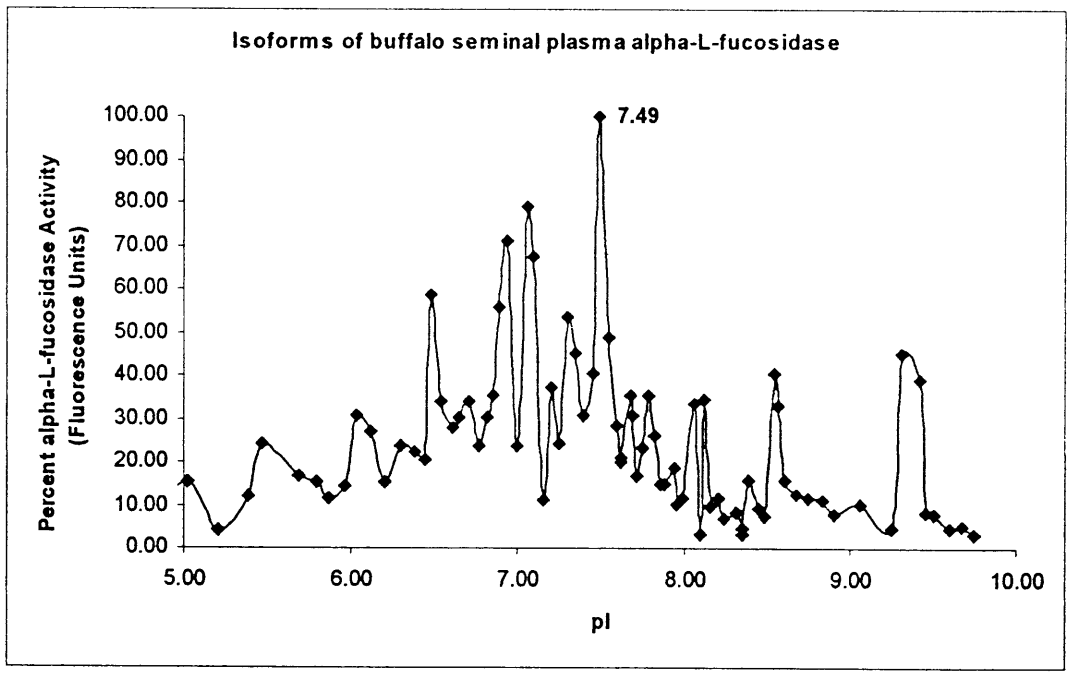
บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อสดจากพ่อพันธุ์กระบือปลักจำนวน 5 ตัว ซึ่งรีดเก็บโดยใช้ช่องคลอดเทียมแล้วนำมาตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น พบว่า น้ำเชื้อมีปริมาตรรวม 3.5 มิลลิลิตร มีพีเอชเฉลี่ย 7.26 สีของน้ำเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในระดับ 3 คือ มีสีขาวขุ่นเหมือนน้ำครีม และมีความเหนียวหนืดมาก การเคลื่อนที่ของอสุจิแบบกลุ่มโดยรวมโดยเฉลี่ยอยู่ในระดับ 4 คือ อสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 70-85 ซึ่งเป็นน้ำเชื้อในระดับดีมาก และจากการตรวจสอบความเข้มข้นของน้ำเชื้อพบว่ามีความเข้มข้นเฉลี่ย $1,046\times10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นที่สอดคล้องกับรายงานของ พีระศักดิ์ จันทร์ประทีปและ ประสิทธิ์ โพธิปักษ์ (2518) ที่ศึกษาการรีดและคุณภาพน้ำเชื้ออสุจิของกระบือปลักไทยเพื่อการผสมเทียมจากพ่อพันธุ์กระบือไทยจำนวน 4 ตัว ซึ่งพบว่าน้ำเชื้อมีปริมาตรประมาณ 0.7-2.5 มิลลิลิตร มีพีเอชเท่ากับ 7 น้ำเชื้อมีสีขาวขุ่นเหมือนน้ำครีมและมีลักษณะข้น มีความเข้มข้นของอสุจิ $320\text{-}1,225\times10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับรายงานของ ปาริฉัตร สุขโต และคณะ (2527) ที่ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์กระบือปลักจำนวน 4 ตัว เพื่อศึกษาอิทธิพลของสภาพภูมิอากาศในแต่ละฤดูกาลที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ จากการศึกษาพบว่าสภาพภูมิอากาศในแต่ละฤดูกาลไม่มีอิทธิพลต่อปริมาตรและความเข้มข้นของน้ำเชื้อพ่อพันธุ์กระบือปลัก จากผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นของพ่อพันธุ์กระบือปลักจำนวน 5 ตัว ที่รีดเก็บมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการทดลองขั้นสูงต่อไป

