

บทที่ 4

ผลการวิจัย

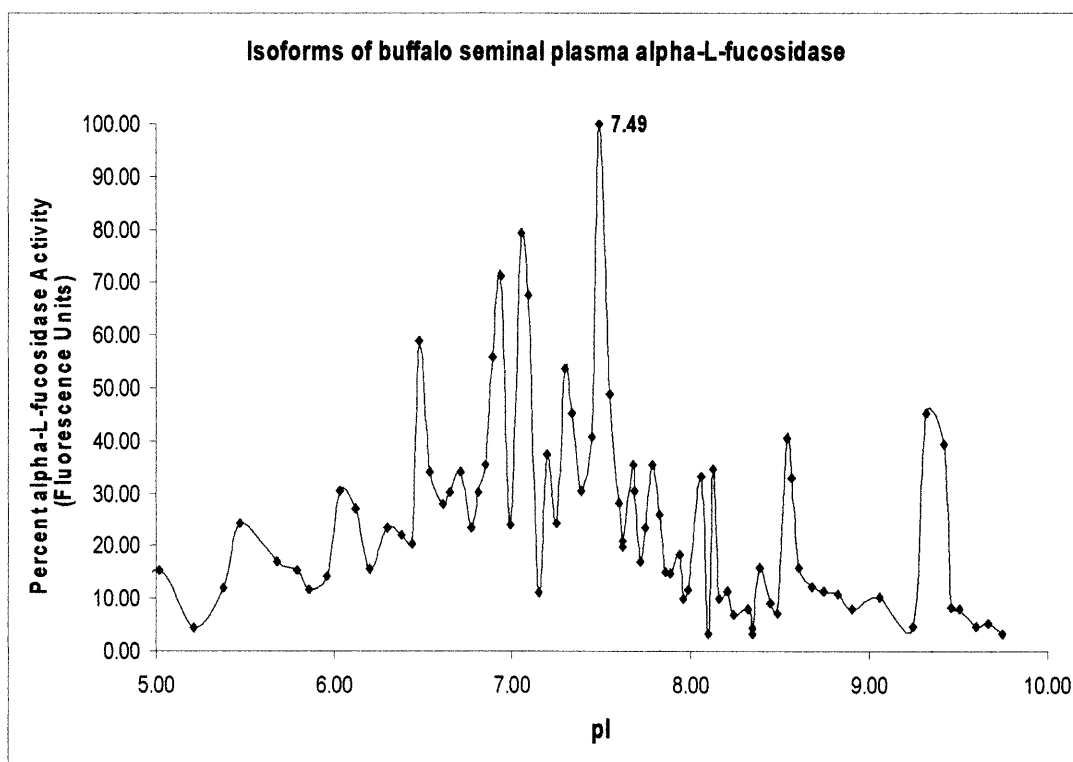
1. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นจากพ่อพันธุ์กระบือปลักจำนวน 5 ตัว โดยทำการวัด ปริมาตร วัดพีเอช ตรวจสอบสีของน้ำเชื้อ วัดการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิแบบกลุ่ม และตรวจนับ ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ได้ผลการทดลองดังนี้ น้ำเชื้อกระบือมีปริมาตรรวมโดยเฉลี่ย 3.75 มิลลิลิตร สีของน้ำเชื้อที่รีดออกมาเฉลี่ยส่วนใหญ่อยู่ในระดับ 3 คือจะมีสีขาวขุ่นเหมือนน้ำครีม มีความเหนียว หนืดมาก มีพีเอชของน้ำเชื้อเฉลี่ยประมาณ 7.26 การเคลื่อนที่ของอสุจิแบบกลุ่มเฉลี่ยโดยรวมอยู่ใน ระดับ 4 ซึ่งเป็นน้ำเชื้อ ที่ดีมาก อสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 70 – 85 เมื่อตรวจนับจำนวนอสุจิเพื่อ ดู ความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ $1,046 \times 10^6$ เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

2. ลักษณะเฉพาะของแอลฟาแอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก

2.1 ผลการตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของแอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Isoelectric focusing

