

การศึกษาชนิดและคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินกระบือปลักโดยใช้เทคนิค โครมาโตกราฟี อิเล็กโตรโฟรีซิสและสเปกโตรเมทรี

Studies of Types and Biochemical Properties of Swamp Buffalo Hemoglobin by Chromatography Electrophoresis and Spectrometry Techniques

คำนำ

ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin, Hb) 1 โมเลกุลประกอบด้วยสาย พอลิเปปไทด์ (Polypeptide chain) 4 สาย แต่ละสายจับกับฮีม (Heme) 1 หน่วย ฮีโมโกลบินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ที่เป็นสายอัลฟา (α - chain) 2 สายและไม่ใช่อัลฟา (β, δ, γ - chain) 2 สายรวมเป็น 4 สาย ในเซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์หนึ่งๆจะมีฮีโมโกลบินอยู่ประมาณ 400 ล้านโมเลกุล คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงที่เป็นน้ำหนักแห้ง ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุล ประกอบด้วยฮีม 4 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลของฮีมจับอย่างแน่นเป็นหมู่พรอสเทติก (Prosthetic group) กับสายพอลิเปปไทด์แต่ละสาย ฮีมประกอบด้วยเหล็ก (Ferrous, Fe^{2+}) อยู่กลางโมเลกุล โดยแต่ละสายของพอลิเปปไทด์ทั้ง 4 สายจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างทรงกลม (spherical structure) หมู่ฮีมจับอยู่ในโมเลกุลของสายพอลิเปปไทด์บริเวณกรดอะมิโนหน่วยที่ไม่มีขั้ว (Non-polar residues) เหล็กของฮีมเชื่อมกับอะตอมไนโตรเจนของหน่วยอิมิดาไซลของกรดอะมิโนฮิสติดีน (Histidine imidazole nitrogen atom) ฮีโมโกลบินของลูกอ่อน (fetal hemoglobin) หรือของสัตว์ที่โตเต็มวัย (adult hemoglobin) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ชนิดอัลฟาและเบต้าชนิดละ 2 สาย ($\alpha_2\beta_2$) ฮีโมโกลบินของตัวอ่อน (embryonic hemoglobin) หรือ Hb E ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ อัลฟาหรือซีต้า (ζ -chain) ชนิดละ 2 สาย และชนิดแกมมาหรือเอพซิลอน (ϵ - chain) ชนิดละ 2 สาย ($\zeta_2\epsilon_2, \alpha_2\epsilon_2, \zeta_2\gamma_2$) จะเห็นได้ว่าฮีโมโกลบินของสัตว์มีความหลากหลาย (Jain *et al.*, 1986)

ฮีโมโกลบินมีความสำคัญต่อการทำงานของสรีรร่างกายของสัตว์ เนื่องจากฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่สำคัญที่สุดในเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ในการลำเลียงออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆทั่วร่างกาย และลำเลียงของเสียจากเนื้อเยื่อเช่น คาร์บอนไดออกไซด์ กับมายังปอด Guyton and Hall (1996) รายงานว่าความแตกต่างกันของกรดอะมิโนที่อยู่บนสายเบต้าของฮีโมโกลบิน มีความสำคัญ

ต่อความสามารถของฮีโมโกลบินในการจับกับออกซิเจนเป็นอย่างมาก ความสามารถของฮีโมโกลบินที่จับกับออกซิเจนขึ้นอยู่กับระดับความเป็นกรด - เบส (pH) อุณหภูมิและความเข้มข้นของ 2, 3 - บิสฟอสโฟกลีเซอเรต (2, 3 - bisphosphoglycerate หรือ 2, 3 - BPG) ทั้งนี้เมื่อพีเอชหรืออุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลง จะมีผลไปเปลี่ยนแปลงความสามารถของฮีโมโกลบินที่จับกับออกซิเจน เมื่อความเข้มข้นของ 2, 3 - BPG เพิ่มขึ้นจะทำให้ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้ลดลง

มีรายงานการศึกษาฮีโมโกลบินในโคยุโรป (*Bos taurus*) โคอินเดีย (*Bos indicus*) โคพื้นเมืองอินโดนีเซีย (*Bos banteng*) (Bachmann *et al.*, 1978) โคพื้นเมืองไทยและโคพันธุ์กัมพูชาบุรี (สุวิชและคณะ, 2547) และโคพันธุ์กำแพงแสน (อรพรรณและคณะ, 2546) รวมทั้งกระบือแม่น้ำ (*Bubalus bubalis*, Water buffalo) (Balani and Barnabas, 1965; Khanna, 1973; Masina *et al.*, 1977; Bachmann *et al.*, 1978; Di Luccia A *et al.*, 1989; Di Luccia A *et al.*, 1991; Ferranti *et al.*, 1992 และ Ferranti *et al.*, 2001) ส่วนการศึกษาในฮีโมโกลบินกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*, Swamp buffalo) ในประเทศไทยอรพรรณและคณะ (2546) ได้ศึกษาเพียง 11 ตัว ซึ่งเป็นข้อมูลที่น้อยเกินไป และยังพบว่ากระบือปลักและกระบือแม่น้ำจัดอยู่ใน Family และ Genus เดียวกันคือ *Bubalus bubalis* แต่มีความแตกต่างกันทางสรีรวิทยา รูปร่าง และผลผลิตต่าง ๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน (กองบำรุงพันธุ์, 2548) อีกทั้งกระบือแม่น้ำที่อาศัยอยู่ในแถบทวีปเอเชียและกระบือแม่น้ำที่อาศัยอยู่ในแถบทวีปยุโรปพบที่มีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมและมีการปรับตัวในการดำรงชีวิตที่แตกต่างกันอีกด้วย (สุรัชย์, 2548) จึงทำการศึกษาชนิดหรือฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบินในกระบือปลักโดยเพิ่มจำนวนกระบือปลักให้มากขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้นและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบิน ซึ่งได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินและน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยหรือสายโซ่พอลิเปปไทด์ (สายโกลบิน) ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไปโดยศึกษาการแยกสาย α และ β ที่พบใน Hb BB และ Hb AB ศึกษาถึงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนภายในสายโกลบินและศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสายโกลบินแต่ละชนิด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดหรือฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินในกระป๋องปลักโดยใช้เทคนิค
อิเล็กโตรโฟรีซิส
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในกระป๋องปลักโดยใช้เทคนิค
โครมาโตกราฟี อิเล็กโตรโฟรีซิสและสเปกโทรเมทรี

การตรวจเอกสาร

กระบือปลัก

กระบือมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bubalus bubalis* มีการเรียกชื่อของกระบือหลากหลายเช่น ในภาษาไทยเรียก กระบือ ภาษามลายูเรียก กระbau (krabau) ชาวสเปนในฟิลิปปินส์เรียก คาราวา (karabao) ชาวเนเธอร์แลนด์ในอินโดนีเซียเรียก คาร์เบา (kabauw) ชาวเขมรเรียกกระบือหรือ กระบาย (จรัญ, 2527)

กระบือเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอยู่ใน Family เดียวกันกับโคแต่อยู่คนละกลุ่ม โดยโคจัดอยู่ในกลุ่ม Bovina ส่วนกระบือเอเชียจัดอยู่ในกลุ่ม Bubalina ในขณะที่กระบือแอฟริกันจัดอยู่ในกลุ่ม Syncerina โดยทั่วไปแล้วกระบือเลี้ยงแบ่งได้ 2 ประเภทคือ กระบือปลัก (swamp type) และกระบือแม่น้ำ (water type) กระบือปลักส่วนใหญ่พบได้ในแถบทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และจะเลี้ยงเพื่อเป็นแรงงาน เป็นแหล่งของเนื้อ และใช้มูลเป็นปุ๋ย ในขณะที่กระบือแม่น้ำเลี้ยงไว้เพื่อให้นมและเนื้อ (สุรชัย, 2548)

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งประเภทของกระบือตามหลักภูมิศาสตร์

เขตภูมิศาสตร์	ประเภทของกระบือ
1. เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (มาเลเซีย อินโดนีเซีย ไทย ฟิลิปปินส์)	กระบือปลัก
2. ศรีลังกา	กระบือปลัก
3. ชมพูทวีป (อินเดีย ปากีสถาน)	กระบือแม่น้ำ
4. ยุโรป (อียิปต์ ยุโรปใต้)	กระบือแม่น้ำ

ที่มา: คัดแปลงจาก Fischer and Scheurmann (1977)

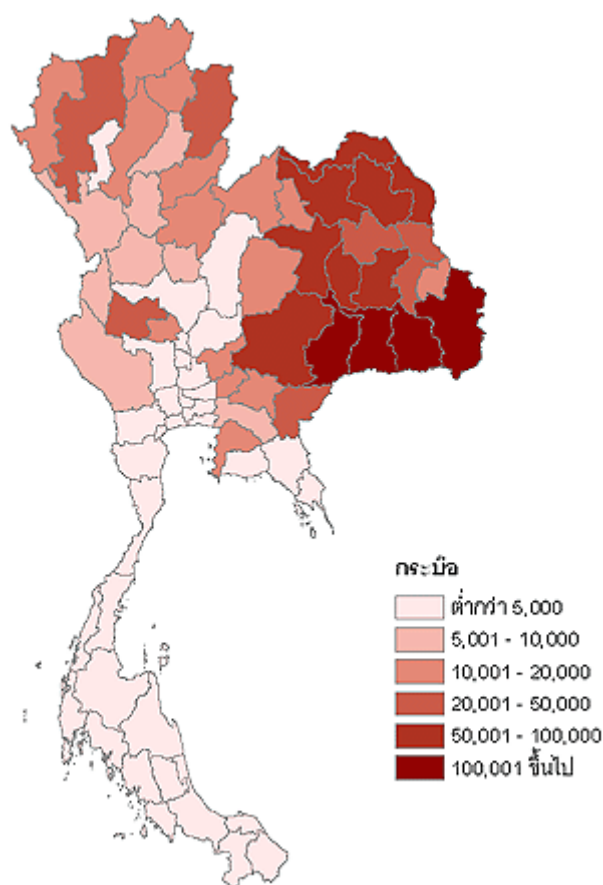
กระบือทั้ง 2 ประเภทนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์เหมือนกันคือ *Bubalus bubalis* แต่มีความแตกต่างกันทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ ความแตกต่างทางจีโนไทป์ที่ชัดเจน คือ จำนวนโครโมโซมซึ่งกระบือปลักมีจำนวน $2n = 48$ กระบือแม่น้ำมีจำนวน $2n = 50$ ส่วนความแตกต่างทางฟีโนไทป์ได้แก่ รูปร่างภายนอกซึ่งสามารถแยกได้ชัดเจนดังตารางที่ 1 (สุรชัย, 2548)

ตารางที่ 2 แสดงความแตกต่างทางฟีโนไทป์ของกระบือปลักและกระบือแม่น้ำ

ลักษณะทางฟีโนไทป์	กระบือปลัก	กระบือแม่น้ำ
1. โครงสร้างร่างกาย	กำยำล่ำสัน	ใหญ่แน่น
2. ลักษณะเขา	ใหญ่ ไส้กว้าง	ใหญ่มีวงงอ
3. สีผิว	เทา ดำ	เทา
4. ลักษณะขนสีขาวยูปร่างตัว V ที่ใต้คอ (chevron)	มี	ไม่มี

ที่มา: ดัดแปลงจากสุรชัย (2548)

กระบือเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมากชนิดหนึ่ง เกษตรกรไทยเลี้ยงกระบือคู่กับวัฒนธรรมการเกษตรมาแต่โบราณ ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการนำเครื่องจักรมาใช้ทดแทนกระบือในการเกษตรแล้วก็ตาม แต่กระบือก็ยังเป็นสัตว์ที่เทคโนโลยีไม่สามารถลบภาพออกไปจากการเกษตร ซึ่งมีความสำคัญในการใช้แรงงาน ทั้งทางด้านการคมนาคมและการไถนา ให้เนื้อบริโภคในราคาสูง เป็นต้น กระบือที่เกษตรกรไทยใช้เป็นแรงงานในการเกษตรนั้น คือ กระบือปลัก (Swamp Buffalo) มีลักษณะสี 2 สี คือ สีเทาเข้มเกือบดำและสีเผือก ผิวหนังสีชมพู มีความแข็งแรง มีกีบเท้าใหญ่ เคลื่อนไหว และเจริญเติบโตช้า กระบือจะโตเต็มวัยเมื่ออายุระหว่าง 5 ปี น้ำหนักตัวผู้โตเต็มวัยโดยเฉลี่ยประมาณ 500 - 600 กิโลกรัม ตัวเมียเฉลี่ยโดยประมาณ 400 - 450 กิโลกรัม (กองบำรุงพันธุ์, 2548)



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงความหนาแน่นของปริมาณกระบือ ในประเทศไทย ปี 2548

ที่มา: กรมปศุสัตว์ (2548)

ปริมาณกระบือในประเทศไทยลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 5 - 13 เปอร์เซ็นต์ต่อปี สาเหตุที่ปริมาณกระบือทั้งประเทศลดลง มีสาเหตุหลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงระบบเศรษฐกิจของประเทศ จากภาคการเกษตรกรรมเข้าสู่ภาคอุตสาหกรรมมากขึ้น มีผลกระทบต่อการทำการเกษตรหลายประการ กล่าวคือ เกษตรกรนิยมใช้เครื่องจักรกลการเกษตรเพิ่มขึ้น รวมทั้งทำเลในการเลี้ยงสัตว์ลดลง นอกจากนี้แรงงานเลี้ยงกระบือบางฤดูจะขาดแคลน เนื่องจาก การอพยพแรงงานจากชนบทเข้าสู่เมืองมากขึ้น รวมทั้งปริมาณการฆ่าเพื่อบริโภคสูงมากตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากประชากรมีความต้องการบริโภคอาหารที่มีโปรตีนสูง อีกทั้งการผลิตกระบือของเกษตรกรไม่ทันกับความต้องการของตลาดและยังเกิดจากสภาพการเลี้ยงดูกระบือของเกษตรกรยังไม่พัฒนาเท่าที่ควร ยังมีปัญหาเกี่ยวกับสถาบันของรัฐที่ไม่เห็นความสำคัญของกระบือ ทำให้งบประมาณ

ต่างๆและ แนวทางการส่งเสริมกระบือไม่ได้รับการสนับสนุนเต็มที่ อีกทั้งเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือเป็นเกษตรกรที่ด้อยโอกาสในทุกๆ ด้าน ทั้งการศึกษาที่จะรับความรู้ใหม่ๆ เป็นไปได้ยาก รวมทั้งด้านการบริการต่างๆ ของรัฐไม่ทั่วถึง เช่น บริการผสมเทียม เป็นต้น เกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือจะอยู่ในพื้นที่ห่างไกลจากจุดบริการผสมเทียม ขาดอำนาจต่อรองต่างๆ ฉะนั้น การปรับปรุงพันธุ์ในภาคเกษตรกรจึงไม่มีความก้าวหน้าเท่าที่ควร

โครงสร้างของฮีโมโกลบิน

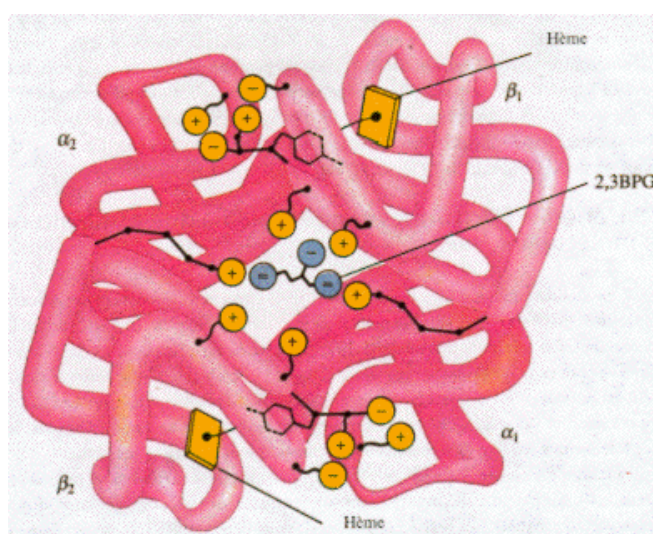
เม็ดเลือดแดงประกอบด้วยฮีโมโกลบินซึ่งเป็นโปรตีนกลอบูลาร์ (globular protein) (Ritter, 1996) ที่ทำหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย ในเซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์หนึ่งจะมีฮีโมโกลบินอยู่ประมาณ 400 ล้านโมเลกุล (Jain, 1993) คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงที่เป็นน้ำหนักแห้ง ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลประกอบด้วยฮีโม 4 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลของฮีโมจับอย่างแน่นเป็นหมู่พอร์สติดกับสายพอลิเปปไทด์แต่ละสาย หมู่ฮีโมประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์และอะตอมของ Fe^{2+} อยู่กลางโมเลกุล สารอินทรีย์คือ โปรโตพอร์ไฟริน (protophyrin) ซึ่งเป็นวงแหวนของไพร์รอล (pyrrole ring) 4 วง เชื่อมกันด้วยสะพานเมธีน (methene bridge) เกิดเป็นเตตระไพร์รอล (tetrapyrrol) และในโมเลกุลประกอบด้วยโซ่ข้างเป็นหมู่เมทิล (methyl group) 4 หมู่ หมู่ไวนิล (vinyl group) 2 หมู่และหมู่โปรปิโอเนต (propionate group) 2 หมู่ (อาภัสสร, 2547; Hortom *et al.*, 2002)

อะตอมของ Fe^{2+} ซึ่งอยู่ที่ศูนย์กลางของวงแหวนโปรโตพอร์ไฟรินสามารถสร้างพันธะกับอะตอมอื่นๆได้ 6 พันธะ โดย 4 พันธะจะจับกับ N อะตอมของหมู่ไพร์รอลที่อยู่ในระนาบเดียวกับหมู่ฮีโม พันธะที่ 5 หรือตำแหน่งโคออร์ดิชันที่ 5 จะจับกับ N อะตอมของกรดอะมิโนฮิสติดีน F8 ส่วนพันธะที่ 6 หรือตำแหน่งโคออร์ดิชันที่ 6 จะจับกับโมเลกุลของออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่า สารโมเลกุลเล็ก เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) สามารถสร้างพันธะที่ 6 ของ Fe^{2+} ได้ และมีความชอบ (affinity) สูงกว่าออกซิเจน (อาภัสสร, 2547)

Kanko and Autio (1985) กล่าวว่าฮีโมโกลบินเป็นฮีโมโปรตีน (hemoprotein) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 สาย เป็นสายอัลฟา 2 สายและสายเบต้า 2 สาย ($\alpha_2\beta_2$) จัดตัวอยู่ในโครงสร้างทรงกลม (spherical structure) แต่ละสายของพอลิเปปไทด์จับอยู่กับหมู่ฮีโม 1 หน่วย

ซึ่งเกาะอยู่ภายในของโมเลกุลตรงบริเวณหน่วยที่ไม่มีขั้ว (non – polar residues) สูง เหล็กของฮีมเชื่อมกับอะตอมไนโตรเจนของหน่วยอิมิดาโซลของกรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine imidazole nitrogen atom) ของสายพอลิเปปไทด์ เมื่อเอาฮีมออกจากฮีโมโกลบินความเสถียรของโมเลกุลฮีโมโกลบินจะลดลง Sripanitan (1983) ได้รายงานเพิ่มเติมว่า โปรตีนในฮีโมโกลบิน เรียกว่า โกลบิน (globin) โกลบินในมนุษย์มีความแตกต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ อัลฟา (α) เบต้า (β) แกมมา (γ) เดลต้า (δ) เอพซิลอน (ϵ) หรือสายเหมือนเบต้า (β -like chain) และซีต้า (ζ) หรือสายเหมือนอัลฟา (α -like chain) ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลประกอบด้วย 2 สายอัลฟาและ 2 สายที่ไม่เป็นสายอัลฟา ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโต

Leone (1998) ได้กล่าวว่าฮีโมโกลบินเป็นโปรตีน 4 หน่วยย่อย (tetrameric protein) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 64,000 ดาลตัน เมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดแดงออกมาอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีผลทำให้โมเลกุลฮีโมโกลบินแยกออกจากกันอย่างรวดเร็วเป็น 2 หน่วยย่อย (dimers)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของฮีโมโกลบิน

ที่มา : Ritter (1996)

Zinoffsky (1985) ได้ทำการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินพบว่าประกอบด้วยเหล็ก 1 อะตอมและคาร์บอน 600 อะตอม แสดงว่าใน 1 โมเลกุลฮีโมโกลบินประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมอย่างน้อย

ที่สุด 600 คาร์บอนอะตอมและขนาดเล็กที่สุดของโมเลกุลฮีโมโกลบินบรรจุเหล็กเพียง 1 อะตอมเท่านั้น

