บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

กระบือปลัก *(Bubalus bubalis* L.) เป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพเกษตรกร นอกจากนี้กระบือปลักยังมีส่วนสำคัญในการประกอบพิธีกรรมต่าง ๆ ตามวัฒนธรรมประเพณีของชาวไทยอีกด้วย ในปัจจุบันจำนวนประชากรของกระบือปลักในประเทศไทยลดลงอย่างรวดเร็วจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวางแผนการอนุรักษ์หรือศึกษาวิจัยในแนวทางต่าง ๆ เพื่อนำไปสู่การเพิ่มจำนวนประชากรของกระบือปลัก ในปัจจุบันการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยเพิ่มจำนวนประชากรกระบือปลักยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากมีข้อมูลทางชีววิทยาโมเลกุลทางการสืบพันธุ์น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลทางด้านโปรตีนในระบบการสืบพันธุ์ซึ่งมีโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง

แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α-L-fucosidase) เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่เชื่อว่ามีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากพบว่าการขาดแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจะมีผลทำให้เกิดโรคฟูโคซิโดซีส (fucosidosis) ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่หาได้ยากและถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อยบนโครโมโซมร่างกาย (autosomal recessive) ซึ่งในมนุษย์ที่ป่วยเป็นโรคนี้มักจะเสียชีวิตตั้งแต่เยาว์วัย เนื่องจากไม่มีกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเพราะเกิดการกลาย (mutation) ทำให้เกิดการสะสมของสารประกอบชีวโมเลกุลที่มีน้ำตาลฟูโคสเป็นองค์ประกอบในอวัยวะต่าง ๆ จึงทำให้สามารถเสียชีวิตได้ตั้งแต่เยาว์วัย สำหรับความสำคัญของเอนไซม์นี้ในกระบวนการสืบพันธุ์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานในสุนัขที่เป็นโรคฟูโคซิโดซีสว่ามีปริมาณอสุจิลดลง เกิดความผิดปกติบริเวณอะโครโซม (acrosome) ของอสุจิ เซลล์อสุจิไม่สามารถพัฒนาเป็น mature spermatozoa และพบว่าในน้ำกามของสุนัขที่มีเซลล์อสุจิจำนวนประมาณ 72.6 ล้านตัวมีเพียง 3-5% เท่านั้นที่อสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีความจำเป็นต่อการพัฒนาของตัวเซลล์อสุจิและมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Veeramachaneni *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีหลายรายงานการศึกษาที่พบว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการจับกันระหว่างอสุจิกับไข่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด (Huang *et al.*, 1982) ในกระบวนการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างอสุจิและไข่ (sperm-egg interaction) ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (species-specific form) ที่จำเป็นต้องเกิดขึ้นก่อนจะมี

การปฏิสนธิ โดยเป็นปฏิสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการจดจำกัน (recognition) และการจับกัน (binding) ระหว่างโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (protein-carbohydrate interaction) (Park *et al.*, 2002) จากรายงานการวิจัยของ Alhadeff *et al.* (1999) ที่ทำการศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อของมนุษย์ด้วยวิธี Immunocytochemical พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิบริเวณส่วนท้ายของอะโครโซม นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากส่วนพลาสมาของน้ำอสุจิและบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิพบว่าในส่วนที่เป็นพลาสมาของน้ำอสุจิมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมากกว่าที่พบในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ และพบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ พีเอชประมาณ 4.8-7.0 ซึ่งกว้างกว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสม (pH optimum) ของเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งทำงานได้ดีในช่วงพีเอช ประมาณ 3.4-4.0 นอกจากนี้ในการศึกษายังพบความแตกต่างของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากพลาสมาของน้ำอสุจิและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ คือ เอนไซม์ชนิดนี้ในพลาสมาของน้ำอสุจิมีขนาดประมาณ 56 kDa แต่บนเยื่อหุ้มอสุจิมีขนาดประมาณ 51 kDa ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่พบในพลาสมาของน้ำอสุจิและบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของมนุษย์มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Khunsook *et al.* (2002) ที่ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56-57 kDa มีกรดเซียลิก (sialic acid) เป็นองค์ประกอบ และสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชค่อนข้างกว้าง คือ ช่วงพีเอช 4.0-4.5 ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่มีน้ำหนักโมเลกุล 51 kDa มีน้ำตาลแมนโนส (mannose) เป็นองค์ประกอบ และสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชที่เป็นกลาง

ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักโดยใช้เทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากระบวนการสืบพันธุ์ของกระบือปลักในระดับโมเลกุลและนำไปสู่แนวทางในการหาวิธีการเพิ่มจำนวนและการอนุรักษ์ประชากรกระบือปลักในประเทศไทยต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก

2.2 เพื่อทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักบริสุทธิ์บางส่วน

2.3 เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

2.4 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากระบวนการสืบพันธุ์ของกระบือปลัก

3. ขอบเขตของการวิจัย

3.1 น้ำเชื้อสดของกระบือปลักที่นำมาใช้ในการศึกษาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตำบลท่าพระ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

3.2 ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก โดยใช้เทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ *N*-glycanase treatment Nueraminidase treatment Isoelectric focusing (IEF) Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) Western analysis Dialysis และ Gel filtration chromatography

3.3 สถานที่ทำการวิจัย คือ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 ได้ทราบถึงลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก

4.2 สามารถทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักบริสุทธิ์บางส่วน

4.3 ได้ทราบถึงลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.4 ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากระบวนการสืบพันธุ์ของกระบือปลักและการศึกษาในขั้นสูงต่อไป

4.5 ใช้เป็นแนวทางในการศึกษาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

4.6 เพื่อตีพิมพ์ผลงานวิจัยบางส่วนในวารสารระดับนานาชาติ