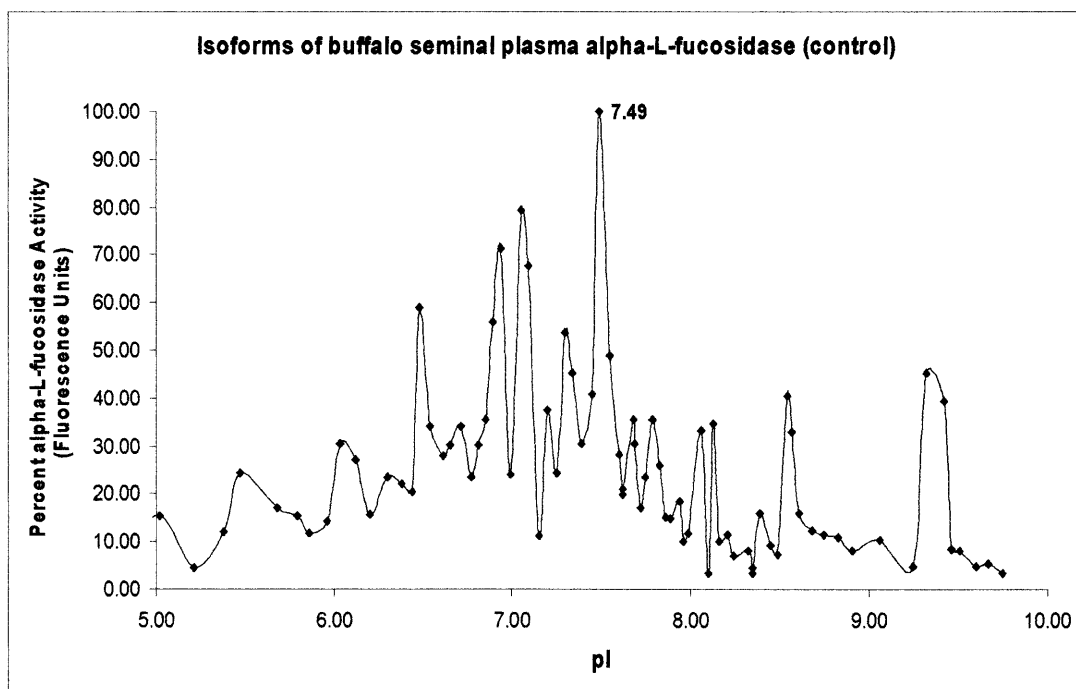
ผลการตรวจหาจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Isoelectric focusing โดยนำโปรตีนจากพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักใส่ลงในคอลัมน์ IEF ขนาด 40 มิลลิลิตร พบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมีไอโซ ฟอร์มประมาณ 12 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 6.48-9.32 มีพีคสูงสุดที่พีไอ 7.49 โดยประกอบด้วย 3 ไอโซฟอร์มหลัก คือ ที่พีไอ 6.96, 7.05 และ 7.49 มี 9 ไอโซฟอร์มย่อย คือ ที่พีไอ 6.48, 7.20, 7.30, 7.68, 7.79, 8.06, 8.13, 8.54 และ 9.32 ดังแสดงในภาพที่ 9



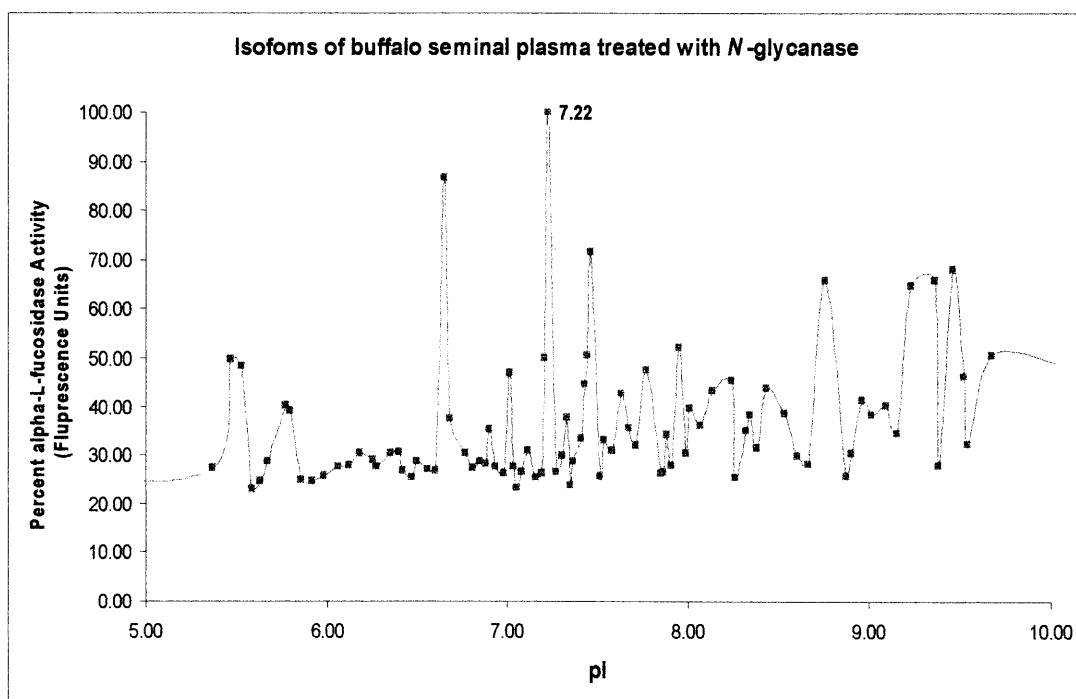
ภาพที่ 9 จำนวนไอโซฟอร์มของ-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก

2.2 ผลการตรวจสอบเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอล-ฟูโคซิเดสก่อนและหลังการทดสอบด้วย *N-glycanase treatment* โดยวิธี *Isoelectric focusing*

ผลการตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนการย่อยด้วย *N-glycanase* พบว่ามีไอโซฟอร์มประมาณ 12 ไอโซฟอร์มอยู่ในช่วง พีไอ 6.48 – 9.32 มีพีคสูงสุดที่พีไอ 7.49 โดยประกอบด้วย 3 ไอโซฟอร์มหลัก คือ พีไอ 6.96, 7.05 และ 7.49 มี 9 ไอโซฟอร์มย่อย คือ พีไอ 6.48, 7.20, 7.30, 7.68, 7.79, 8.06, 8.13, 8.54, และ 9.32 ดังแสดงในภาพที่ 10 ส่วนแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักหลังการย่อยด้วย *N-glycanase* พบว่ามีไอโซฟอร์มประมาณ 10 ไอโซฟอร์มอยู่ในช่วงพีไอ 5.47 – 9.46 มีพีคสูงสุดที่พีไอ 7.22 ดังแสดงในภาพที่ 11 และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนและหลังการย่อยด้วย *N-glycanase* พบว่ามีหลายไอโซฟอร์มหลักและไอโซฟอร์มย่อยที่พบก่อนการย่อยด้วย *N-glycanase* มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนในเกือบทุกไอโซฟอร์ม