Sripanitan (1983) กล่าวว่าระยะตัวอ่อน (embryonic state) จะพบฮีโมโกลบิน 3 รูปแบบ คือ $\zeta_2\epsilon_2$ (Hb Gower 1) $\alpha_2\epsilon_2$ (Hb Gower 2) และ $\zeta_2\gamma_2$ (Hb protland) โดยเชื่อว่า Hb Gower 1 จะถูกสังเคราะห์ขึ้นก่อน ต่อมาเกิดการสังเคราะห์สายอัลฟา ทำให้พบฮีโมโกลบินแบบ Hb Gower 2 และเมื่อใกล้เข้าสู่ระยะลูกอ่อน (fetal state) จะมีการสังเคราะห์สายแกมมา ทำให้พบฮีโมโกลบินแบบ Hb protland โดยสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินทั้ง 3 รูปแบบในระยะ 3 เดือนแรกของการเจริญเติบโต

ในระหว่างที่ตัวอ่อนของสัตว์อยู่ในช่วงอุ้มท้องจนกระทั่งโตเต็มวัย การสังเคราะห์ฮีโมโกลบินมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ ระยะตัวอ่อนสองสายซิก้า (ζ -chain) ถูกสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งจะไปรวมกับสองสายเอฟซิลอน (ϵ -chain) ทำให้ฮีโมโกลบินอยู่ในรูป $\zeta_2\epsilon_2$ ขณะเดียวกันสองสายเอฟซิลอนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะไปรวมกับ 2 สายอัลฟา ฮีโมโกลบินจึงอยู่ในรูป $\alpha_2\epsilon_2$ จากนั้นเมื่อตัวอ่อนเจริญไปเป็นลูกอ่อน มีการสังเคราะห์สองสายแกมมา (γ -chain) มาแทนสองสายเอฟซิลอน ซึ่งจะไปรวมกับสองสายอัลฟาเป็นฮีโมโกลบินในรูป $\alpha_2\gamma_2$ ระยะกลางการอุ้มท้องสองสายแกมมาลดการสังเคราะห์ลง ขณะที่สองสายเบต้าถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นแล้วจะไปรวมตัวกับสองสายอัลฟา เป็นฮีโมโกลบินอยู่ในรูป $\alpha_2\beta_2$ ไปจนกระทั่งเมื่อสัตว์โตเต็มวัย Sripanitan (1983)

ระยะโตเต็มวัย (adult state) โดยทั่วไปจะพบฮีโมโกลบิน 3 รูปแบบได้แก่ Hb A ประมาณ 97 เปอร์เซ็นต์ Hb A₂ ประมาณ 1.5 – 3 เปอร์เซ็นต์และ Hb F น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังอาจพบฮีโมโกลบินเป็นอนุพันธ์ของ Hb A โดยที่สายเบต้ามีกลูตาไธโอน (glutathione) จับอยู่เรียกว่า Hb A₃ ซึ่งพบในปริมาณน้อยมาก (Srichayanont, 1974)

โกลบินมีจำนวนกรดอะมิโนในสายอัลฟา 141 หน่วย ส่วนสายเบต้า แกมมา และเดลต้า มี 146 หน่วยเท่ากัน โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรง (linear polymer) เชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) สายพอลิเมอร์นี้สามารถหมุนได้อิสระจึงเกิดส่วนเป็นเกลียว (helical segment) และส่วนไม่เป็นเกลียว (non-helical segment) กลายเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ซึ่งสามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน (H-bond)

และพบว่าส่วนเป็นเกลียวมี 80 เปอร์เซ็นต์ สายเบต้ามี 8 เกลียวได้แก่ A B C D E F G และ H ส่วนสายอัลฟามี 7 เกลียว ไม่มีเกลียว D โดยนับจากปลาย N (N - terminal) ไปยังปลาย C (C - terminal) ส่วนไม่เป็นเกลียวมี 20 เปอร์เซ็นต์ เช่น NA AB และ BC เป็นต้น (Sripanitan, 1983)

โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของฮีโมโกลบินมีลักษณะการม้วนตัวของโครงสร้างทุติยภูมิโดยหันส่วนของโซ่ข้างมีขั้ว (polar side chain) สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำบริเวณผิวด้านนอก โดยมีหมู่ฮีมอยู่ด้านในลักษณะแบบกระเป๋า (pocket) ซึ่งเชื่อมกับสายโกลบินส่วนของโซ่ข้างที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic side chain) อะตอมของ Fe^{2+} ในฮีมมีการสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับกรดอะมิโนฮิสติดีน F8 (histidine F8 หรือ proximal histidine) ที่ตำแหน่ง 87 ของสายอัลฟาและตำแหน่ง 92 ของสายเบต้าและยังมีตำแหน่งลิแกนด์ (ligand) ที่สำคัญคือ กรด อะมิโนฮิสติดีน E7 (histidine E7 หรือ distal histidine E7) ที่ตำแหน่ง 58 ของสายอัลฟาและตำแหน่ง 63 ของสายเบต้าซึ่งเป็นตำแหน่งที่จับกับออกซิเจนเมื่อ Fe^{2+} จับกับออกซิเจนแล้ว (Boonyarat, 1997; Sripanitan, 1983)

โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) ของฮีโมโกลบินของคนที่อยู่ในรูปเทตระเมอร์ภายในโมเลกุลมีรูปแบบการเชื่อมกัน 2 ลักษณะ ลักษณะที่ 1 เป็นการเชื่อมระหว่างสายที่คล้ายกันได้แก่ $\alpha_1\alpha_2$ และ $\beta_1\beta_2$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการเชื่อมกันระหว่างหมู่ฮีม (heme - heme interaction) Borh effect และการขนส่งคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 carriage) (Sripanitan, 1983) และลักษณะที่ 2 เป็นการเชื่อมกันระหว่างสายต่างกัน ได้แก่ $\alpha_1\beta_1$ หรือ $\alpha_2\beta_2$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับส่วนเกลียว B G H และส่วนมุม GH และ $\alpha_1\beta_2$ หรือ $\alpha_2\beta_1$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับส่วนเกลียว C G และส่วนมุม FG (Shikama and Matsuoka, 2003) พันธะที่พบในโครงสร้างนี้คือพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ซึ่งเกิดขึ้นเองจากหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine - SH group) ที่พบมากในสายฮีโมโกลบิน (Ritter, 1996)

เมื่อฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนจะมีการเปลี่ยนรูปจากดีออกซีฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin form) ไปเป็นออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin form) โครงสร้างของฮีโมโกลบินจะมีการหมุนไปจากเดิม 15 องศา เป็นผลจากการเชื่อมกันระหว่าง $\alpha_1\beta_2$ หรือ $\alpha_2\beta_1$ ที่เรียกว่า sliding contacts และจะเกิดช่องว่าง (gap) ระหว่างสายเบต้า ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการจับของฟอสเฟตอินทรีย์ (organic phosphate) ที่จะลดความชอบต่อออกซิเจน (oxygen affinity) เรียกแบบโครงสร้างนี้ว่า รูปแบบ Relaxed state (R state) และยังมีการเชื่อมกันระหว่าง $\alpha_1\beta_1$ หรือ

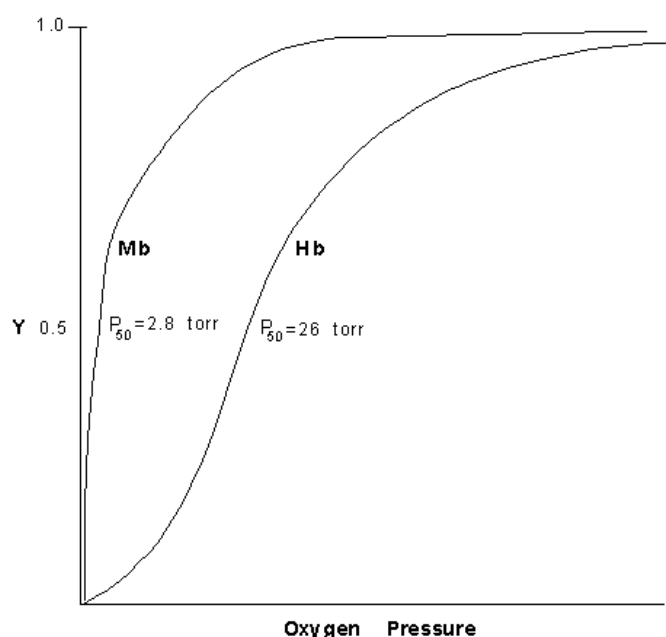
$\alpha_2\beta_2$ ที่เรียกว่า packing contacts ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงเล็กน้อย เชื่อว่าการเชื่อมแบบนี้มีผลต่อความคงตัวของ HbO₂ tetramer เรียกรูปแบบโครงสร้างของฮีโมโกลบินที่ไม่มีการจับกับออกซิเจนนี้ว่า รูปแบบ Tense state (T state) (Prisco *et al.*, 2002; Shikawa and Matsuoka, 2003) กล่าวคือ รูปร่างของฮีโมโกลบินที่จับกับออกซิเจนจะแตกต่างไปจากฮีโมโกลบินที่ไม่มีออกซิเจนจับอยู่ ฮีโมโกลบินที่ไม่มีออกซิเจน โครงสร้างของฮีโมโกลบินจะอยู่ในรูปแบบ Tense state และมีความชอบต่อออกซิเจนน้อย แต่เมื่อฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนแล้ว โครงสร้างของฮีโมโกลบินจะอยู่ในรูปแบบ Relaxed state และมีความชอบต่อออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น

คุณสมบัติของฮีโมโกลบิน

ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่ละลายอยู่ในเม็ดเลือดแดงของมนุษย์เท่ากับ 330 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและปริมาณของฮีโมโกลบินในเลือดมี 100-200 กรัมต่อลิตร โดย 1 กรัมของฮีโมโกลบินสามารถจับออกซิเจนได้ 1.34 มิลลิลิตรออกซิเจน อายุของเม็ดเลือดแดงในมนุษย์เท่ากับ 120 วันและมีอัตราการสลายเพื่อทดแทน 6 กรัมต่อวัน

ฮีโมโกลบินมีกลไกการจับเป็นแบบ positive cooperative คือเมื่อโมโนเมอร์ใดภายในโมเลกุลของฮีโมโกลบินสามารถจับกับออกซิเจนจะทำให้โครงสร้างของฮีโมโกลบินทั้งโมเลกุลหมุนจากแกนเดิมไป 15 องศาและหมู่ฮีมที่มีออกซิเจนจะมีการสื่อสารสัญญาณไปยังหมู่ฮีมของโมโนเมอร์อื่นๆ (heme – heme interaction) ส่งผลให้หมู่ฮีมในโมโนเมอร์อื่นมีความสามารถจับออกซิเจนได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะการเพิ่มความชอบต่อออกซิเจน (Sripanitan, 1983; Ritter, 1996; Horton *et al.*, 2002) Ritter, 1996; Horton *et al.*, 2002 ได้กล่าวเพิ่มเติมว่า ความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินวัดได้ด้วยค่า P_{50} ซึ่งหมายถึง ความดันของออกซิเจนที่ทำให้ปริมาณของฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจนเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด โดยพิจารณาจากกราฟระหว่างความดันออกซิเจน (pO_2) มีหน่วยเป็นทอร์ (torr) (1 มิลลิเมตรปรอท = 760 ทอร์ = 1 บรรยากาศ) เป็นแกน X และค่าความอิ่มตัวออกซิเจน (oxygen saturation) ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิฮีโมโกลบินต่อปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมดเป็นแกน Y เรียกกราฟนี้ว่า oxygen binding curve หรือ oxygen dissociation curve oxygen binding curve ของฮีโมโกลบินเป็น sigmoid (S shape) ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แตกต่างจาก oxygen binding curve ของไมโอโกลบิน (myoglobin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เช่นเดียวกับฮีโมโกลบินแต่อยู่ในกล้ามเนื้อและมีโครงสร้างคล้ายกับโมโนเมอร์ของฮีโมโกลบินด้วย ที่มีลักษณะกราฟเป็นแบบ

hyperbolic (ภาพที่ 3) ทั้งนี้ถึงความแตกต่างซึ่งเป็นแบบเฉพาะ (unique) และรูปร่างที่จำเพาะ (specifically shape) ของการทำงานของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ (Ritter, 1996) โดยค่า P_{50} ของฮีโมโกลบินเท่ากับ 26 ทอร์ ขณะที่ค่า P_{50} ของไมโอโกลบินเท่ากับ 2.8 ทอร์ แสดงว่าฮีโมโกลบินมีความชอบต่อออกซิเจนต่ำกว่าไมโอโกลบิน (Horton *et al.*, 2002) นอกจากนี้กราฟแบบ sigmoid ของฮีโมโกลบินยังบ่งบอกถึงการทำงานแบบ positive cooperative ของเทตระเมอร์ซึ่งต่างจากโมโนเมอร์ของไมโอโกลบิน (Boonyarat, 1997)



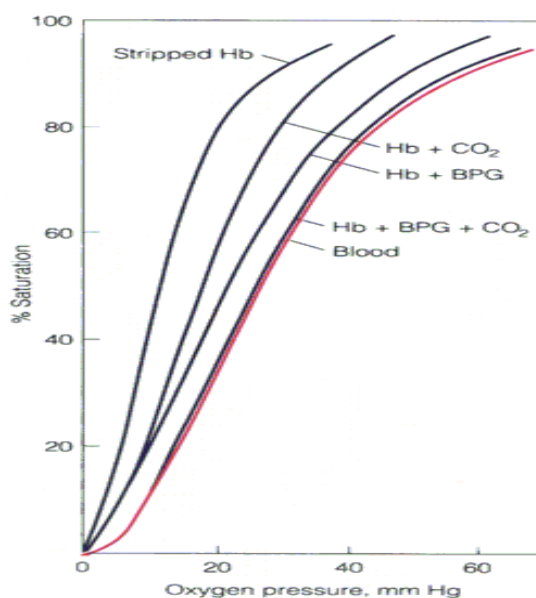
ภาพที่ 3 Oxygen binding curve ของฮีโมโกลบินและไมโอโกลบิน

ที่มา: Horton *et al.* (2002)

Moss (1984) ได้กล่าวถึงลักษณะเฉพาะของฮีโมโกลบินไว้ 3 ประการคือ ประการแรก ฮีโมโกลบินที่อิ่มตัว 1 กรัมมีความสามารถที่จะจับกับออกซิเจนได้ 1.3 ซีซี แต่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมปกติจะมีฮีโมโกลบินเฉลี่ย 10-15 กรัมเปอร์เซ็นต์ ฉะนั้นความจุออกซิเจนจะมีค่าประมาณ 13.9 - 21 ซีซี ต่อเลือด 100 ซีซี หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าความจุของออกซิเจนจะมีค่าประมาณ 13.9 - 21 ปริมาตรเปอร์เซ็นต์ ประการที่สองฮีโมโกลบินมีความสามารถที่จะจับกับออกซิเจนได้อย่างอิ่มตัวในสภาวะที่มีออกซิเจน และประการที่สามความดันย่อยออกซิเจน (oxygen pressure) ประมาณ 40 ทอร์ (torr) ในเส้นเลือดดำ (venous blood) ออกซิเจนถูกปลดปล่อยจากฮีโมโกลบินที่อยู่ในเส้น

เลือดดำฝอยผ่านไปยังเนื้อเยื่อโดยรอบ (peripheral tissue) นอกจากนี้ความชอบออกซิเจนของฮีโมโกลบิน (hemoglobin-oxygen affinity) ยังขึ้นอยู่กับความเป็นกรดเบสของเลือด ความดันย่อยของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และ 2,3 - บิสฟอสโฟกลีเซอเรต ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ความสามารถในการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลง (Brewer, 1972) ซึ่งเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดจากกรดในเมแทบอลิซึมหรือคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลให้ฮีโมโกลบินจับออกซิเจนได้ลดลง ทำให้เส้นโค้งของการจับออกซิเจนเลื่อนไปทางขวาและทำให้ค่าความดันย่อยที่ฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจน 50 เปอร์เซ็นต์ (P_{50}) เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนลดลงเส้นโค้งการจับออกซิเจนเลื่อนไปทางซ้ายเป็นผลให้ P_{50} ลดลง (Guyton and Hall, 1996)

Sripanitan (1983) กล่าวว่าความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ pH สารอินทรีย์ฟอสเฟต (organic phosphate) และความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ ($p\text{CO}_2$) โดยถ้าเพิ่ม pH ลดค่าอุณหภูมิและลดสารฟอสเฟตอินทรีย์ จะทำให้ค่าความชอบต่อออกซิเจนสูง ซึ่งค่า P_{50} จะต่ำ ในทางกลับกันถ้าลด pH เพิ่มค่าอุณหภูมิและเพิ่มสารฟอสเฟตอินทรีย์จะทำให้ได้ค่าความชอบต่อออกซิเจนต่ำ ซึ่งค่า P_{50} จะสูงขึ้นดังภาพที่ 4



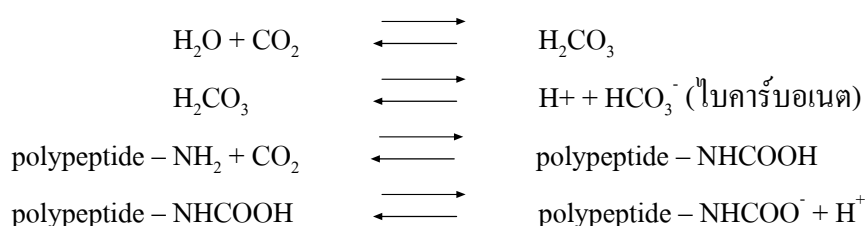
ภาพที่ 4 แสดงผลของ pH, CO_2 , 2, 3 - BPG และอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของเส้นโค้งของการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบิน

ที่มา: Guyton and Hall (1996)

Chang (1999) ได้รายงานว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงมี 2, 3 – BPG สามารถจับอยู่กับสายเบต้าทั้งสองของฮีโมโกลบินตรงตำแหน่งของหมู่อะมิโนที่ปลาย N และหมู่ฮิสติดีนของ β - 143 ฮิสติดีนของโมเลกุลฮีโมโกลบิน

Rapoport and Guest (1941) ได้กล่าวว่า 2,3 – BPG เป็นสารอินทรีย์ฟอสเฟตในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวนมาก Benesch และ Benesch (1967) พบว่า 2,3 – BPG สามารถควบคุมการปรับตัวต่อภาวะปริมาณออกซิเจนในเลือดต่ำ (hypoxia) ซึ่งสอดคล้องกับ Horton et al., 2002 ได้กล่าวว่า 2,3 – BPG ซึ่งถูกสร้างขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงทำหน้าที่เป็น allosteric modulator หรือ allosteric effector ของฮีโมโกลบิน คือ ทำหน้าที่เลือกจับกับไดออกซีฮีโมโกลบินแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างส่งผลให้มีค่าความชอบต่อออกซิเจนลดลง เป็นการเพิ่มการปลดปล่อยออกซิเจนของไดออกซีฮีโมโกลบินแก่เนื้อเยื่อโดยไม่มีการจับออกซิเจนอีก การทำงานในลักษณะนี้เป็นการปรับสมดุลทางโครงสร้างของฮีโมโกลบินระหว่างรูปร่างไดออกซีฮีโมโกลบินและรูปร่างออกซีฮีโมโกลบิน ($T \longleftrightarrow R$ equilibrium) นอกจากนี้ยังพบว่า 2,3 – BPG จะถูกสร้างมากขึ้นในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เช่นบริเวณที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล (altitude) มากๆ

บอร์เอฟเฟกต์ (Bohr effect) เป็นผลจากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตอน (H^+) หรือการเพิ่มภาวะความเป็นกรดหรือการลดค่า pH ที่ทำให้มีการปล่อยออกซิเจนออกจากโมเลกุลของฮีโมโกลบินหรือลดค่าความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบิน ซึ่งปริมาณของโปรตอนสร้างมาจากคาร์บอนไดออกไซด์ทั้งที่อยู่ในเลือดและที่สายฮีโมโกลบิน ดังสมการ



บอร์เอฟเฟกต์เป็นสิ่งสำคัญต่อการทำงานของฮีโมโกลบิน กล่าวคือ ช่วยให้มีการถ่ายโอนออกซิเจนจากฮีโมโกลบินในเลือดสู่เนื้อเยื่อและฮีโมโกลบินสามารถกลับมาทำหน้าที่ได้อีกครั้ง จึงเกิดการทำงานอย่างต่อเนื่อง (Ritter, 1996)