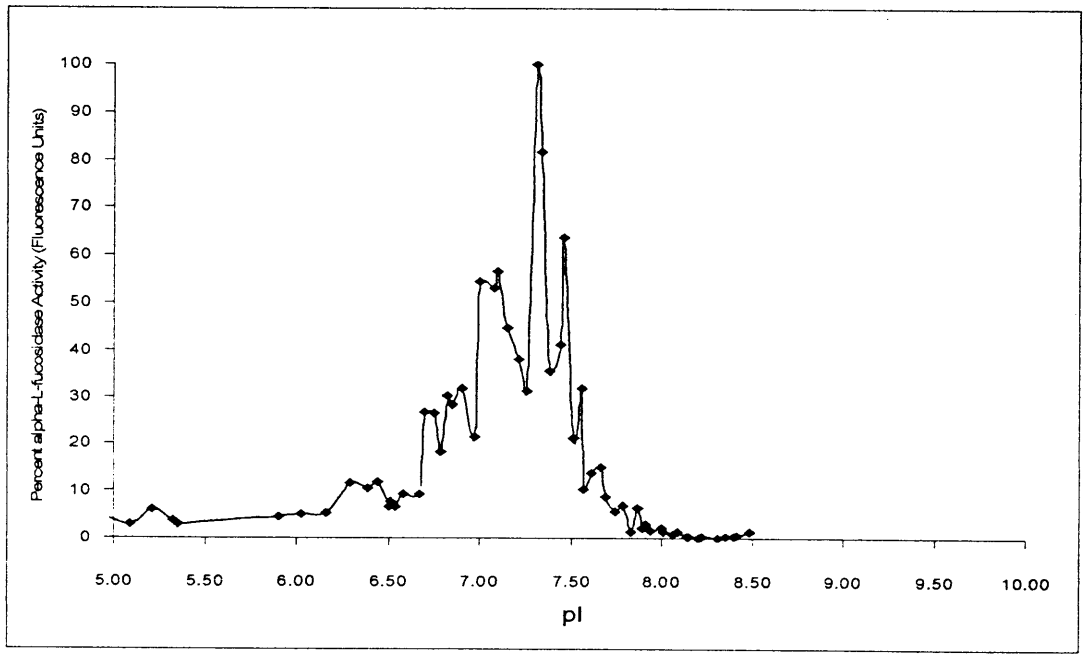
ในการวิจัยได้ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ การตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Isoelectric focusing การตรวจสอบเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ก่อนและหลังการย่อยด้วย *N*-glycanase ด้วยวิธี Isoelectric focusing และการตรวจสอบเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสหลังการย่อยด้วยนิวรามินิเดสด้วยวิธี Isoelectric focusing การศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis รวมทั้งการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Gel filtration chromatography เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสภาพธรรมชาติ (native state) นอกจากนี้ได้ทดลองทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักบริสุทธิ์บางส่วนแล้วศึกษา

แบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาขั้นสูงต่อไป

จากการทดลองตรวจหาจำนวนไอโซฟอร์มด้วยวิธี Isoelectric focusing พบว่าจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมีจำนวนไอโซฟอร์มประมาณ 12 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 6.48-9.32 พบว่ามีพีคสูงสุดที่พีไอ 7.49 โดยประกอบด้วย 3 ไอโซฟอร์มหลัก คือ พีไอ 6.96, 7.05 และ 7.49 มี 9 ไอโซฟอร์มย่อย คือที่พีไอ 6.48, 7.20, 7.30, 7.68, 7.79, 8.06, 8.13, 8.54 และ 9.32 **ดังแสดงในภาพที่ 21** โดยสอดคล้องกับรายงานของ สิทธิศักดิ์ จันทรัตน์ (2548) ที่ตรวจหาจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อของกระบือปลักที่พบว่าในพลาสมาของน้ำอสุจิมีจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ประมาณ 7-11 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 6.2-7.6 และมีพีคสูงสุดที่พีไอ 7.31 **ดังแสดงในภาพที่ 22** ซึ่งแตกต่างจากรายงานวิจัยของ Alhadeff *et al.* (1999) ที่ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อของมนุษย์ที่พบว่าในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์มีไอโซฟอร์มประมาณ 3-6 ไอโซฟอร์มในช่วงพีไอ 5-7 มีพีคพีไอระหว่าง 5.0-7.3 เช่นเดียวกับในรายงานวิจัยของ Khunsook *et al.* (2002) ที่ตรวจหาจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีประมาณ 4-8 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 5.0-7.0 รวมทั้งแตกต่างจากรายงานการวิจัยของ อรทัย รอดสวัสดิ์ (2547) ที่ตรวจหาจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของวัวที่พบว่ามีจำนวนไอโซฟอร์มประมาณ 5-10 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 5.3-7.6 และมีพีคสูงสดที่พีไอ 7.55 ซึ่งผลจากวิจัยที่ได้แสดงถึงการมีลักษณะเฉพาะทางองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด



ภาพที่ 21 แสดงจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก



ภาพที่ 22 แสดงจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก (สิทธิศักดิ์ จันทรัตน์, 2548)

ในการทดลองศึกษาเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนและหลังการย่อยด้วย *N*-glycanase ด้วยวิธีIsoelectric focusing พบว่าหลังการย่อยด้วย *N*-glycanase พบไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสประมาณ 10 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 5.47-9.46 และมีพีคสูงสุดที่พีไอ 7.22 **ดังแสดงในภาพที่ 11** ซึ่ง เมื่อเปรียบเทียบไอโซฟอร์มกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ย่อยด้วย *N*-glycanase พบว่ามีหลายไอโซฟอร์มหลักและไอโซฟอร์มย่อยที่พบในกลุ่มควบคุมมีค่าพีไอเปลี่ยนแปลงชัดเจนในทุกไอโซฟอร์มแสดงให้เห็นว่า *N*-glycanase ที่เติมลงไปทำการตัดโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Khunsook *et al.* (2002) ที่ตรวจหาไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์ที่ทำให้บริสุทธิ์พบว่าหลังการย่อยด้วย *N*-glycanase แถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส จากการทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Silver nitrate พบว่าแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงจาก 56 kDa เหลือ 51 kDa และ 45 kDa ซึ่งการทดลองข้างต้นในมนุษย์ได้สรุปว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น *N*-glycans จึงทำให้สามารถสรุปผลการทดลองครั้งนี้ว่าได้ว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมีคุณสมบัติเป็น *N*-glycans

จากการทดลองตรวจสอบเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนและหลังการย่อยด้วยนิวรามินิเดส ด้วยวิธี Isoelectric focusing พบว่า หลังการย่อยด้วยนิวรามินิเดสพบไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสประมาณ 4 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 7.66-8.34 มีพีคสูงสุดที่พีไอ 8.34 โดยประกอบด้วย2 ไอโซฟอร์มหลัก คือ พีไอ 8.25 และ 8.34 มี 2 ไอโซฟอร์มย่อย คือ พีไอ 7.66 และ 8.00 **ดังแสดงในภาพที่ 13** ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม คือ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนการย่อยด้วยนิวรามินิเดส มีไอโซฟอร์มประมาณ 12 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 6.45-9.32 มีพีคสูงสุดที่พีไอ 7.49 ประกอบด้วย 3 ไอโซฟอร์มหลัก คือ พีไอ 6.96, 7.05 และ 7.49 มี 9 ไอโซฟอร์มย่อยในช่วงพีไอ 6.48-9.32 **ดังแสดงในภาพที่ 12** จากการเปรียบเทียบผลของนิวรามินิเดสที่มีต่อไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก แสดงให้เห็นถึงการลดลงของไอโซฟอร์มด้านกรด (acidic isoforms) ที่ชัดเจน จึงแสดงว่านิวรามินิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีอิทธิพลต่อการเกิดไอโซฟอร์มที่แตกต่างกันของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส โดยผลการทดลองในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Khunsook *et al.* (2002) ที่ตรวจหาไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของ น้ำอสุจิในมนุษย์ ที่พบว่าน้ำตาลที่ต่ออยู่ส่วนปลายสุดของโมเลกุลของเอนไซม์ชนิดนี้ คือ กรดเซียลิค (sialic acid) เนื่องจากหลังการย่อยด้วยนิวรามินิเดสซึ่งมีคุณสมบัติในการตัดโมเลกุลของกรดเซียลิคออกจากโมเลกุลของเอนไซม์แล้ว พบว่าจำนวน

ไอโซฟอร์มของเอนไซม์ลดลงจากเดิมที่มีไอโซฟอร์มประมาณ 4-8 ไอโซฟอร์ม ในช่วงพีไอ 5.0-7.0 เหลือเพียง 1 ไอโซฟอร์มเท่านั้น และค่าพีไอยังมีการเปลี่ยนแปลง คือ เคลื่อนเข้าสู่ค่าความเป็นด่างมากขึ้นด้วย ทำให้สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่า ไอโซฟอร์มที่มีความแตกต่างกันของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักเกิดจากการมีกรดเซียลิคต่ออยู่ที่บริเวณส่วนปลายของโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก สำหรับสาเหตุที่หลังการย่อยด้วยนิวรามินิเดสยังปรากฏไอโซฟอร์มของเอนไซม์จำนวนมากกว่า 1 ไอโซฟอร์ม อาจเกิดจากการที่ปริมาณของนิวรามินิเดสที่ใช้ย่อยไม่เพียงพอต่อการตัดกรดเซียลิคทั้งหมด เนื่องจากในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักไม่ได้มีเพียงแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเท่านั้นที่มีกรดเซียลิคต่ออยู่ที่ส่วนปลายโมเลกุลแต่ยังมีโปรตีนหรือเอนไซม์อีกจำนวนมากที่มีคาร์โบไฮเดรทชนิดนี้เป็นองค์ประกอบ เมื่อเปรียบเทียบไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์ วัวและกระบือปลัก พบว่า จำนวนไอโซฟอร์มของสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยในมนุษย์มีประมาณ 4-8 ไอโซฟอร์ม (Khunsook *et al.*, 2002) ในวัวมีประมาณ 8 ไอโซฟอร์ม (อรทัย รอดสวัสดิ์, 2547) กระบือปลักมีประมาณ 7-11 ไอโซฟอร์ม (สิทธิศักดิ์ จันรัตน์, 2548) จึงสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Alhadeff and Johnson (1991) ที่สรุปว่าความแตกต่างของจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสขึ้นอยู่กับกรดเซียลิค ชนิดของเนื้อเยื่อ และชนิดของสิ่งมีชีวิต

ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis พบว่าแบบแผนโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิมีจำนวนแถบโปรตีนมากกว่าโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่สกัดด้วย 0.2% Triton X—100 และพบว่ามีแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61 kDa และประมาณ 33 kDa โดยทำการเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ที่มีการทำให้บริสุทธิ์และมีการศึกษามาอย่างดีแล้ว คือ Purified human liver α-L-fucosidase ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 59 kDa ซึ่งผลการทดลองนี้แตกต่างจากรายงานการวิจัยของ Alhadeff *et al.* (1999) ที่พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์ มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 56 kDa และในเซลล์อสุจิมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 51 kDa รวมทั้งรายงานการวิจัยของ Khunsook *et al.* (2002) ที่ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56-57 kDa สำหรับแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีน้ำหนักโมเลกุล 51 kDa โดยผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานการวิจัยของ วุฒิไกร นิ่มละมูล (2546) ที่ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อของวัว

พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในทั้งส่วนพลาสมาของน้ำอสุจิและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือประมาณ 54 kDa รวมทั้งยังสอดคล้องกับรายงนการวิจัยของ สิทธิศักดิ์ จันทรัตน์ (2548) ที่พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในทั้งส่วนพลาสมาของน้ำอสุจิและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือประมาณ 61 และ 33 kDa สำหรับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33 kDa ซึ่งเป็นขนาดน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ที่ทำให้เกิดข้อสงสัยว่าแถบโปรตีนดังกล่าวเป็น แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่มีอยู่จริงในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักตามปกติหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองซ้ำจำนวนหลายครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลองซึ่งยังปรากฏแถบโปรตีนขนาดดังกล่าว ผู้วิจัยจึงคาดว่าอาจเกิดจากมีการมีโปรทีเอสบางชนิดเข้าไปทำการย่อยโมเลกุลของแอลฟา-แอล- ฟูโคซิเดสทำให้ปรากฏแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในขนาดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงซึ่งในการทดลองในอนาคตควรทดลองใช้ตัวยับยั้งโปรทีเอส (protease inhibitor) ร่วมในการทดลองเพื่อพิสูจน์ข้อสงสัยดังกล่าว

จากการทดลองยืนยันผลการย่อยโปรตีนด้วย *N*-glycanase โดยนำโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ถูกย่อยด้วย *N*-glycanase มาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Western analysis พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61 kDa มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงเหลือประมาณ 59 kDa หลังถูกย่อยด้วย *N*-glycanase ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Khunsook *et al.* (2002) ที่ตรวจหาไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์ที่ทำให้บริสุทธิ์พบว่าหลังการย่อยด้วย *N*-glycanase แถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส จากการทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Silver nitrate พบว่าแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงจาก 56 kDa เหลือ 51 kDa และ 45 kDa ซึ่งการทดลองข้างต้นในมนุษย์ได้สรุปว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น *N*-glycans จึงทำให้สามารถสรุปผลการทดลองครั้งนี้ว่าได้ว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมีคุณสมบัติเป็น *N*-glycans

สำหรับทดลองวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสภาพธรรมชาติด้วยวิธี Gel filtration chromatography พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 251-252 kDaDa ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการวิจัยของ Khunsook *et al.* (2002) ที่พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของมนุษย์ที่ทำให้บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 110, 236 และ 314 kDa

นอกจากการศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก (crude swamp buffalo seminal plasma) ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักบริสุทธิ์บางส่วนแล้วศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western โดยในการศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วยวิธี Silver staining พบว่าโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิที่ผ่านกระบวนการแยกให้บริสุทธิ์บางส่วนมีจำนวนแถบโปรตีนน้อยกว่าโปรตีนในพลาสมาของน้ำอสุจิชัดเจน แต่ยังพบว่ามีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 20 kDa และ 14 kDa (Lane 4 และ 5) โดยคาดว่าอาจเป็นหน่วยย่อย (subunits) ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในสภาพ native ที่ใกล้เคียงกับแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส คือประมาณ 251 – 252 kDa การศึกษาแบบแผนโปรตีนในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้ในการทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบริสุทธิ์นั้นไม่เพียงพอในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้ แต่มีประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์บางส่วนได้ **ดังแสดงในภาพที่ 19** ส่วนผลการทดลองตรวจหาแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี Western analysis โดยใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่สกัดจากตับมนุษย์ (Goat anti human liver α-L-fucosidase antibody) และแอนติบอดีทุติยภูมิที่สร้างในกระต่ายซึ่งที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ [(Rabbit anti goat horseradish peroxidase conjugated (HRP)] พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70, 67, 57, 48, และ 24 kDa (Lane 8) เช่นเดียวกับแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ถูกแยกให้บริสุทธิ์บางส่วนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70, 67, 57, 48 และ 24 kDa (Lane 5, 6) และในการทดลองตรวจหาแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ได้จากวิธี Isoelectric focusing พบว่ามีแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจำนวน 3 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70, 67 และ 24 kDa (Lane 2, 7) **ดังแสดงในภาพที่ 20** ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้แตกต่างจากรายงานการวิจัยของ Alhadeff *et al.* (1999) ที่ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อมนุษย์ พบว่าในพลาสมาของน้ำอสุจิมีแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่มีน้ำหนักโมเลกุล ขนาดประมาณ 56 kDa และในเซลล์อสุจิมีแถบโปรตีนของเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ขนาดประมาณ 51 kDa รวมทั้งแตกต่างจากรายงานการวิจัยของ Khunsook *et al.* (2002) ที่ศึกษาการทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในพลาสมาของน้ำอสุจิและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของมนุษย์พบว่าเมื่อทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบริสุทธิ์แล้วในพลาสมาของน้ำอสุจิจะมีแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 56-57 kDa สำหรับแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 51 kDa ในการทดลองด้วยวิธี

Western analysis ครั้งนี้พบแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันหลายขนาด ผู้วิจัยได้ทำการทดลองซ้ำจำนวนหลายครั้งเพื่อตรวจสอบว่าแถบโปรตีนของเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ ดังกล่าวเป็นแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่มีอยู่ตามธรรมชาติ หรืออาจเกิดจากมีการมีเอนไซม์โปรทีเอส (protease) บางชนิดอยู่ในตัวอย่างน้ำเชื้อซึ่งทำการย่อยโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ทำให้ได้แถบโปรตีนของ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสออกเป็นหลายขนาด โดยผู้วิจัยคาดว่าแถบโปรตีนของ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ที่พบจำนวนหลายขนาดเป็นผลจากการถูกโปรทีเอสย่อย

จากการทดลองด้วยวิธี Western analysis โดยใช้แอนติบอดีชนิดเดียวกันกับที่ใช้ศึกษา แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในมนุษย์ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ถูกสร้างจากแอนติเจนของมนุษย์มีความสามารถที่จะจับอย่างจำเพาะกับแอนติเจนบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้าง แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมี สายวิวัฒนาการมาร่วมกันและยีนก็ได้ถูกอนุรักษ์ (conserved) ไว้แสดงว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิต สอดคล้องกับการค้นพบเอนไซม์ชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แมลงหวี่ เพรียงหัวหอม หนูขาว วัว และมนุษย์ นอกจากนี้พบว่ายีนที่ทำหน้าที่ในการสร้างกรดอะมิโนที่เปลี่ยนเป็น แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ของเพรียงหัวหอม (*Halocynthia roretzi*) มีความเหมือน (homology) กับมนุษย์ถึง 47.7% หนู 47.4% และ *Dictiosterium* 37.6% (Matsumoto *et al.*, 2002) ที่ทำให้ในการทดลองครั้งนี้ที่ใช้แอนติบอดีมนุษย์แต่สามารถจดจำเอนไซม์ในกระบือปลักได้