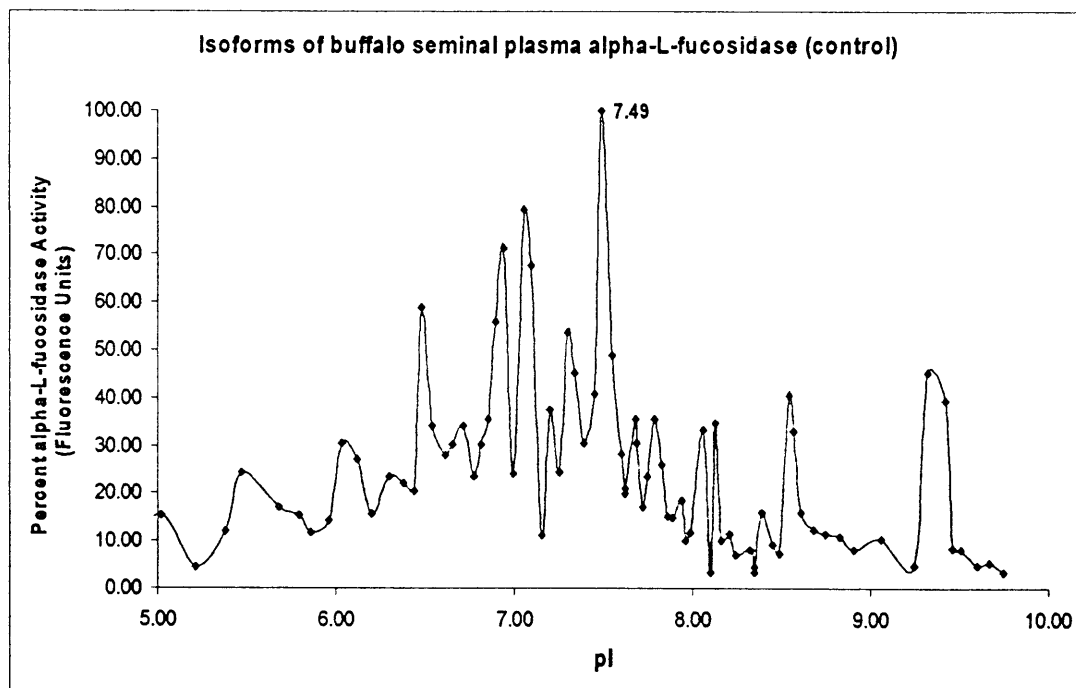
ภาพที่ 10 จำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนการย่อยด้วย *N*-glycanase



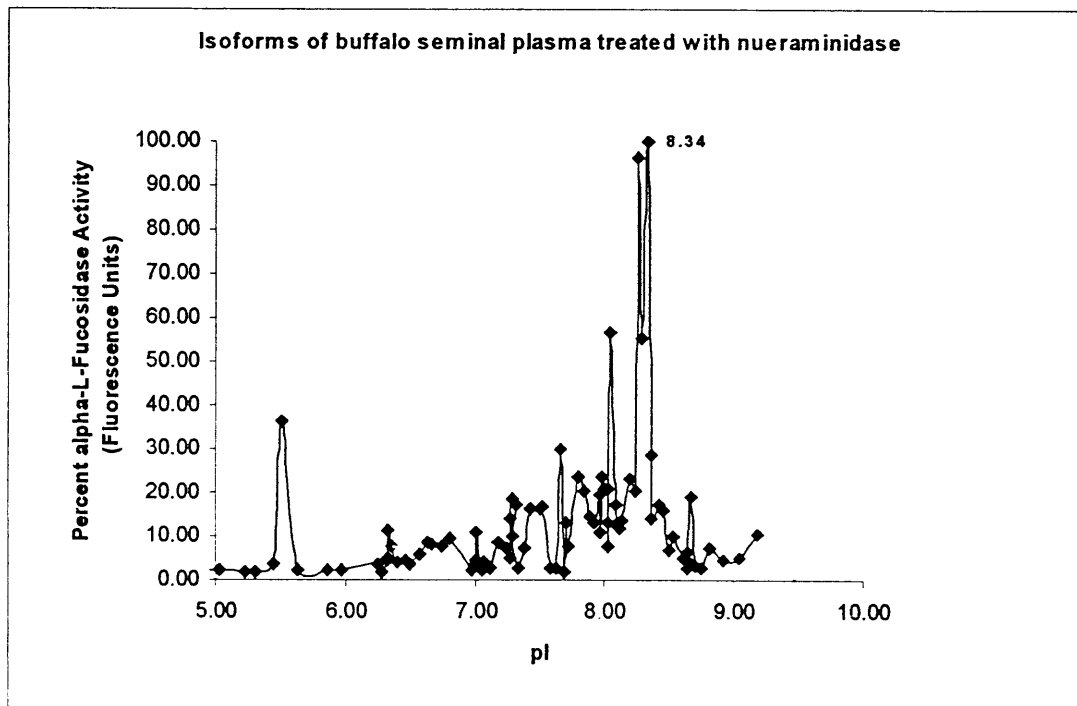
ภาพที่ 11 จำนวนไอโซฟอร์มของแอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักหลังการย่อยด้วย *N*-glycanase

2.3 ผลการตรวจสอบเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอล-ฟูโคซิเดสก่อนและหลังการทดสอบด้วย Neuraminidase treatment โดยวิธี Isoelectric focusing

ผลการตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนการย่อยด้วยนิวรามิเนส พบไอโซฟอร์มประมาณ 12 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 6.48 – 9.32 มีพีคสูงสุดที่พีไอ 7.49 ประกอบด้วย 3 ไอโซฟอร์มหลัก คือพีไอ 6.96, 7.05 และ 7.49 และมี 9 ไอโซฟอร์มย่อย คือพีไอ 6.4, 7.20, 7.30, 7.68, 7.79, 8.06, 8.13, 8.54 และ 9.32 ดังแสดงในภาพที่ 12 ส่วนแอลฟาแอล-ฟูโคซิเดส ในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักหลังการย่อยด้วยนิวรามิเนสพบว่ามีไอโซฟอร์ม 4 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 7.66 – 8.34 มีพีคสูงสุดที่พีไอ 8.34 โดยประกอบด้วย 2 ไอโซฟอร์มหลัก คือพีไอ 8.25 และ 8.34 และมี 2 ไอโซฟอร์มย่อย คือพีไอ 7.66 และ 8.00 ดังแสดงในภาพที่ 13 และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนและหลังการย่อยด้วยนิวรามิเนส พบว่าไอโซฟอร์มด้านกรด (acidic isoforms) มีจำนวนลดลงอย่างชัดเจนเมื่อถูกย่อยด้วยนิวรามิเนส



ภาพที่ 12 จำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก ก่อนการย่อยด้วยนิวรามิเนส



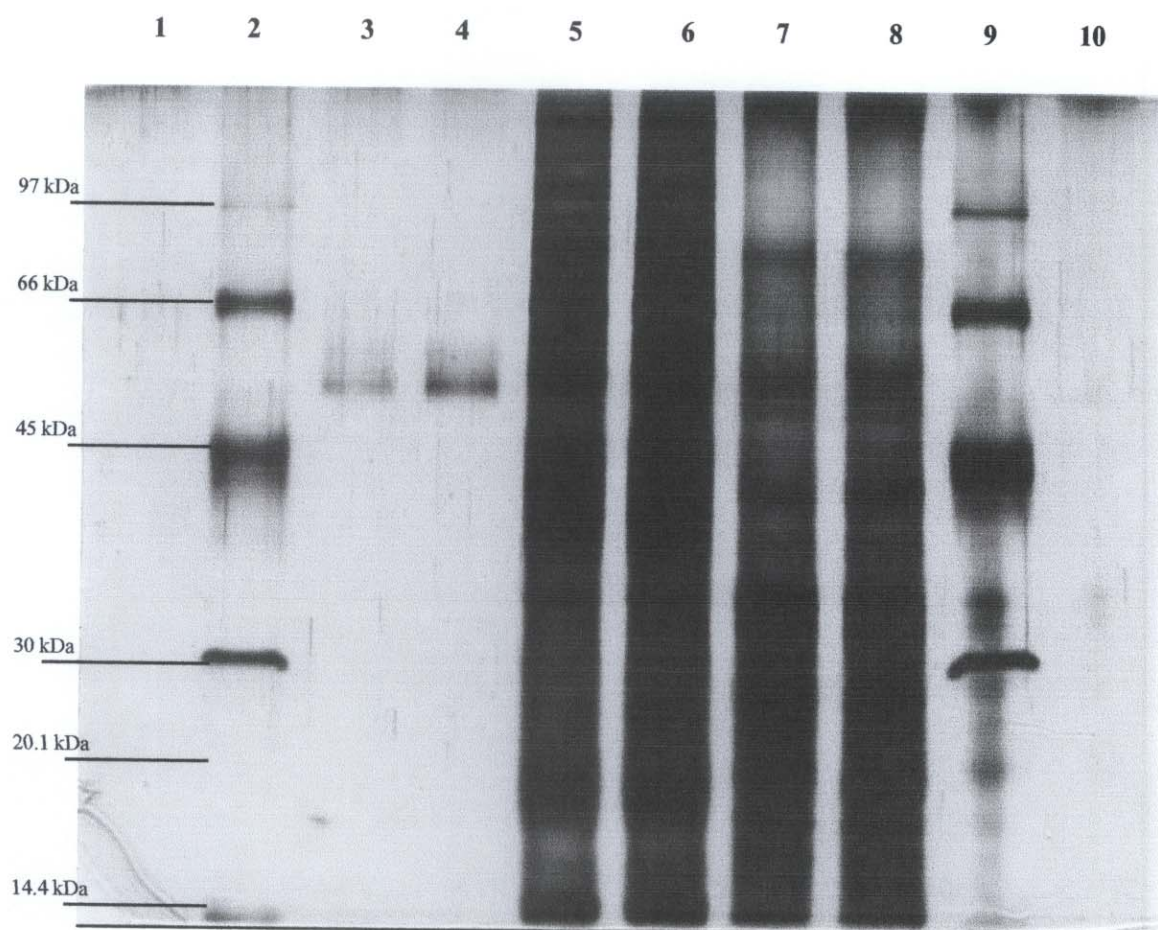
ภาพที่ 13 จำนวนไอโซฟอร์มของแอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักหลัง การย่อยด้วยนิวรามิเนส

2.4 ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากวิธี SDS-PAGE และ Western analysis

ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยวิธี Silver staining (Rosenberg, 1996) พบว่าโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิ (Lane 5 และ 6) มีจำนวนแถบโปรตีนมากกว่าโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่สกัดด้วย 0.2% Triton X-100 (Lane 7 และ 8) ดังแสดงในภาพที่ 14 และจากการตรวจหาแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Western analysis พบว่ามีแถบโปรตีนของ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61 kDa และประมาณ 33 kDa (Lane 4 และ 5) ดังแสดงในภาพที่ 15