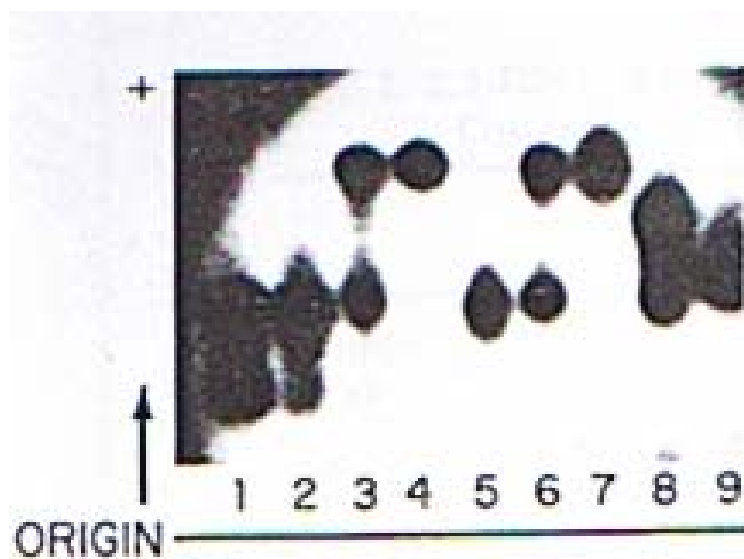
ฮีโมโกลบินของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ (low oxygen affinity) มีรูปแบบโครงสร้างเป็น Tense state กล่าวคือ มี salt bridge จำนวนมากยึดโครงสร้างไว้อยู่ในสภาพเครียด ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ได้จับกับออกซิเจนหรือคือออกซีฮีโมโกลบิน และกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูง (high oxygen affinity) มีรูปแบบโครงสร้างเป็น relaxed state ไม่มี salt bridge อยู่ในสภาพคลาย ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จับกับออกซิเจนหรือออกซีฮีโมโกลบิน (Bunn, 1971) T state มีความเสถียรมากกว่า R state เนื่องจากมี ionic salt bridge จำนวนมากที่ $\alpha_1\beta_2$ (Lehninger, 2003) นอกจากนี้ Perutz and Imai (1980) ได้รายงานเพิ่มเติมถึงความแตกต่างระหว่างฮีโมโกลบิน 2 กลุ่ม ซึ่งมีความแตกต่างที่ปลาย N ของกรดอะมิโนในสายเบต้าตำแหน่งที่ 2 ($\text{NA}_2\beta$) ตรงบริเวณที่ไม่ใช่เกลียวฮีลิคัล (non-helical segment) โดยกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophobic ที่มี กรดอะมิโนลิซีนกับกรดอะมิโนเมไทโอนีนหรือกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ขณะที่กลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูงเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophilic ที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนกับกรดอะมิโน กลูตามีนหรือกรดอะมิโนแอสพาราจีน

Varijavand *et al.* (2000) ได้กล่าวว่าเส้นโค้งที่แสดงการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินเป็นสิ่งสำคัญให้ทราบถึงการนำพาและการปลดปล่อยออกซิเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีความสำคัญเกี่ยวกับการอิ่มตัวของออกซิเจน (oxygen saturation; SO_2) และความดันย่อยของออกซิเจนในเลือด ซึ่งถูกกำหนดโดยความสามารถของฮีโมโกลบินที่จับกับออกซิเจนและปลดปล่อยโมเลกุลออกซิเจนให้กับเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆ มัน การที่ฮีโมโกลบินสามารถจับกับออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็นลำดับนั้น โมเลกุลจำนวนมากที่เพิ่มขึ้นทำให้ความดันย่อยของออกซิเจนเพิ่มขึ้นด้วยจนกระทั่งถึงปริมาณสูงสุดที่สามารถจะจับกับฮีโมโกลบินได้ เส้นโค้งของการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินมีลักษณะเป็นรูปตัวเอส (sigmoidal) ซึ่งระยะเจริญวัยของคนที่มี Hb A ภายใต้สภาวะที่ปกติ (physiology pH 7.4) และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ฮีโมโกลบินจับออกซิเจนประมาณร้อยละ 75 ที่ระดับความดันออกซิเจน 26 ± 1 มิลลิเมตรปรอท เมื่อฮีโมโกลบินจับออกซิเจนเพิ่มขึ้นทำให้เส้นโค้งของการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินเลื่อนไปทางซ้าย แสดงให้เห็นว่า P_{50} มีค่าลดลง แม้ว่าจะมีความดันย่อยของออกซิเจนเพียงเล็กน้อยก็ทำให้มีผลต่อจำนวนฮีโมโกลบินที่จับกับออกซิเจนได้มาก

การศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินในสัตว์เลื้อยคลานมีการศึกษามากแล้ว มีรายงานการศึกษาฮีโมโกลบินของโคยุโรป (*Bos taurus*) พบว่ามีชนิด AA, AB และ BB ชนิดของฮีโมโกลบินถูกควบคุมโดยคู่ยีนที่ต่างกันซึ่งอยู่ที่ตำแหน่งโลคัส (locus) เดียวกันที่เรียกว่าอัลลีล

(allele) Hb A ถูกควบคุมโดยอัลลีลหนึ่ง ขณะที่ Hb B ถูกควบคุมโดยอัลลีลตรงกันข้าม Hb AA และ Hb BB มีคู่ยีนเหมือนกัน (homozygous) ส่วน Hb AB มีคู่ยีนต่างกัน (heterozygous) Hb B มีโอกาสพบในโคอินเดียสูงกว่าโคยุโรป ส่วนในโคพื้นเมืองอินโดนีเซียพบว่ามี Hb B และ Hb C เท่านั้น เนื่องจากประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิด BB, BC และ CC ขณะที่ลูกผสมพันธุ์บราห์มันกับโคพื้นเมืองอินโดนีเซียมีฮีโมโกลบินเป็นชนิด AB และ AC โดย Hb B จัดเป็น Hb fast และ Hb A จัดเป็น Hb slow เนื่องจาก Hb fast เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า Hb slow ขณะที่ Hb C เคลื่อนที่ได้ช้ากว่า Hb B และเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า Hb A (Bachman *et al.*, 1978)

Adams *et al.* (1975) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของโคป่าโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแป้งเจล (starch gel electrophoresis) เปรียบเทียบระหว่างฮีโมโกลบินโคป่า ฮีโมโกลบินโคพันธุ์ต่างๆ ฮีโมโกลบินกระบือและฮีโมโกลบินเอของคน ดังภาพที่ 5 และทำการหาอัตราส่วนของ Hb fast ต่อ Hb slow โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส (cellulose acetate electrophoresis) พบว่าฮีโมโกลบินของโคป่ามีอัตราส่วน Hb slow ต่อ Hb fast เป็น 38 ต่อ 62 จากการทดลองในโคลูกผสมอีก 4 ตัว พบว่าเปอร์เซ็นต์ Hb slow เริ่มที่ 37 ± 1.2 (mean $\pm$ SD) โดยที่ Hb slow จะลดลงในรุ่น F1 และ F2 ในโคที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างโคป่าและโคพันธุ์เจอร์ซี่ซึ่งได้ลูกเป็นรุ่น F1 และนำลูกรุ่น F1 มาผสมกับโคป่า โคพันธุ์เจอร์ซี่และโคพันธุ์ซิมูได้เปอร์เซ็นต์ Hb slow ลดลงเป็น 37.8%, 20.0% และ 9.1% ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ Hb ของโคป่าโดยใช้เทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแป้งเจลพบ โกลบิน 3 สายโดยอัตราส่วนของสายอัลฟาหนึ่งสายอัลฟาสองต่อเบต้าเท่ากับ 1 ต่อ 1 และระหว่างสายอัลฟาหนึ่งต่อสายอัลฟา สองเท่ากับ 37.5 ต่อ 62.5 ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างอีโมโกลบินโคปา อีโมโกลบินโคพันธุ์ต่างๆ อีโมโกลบินกระป๋องและอีโมโกลบินเอของคน ดังนี้

เลนที่ 1 โคปา

เลนที่ 2 การผสมข้ามระหว่างโคปาและโคพันธุ์เจอร์ซี่

เลนที่ 3 การผสมข้ามระหว่างโคปา โคพันธุ์เจอร์ซี่และโคพันธุ์ชีบู

เลนที่ 4 และเลนที่ 7 โคพันธุ์ชีบู

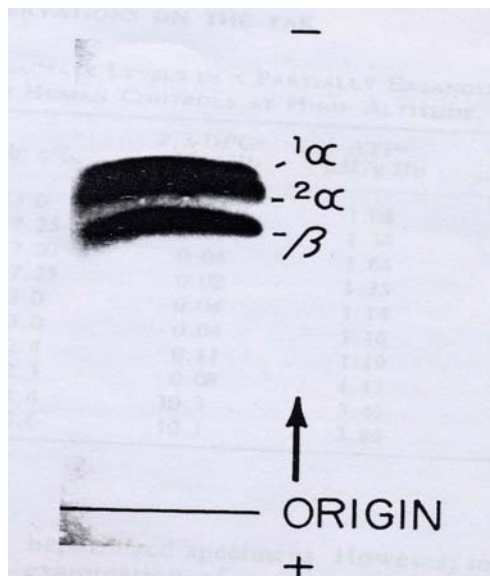
เลนที่ 5 โคพันธุ์เจอร์ซี่

เลนที่ 6 การผสมข้ามระหว่างโคพันธุ์เจอร์ซี่กับโคพันธุ์ชีบู

เลนที่ 8 Asiatic Buffalo

เลนที่ 9 อีโมโกลบินเอของคน

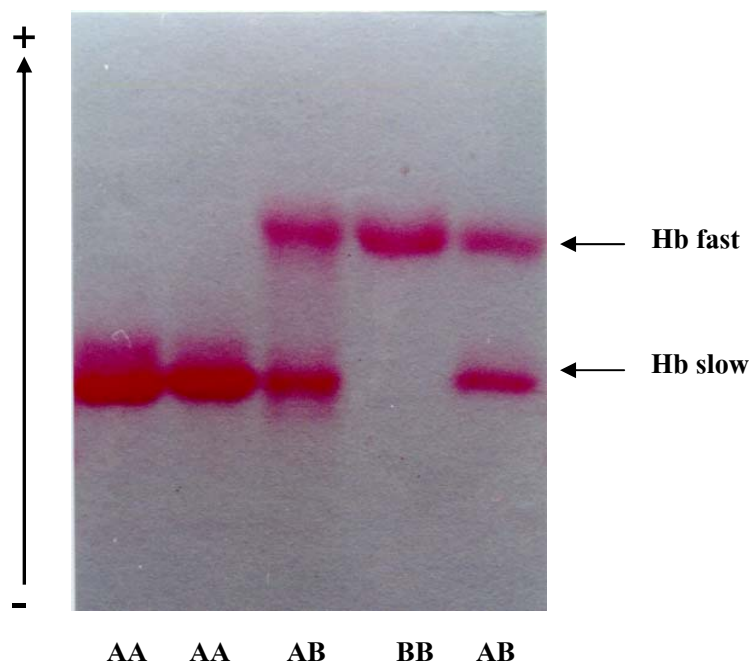
ที่มา: Adams *et al.* (1975)



ภาพที่ 6 แสดงสายโกลบินของโคป่า ซึ่งมีอัตราส่วนของสายอัลฟาหนึ่ง สายอัลฟาสองต่อสายเบต้า เป็น 1 ต่อ 1 และอัตราส่วนของสายอัลฟาหนึ่งต่อสายอัลฟาสองเป็น 37.5 ต่อ 62.5

ที่มา: Adams *et al.* (1975)

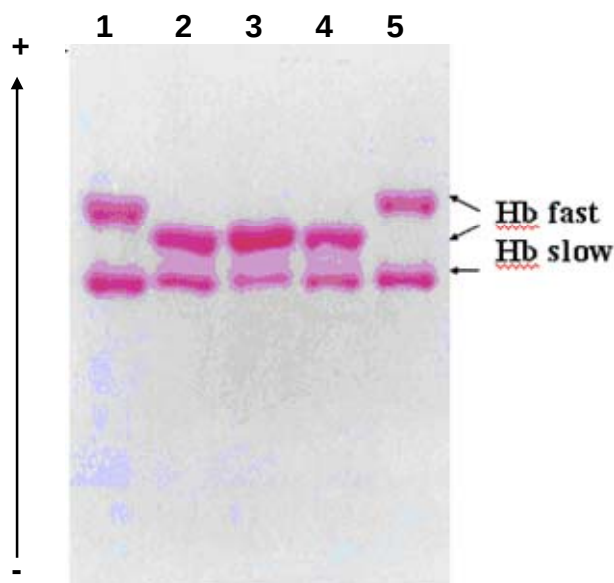
อรพรรณและคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาฮีโมโกลบินของโคกำแพงแสน 15 ตัว โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อใช้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของแถบฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก พบฮีโมโกลบิน 3 ฟิโนไทป์ คือ Hb AA 8 ตัว และ Hb BB 2 ตัวและ Hb AB 5 ตัว โดยที่ Hb AA ประกอบด้วย Hb slow เพียงอย่างเดียว Hb BB ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว ขณะที่ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ดังภาพที่ 7 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Bachmann *et al.* (1978) ที่ได้ศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินโคพันธุ์รามันห์ (โคอินเดีย) พบฮีโมโกลบิน 3 ฟิโนไทป์ คือ Hb AA Hb BB และ Hb AB ด้วยความถี่ของ Hb A และ Hb B ใกล้เคียงกัน โคพันธุ์ชาโรเลห์ (โคยุโรป) พบฮีโมโกลบิน 2 ฟิโนไทป์ คือ Hb AA และ Hb AB โดยมีความถี่ของ Hb A มากกว่า Hb B (Bangham and Blumberg, 1958)



ภาพที่ 7 แสดงฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb AA ประกอบด้วย Hb slow เพียงอย่างเดียว Hb BB ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว ขณะที่ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow

ที่มา: อรพรรณและคณะ (2546)

อรพรรณและคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาฮีโมโกลบินในกระบือปลักจำนวน 12 ตัว โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อใช้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของแถบฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก พบฮีโมโกลบิน 2 ฟีนোটป์ คือ Hb BB 11 ตัวและ Hb AB 1 ตัว ไม่พบ Hb AA นอกจากนี้ Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow (ดังแสดงในภาพที่ 8) ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ



ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างฮีโมโกลบิน โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลักโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25นาที่) เลนที่ 1 และ 5 แสดง Hb AB ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน เลนที่ 2 3 และ 4 แสดง Hb BB Hb AB และ Hb AB ของกระบือปลักตามลำดับ Hb fast ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า Hb fast ของกระบือปลัก ในขณะที่ Hb slow ของโคเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เท่ากับ Hb slow ของกระบือปลัก

ที่มา: อรพรรณและคณะ (2546)

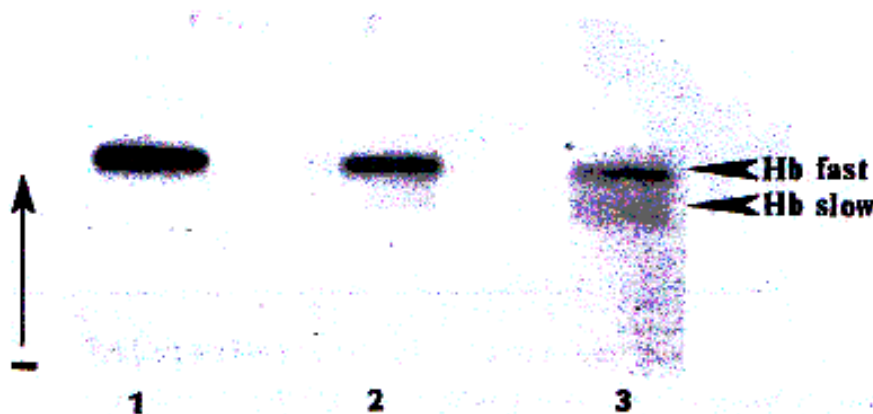
อรพรรณและคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและฮีโมโกลบินของกระบือปลักโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อใช้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของแถบฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก พบว่า Hb fast ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า Hb fast ของกระบือปลัก ในขณะที่ Hb slow ของโคเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เท่ากับ Hb slow ของกระบือปลัก ดังแสดงในภาพที่ 8 ต่อมาสุวิษและคณะ (2547) ได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่า Hb C ของโคเนื้อเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เท่ากับ Hb fast ของกระบือ

Bachmann *et al.* (1978) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของกระบือแม่น้ำ (*Bubalus bubalis*) พบว่ามีฮีโมโกลบิน 2 ชนิด ตามการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าคือ HbA₁ และ HbA₂ ในขณะที่ Khanna

(1973) ได้รายงานว่าโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส HbA₁ เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า HbA₂ ในกระป๋องอินเดีย (Indian buffaloes) ซึ่งแถบที่ปรากฏตรงกันกับ Hb C และ Hb A ของโคตามลำดับ

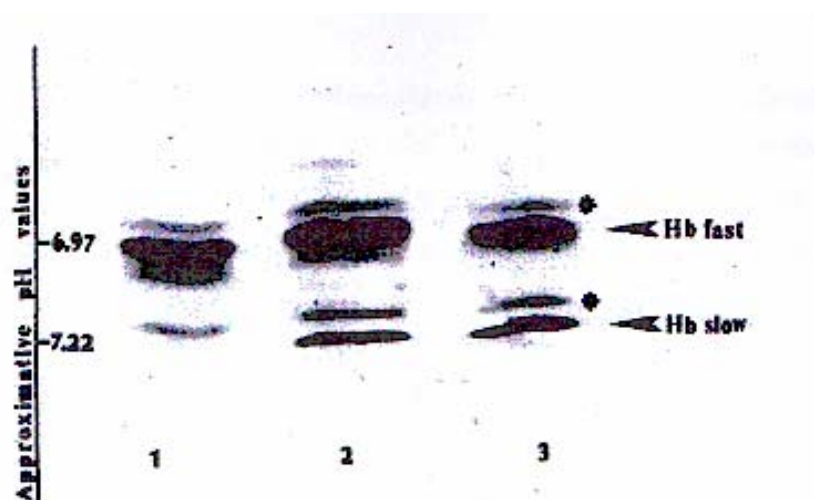
Di Luccia A *et al.* (1989) ได้ศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินในกระป๋องแม่น้ำอิตาลี (Italian water buffalo) โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดแบบแบ่งเจลที่พีเอช 8.9 พบว่ากระป๋องแม่น้ำมีฮีโมโกลบิน 3 ฟิโนไทป์คือ Hb AA, Hb BB และ Hb AB ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยที่ Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ซึ่ง Masina *et al.* (1977) ได้รายงานไว้ว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 68 ต่อ 32 และ 84 ต่อ 16 ตามลำดับ ขณะที่ Hb AA ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว เนื่องจาก Hb slow ประกอบด้วยกรดอะมิโนฮิสติดีนหรือไลซีนเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นที่พีเอชเป็นด่าง (8.9) Hb fast จึงมีประจุสุทธิเป็นลบมากกว่า Hb slow ทำให้ Hb fast เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วบวกได้เร็วกว่า (Di Luccia A *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่า Hb fast ประกอบด้วยสายอัลฟาหนึ่ง (α^I) ขณะที่ Hb slow ประกอบด้วยสายอัลฟาสอง (α^{II}) (Balani and Barnabas, 1965 และ Masina *et al.*, 1997) สายอัลฟาสองมีค่า pI สูงกว่าสายอัลฟาหนึ่ง (Di Luccia A *et al.*, 1989 และ Masina *et al.*, 1997) และสายอัลฟาทั้งสองมีกรดอะมิโนสามชนิดที่แตกต่างกัน คือ กรดอะมิโนทรีปโตเฟน (Balani and Barnabas, 1965) กรดอะมิโนซิสเทอีนและกรดอะมิโนไลซีน (Di Luccia A *et al.*, 1989) ซึ่งพบในสายอัลฟาหนึ่งเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ Di Luccia A *et al.* (1989) ได้ศึกษาความแตกต่างของ Hb fast และ Hb slow โดยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis, IEF) ที่ช่วงพีเอช 6.5-8.0 พบว่า Hb slow มีค่า pI สูงกว่า Hb fast แสดงดังภาพที่ 10 และเมื่อนำสายโกลบินจาก Hb AA, Hb BB และ Hb AB มาศึกษาด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ช่วง พีเอช 6.8-8.5 พบว่าสายโกลบินจาก Hb BB และ Hb AB ปรากฏบนอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็น 3 แถบ คือ สายอัลฟาหนึ่ง (α^I - chain) สายอัลฟาสอง (α^{II} - chain) และสายเบต้า (β - chain) ที่พีเอช 7.42, 7.76 และ 6.82 ตามลำดับ ส่วนสายโกลบินจาก Hb AA ปรากฏ 2 แถบคือสายอัลฟาหนึ่งและสายเบต้า แสดงดังภาพที่ 11 และเมื่อนำมาศึกษาที่พีเอชเป็นกรด พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับที่พีเอชเป็นด่าง คือ Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วยสายอัลฟาหนึ่ง สายอัลฟาสอง และสายเบต้า ขณะที่ Hb AA ประกอบด้วยสายอัลฟาหนึ่งและเบต้า เนื่องจากความแตกต่างกันของประจุ โดยที่สายอัลฟาสองใน Hb slow มีประจุสุทธิเป็นบวกมากกว่าสายอัลฟาหนึ่งใน Hb fast จึงทำให้สายอัลฟาสองมีค่า pI สูงกว่าสายอัลฟาหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่าสายอัลฟาหนึ่งและสายอัลฟาสองมีความแตกต่างกันที่กรดอะมิโนสามชนิดด้วยกัน คือ ทรีปโตเฟน (Balani and

