et al. 1998: 287-292) โคลนยีน *V-ATPase* Subunit G จากใบยาสูบเข้าสู่ pET-3c แล้วถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* BL21 (DE3) โดยเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.4 mM แล้วทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งโปรตีนที่เตรียมได้มีขนาด 13 kDa จากนั้นนำโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ไปผสมกับ Freund's Adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระด่าย เป็นเวลา 1 -2 เดือนและทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค Western Blot พบว่า ในช่วงของไดเตอร์ที่เจือจาง 1:10000 เท่ามีการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน V-ATPase Subunit G ในยาสูบ