2.5 ผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสหลังการทดสอบด้วย *N*-glycanase treatment จากวิธี SDS-PAGE และ Western analysis

จากการทดลองยืนยันผลของการย่อยโปรตีนด้วย *N*-glycanase โดยนำโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ถูกย่อยด้วย *N*-glycanase มาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Western analysis พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ปกติมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61 kDa (Lane 9 และ 10) มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงเหลือประมาณ 59 kDa (Lane 11) ดังแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 14 แสดงแบบแผนโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระป๋องปลักด้วยวิธี SDS-PAGE
แล้วย้อมด้วย Silver staining

Lane 1, 10 : sample buffer

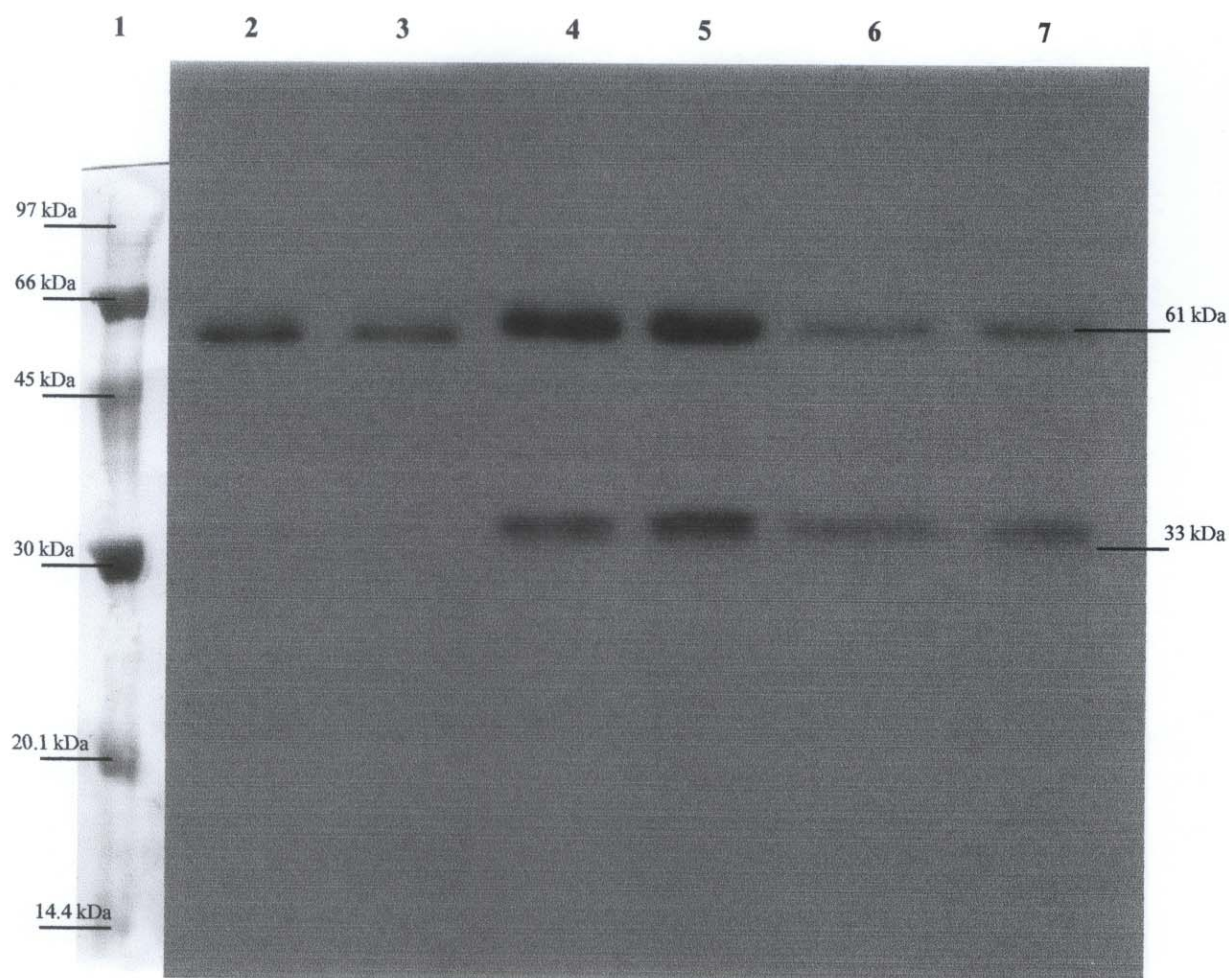
Lane 2, 9 : โปรตีนมาตรฐาน

Lane 3, : Purified human liver α -L-fucosidase

Lane 4, : Purified mouse liver α -L-fucosidase

Lane 5, 6 : โปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระป๋องปลัก

Lane 7, 8 : โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของกระป๋องปลัก ที่สกัดด้วย 0.2% Triton X-100