Barnabas, 1965) ซีสเตอีนและไลซีน ซึ่งพบในสายอัลฟาหนึ่งมากกว่าสายอัลฟาสอง (Di Luccia A *et al.*, 1989)



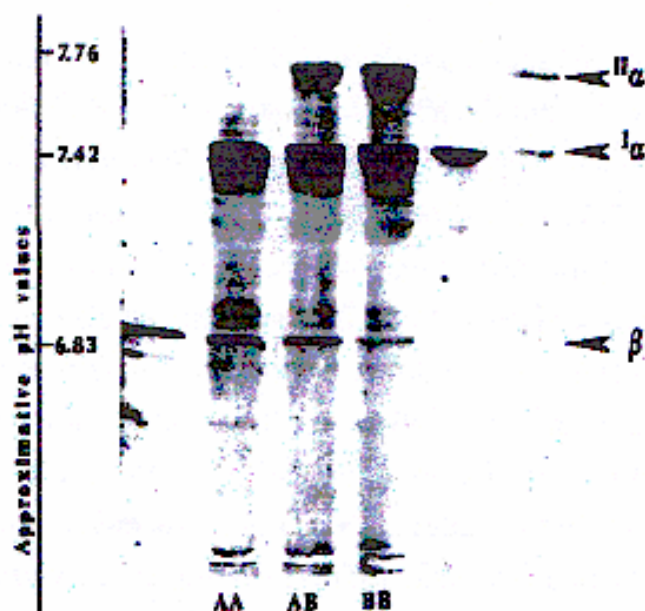
ภาพที่ 9 แสดงฮีโมโกลบินของกระบือแม่น้ำ 3 ฟิโนไทป์ คือ Hb AA (1) Hb AB (2) และ Hb BB (3) โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแบ่งเจลที่พีเอช 8.9

ที่มา: Di Luccia A *et al.* (1989)



ภาพที่ 10 แสดงฮีโมโกลบิน 3 ฟิโนไทป์ของกระบือแม่น้ำโดยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงแบบเกรเดียนต์ที่พีเอช 6.5-8.0 (1 = AA 2 = AB และ 3 = BB) * แถบที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

ที่มา: Di Luccia A *et al.* (1989)

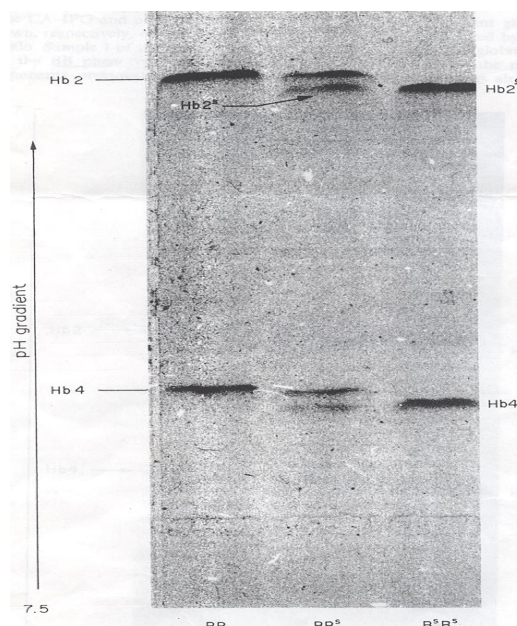


ภาพที่ 11 แสดงการแยกสายพอลิเปปไทด์จากฮีโมโกลบิน 3 ฟิโนไทป์ คือ Hb AA Hb BB และ Hb AB โดยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในช่วงพีเอช 6.8 - 8.5

ที่มา: Di Luccia A *et al.* (1989)

Di Luccia A *et al.* (1991) ได้ศึกษาสายโกลบินจาก Hb BB ในกระป๋องแม่ น้ำเพิ่มเติมพบว่า Hb BB มี 3 ฟิโนไทป์ คือ Hb BB, Hb B^sB^s และ Hb BB^s โดยใช้เทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงที่พีเอช 7.1-7.5 ดังแสดงในภาพที่ 12 พบว่า Hb BB ประกอบด้วย Hb 2 และ Hb 4 Hb 2 ประกอบด้วยสายอัลฟาหนึ่งสอง ($I\alpha_2$) และ Hb 4 ประกอบด้วยสายอัลฟาสองสี่ ($II\alpha_4$) Hb B^sB^s ประกอบด้วย Hb 2^s และ Hb 4^s ขณะที่ Hb BB^s ประกอบด้วย Hb 2 Hb 4 Hb 2^s และ Hb 4^s โดยฮีโมโกลบินทั้งสี่มีค่า pI จากซ้ายขวาไปยังขวาลบเป็น 7.160 7.168 7.350 และ 7.358 ตามลำดับ และจากการศึกษา Hb BB Hb BB^s และ Hb B^sB^s ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอชเป็นกรด พบว่าฮีโมโกลบินทั้ง 3 ฟิโนไทป์ประกอบด้วยสายอัลฟาที่เหมือนกัน คือ สายอัลฟาหนึ่งสอง ($I\alpha_2$) และสายอัลฟาสองสี่ ($II\alpha_4$) ขณะที่พบความแตกต่างเกิดขึ้นที่สายเบต้า โดยที่ Hb BB ประกอบด้วยสายเบต้า (β -chain) Hb B^sB^s ประกอบด้วยสายเบต้าเอส (β^s -chain) และ Hb BB^s ประกอบด้วยสายเบต้าและสายเบต้าเอส ($\beta + \beta^s$ -chain) จากการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันในสายเบต้า

ทั้งสองเนื่องจากมีความแตกต่างกันตรงส่วน hydrophobicity โดยที่สายเบต้าเอสของ Hb B^SB^S และ Hb BB^S ประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophobic มากกว่าสายเบต้าของ Hb BB



ภาพที่ 12 แสดงฟิโนไทป์ของ Hb B ในกระป๋องแม่ น้ำ โดยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงในพีเอชเกรเดียนต์ 7.1-7.5 ซึ่งปรากฏ HbBB ประกอบด้วย Hb 2 และ Hb 4; Hb BB^S ประกอบด้วย Hb 2, Hb 2^S Hb 4 และ Hb 4^S ส่วน Hb B^SB^S ประกอบด้วย Hb 2^S และ Hb 4^S

ที่มา: Di Luccia A *et al.* (1991)

Feranti *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องแม่ น้ำโดยใช้เทคนิค electrospray mass spectrometry (ES/MS) พบว่าสายเบต้าของ Hb AA มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $15,985.98 \pm 1.00$ ดาลตัน ส่วนสายอัลฟาหนึ่งและอัลฟาสามมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $15,058.12 \pm 0.43$ ดาลตัน และ $14,997.18 \pm 0.44$ ดาลตัน ตามลำดับ สายอัลฟาทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งมีค่าสูงกว่าโครงสร้างปฐมภูมิพื้นฐานที่ได้คาดไว้ นอกจากนี้ ลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย C (C-terminal region) ของสายอัลฟาหนึ่งใน Hb AA ตำแหน่งที่ 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนชนิดลิวซีนและเซอรีน ในขณะที่สายอัลฟาสามเป็นกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะลานีนและแอสพาราจีน ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ความยาว 1.5 นิ้ว
2. กระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี
3. หลอดเก็บตัวอย่าง

สารเคมี

1. เฮปาริน (Heparin)
2. เอธิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol)

สัตว์ทดลอง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกระบือปลักที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพูนกลาง อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี โดยแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองดังนี้

กระบือปลัก (*Bubalus bubalis*, Swamp buffalo)

เพศผู้	ช่วงอายุ	1 ปี ถึง 3 ปี	จำนวน 31 ตัว
เพศเมีย	ช่วงอายุ	1 ปี ถึง 3 ปี	จำนวน 30 ตัว
เพศเมีย	ช่วงอายุ	มากกว่า 7 ปี	จำนวน 10 ตัว

กระบือแม่น้ำ (*Bubalus bubalis*, River buffalo) ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดกระบือแม่น้ำจากกรมปศุสัตว์

เพศผู้	ช่วงอายุ	3 ปี 5 เดือน ถึง 8 ปี	จำนวน 3 ตัว
เพศเมีย	ช่วงอายุ	2 ปี และ 4 ปี 4 เดือน	จำนวน 2 ตัว

วิธีการ

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกระป๋องปลักและกระป๋องแม่ น้ำโดยเจาะที่เส้นเลือดดำใหญ่ (Jugular vein) บริเวณใต้ลำคอ นำตัวอย่างเลือดที่ได้แบ่งใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่บรรจุเฮปาริน ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเพื่อทำการเก็บ whole blood

2. การเตรียมสารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลเสต

นำตัวอย่างเลือด (whole blood) มาปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้งด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) ด้วยปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่างเลือด แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงมาเติมสารละลายฮีโมไลเสต (hemolysate reagent) ที่ประกอบด้วย 0.005 โมลาร์ EDTA และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide) ในอัตราส่วน 1:5 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัดเศษเซลล์ (cell debris) และผนังเซลล์ (cell membrane) เก็บของเหลวหรือสารละลายฮีโมโกลบินที่อยู่ด้านบนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป (ดัดแปลงจาก Tamburrini *et al.*, 2001; Fago *et al.*, 1995)

3. การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

3.1 การศึกษาชนิดหรือฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักและกระป๋องแม่ น้ำโดยเทคนิคเซลล์โลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีของ Helena Laboratories, Sweden (1985)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือเซลล์โลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Helena Laboratories, France)
2. แผ่นเซลล์โลสอะซิเตด (TITAN III-H) ขนาด 76 x 60 มิลลิเมตร
1. จานแก้ว

2. ตู้อบ (Memmert, Germany)
3. กระจกกรอง
4. แผ่นสไลด์
5. เครื่องวิเคราะห์แผ่นเจล

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์

สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-EDTA-กรดบอริก (Supre-Heme Buffer) พีเอช 8.2-8.6

2. สีย้อมพองโซ เอส (Ponceau S) ประกอบด้วย 0.5 % พองโซเอส ในสารละลาย 3.5 % กรดซัลโฟซาลิไซลิก (Sulfosalicylic acid) และ 3.5% กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid)

3. สารล้างสีย้อม (Destaining reagent) ประกอบด้วย 5% กรดอะซิติก

4. สารละลาย Clearing ประกอบด้วย

2.2 30 ส่วน กรดอะซิติก

2.3 70 ส่วน เมทานอล

2.4 4 ส่วน Clear aid (Helena Laboratories, France)

5. สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) (Helena Laboratories, France)

6. สารละลายฮีโมโกลบินกระป๋องปลักและกระป๋องแม่น้ำ

วิธีการ

1. นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 5 นาที

2. เทสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในอ่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 ข้างของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระจกกรอง (Wick) ที่ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์วางพาดลงในอ่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 ข้าง เพื่อเป็นสะพานเชื่อมระหว่างแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตและสารละลายบัฟเฟอร์

3. นำสารละลายฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก กระป๋องแม่น้ำและสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control ปริมาตร 8 ไมโครลิตรมาใส่ลงในช่องใส่สาร

4. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดที่แช่ในบัฟเฟอร์มาซับด้วยกระดาษกรอง แล้วนำมาใส่สารละลายฮีโมโกลบินกระบือปลัก กระบือแม่น้ำและสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control ที่เตรียมไว้

5. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดที่ใส่สารเรียบร้อยแล้วมาวางคว่ำหน้าบนอ่างอิเล็กโทรด โดยหันด้านใสตัวอย่างมาทางขั้วลบ ใช้แผ่นสไลด์วางทับลงบนแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดเพื่อให้ผิวหน้าสัมผัสกับกระดาษกรองและปิดฝาอ่างอิเล็กโทรด

6. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 350 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที

7. ย้อมสีโดยใช้แผ่นเซลล์โลสอะซิเตดในสารละลายสีย้อมฟองโซ เอส เป็นเวลา 8 นาที

8. ล้างสีย้อมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก จนมองเห็นแถบของฮีโมโกลบินชัดเจนหรือจนพื้นหลังของแผ่นเจลไม่มีสีย้อม

9. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดมาแช่ลงในเมธานอล 4 นาที

10. หลังจากนั้นแช่ลงในสารละลาย Clearing เป็นเวลา 9 นาที

11. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดมาให้ความร้อนโดยอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้แผ่นเซลล์โลสอะซิเตดเปลี่ยนจากแผ่นทึบแสงมาเป็นแผ่นโปร่งแสงและแห้งสนิททั่วทั้งแผ่น

12. นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์แผ่นเจล

3.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระบือปลักโดยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Gel filtration column chromatography) (ดัดแปลงจากวิธีของ Verdergon and Colacino, 1989)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือ Econo system (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
2. ตู้เย็น Kelvinator scientific (U.S.A.) ที่ 4 องศาเซลเซียส
3. UV – visible recording spectrophotometer UV – 160 (Shimadzu, Japan)
4. เข็มฉีดยาเคมีขนาด 5 ซีซี
5. คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 75 เซนติเมตร

สารเคมี

1. เซฟาเดกซ์ G – 100 (Sephadex G – 100 Grade fine, Pharmacia Laboratories, Sweden)
2. 0.05 โมลาร์ ทรียส บัฟเฟอร์ (Tris buffer) 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์ (Sodium axide, NaN_3) พีเอช 7.4

3. สารละลายมาตรฐาน (Standard solution) ประกอบด้วย

- 3.1 บลูเดกซ์เทรน (Blue Dextran) น้ำหนักโมเลกุล 2,000,000 ดาลตัน
- 3.2 ซีรัมอัลบูมินของโค (Bovine Serum Albumin) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน
- 3.3 โอวัลบูมินของไก่ (Chicken Ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 44,000 ดาลตัน
- 3.4 ไคโมทริปซินโนเจน เอ (Chymotrypsinogen A) น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน
- 3.5 ไรโบนิวคลีเอส เอ (Ribonuclease A) น้ำหนักโมเลกุล 13,000 ดาลตัน

วิธีการ

1. การเตรียมคอลัมน์

- 1.1 ชั่ง Sephadex G – 100 ในปริมาณที่ต้องการค่อยๆเติมน้ำกลั่น คนเบาๆนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- 1.2 รินน้ำทิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้งจากนั้นเติมทรียสบัฟเฟอร์ตั้งทิ้งไว้ให้อิ่มตัวที่อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเป็นเวลา 30 นาที
- 1.3 เตรียมคอลัมน์ไว้ในตู้เย็น ต่อคอลัมน์ด้วย reservoir ปิดปลายล่าง เติมบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์สูงประมาณ 1/3 ของคอลัมน์ รินบัฟเฟอร์ในเจลทิ้งให้เหลือบัฟเฟอร์ 25 เปอร์เซนต์ของเจล แล้วทำการบรรจุเจลลงในคอลัมน์ โดยคนและเทเบาๆให้หมดในครั้งเดียว
- 1.4 เมื่อเจลเรียงตัวในคอลัมน์ ใส่ adapter และ equilibrate ด้วยทรียส บัฟเฟอร์ที่อัตราไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาทีจนปริมาตรของเจลคงที่แล้วหาปริมาตรเจลที่แน่นอน จากนั้น equilibrate ต่อไปประมาณ 2 เท่าของปริมาตรเจลจะได้คอลัมน์เจลที่พร้อมใช้งาน

2. แยกโปรตีนมาตรฐานในสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และแยกโปรตีนในอีโมไลเซตของกระป๋องปลั๊กที่มีความ

เข้มข้นของโปรตีน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ที่อัตรา
การไหล 1.8 มิลลิลิตรต่อนาที

3. เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่
280 นาโนเมตรสำหรับโปรตีน และที่ 415 นาโนเมตร สำหรับฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊ก

4. สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตร
(มิลลิลิตร) ของแต่ละหลอด (fraction) ที่ได้จากกราฟ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย
(Distribution coefficient, K_d) ดังสูตร

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

โดยที่ V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ที่บรรจุเม็ดเจล (total volume)

V_e คือ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารออกมา (elution volume)

V_o คือ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ล้อมรอบเม็ดเจล (void volume)

5. นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การกระจายกับค่าลอการิทึมน้ำหนัก
โมเลกุล (log molecular weight) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊ก

3.3 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลั๊ก โดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี
(mass spectrometry)

หลักการ

อาศัยหลักการยิงแสงเลเซอร์ลงไปในตัวอย่างโปรตีนที่จับกับเมทริกซ์ ทำให้เกิดการแตก
ตัวของไอออน (Ion) แล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้า ภายใต้สภาวะดังกล่าว สารที่
มวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบกับตัวตรวจจับ
(detector) ซึ่งส่งเป็นสัญญาณไปยังระบบคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป

อุปกรณ์

1. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer) แบบ MALDI – TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.)
2. แผ่นใสตัวอย่าง (sample slide)

สารเคมี

1. 0.01 โมลาร์ กรดไซแนพินิก (Sinapinic acid)

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักโดยนำฮีโมไลสผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี ของ Sephadex G – 100 แล้วเก็บหลอดที่เป็นสารละลายฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
2. ผสมสารละลายฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักข้างต้นประมาณ 1 ไมโครลิตร (10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) กับกรดไซแนพินิก ซึ่งเป็นเมทริกซ์ประมาณ 1 ไมโครลิตร ใส่ลงบนแผ่นใสตัวอย่าง ปลดปล่อยไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
3. นำไปผ่านเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เมื่อยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์ (Nitrogen laser) เครื่องจะรายงานผลตามน้ำหนักโมเลกุลผ่านทางคอมพิวเตอร์

3.4 การศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธี เนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis, N-PAGE) (ดัดแปลงจาก Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟรีซิส Mini Protein II (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Bio-Rad รุ่น Power PAC 200, Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)
3. กระบอกฉีด (micro syringe) ขนาด 25 ไมโครลิตร

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมแผ่นเจล ประกอบด้วย

- 1.1 สารละลายอะคริลาไมด์/บิส มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร (30%T, 2.67%C) (30% Acrylamide / N,N' - methylene - bis - acrylamide stock solution) ประกอบด้วย อะคริลาไมด์ 14.6 กรัม และบิส 0.4 กรัม
- 1.2 1.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 8.8
- 1.3 0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8
- 1.4 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)
- 1.5 N, N, N', N' เทตราเมทิลีนไดเอมีน (N, N, N', N' - tetramethylenediamine; TEMED)

2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer) ประกอบด้วย

- 1.6 0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 0.5 มิลลิลิตร
- 1.7 99.99 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 0.4 มิลลิลิตร
- 1.8 1 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) 0.2 มิลลิลิตร
- 1.9 น้ำกลั่น 2.9 มิลลิลิตร

3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 (electrode buffer, pH 8.3) 1 ลิตร

- 3.1 ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 3 กรัม
- 3.2 ไกลซีน (glycine) 14.4 กรัม
- 3.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย

- 4.1 กรดอะซิติก 10 ส่วน
- 4.2 เอทานอล 25 ส่วน
- 4.3 น้ำกลั่น 65 ส่วน

5. สีย้อม ประกอบด้วย

- 5.1 โคแมสซึบลูอาร์-250 (Coomassie blue R-250) ในสารละลายล้างสีย้อม

6. สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) (Helena Laboratories, France)

7. สารละลายอีโมโกลบินกระป๋องปลัก

วิธีการ

1. ทำการเตรียมแผ่นเจลดังนี้

1.1 เตรียมสารละลายสำหรับ separating gel (12%T, 4%C) ทั้งหมดยกเว้น TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ดังตาราง แล้วดูดอากาศออกด้วยปั๊มสุญญากาศ

1.2 ประกอบชุดเตรียมเจลและทำเครื่องหมายแสดงความสูงของ separating gel บนแผ่นกระจก

1.3 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลายเจล แล้วเปิดใส่ช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนถึงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมาย ปิดฝิวน้ำเจลด้วยน้ำกลั่นเบาๆ