สำหรับบทบาทที่แท้จริงของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในกระบวนการสืบพันธุ์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากรายงานการวิจัยของ Srivastava *et al.* (1986) ที่ศึกษาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในส่วนของพลาสมาของน้ำอสุจิวัว พบว่าเอนไซม์ที่พบในพลาสมาของน้ำอสุจิมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการอะโครโซมรีแอ็กชัน (acrosome reaction)ในฐานะที่เป็นตัวกลางให้อสุจิสามารถจับกับไข่ได้อย่างจำเพาะ นอกจากนี้พบว่าอาจจะมีแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสส่วนหนึ่งได้มาจากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อก่อนนำมาศึกษา รวมทั้งจากรายงานการวิจัยของ Suarez *et al.* (1998) ที่ทำการศึกษากระบวนการเคลื่อนที่ของอสุจิวัวผ่านท่อนำไข่พบว่าในขณะที่อสุจิของวัวเคลื่อนที่ผ่านท่อนำไข่ อสุจิจะถูกจับยึดให้ติดกับผนังท่อนำไข่โดยอาศัยน้ำตาลฟูโคสที่อยู่บนโปรตีนบนท่อนำไข่ เพื่อให้อสุจิเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (capacitation) ก่อนที่จะปล่อยให้อสุจิเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ นอกจากนี้พบว่าอสุจิที่ผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์แล้วจะไม่ถูกยึดติดกับผนังท่อนำไข่ นั่นแสดงถึงคุณสมบัติในการจับกันอย่างจำเพาะกับผนังท่อนำไข่ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส นอกจากนี้

รายงานการวิจัยในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ไม่ใช่พวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ได้แก่ เพรียงหัวหอม (Ascidian) ที่ศึกษากระบวนการจับกันของอสุจิและไข่โดยแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสพบว่าในการจับกันและเชื่อมกันของเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์พวกเพรียงหัวหอมจะอาศัยการจดจำคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีน (receptor) ที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งรีเซปเตอร์เหล่านี้จะมีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของไข่ พบว่าในเพรียงหัวหอม (*Halocynthia roretzi*) มีน้ำตาลแอลฟา-แอล-ฟูโคซิล (alpha-L-fucosyl) ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการจับกันของเซลล์สืบพันธุ์ โดยน้ำตาลแอลฟา-แอล-ฟูโคซิลที่ต่ออยู่ปลายสุดของสายไกลโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของไข่มีความสำคัญต่อการเป็น sperm receptor โดยจะมีแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเป็นรีเซปเตอร์ที่มีความจำเพาะกับน้ำตาลแอลฟา-แอล-ฟูโคซิลทำให้เกิดกระบวนการจับกันระหว่างอสุจิกับไข่ (sperm-egg binding) (Matsumoto *et al.*, 2002) จากการศึกษาตำแหน่งและคุณสมบัติต่าง ๆ ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่พบจากรายงานการวิจัยต่าง ๆ ทำให้สามารถคาดได้ว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิน่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจดจำสารชีวโมเลกุล นั่นคือเป็นโปรตีนรีเซปเตอร์ซึ่งมีความจำเพาะกับน้ำตาลฟูโคสที่ต่ออยู่บริเวณสายไกลโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของไข่ ส่วนแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่พบในพลาสมาของน้ำอสุจิมีส่วนเกี่ยวข้องในฐานะที่เป็นตัวกลางให้อสุจิสามารถจับกับไข่ได้อย่างจำเพาะทำให้เกิดกระบวนการจับกันระหว่างอสุจิและไข่ (sperm-egg binding) ซึ่งนำไปสู่เกิดการกระบวนการปฏิสนธิ แต่ทั้งนี้ยังต้องมีการศึกษาถึงหน้าที่ที่แท้จริงของ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส บนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและในพลาสมาของน้ำอสุจิในกระบวนการสืบพันธุ์ต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษา แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในขั้นต่อไป ควรทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อด้วยวิธีอื่น ๆ เพิ่มเติม รวมทั้งทำการศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มเติม ได้แก่ การศึกษาเสถียรภาพ (stability) การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพื่อการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับกระบือปลัก และการทดสอบการจับกัน (binding assay) เพื่อศึกษาหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการสืบพันธุ์ด้วยการใช้ Zona – free hamster test โดยใช้ตัวยับยั้งของฟูโคซิเดส (Fucosidase inhibitor) เช่น ฟูคอยดิน (Fucoidin) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับการผสมพันธุ์กระบือปลักต่อไป