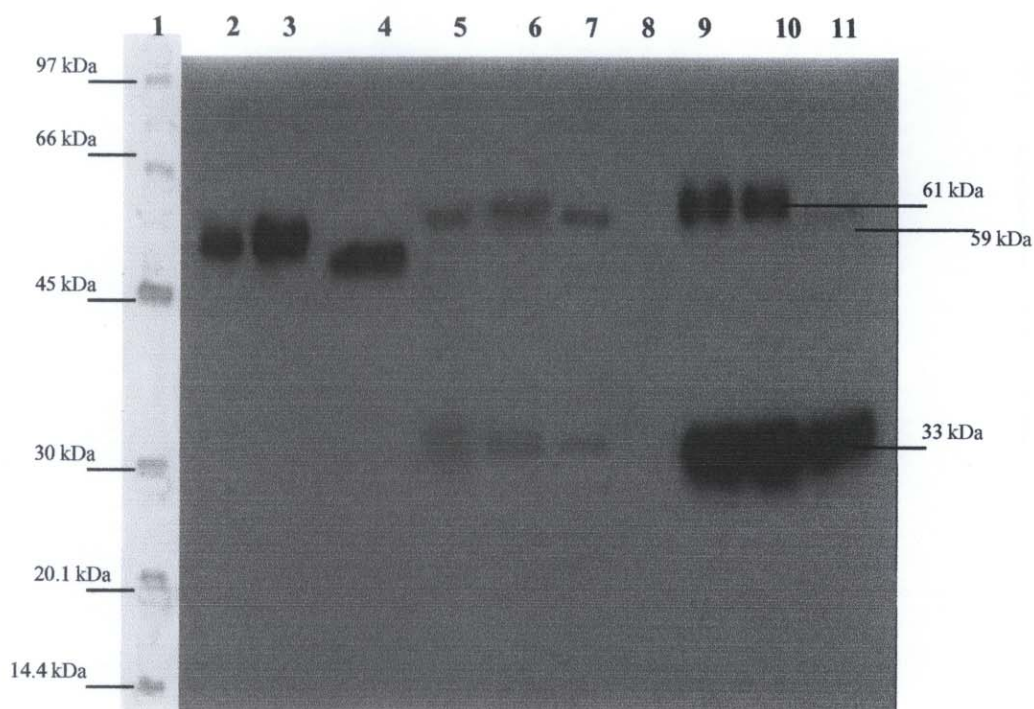
ภาพที่ 15 แสดงแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบี้อปลัก
ด้วยวิธี Western analysis

Lane 1 : โปรตีนมาตรฐาน

Lane 2, 3 : Purified human liver α -L-fucosidase (59 kDa)

Lane 4, 5 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบี้อปลัก (61 และ 33kDa)

Lane 6, 7 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของกระบี้อปลัก ที่สกัดด้วย 0.2% Triton X-100 (61 และ 33kDa)



ภาพที่ 16 แสดงแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก
หลังถูกย่อยด้วย *N*-glycanase ด้วยวิธี Western analysis

Lane 1 : โปรตีนมาตรฐาน

Lane 2,3 : Purified human liver (59 kDa)

Lane 4, : Purified human liver ที่ถูกย่อยด้วย *N*-glycanase (56 kDa)

Lane 5, 6 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของกระบือปลัก ที่สกัดด้วย 0.2% Triton X-100 (61 kDa)

Lane 8 sample buffer

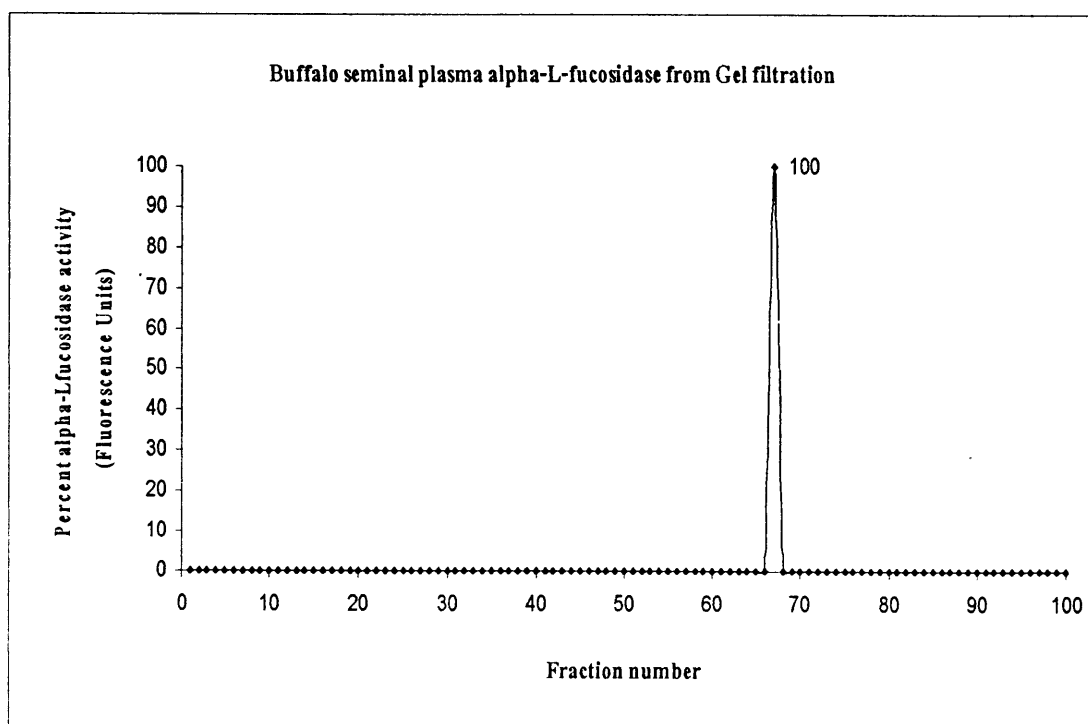
Lane 7 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของกระบือปลัก ที่สกัดด้วย 0.2% Triton X-100 ที่ถูกย่อยด้วย *N*-glycanase (59 kDa)

Lane 9, 10 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก (61 kDa)