1.4 ปล่อยให้เจลแข็งตัว (polymerization) ประมาณ 30 - 45 นาที ขณะรอเวลาให้เตรียม stacking gel (4%T, 4%C) ซึ่งขั้นตอนเหมือนกับการเตรียม separating gel ดังตาราง

สารในการเตรียมเจล	ปริมาณสารในการเตรียมเจล	
	12%T	4%T
น้ำกลั่น (ml)	6.9	6.2
1.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 8.8 (ml)	5	-
0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 (ml)	-	2.5
30 % สารละลายอะคริลาไมด์/บิส (ml)	8	1.33
10 % แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (μl)	200	100
TEMED (μl)	10	5

หมายเหตุ : สูตรสำหรับเจล 4 แผ่น

1.5 เมื่อเจลแข็งตัวจะเกิดแนวเส้นตรงบริเวณฝิวน้ำเจล ชับน้ำบนฝิวน้ำเจลแล้วใส่ comb ในช่องว่างระหว่างกระจกเอียงทำมุมประมาณ 10 องศา

1.6 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลาย stacking gel เปิดสารละลายเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนเต็ม แล้วจัด comb ให้อยู่ในแนวเส้นตรง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 - 45 นาที

1.7 คิง comb อย่างระมัดระวังแล้วล้างหลุมเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 จะได้เจลพร้อมสำหรับทำ N-PAGE จากนั้นประกอบแผ่นเจลเข้ากับชุดอิเล็กโทรด เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 ในอ่างอิเล็กโทรดบนและล่างและให้ท่วมผิวหน้าเจล

2. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง โดยเตรียมสดใช้ใน 1 วัน ผสมสารละลายละลายอีโมไลเซตและอีโมโกลบีนมาตรฐานเข้ากับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสม ประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่หลุมเจลด้วยกระบอกฉีด

3. ต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสที่พร้อมทำงานกับเครื่องจ่ายกระแสไฟ ตั้งค่าที่ 200 โวลต์คงที่ และ 60 มิลลิแอมป์ ต่อเจล 1 แผ่น ใช้เวลา 45 นาที

4. นำแผ่นเจลออกมาข้อมสี เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าขณะข้อม)

5. ล้างสีข้อมโดยเปลี่ยนทุกๆ 30 นาที (เขย่าขณะข้อม) ล้างจนกระทั่งเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจลใสไม่มีสีข้อม

6. เก็บแผ่นเจลในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

3.5 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสายโกลบินโดยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมืออิเล็กโทรโฟรีซิส Mini Protein (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Bio-Rad รุ่น Power PAC 200, Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)
3. กระบอกฉีด (micro syringe) ขนาด 25 ไมโครลิตร
4. เครื่องให้ความร้อน (Stuart Scientific รุ่น SHT 1, United Kingdom)
5. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมแผ่นเจล ประกอบด้วย

- 1.1 30 เปอร์เซ็นต์ สารละลายอะคริลาไมด์/บิส จำนวน 50 มิลลิลิตร (30%T, 2.67%C) (30% Acrylamide/N, N'-methylene-bis-acrylamide stock solution) ประกอบด้วย อะคริลาไมด์ 14.6 กรัม และบิส 0.4 กรัม
- 1.2 1.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 8.8
- 1.3 0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8
- 1.4 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)
- 1.5 N, N, N', N' เทตราเมทิลีนไดเอมีน (N, N, N', N' - tetramethylenediamine; TEMED)
- 1.6 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate; SDS)

2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer)

- 1.1 0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8
- 1.2 99.9 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล
- 1.3 1 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue)
- 1.4 2 - เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)
- 1.5 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 1 ลิตร ประกอบด้วย

- 3.1 ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 3 กรัม
- 3.2 ไกลซีน 14.4 กรัม
- 3.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 1 กรัม
- 3.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย

- 4.1 กรดอะซิติก 10 ส่วน
- 4.2 เอทานอล 25 ส่วน
- 4.3 น้ำกลั่น 65 ส่วน

5. สีย้อม ประกอบด้วย

- 5.1 โคแมสซิบลูอาร์-250 (Coomassie blue R-250) ในสารละลายล้างสีย้อม

6. โปรตีนมาตรฐานชนิด Broad range molecular weight (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)

ประกอบด้วย

- 6.1 ไมโอซิน (myosin) น้ำหนักโมเลกุล 214 กิโลดาลตัน
- 6.2 เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) น้ำหนักโมเลกุล 118 กิโลดาลตัน

- 6.3 ซีรัมอัลบูมินของโค น้ำหนักโมเลกุล 92 กิโลดาลตัน
- 6.4 โอวาลบูมิน น้ำหนักโมเลกุล 52.2 กิโลดาลตัน
- 6.5 คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) น้ำหนักโมเลกุล 35.7 กิโลดาลตัน
- 6.6 ตัวยับยั้งทริปซินของถั่วเหลือง (soy bean trypsin inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 28.9 กิโลดาลตัน
- 6.7 ไลโซไซม์ (lysozyme) น้ำหนักโมเลกุล 20.8 กิโลดาลตัน
- 6.8 อะโปรตีนิน (aprotinin) น้ำหนักโมเลกุล 6.8 กิโลดาลตัน

วิธีการ

1. ทำการเตรียมแผ่นเจลดังนี้

- 1.1 เตรียมสารละลายสำหรับ separating gel (12%T, 4%C) ทั้งหมดยกเว้น TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ดังตาราง แล้วดูอากาศออกด้วยปั๊มสุญญากาศ
- 1.2 ประกอบชุดเตรียมเจลและทำเครื่องหมายแสดงความสูงของ separating gel บนแผ่นกระจก
- 1.3 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ลงในสารละลายเจล แล้วเปิดใส่ช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนถึงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมาย ปิดฝิหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นเบาๆ
- 1.4 ปลอ่ยให้เจลแข็งตัว (polymerization) ประมาณ 30 - 45 นาที ขณะรอเวลาให้เตรียม stacking gel (4%T, 4%C) ซึ่งขั้นตอนเหมือนกับการเตรียม separating gel ดังตาราง

สารในการเตรียมเจล	ปริมาณสารในการเตรียมเจล	
	12%T	4%T
น้ำกลั่น (ml)	6.7	6.1
1.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 8.8 (ml)	5	-
0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 (ml)	-	2.5
30 เปอร์เซนต์ สารละลายอะครีลาไมด์/บิส (ml)	8	1.33
10 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (μ l)	200	100
10 เปอร์เซนต์ โซเดียมโคดีซิลซัลเฟต	200	100
TEMED (μ l)	10	5

หมายเหตุ : สูตรสำหรับเจล 4 แผ่น

1.5 เมื่อเจลแข็งตัวจะเกิดแนวเส้นตรงบริเวณผิวหน้าเจล ชับน้ำบนผิวหน้าเจลแล้วใส่ comb ในช่องว่างระหว่างกระจกเอียงทำมุมประมาณ 10 องศา

1.6 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลาย stacking gel ปิดสารละลายเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนเต็ม แล้วจัด comb ให้อยู่ในแนวเส้นตรง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 - 45 นาที

1.7 ดึง comb อย่างระมัดระวังแล้วล้างหลุมเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับ อิเล็กโทรด พีเอช 8.3 จะได้เจลพร้อมสำหรับทำ N-PAGE จากนั้นประกอบแผ่นเจลเข้ากับชุดอิเล็กโทรด เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 ในอ่างอิเล็กโทรดบนและล่างและให้ท่วมผิวหน้าเจล

2. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง โดยเตรียมสดใช้ใน 1 วัน ผสมสารละลายละลายอีโมไลเซตและอีโมโกบินมาตรฐานเข้ากับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความร้อนสารละลายละลายอีโมไลเซตที่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ส่วนสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ให้ความร้อนที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปใส่หลุมเจลด้วยกระบอกลีด

3. ต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสที่พร้อมทำงานกับเครื่องจ่ายกระแสไฟ ตั้งค่าที่ 200 โวลท์คงที่ และ 60 มิลลิแอมแปร์ ต่อเจล 1 แผ่น ใช้เวลา 45 นาที

4. นำแผ่นเจลออกมาข้อมสีเป็นเวลา 30 นาที (เขย่าขณะข้อม)

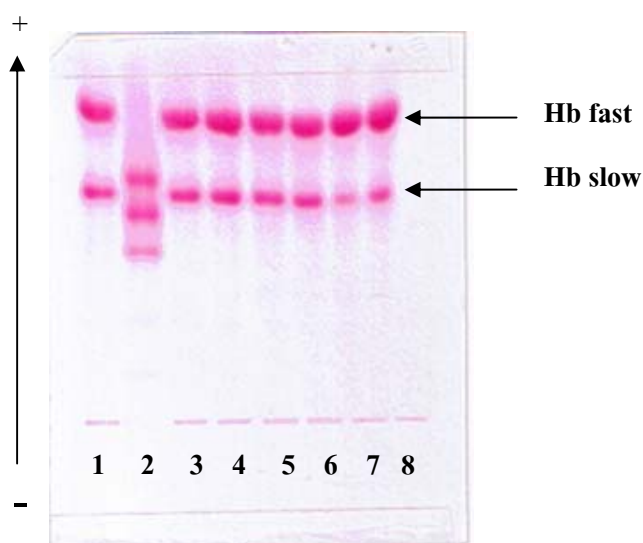
5. ล้างสีข้อมโดยเปลี่ยนทุกๆ 30 นาที (เขย่าขณะข้อม) ล้างจนกระทั่งเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจลาโตไม่มีสีข้อม

6. เก็บแผ่นเจลาในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

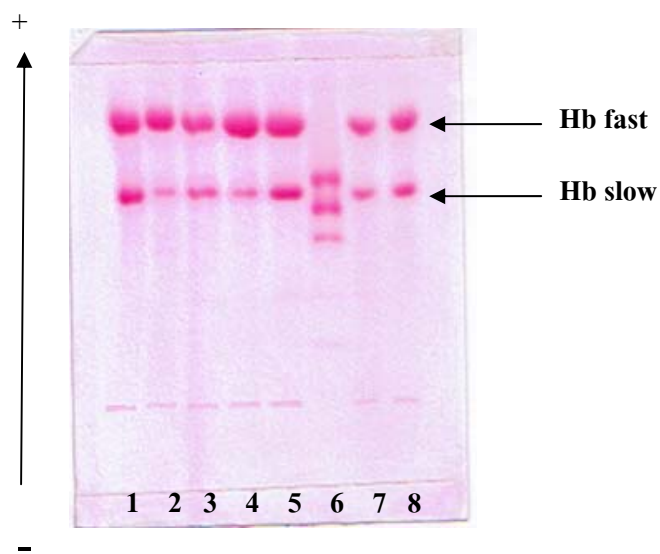
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักและกระป๋องแม่น้ำ

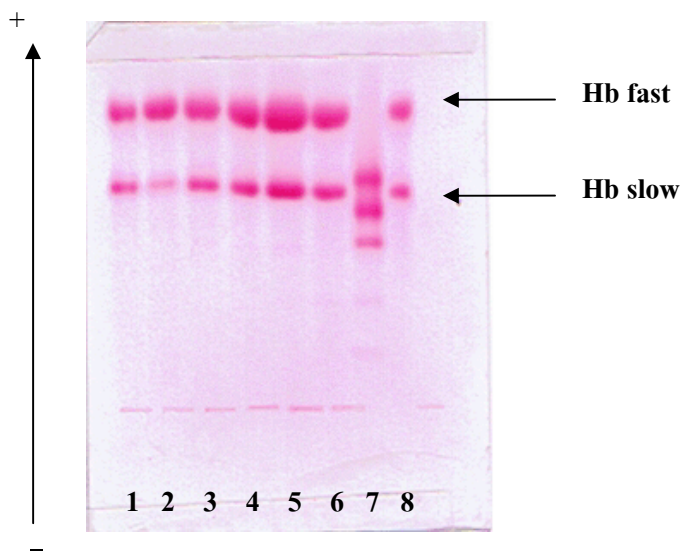
จากการทดลองนำฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักมาทำการศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบิน โดยวิธีเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ พีเอช 8.2 - 8.6 พบว่าฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักมี 2 ฟิโนไทป์ แสดงดังภาพที่ 13 – 17 คือ ฮีโมโกลบิน BB และฮีโมโกลบิน AB ซึ่ง Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ และเมื่อนำฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่น้ำมาทำการศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินโดยวิธีเช่นเดียวกับการศึกษาในกระป๋องปลักพบว่าฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่น้ำมี 2 ฟิโนไทป์ แสดงดังภาพที่ 18 คือ ฮีโมโกลบิน BB และฮีโมโกลบิน AB ซึ่ง Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับเช่นเดียวกัน และ ภาพที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินกระป๋องปลักและกระป๋องแม่น้ำ



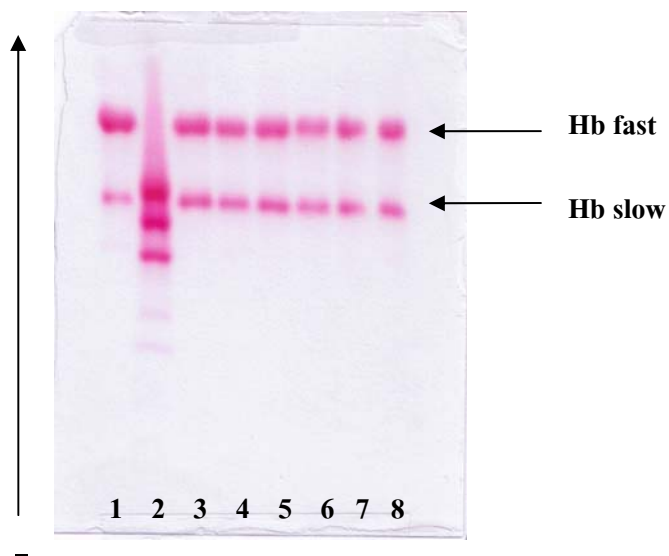
ภาพที่ 13 แสดงฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักเพศเมียช่วงอายุ 1 ปี – 3 ปี โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1, 3, 4, 5 และ 6 แสดง Hb BB เลนที่ 7 และ 8 แสดง Hb AB และเลนที่ 2 แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)



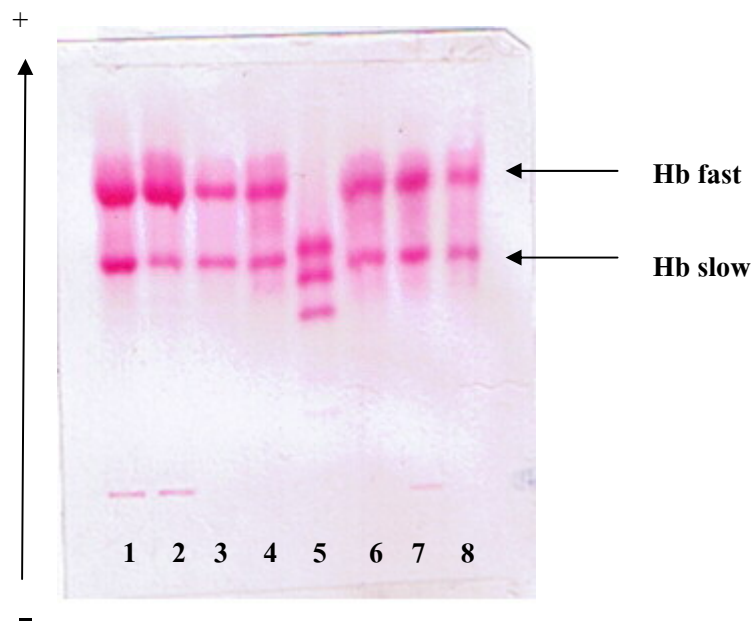
ภาพที่ 14 แสดงฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กเพศเมียช่วงอายุมากกว่า 7 ปี โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1, 3, 5, 7 และ 8 แสดง Hb BB เลนที่ 2 และ 4 แสดง Hb AB และเลนที่ 6 แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)



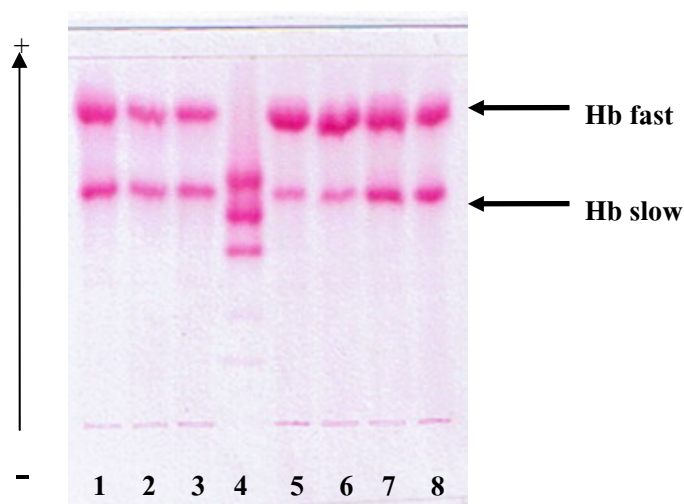
ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กเพศเมียช่วงอายุ 1 ปี – 3 ปี กับ อายุมากกว่า 7 ปี โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1 และ 2 ช่วงอายุมากกว่า 7 ปี แสดง Hb BB และ AB ตามลำดับ เลนที่ 3, 4, 5, 6 และ 8 ช่วงอายุ 1 ปี – 3 ปี แสดง Hb BB และเลนที่ 7 แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)



ภาพที่ 16 แสดงฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กเพศผู้ช่วงอายุ 1 ปี - 3 ปี โดยเทคนิคเซลลูโลส อะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1 แสดง Hb AB เลนที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 แสดง Hb BB และเลนที่ 2 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)

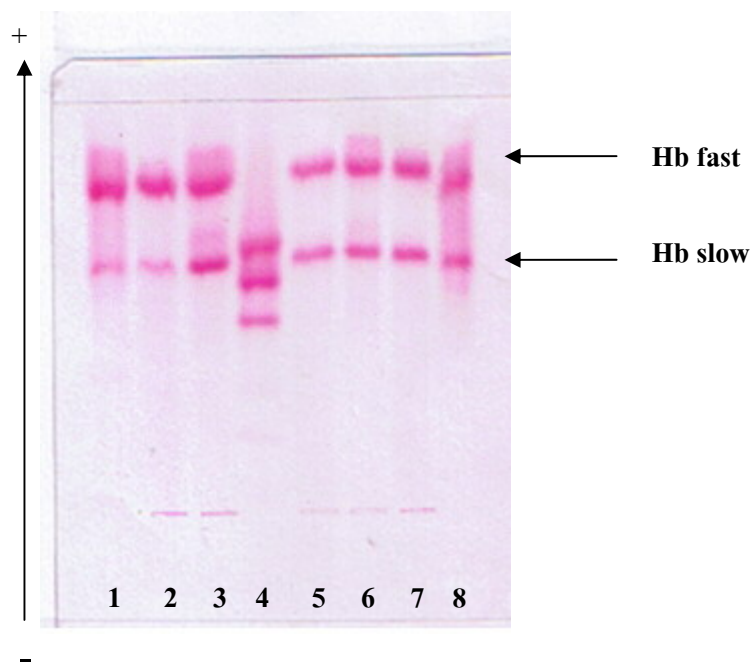


ภาพที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กเพสผู้และเพสเมียโดยเทคนิค เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟริซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ ฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กเพสเมีย: เลนที่ 1, 3 และ 7 แสดง Hb BB เลนที่ 2 แสดง Hb AB ฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กเพสผู้: เลนที่ 4, 6 และ 8 แสดง Hb BB และเลนที่ 5 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)

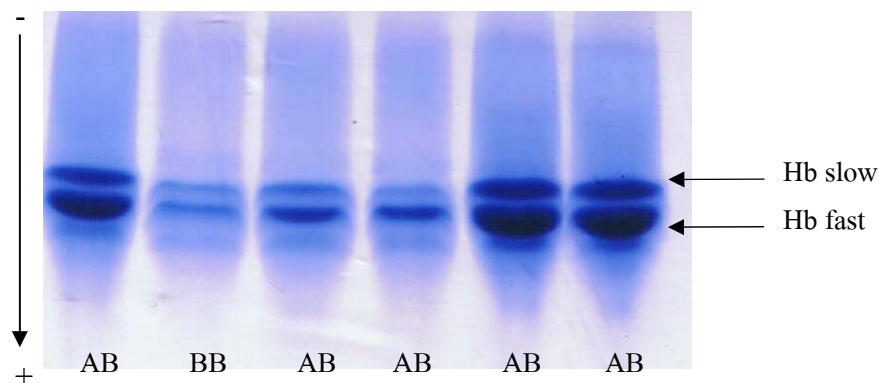


ภาพที่ 18

แสดงฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่ น้ำพุและผู้และเพศเมียโดยเทคนิคเซลลูโลส อะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ ฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่ น้ำพุและผู้: เลนที่ 1, 2, 7 และ 8 แสดง Hb BB เลนที่ 6 แสดง Hb AB ฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่ น้ำพุและผู้: เลนที่ 3 และ 5 แสดง Hb BB และ Hb AB ตามลำดับ และเลนที่ 4 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)



ภาพที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กและกระป๋องแม่ น้ำ โดยเทคนิค เซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1 และ 2 แสดง Hb AB เลนที่ 3, 5, 6, 7 และ 8 แสดง Hb BB และเลนที่ 4 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)



ภาพที่ 20 แสดงชนิดของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักโดยเทคนิคเนทีฟโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 12%T, 4%C ที่พีเอช 8.3 (200 โวลท์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์/เจล 1 แผ่น 40 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ

เมื่อนำสารละลายฮีโมโกลบินกระป๋องปลักมาทำการศึกษาไฟโนไทป์ โดยวิธีเนทีฟโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วยเจล 12%T 4%C (200 โวลท์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์สำหรับเจล 1 แผ่นใช้เวลา 40 นาที) ดังแสดงในภาพที่ 20 ได้ผลเช่นเดียวกับผลที่ได้จากเทคนิคเซลลูโลส อะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส พีเอช 8.2 - 8.6 ตามวิธีของ Helena Laboratories (U.S.A.) โดยพบ ฮีโมโกลบิน 2 ชนิด คือ Hb fast และ Hb slow ตามการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก

จากการศึกษาไฟโนไทป์กระป๋องปลักเพศผู้จำนวน 31 ตัว เพศเมียจำนวน 40 ตัวและกระป๋องแม่น้าเพศผู้ 3 ตัว เพศเมีย 2 ตัว โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสและพอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 เมื่อใช้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของแถบฮีโมโกลบินในอิเล็กโตรโฟรีซิสจากขั้วลบไปยังขั้วบวก พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ผลเช่นเดียวกันคือพบฮีโมโกลบิน 2 ไฟโนไทป์ในกระป๋องปลัก คือ Hb BB 59 ตัว (เพศผู้ 27 ตัวและเพศเมีย 32 ตัว) และ Hb AB 12 ตัว (เพศผู้ 4 ตัวและเพศเมีย 8 ตัว) และพบฮีโมโกลบิน 2 ไฟโนไทป์ในกระป๋องแม่น้าเช่นกัน คือ Hb BB 3 ตัว (เพศผู้ 2 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว) และ Hb AB 2 ตัว (เพศผู้ 1 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว) ไม่พบ Hb AA ที่ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องการรายงานของ Masina *et al.*, (1977) ได้กล่าวว่าที่พีเอชเป็นค่าในระบบอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบิน 3 ไฟโนไทป์ในกระป๋องแม่น้า คือ Hb AA, Hb BB และ Hb AB โดยที่ Hb AA ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว (Naik and

Suzumaran, 1967., Masina *et al.*, 1977 และ Iorio *et al.*, 1986) ขณะที่ Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ (Masina *et al.*, 1977) เนื่องจาก Hb fast มีประจุสุทธิเป็นลบมากกว่า Hb slow และ Hb slow ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีนหรือไลซีนเป็นส่วนใหญ่ Hb fast จึงเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้เร็วกว่าในอิเล็กโตรโฟรีซิส (Di Luccia A *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่า Hb fast ประกอบด้วยสายอัลฟาหนึ่ง ($I\alpha$) ขณะที่ Hb slow ประกอบด้วยสายอัลฟาสอง ($II\alpha$) (Balani and Barnabas, 1965 และ Masina *et al.*, 1977) ซึ่งสายอัลฟา สองมีค่า pI สูงกว่าสายอัลฟาหนึ่ง (Di Luccia A *et al.*, 1989 และ Masina *et al.*, 1977) เนื่องจากสายอัลฟาทั้งสองมีกรดอะมิโนสามตัวที่แตกต่างกัน คือ กรดอะมิโนทริปโตเฟน (Balani and Barnabas, 1965) กรดอะมิโนซีสเทอีนและกรดอะมิโนไลซีน (Di Luccia A *et al.*, 1989) ซึ่งพบในสายอัลฟาหนึ่งเป็นส่วนใหญ่และจากการศึกษาของ Braend and Stormont (1955) ในกระบือพันธุ์ไบซันพบฮีโมโกลบิน 2 พิโนไทป์ คือ Hb AA และ Hb BB

การศึกษาเปรียบเทียบพิโนไทป์ระหว่างกระบือปลักเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพที่ 17 เมื่อใช้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของแถบฮีโมโกลบินในอิเล็กโตรโฟรีซิสจากขั้วลบไปยังขั้วบวก พบว่าแถบของฮีโมโกลบินเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกได้เหมือนกันและเมื่อทำการวิเคราะห์แผ่นเจลโดยใช้เครื่องวิเคราะห์พบว่าอัตราส่วนของ Hb BB และ Hb AB มีอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของอรพรรณและคณะ (2546) ที่ได้ทำการศึกษาพิโนไทป์ของกระบือปลักจำนวน 12 ตัว โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสและพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พิเศษเป็นต่าง พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ผลเช่นเดียวกัน กล่าวคือพบฮีโมโกลบิน 2 พิโนไทป์ คือ Hb BB 11 ตัว (เพศผู้ 4 ตัวและเพศเมีย 7 ตัว) และ Hb AB 1 ตัว (เพศเมีย 1 ตัว) ไม่พบ Hb AA นอกจากนี้ Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบพิโนไทป์ระหว่างกระบือปลักและกระบือแม่น้ำ ดังแสดงในภาพที่ 19 พบว่าแถบของฮีโมโกลบินเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกได้เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าชนิดของฮีโมโกลบินกระบือปลักและกระบือแม่น้ำมีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกัน การศึกษาฮีโมโกลบินของกระบือปลักและกระบือแม่น้ำครั้งนี้ไม่พบ Hb AA อาจเนื่องมาจาก ตัวอย่างเลือดกระบือแม่น้ำที่นำมาทำการศึกษาเป็นกระบือแม่น้ำที่มาจากประเทศอินเดีย (กระบือแม่น้ำแถบทวีปเอเชีย) ซึ่งมีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมและมีการปรับตัวในการดำรงชีวิตที่แตกต่างจากกระบือแม่น้ำที่อยู่แถบทวีปยุโรปจึงทำให้ไม่พบฮีโมโกลบินชนิด Hb AA ที่พบได้ในกระบือแม่น้ำอิตาลี (Italian water buffalo) อีกทั้งจำนวนกระบือแม่น้ำที่นำมาศึกษามีเพียง 5 ตัวจึงไม่พบฮีโมโกลบินชนิด Hb

AA และในกระป๋องปลั๊กที่ไม่พบ Hb AA อาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันทางสรีรวิทยา รูปร่าง ผลผลิตและการปรับตัวในการดำรงชีวิตที่แตกต่างจากกระป๋องแม่และนมและความหลากหลายของแหล่ง ที่เก็บตัวอย่างเลือดกระป๋องปลั๊กมาศึกษาได้นำมาจากแหล่งเดียวกัน Di Luccia A *et al.*, 1989 ศึกษาฟีนไทป์ของฮีโมโกลบินในกระป๋องแม่และนมอิตาลี พบฮีโมโกลบิน 3 ฟีนไทป์คือ Hb AA, Hb BB และ Hb AB โดยใช้เทคนิคเซลล์โลสอะซีเตตแบบแบ่งเจลที่พีเอช 8.9

จากการศึกษารายงานต่าง ๆ ของฮีโมโกลบินโดยยุโรป โคอินเดียและกระป๋องแม่ พบ ความแตกต่างของกรดอะมิโนในสายอัลฟาของ Hb fast และ Hb slow (Bachmann *et al.*, 1978 ; Di Luccia A *et al.*, 1989; Ferranti *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของกรดอะมิโนใน สายเบต้า ซึ่งความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นบนสายเบต้ามีความสำคัญต่อความสามารถของ ฮีโมโกลบินในการจับกับออกซิเจนเป็นอย่างมาก เนื่องจากสายเบต้าจับกับออกซิเจนที่ตำแหน่ง เดียวกันกับ 2,3-BPG (Perutz and Imai, 1980) Chang (1991) ได้รายงานไว้ในเซลล์เม็ดเลือดแดงมี 2,3-BPG ซึ่ง 2,3-BPG สามารถจับอยู่กับสายเบต้าทั้งสองของฮีโมโกลบินตรงตำแหน่งของหมู่ อะมิโนที่ปลาย N (N-terminal amino group) และหน่วยอิมิดาโซลของ β -143 ฮิสติดีนของ โมเลกุลฮีโมโกลบิน (วิชัย, 2541) จากการรายงานของ Bunn (1971) พบว่าฮีโมโกลบินของสัตว์เลี้ยง ลูกด้วยนมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำและกลุ่มที่มีความชอบต่อ ออกซิเจนสูง Perutz and Imai (1980) ได้รายงานเพิ่มเติมถึงความแตกต่างระหว่างฮีโมโกลบิน 2 กลุ่ม ซึ่งมีความแตกต่างที่ปลาย N ของกรดอะมิโนในสายเบต้าตำแหน่งที่ 2 ตรงบริเวณที่ไม่ใช่ เกลียว โดยกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophobic ได้แก่ กรด อะมิโนลิซีน เมทไธโอนีนหรือฟีนิลอะลานีน และกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูงเป็นกรด อะมิโนพวก hydrophilic ได้แก่ กรดอะมิโนฮิสติดีน กลูตามีนหรือแอสพาราจีน

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการทำงานวิจัยต่อไปโดย ทำการศึกษาแยกสาย α และ β ที่พบใน Hb BB และ Hb AB ศึกษาถึงความแตกต่างของลำดับ กรดอะมิโนภายในสายโกลบินและศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสายโกลบินแต่ละชนิดได้ John และ Barnabas (1978) ได้ศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบินในตระกูลของ Bovidae โดยวิเคราะห์ ตัวอย่างฮีโมโกลบินใน Nilgai พบว่ามีสายพอลิเปปไทด์ 3 ชนิด คือ ชนิดสายเบต้าและอีก 2 ชนิด เป็นสายอัลฟาชนิดสายอัลฟาหนึ่ง ($I\alpha$) และชนิดสายอัลฟาสอง ($II\alpha$) ฮีโมโกลบินใน Nilgai สองโมเลกุลประกอบด้วยหนึ่งโมเลกุลเป็น 2 สายอัลฟาหนึ่ง และ 2 สายเบต้า ($I\alpha_2\beta_2$) ส่วนอีกหนึ่ง โมเลกุล เป็น 2 สายอัลฟาสอง และ 2 สายเบต้า ($II\alpha_2\beta_2$) ส่วนโคมีสายอัลฟาที่มียีน 1 คู่ที่มีรูปแบบ ต่างกันและที่ตำแหน่งโลกัสเดียวกัน ขณะที่สายเบต้ามียีนคู่ที่มีรูปแบบต่างกันและที่ตำแหน่งโลกัส

เดียวกันอยู่ถึง 3 คู่ และพบในสายเบต้าของ Hb A และ Hb B ในโคเท่านั้น สายเบต้าของ Hb A ตำแหน่งที่ 15 เป็นกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) สายเบต้าของ Hb B เป็น กรดอะมิโนเซอรีน (serine) ตำแหน่งที่ 18 สายเบต้าของ Hb A เป็นกรดอะมิโนไลซีน (lysine) สายเบต้าของ Hb B เป็น กรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine) และตำแหน่งที่ 119 สายเบต้าของ Hb A เป็นกรดอะมิโนไลซีน และสายเบต้าของ Hb B เป็นกรดอะมิโนแอสพาราจีน (asparagine) (Schroeder *et al.*, 1967) ฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่ที่พบจะเป็นสายอัลฟาที่มีขึ้น 2 คู่ที่มีรูปแบบต่างกันและที่ตำแหน่ง โลกัสดียวกัน ขณะที่สายเบต้าที่มีขึ้น 1 คู่ที่มีรูปแบบต่างกันและที่ตำแหน่งโลกัสดียวกัน (Ranjekar และ Barnabas, 1969) John และ Barnabas (1978) ได้รายงานว่ามีฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่ที่ 1 โมเลกุลประกอบด้วยสายโกลบิน 4 รูปแบบด้วยกัน คือ รูปแบบที่หนึ่งมี 2 สายอัลฟาหนึ่งและ 2 สายเบต้าหนึ่ง ($I\alpha_2I\beta_2$) รูปแบบที่สองมี 2 สายอัลฟาสองและ 2 สายเบต้าหนึ่ง ($II\alpha_2I\beta_2$) รูปแบบที่ สามมี 2 สายอัลฟาสองและ 2 สายเบต้า สอง ($II\alpha_2II\beta_2$) รูปแบบสุดท้ายมี 2 สายอัลฟาหนึ่งและ 2 สายเบต้าสอง ($I\alpha_2II\beta_2$)

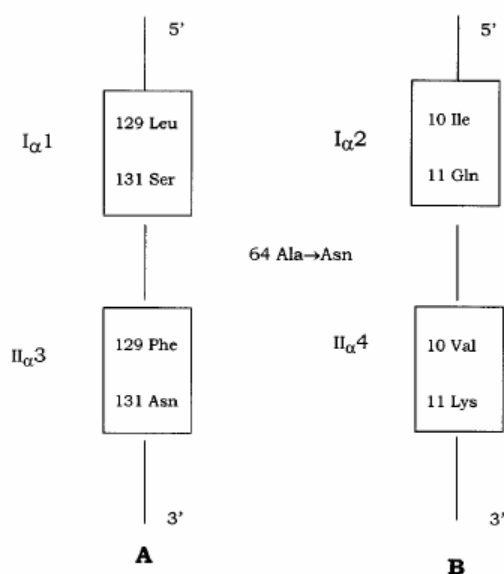
Balani and Barnabas (1965) และ Masina *et al.* (1997) ได้รายงานว่ามี Hb fast ประกอบด้วย สายอัลฟาหนึ่งขณะที่ Hb slow ประกอบด้วยสายอัลฟาสอง นอกจากนี้ Di Luccia A *et al.* (1989) นำสายโกลบินจาก Hb AA, Hb BB และ Hb AB มาศึกษาด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ช่วงพีเอช 6.8-8.5 พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย สายอัลฟาหนึ่ง สายอัลฟาสองและสายเบต้า ขณะที่ Hb AA ประกอบด้วยสายอัลฟาหนึ่งและเบต้า Di Luccia A *et al.* (1991) ได้ศึกษาสายโกลบินจาก Hb BB โดยเทคนิคไอโซ อิเล็กทริกโฟกัสซิงใน พีเอช กราเดียนต์ 7.1 - 7.5 ในกระป๋องแม่ที่พบว่ามี 3 ชนิดย่อย คือ Hb BB, Hb B^sB^s และ Hb BB^s ดังแสดงในภาพที่ 12 Hb BB ประกอบด้วย Hb 2 และ Hb 4 Hb 2 ประกอบด้วยสายอัลฟา หนึ่งสอง ($I\alpha_2$) และ Hb 4 ประกอบด้วยสายอัลฟาสองสี่ ($II\alpha_4$) Hb B^sB^s ประกอบด้วย Hb 2^s และ Hb 4^s ขณะที่ Hb BB^s ประกอบด้วย Hb 2 Hb 4 Hb 2^s และ Hb 4^s โดยฮีโมโกลบินทั้งสี่ชนิดมีค่า pI จากซ้ายขวามาเป็น 7.160 7.168 7.350 และ 7.358 ตามลำดับ และจากการศึกษา Hb BB Hb BB^s และ Hb B^sB^s ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอชเป็นกรด พบว่า ฮีโมโกลบินทั้ง 3 ฟิโนไทป์ย่อยประกอบด้วยสายอัลฟาที่เหมือนกัน คือ สายอัลฟาหนึ่งสอง ($I\alpha_2$) และสายอัลฟาสองสี่ ($II\alpha_4$) ขณะที่พบความแตกต่างเกิดขึ้นที่สายเบต้า โดยที่ Hb BB ประกอบด้วยสายเบต้า (β -chain) Hb B^sB^s ประกอบด้วยสายเบต้าเอส (β^s -chain) และ Hb BB^s ประกอบด้วยสายเบต้าและสายเบต้าเอส ($\beta + \beta^s$ -chain) การเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันในสายเบต้าทั้งสองเนื่องจากมีความแตกต่างกันตรงส่วน hydrophobicity โดยที่สายเบต้าเอสของ Hb B^sB^s และ

Hb BB^s ประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophobic มากกว่าสายเบต้าของ Hb BB ต่อมา Ferranti *et al.* (1992) ได้ศึกษาเพิ่มเติมสายโกลบินของ Hb AA ด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัส ซิงพลอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ พีเอช 7.1-7.5 ใ้ช้ยูเรียเป็นสารทำให้ Hb AA เสียสภาพธรรมชาติ พบว่าแถบของ Hb fast ถูกแยกออกจากกันเป็น 2 แถบ คือ Hb 1 และ Hb 3 โดยที่ Hb 1 และ Hb 3 ประกอบด้วยสายอัลฟาหนึ่งและสายอัลฟาสามตามลำดับ Ferranti *et al.* (2001) ได้ศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของสายอัลฟาในฮีโมโกลบินกระป๋องแม่น้ำจำนวน 4 ตัว พบว่าลำดับกรดอะมิโนในสายอัลฟา ประกอบด้วยกรด อะมิโนทั้งหมด 141 หน่วยและพบความแตกต่างกันของ ยีน A และยีน B ยีน A ถอดรหัสได้ 2 สายอัลฟา คือ สายอัลฟาหนึ่งหนึ่ง ($I\alpha 1$) และสายอัลฟาสองสาม ($II\alpha 3$) หรือ Hb 1 และ Hb 3 ใน Hb AA สายอัลฟาทั้งสองสายมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันที่ตำแหน่ง 129 และ 131 สายอัลฟาหนึ่งหนึ่งตำแหน่งที่ 64, 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนอะลานีน ลิวซีนและเซอรีน ตามลำดับ ขณะที่สายอัลฟาสองสาม ตำแหน่ง ที่ 64, 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนอะลานีน ฟีนิลอะลานีนและแอสปารากีนตามลำดับ ส่วนยีน B ถอดรหัสได้ 2 สายอัลฟา คือ สายอัลฟาหนึ่งสอง ($I\alpha 2$) และ สายอัลฟาสองสี่ ($II\alpha 4$) หรือ Hb 2 และ Hb 4 ใน Hb BB สายอัลฟาทั้งสองสายมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันที่ตำแหน่ง 10, 11 และ 64 สายอัลฟาหนึ่งสองตำแหน่งที่ 10, 11 และ 64 เป็นกรดอะมิโนไอโซลิวซีน กลูตามีนและแอสปารากีนตามลำดับ ขณะที่สายอัลฟาสองสี่ ตำแหน่ง 10, 11 และ 64 เป็นกรดอะมิโนวาลีน ไลซีนและแอสปารากีนตามลำดับ กรดอะมิโนถูกแทนที่ในตำแหน่งโลกส์เดียวกันและในตำแหน่งไม่ใช่โลกส์เดียวกันในสายอัลฟาเป็นผลจากการเกิดการกลายแบบ single point mutation แสดงดังภาพที่ 21 และ 22

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50																																								
$\alpha 1$	V	L	S	A	A	D	K	G	N	V	Q	A	A	W	G	K	V	G	G	H	A	A	D	Y	G	A	E	A	L	E	R	M	F	L	S	F	P	T	T	K	T	Y	P	P	H	F	D	L	S	H
$\alpha 2$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100																																								
$\alpha 1$	G	S	A	Q	V	K	G	H	G	A	K	V	A	A	A	L	T	K	A	V	G	H	L	D	D	L	P	G	A	L	S	E	L	S	D	L	H	A	H	K	L	R	V	D	P	V	H	F	K	L
$\alpha 2$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	105	110	115	120	125	130	135	140																																										
$\alpha 1$	L	S	H	S	L	L	V	T	L	A	S	H	L	P	S	D	F	T	P	A	V	H	A	S	L	D	K	F	L	A	S	V	S	T	V	L	T	S	K	Y	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 2$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ภาพที่ 21 แสดงลำดับของกรดอะมิโนในสายอัลฟาทั้ง 4 สายในอีโมโกลบินกระป๋องแม่น้ำโดยที่สายอัลฟาหนึ่งหนึ่งและ สายอัลฟาสองสาม ถอดจากรหัสยีน A และสายอัลฟาหนึ่งสองและสายอัลฟาสองสี่ ถอดรหัสจากยีน B

ที่มา: Feranti *et al.* (2001)