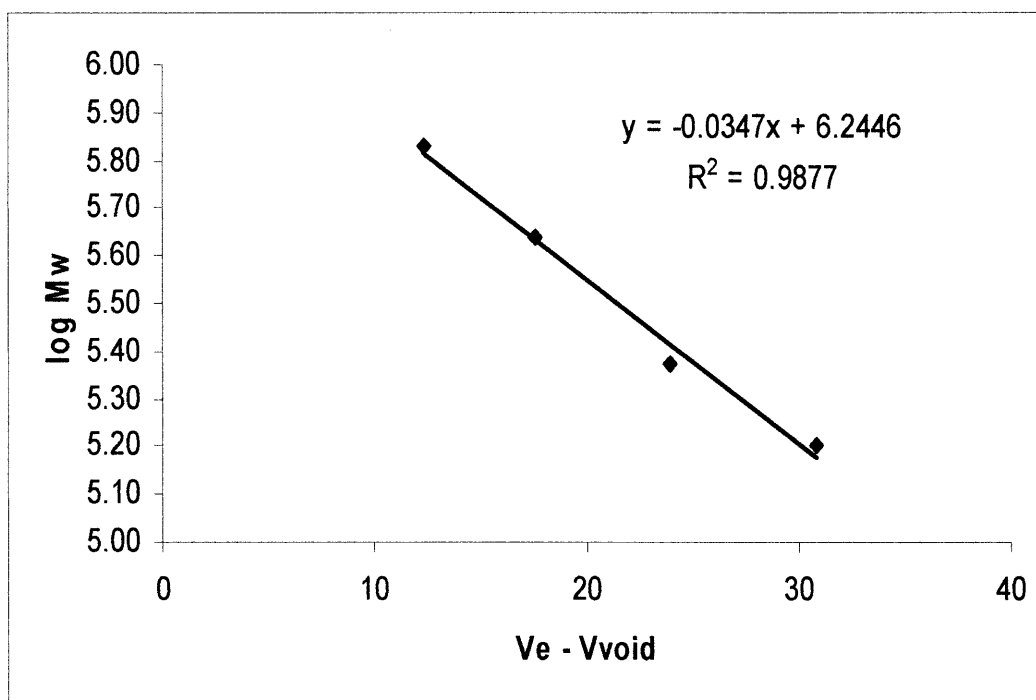
Lane 11 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก ที่ถูกย่อยด้วย *N*-glycanase (59 kDa)

2.6 ผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Gel filtration chromatography

ผลจากการทดลองนำตัวอย่างพลาสมาของน้ำอสุจิกระป๋องที่ผ่านการทำ Dialysis มาศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสภาพธรรมชาติด้วยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้คอลัมน์ Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 High resolution แล้วนำไปตรวจวัดกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส พบว่า fraction ที่มีกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส สูงสุดคือ fraction ที่ 64 ดังแสดงในภาพที่ 17 ซึ่งใช้ปริมาตรรวมของบัฟเฟอร์ในการชะจำนวน 62.30 มิลลิลิตร (V_e) แล้วทำการลบด้วยค่า V_{void} คือ $62.30 - 37.65 = 24.65$ (กำหนดให้เป็นค่า R_f ในแนวแกน X) แล้วเมื่อนำไปแทนค่าในสมการเส้นตรงที่สร้างจากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานพบว่าได้ค่า $\log$ Molecular weight (ค่า Y) เท่ากับ 5.40 แล้วแก้ anti-log ทำให้ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส เท่ากับ 251,976 Da ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 17 ผลการตรวจวัดกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระป๋องจากวิธี Gel filtration chromatography



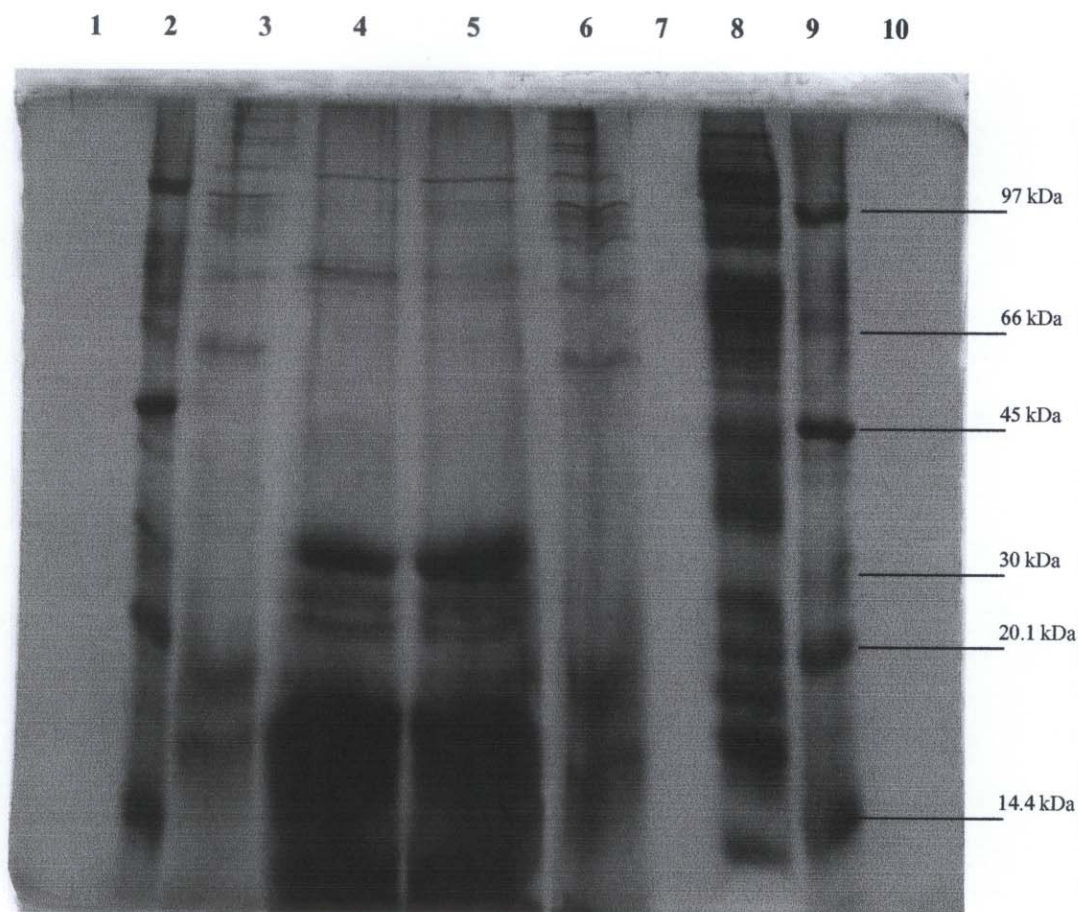
ภาพที่ 18 น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักในสภาพธรรมชาติ จากวิธี Gel filtration chromatography

3. ลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.1 ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี SDS-PAGE และ Western

ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Silver staining พบว่าโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Dialysis Gel filtration chromatography และกรองด้วย 10 kDa molecular weight cut off มีจำนวนแถบโปรตีนน้อยกว่าโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิ (proteins from crude seminal plasma) ดังแสดงในภาพที่ 19 ส่วนผลการตรวจหาแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Western analysis พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70, 67, 57, 48 และ 24 kDa (Lane 4, 5) นอกจากนี้ยังทดลองตรวจหาแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของ น้ำอสุจิของกระบือปลักที่ได้จากวิธี Isoelectric

focusing พบว่ามีแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูลโคซิเดสจำนวน 3 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 67 และ 24 kDa (Lane 2,7) ดังแสดงในภาพที่ 20



ภาพที่ 19 แสดงแบบแผนโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Silver staining

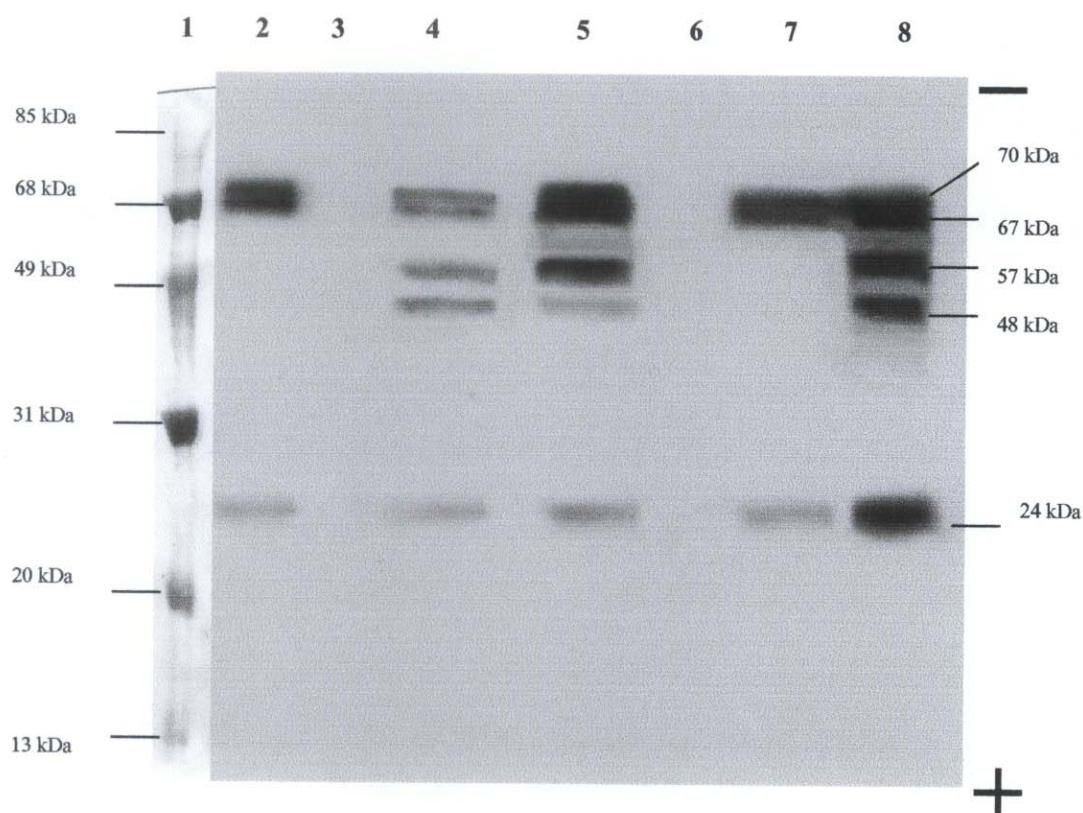
Lane 1, 7, 10: Sample buffer

Lane 2,9 : โปรตีนมาตรฐาน

Lane 3,6 : โปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักจากวิธี Isoelectric focusing

Lane 4,5 : โปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

Lane 8 : โปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก (crude protein)



ภาพที่ 20 แสดงแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก
ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Western analysis

Lane 1 : โปรตีนมาตรฐาน

Lane 2, 7 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากวิธี Isoelectric focusing

Lane 3, 6 : sample buffer

Lane 4, 5 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ถูกแยกให้บริสุทธิ์บางส่วน

Lane 8 : แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก
(crude seminal plasma)