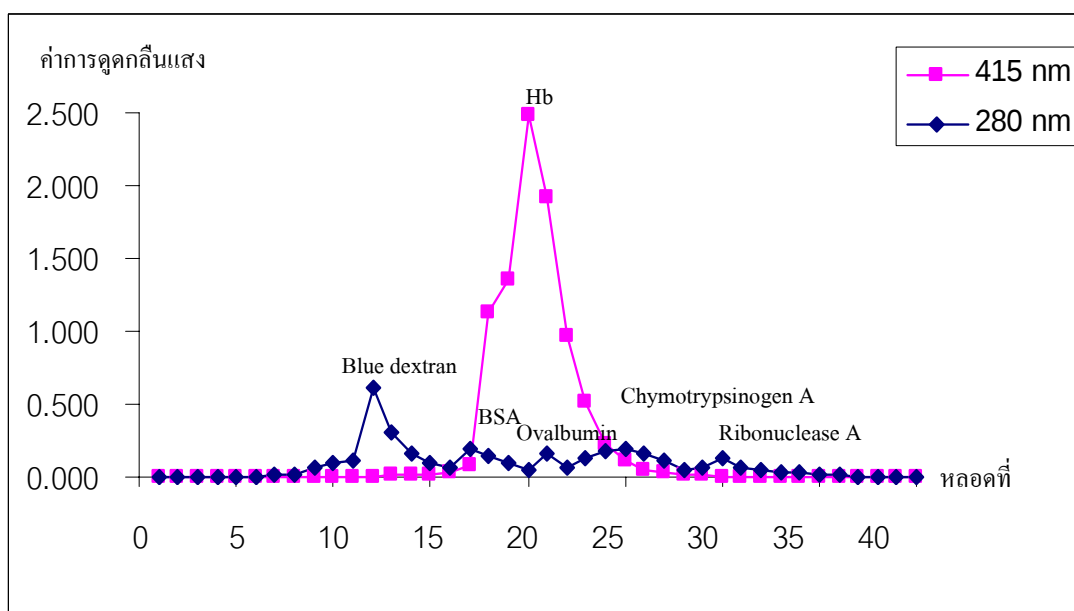


ภาพที่ 22 แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนจากยีน A และจากยีน B ในสายอัลฟาของอีโมโกลบินกระป๋องแม่น้ำ สายอัลฟาหนึ่งหนึ่งและสายอัลฟาสองสามจากยีน A และสายอัลฟาหนึ่งสองและสายอัลฟาสองสี่จากยีน B

ที่มา: Feranti *et al.* (2001)

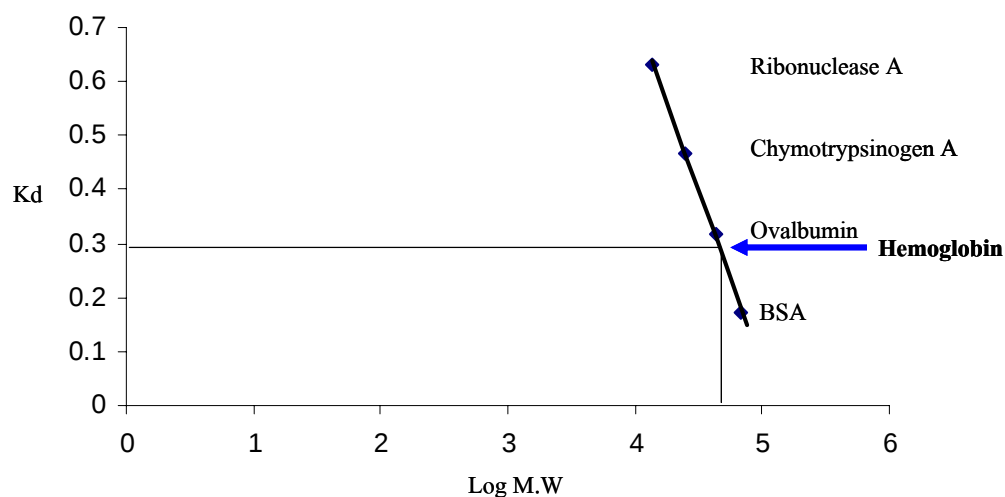
2. น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก

การทำเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Sephadex G-100 Grade fine ซึ่งมีระดับการเชื่อมโยงเป็นตาข่ายร่างแหอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,000 - 150,000 ดาลตัน ผลจากการชะสารของสารละลายบัฟเฟอร์ แสดงดังภาพที่ 23 กราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่างค่า Kd ของโปรตีนมาตรฐานและค่าลอการิทึมน้ำหนักโมเลกุล (log M.W.) ของโปรตีนมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักได้เป็น 46,209 ดาลตัน แสดงดังภาพที่ 24



ภาพที่ 23 แสดงผลการชะสารชนิดต่างๆ ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Sephadex G-100 ด้วย ทริส - ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 อัตราการไหล 1.8 มิลลิลิตรต่อนาที

การหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก โดยการสร้างเส้นกราฟระหว่างค่า K_d และค่า $\log M.W.$

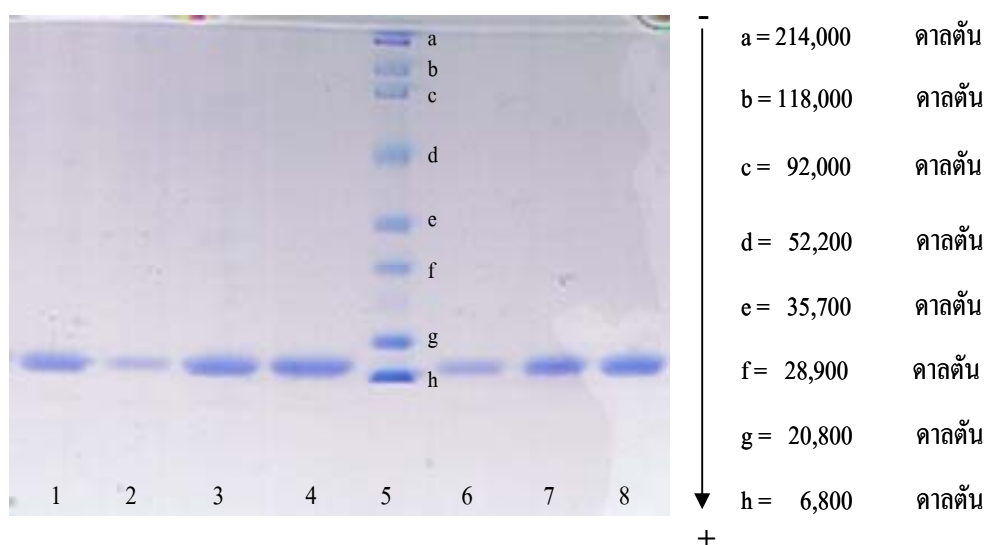


ภาพที่ 24 แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักจากค่า K_d และ $\log M.W.$ ของโปรตีนต่างๆ

หมายเหตุ: น้ำหนักโมเลกุลของสารและโปรตีนมาตรฐาน

Blue dextran	2,000,000	คาลตัน
Bovine serum albumin (BSA)	68,000	คาลตัน
Chicken ovalbumin	44,000	คาลตัน
Chymotrypsinogen A	25,000	คาลตัน
Ribonuclease A	13,700	คาลตัน
น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน (trimer) กระป๋องปลัก คือ	46,209	คาลตัน

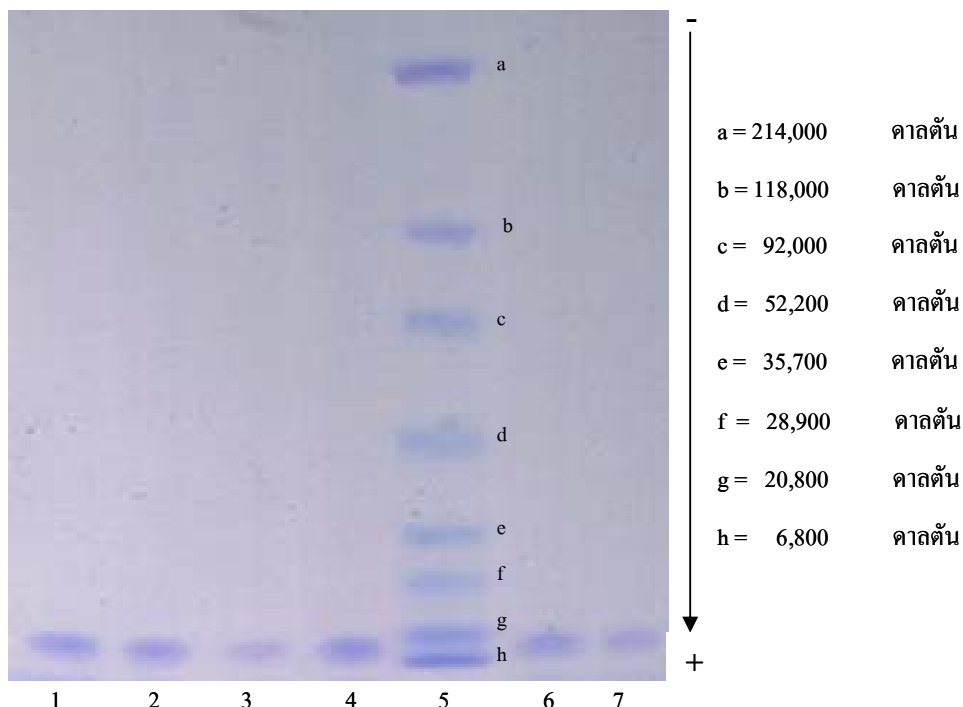
จากการทำไซเคียมโคดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วย เจล 12%T, 4%C เมื่อซ่อมโปรตีนด้วยโคแมสซิบลู อาร์ - 250 พบแถบฮีโมโกลบินบนแผ่นเจลจำนวน 1 แถบ เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมิวิเคราะห์แผ่นเจล พบว่าหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักและกระป๋องแม่น้ำมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 13,227 คาลตันและ 13,525 คาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 25 และ 26



ภาพที่ 25 การหาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก โดยวิธีโซเดียมโดดีลซัลเฟตเฟตฟอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วยเจล 12%T, 4%C (200 โวลท์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์/เจล 1 แผ่น 40 นาที) เลนที่ 1 - 4 และ 6 - 8 คือ สารละลายฮีโมโกลบินกระป๋องปลักเลนที่ 5 คือ broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)

หมายเหตุ: broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)

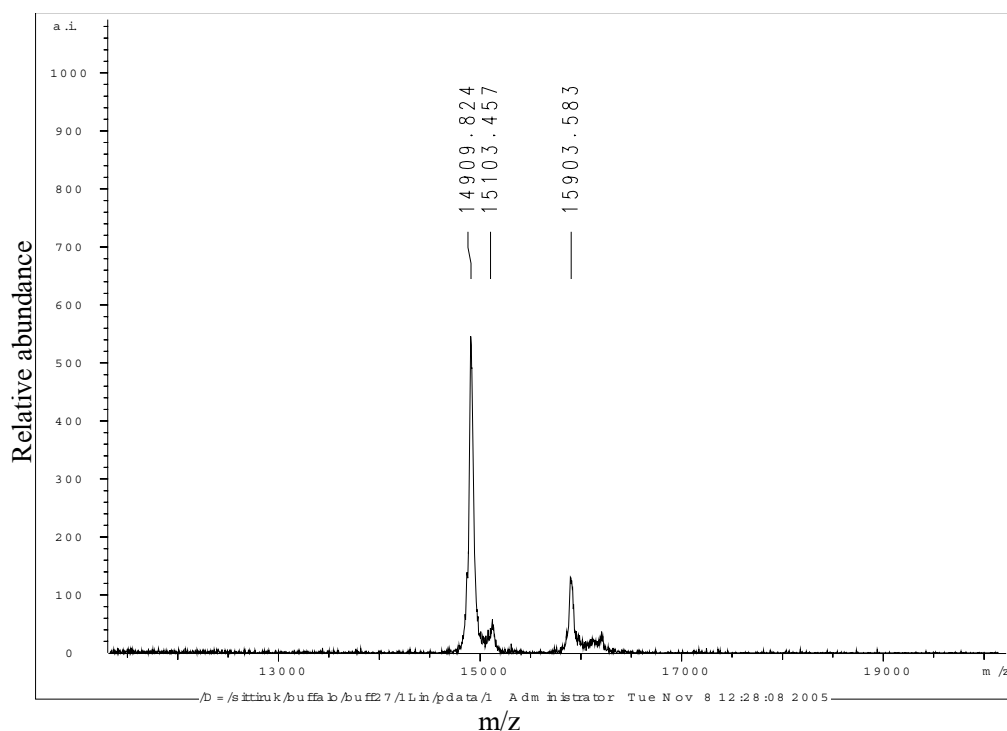
Myosin	214,000 คาลตัน
β – galactosidase	118,000 คาลตัน
Bovine serum albumin (BSA)	92,000 คาลตัน
Ovalbumin	52,200 คาลตัน
Carbonic anhydrase	35,700 คาลตัน
Soybean trypsin inhibitor	28,900 คาลตัน
Lysozyme	20,800 คาลตัน
Aprotinin	6,800 คาลตัน



ภาพที่ 26 การหาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินแม่น้ำโดยวิธีโซเดียมโดดีลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วยเจล 12%T, 4%C (200 โวลท์ คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์/เจล 1 แผ่น 40 นาที เลนที่ 1 - 4 และ 6 - 7 คือ สารละลาย ฮีโมโกลบินกระป๋องแม่น้ำ) เลนที่ 5 คือ broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)

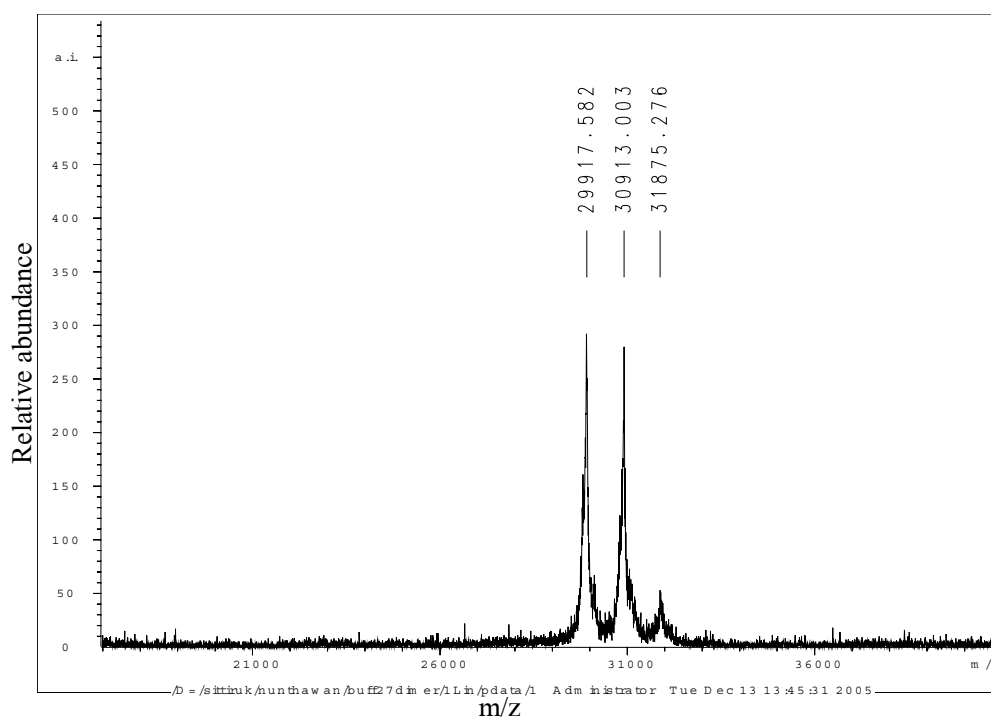
เมื่อนำสารละลายฮีโมโกลบินกระป๋องปลั๊กที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Sephadex G-100 จำนวน 10 ตัวแบ่งเป็น Hb BB 6 ตัวอย่างและ HB AB 4 ตัวอย่าง มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรีผ่านเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์แบบ MALDI - TOF ใช้กรดไซแนมินิกเป็นเมทริกซ์จับกับฮีโมโกลบินและยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์ เมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้จาก peak ทั้ง 3 peak ที่ปรากฏในแต่ละตัวอย่าง จาก Hb BB 6 ตัวอย่าง มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบินและค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบินแบบ monomer dimer และ trimer พบว่ามีค่า 61,014.19 15368.59 30894.98 และ 45917.92 คาลตัน ตามลำดับ เช่นเดียวกันจาก Hb AB 4 ตัวอย่าง ค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบินและค่า

น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบินแบบ monomer dimer และ trimer เท่ากับ 60,788.17 15371.06 30904.09 และ 45903.35 คาลตัน ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋อง ปลักและน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินแบบ monomer dimer และ trimer ชนิด Hb BB และชนิด Hb AB ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 27 – 34



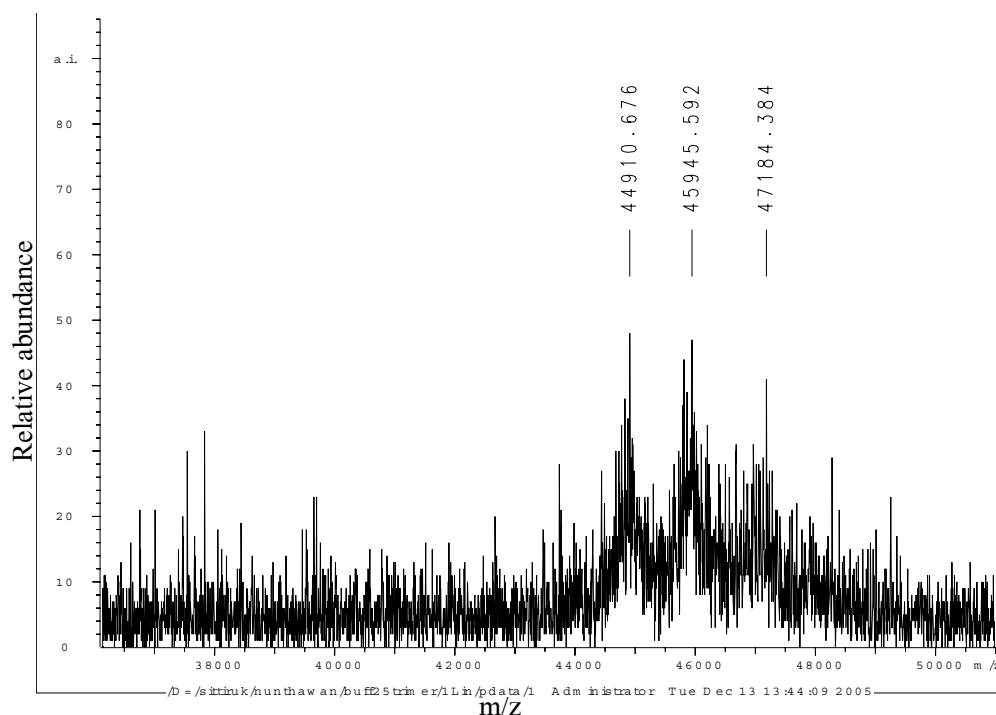
ภาพที่ 27 น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน BB ในกระป๋องปลักแบบ monomer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

หมายเหตุ: คำนวณน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏของ peak ทั้ง 3 peak นำมาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน BB แบบ monomer



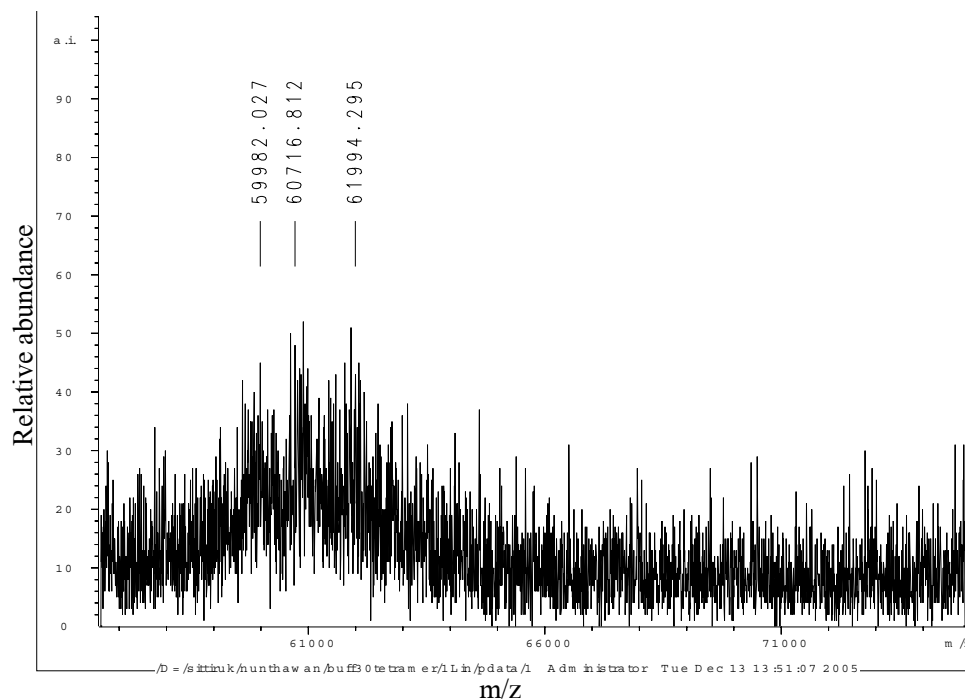
ภาพที่ 28 น้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบิน BB ในกระป๋องปลั๊กแบบ dimer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

หมายเหตุ: คำนวณน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏของ peak ทั้ง 3 peak นำมาหาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของอีโมโกลบิน BB แบบ dimer



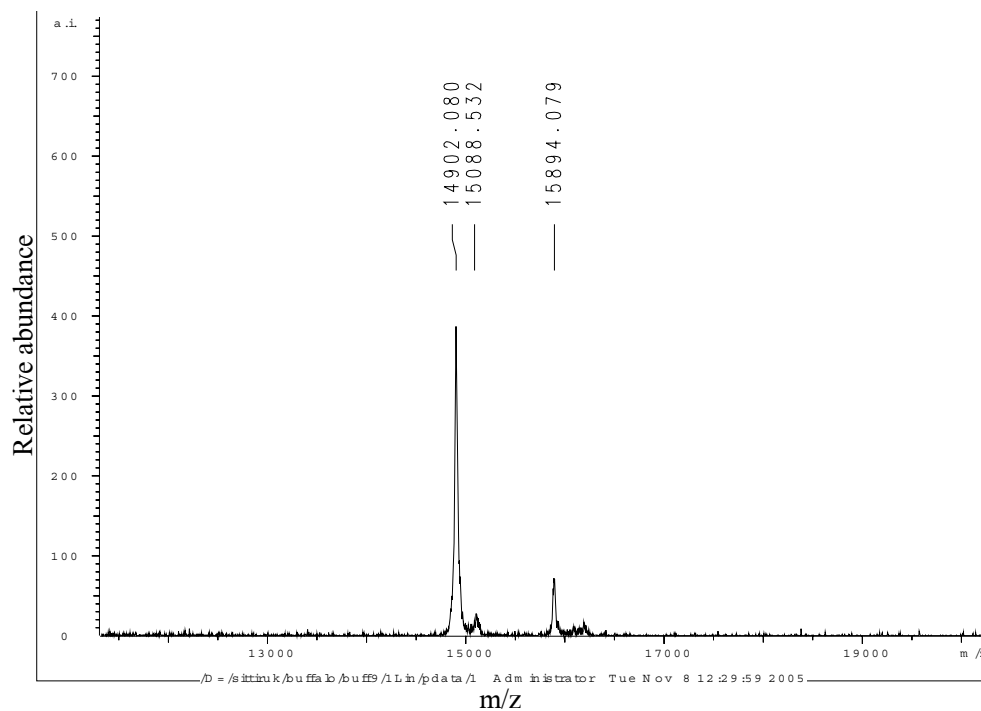
ภาพที่ 29 น้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบิน BB ในกระป๋องปลั๊กแบบ trimer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรีด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

หมายเหตุ: คำนวณน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏของ peak ทั้ง 3 peak นำมาหาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของอีโมโกลบิน BB แบบ trimer



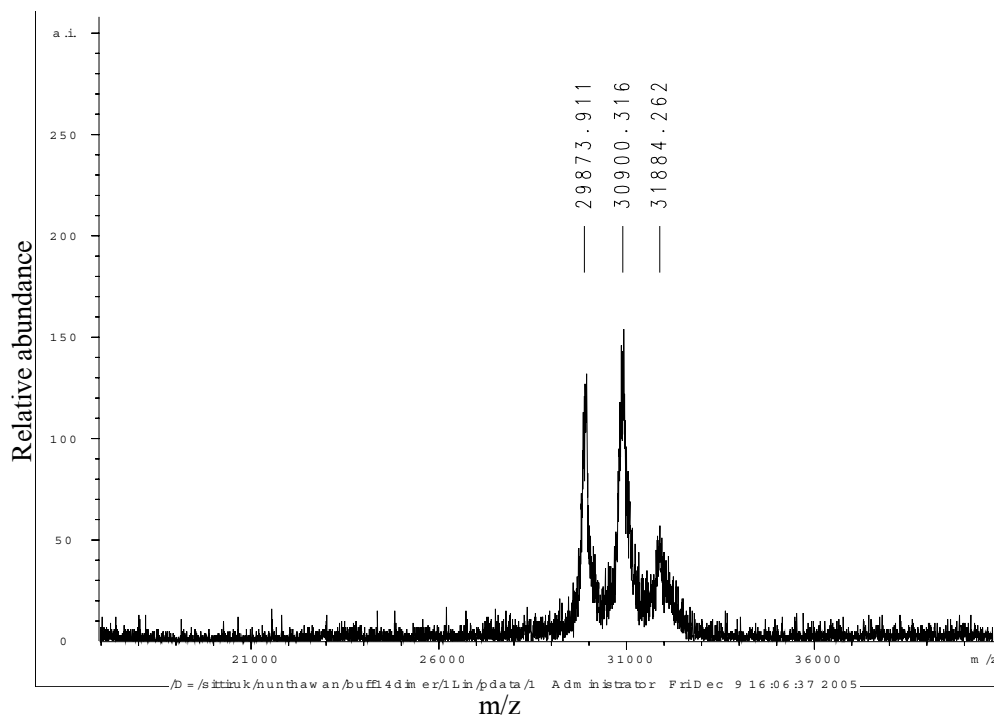
ภาพที่ 30 น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน BB ในกระป๋องปลั๊กแบบ tetramer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

หมายเหตุ: คำนวณน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏของ peak ทั้ง 3 peak นำมาหาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน BB แบบ tetramer



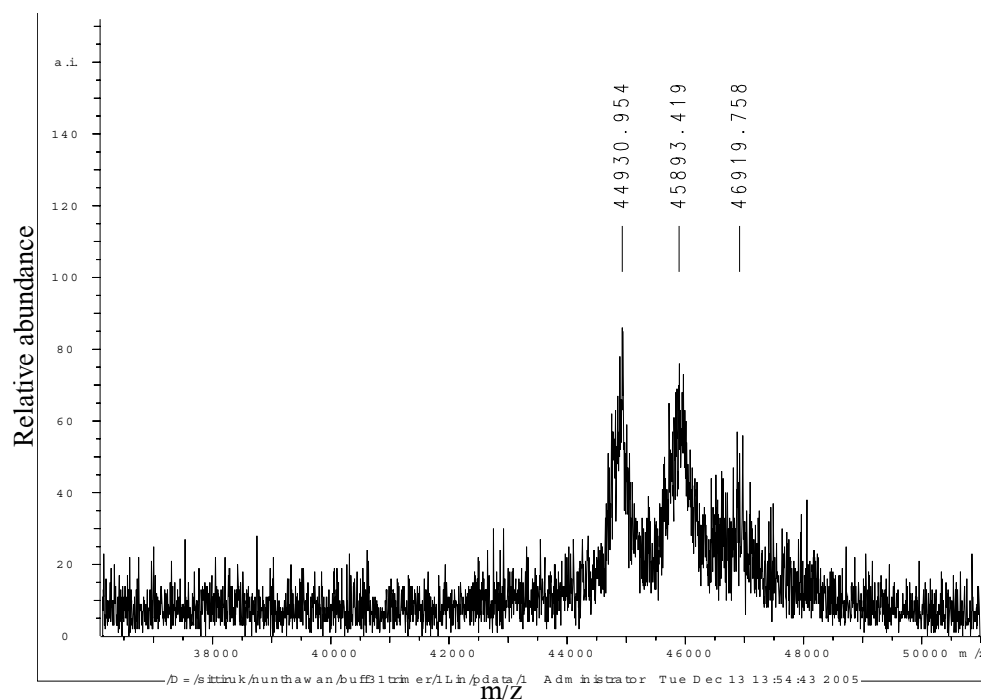
ภาพที่ 31 น้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบิน AB ในกระป๋องปลั๊กแบบ monomer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

หมายเหตุ: ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏของ peak ทั้ง 3 peak นำมาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของอีโมโกลบิน AB แบบ monomer



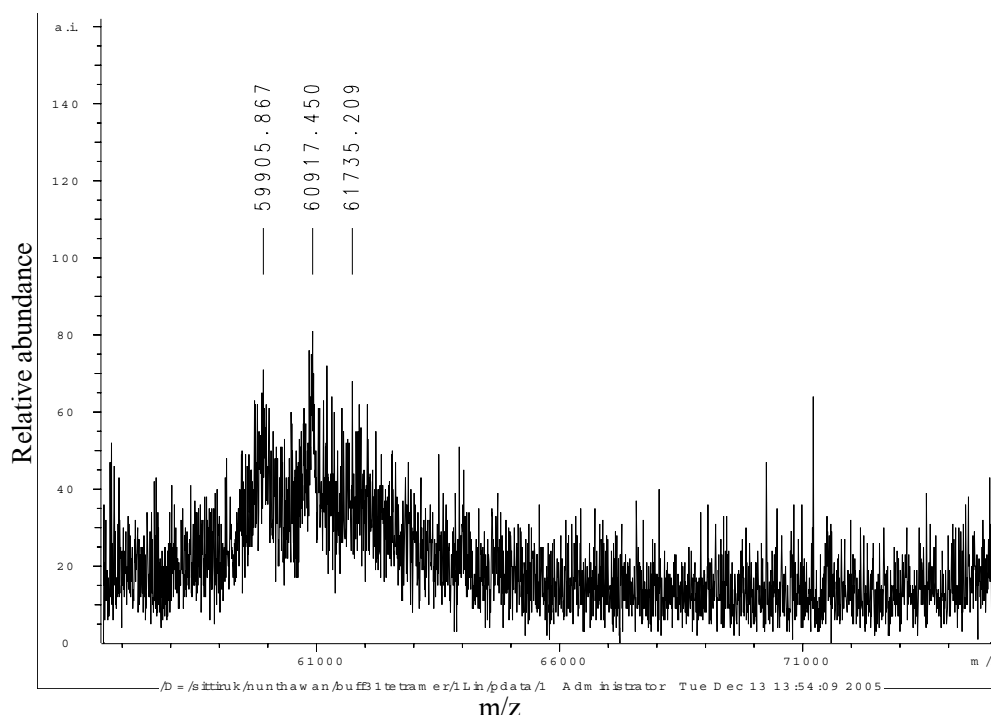
ภาพที่ 32 ^uน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน AB ในกระป๋องปลั๊กแบบ dimer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

หมายเหตุ: ^uน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏของ peak ทั้ง 3 peak ^uนำมาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน AB แบบ dimer



ภาพที่ 33 น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน AB ในกระป๋องปลั๊กแบบ trimer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

หมายเหตุ: คำนวณน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏของ peak ทั้ง 3 peak นำมาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน AB แบบ trimer



ภาพที่ 34 น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน AB ในกระป๋องปลั๊กแบบ tetramer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

หมายเหตุ: คำนำน้หนักโมเลกุลที่ปรากฏของ peak ทั้ง 3 peak นำมาหาคำน้หนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน AB แบบ tetramer

เมื่อพิจารณาวิธีการหำน้หนักโมเลกุลทั้ง 3 วิธีข้างต้น ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลั๊กทั้งในรูปตามธรรมชาติและรูปหน่วยย่อยมีค่าแตกต่างกัน แต่ด้วย sensitivity และ resolution ของวิธีแมสสเปกโตรเมทรีที่สูงกว่าวิธีการอื่นๆ ดังนั้น น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลั๊กจึงใช้ค่าที่ได้จากวิธีการนี้ เมื่อคำนวณคำน้หนักโมเลกุลเฉลี่ยของ Hb AB และ Hb BB จำนวน 10 ตัว ได้คำน้หนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน และคำน้หนักโมเลกุลเฉลี่ยของฮีโมโกลบินแบบ monomer dimer และ trimer เท่ากับ 60,942.79 15,359.67 30,894.40 และ 45,912.42 คาลตันตามลำดับ

ตารางที่ 3 น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของกระบือปลักแบ่งตามวิธีการศึกษา

(หน่วย : ดาลตัน)

โมเลกุล ของฮีโมโกลบิน	วิธีการศึกษาน้ำหนักโมเลกุล				
	Gel filtration	Mass spectrometry			SDS-PAGE
		Hb BB	Hb AB	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย	
Tetramer	-	61,014.19	60,788.17	60,942.79	-
Trimer	46,209	45,917.92	45,903.35	45,912.42	-
Dimer	-	30,894.98	30,904.09	30,894.40	-
Monomer	-	15,368.59	15,317.06	15,359.67	13,227

เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินที่ได้จากการทำเจลฟิลเทรชันคอลัมน์ โครมาโตกราฟีของ Sephadex G-100 Grade fine ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระบือปลักเพียง 46,209 ดาลตัน ซึ่งแตกต่างจากออร์พรรณและคณะ (2546) ที่ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของฮีโมโกลบินโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลักโดยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี Sephadex G-100 Grade fine เช่นกัน พบว่าฮีโมโกลบินโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลักมีน้ำหนักโมเลกุล 64,565 ดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของกราฟที่ได้จากการชะสารชนิดต่างๆ ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Sephadex G-100 ด้วย ทริส-ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 อัตราการไหล 1.8 มิลลิลิตรต่อนาที ดังภาพที่ 23 พบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะที่มีไหล่ของกราฟเกิดขึ้นซึ่งแตกต่างจาก ออร์พรรณและคณะ (2546) ได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นโค้งเรียบ เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากบริเวณไหล่กราฟนี้พบว่ามือน้ำหนักโมเลกุล 62,207 ดาลตันซึ่งน่าจะเป็นน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน (native hemoglobin) ที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (tetramer) และแตกต่างจากออร์พรรณและคณะ (2546) เพียงเล็กน้อย อาจเกิดจากการเลือกใช้โปรตีนมาตรฐานมาเปรียบเทียบที่แตกต่างกัน ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้จาก peak สูงสุด มีค่าเท่ากับ 46,209 ดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินที่ได้จากการศึกษาโดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรีพบว่า มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินแบบ trimer เป็นไปได้ว่าโมเลกุลของฮีโมโกลบินมีการเปลี่ยนแปลงจาก tetramer ไปเป็น trimer Whitaker (1981) ได้รายงานถึงการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี เช่น น้ำหนักโมเลกุลของ

ฮีโมโกลบิน พบว่าความเสถียรของโมเลกุลฮีโมโกลบินมีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดการแยกตัวออกจากกันของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินหรือเจลมีการดูดซับกับโปรตีนตัวอย่างที่ทำการศึกษาจึงทำให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ต่ำกว่าค่าที่ควรจะเป็น

จากเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลในแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินพบว่าฮีโมโกลบินกระบือปลักปรากฏ 1 แถบในอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยปรากฏเป็นแถบบนแผ่นเจลต่ำกว่าแถบโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20,800 ดาลตันและสูงกว่าแถบโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6,800 ดาลตัน เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายโกลบินโดยเครื่องวิเคราะห์แผ่นเจลเฉลี่ยพบว่ามีค่าเท่ากับ 13,227 ดาลตัน แสดงว่าหน่วยย่อยทั้งสี่ของฮีโมโกลบินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน จะเห็นได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลของสายโกลบินทั้ง 4 สายที่ได้เมื่อรวมกันแล้วมีค่าต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลรวมของฮีโมโกลบินที่ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคเจลฟิวเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีและวิธีแมสสเปกโตรเมทรี เป็นไปได้ที่สายโกลบินซึ่งอยู่ในรูปโปรตีนก้อนกลม (globular chain) ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ โดยเบต้าเมอร์แคปโตเอธานอล นอกจากนี้ โซเดียมโดดีซิลซัลเฟตสามารถจับกับสายโกลบินเป็นคอมเพล็กซ์ (SDS - globin complex) ทำให้สายโกลบินนี้มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ส่งผลให้โครงสร้างของฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลงไปทำให้น้ำหนักโมเลกุลรวมของสายโกลบินทั้ง 4 สายต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลรวมของฮีโมโกลบิน สอดคล้องกับการศึกษาของอรพรรณและคณะ (2546) โดยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าฮีโมโกลบินโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลักปรากฏ 1 แถบใน อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยปรากฏเป็นแถบบนแผ่น เจลต่ำกว่าแถบโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14,400 ดาลตัน เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายโกลบินโดยเครื่องวิเคราะห์แผ่นเจลมีค่าเท่ากับ 11,150 ดาลตัน

จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรีโดยใช้สารละลายฮีโมโกลบินชนิด Hb BB และ Hb AB ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิวเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Sephadex G - 100 เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการเลือกช่วงน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินในช่วง 14,000 - 68,000 ดาลตันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินแบบ monomer dimer trimer และ tetramer และให้อยู่ภายในกราฟเดียวกัน พบว่า peak แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของ monomer ได้ peak สูงที่สุดส่วนของ dimer trimer และ tetramer มีระดับความสูงของ peak ที่ต่ำมาก เป็นไปได้ว่าเกิดจากความไม่เสถียรของโมเลกุลฮีโมโกลบินทำให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูป

monomer เป็นส่วนใหญ่ จึงเลือกช่วงน้ำหนักโมเลกุลใหม่โดยให้อยู่ในช่วง 10,000 – 21,000 18,000 – 39,000 36,000 – 52,000 และ 57,000 – 71,000 ดาลตัน เพื่อแยกวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินแบบ monomer dimer trimer และ tetramer ตามลำดับให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น Feranti *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องแม่ค้าโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรสเปรย์ แมสสเปกโตรเมทรี (ES/MS) พบว่าสายเบต้าของ Hb AA มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $15,985.98 \pm 1.00$ ดาลตัน ส่วนสายอัลฟาหนึ่งและอัลฟาสามมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $15,058.12 \pm 0.43$ ดาลตัน และ $14,997.18 \pm 0.44$ ดาลตัน ตามลำดับ สายอัลฟาทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งมีค่าสูงกว่าโครงสร้างปฐมภูมิพื้นฐานที่ได้คาดไว้ นอกจากนี้ ลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย C (C-terminal region) ของสายอัลฟาหนึ่งใน Hb AA ตำแหน่งที่ 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนชนิดลิซีนและเซอรีน ในขณะที่สายอัลฟาสามเป็นกรดอะมิโนชนิดเฟนิลอะลานีนและแอสพาราจีน ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาวิธีการหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินโดยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Sephadex G-100 และวิธีแมสสเปกโตรเมทรีได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินที่แตกต่างกันมาก แต่ด้วย sensitivity และ resolution ของวิธีแมสสเปกโตรเมทรีที่สูงกว่าวิธีการอื่นๆ ดังนั้นจึงใช้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลั๊กจากวิธีนี้เป็นหลัก

สรุป

จากการศึกษาชนิดและคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*) โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี อิเล็กโตรโฟรีซิส และแอสเพคโตรเมทรี จำนวน 71 ตัว เป็นกระบือปลักเพศผู้อายุ 1 ปี - 3 ปี จำนวน 31 ตัว กระบือปลักเพศเมียอายุ 1 ปี - 3 ปี จำนวน 30 ตัว และ อายุมากกว่า 7 ปีจำนวน 10 ตัว พบว่า

1. การศึกษาโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าฮีโมโกลบินกระบือปลักมี 2 ฟีโนไทป์ คือ HB BB และ Hb AB ตามการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ
2. จากการศึกษาด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีพบว่าฮีโมโกลบินของกระบือปลักมีน้ำหนักโมเลกุลแบบ trimer เท่ากับ 46,209 คาลตัน
3. จากการศึกษาด้วยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตร โฟรีซิส ฮีโมโกลบินกระบือปลัก 1 โมเลกุล ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 13,227 คาลตัน
4. จากการศึกษาด้วยเทคนิคแอสเพคโตรเมทรีพบว่าฮีโมโกลบินมีน้ำหนักโมเลกุล 60,942.79 คาลตัน แต่ละหน่วยมีน้ำหนักโมเลกุลย่อยแบบ monomer dimer และ trimer เท่ากับ 15,359.67 30,894.40 และ 45,912.42 คาลตันตามลำดับ
5. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาแยกสาย α และ β ที่พบใน Hb BB และ Hb AB ศึกษาถึงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนภายในสายโกลบินและศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสายโกลบินแต่ละชนิด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กองบำรุงพันธุ์. 2548. **กระบือกับการอนุรักษ์**. สยามรัฐ 2548 (1): 5.

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล. 2542. **ชีวเคมี 2**. ห้างหุ้นส่วนจำกัด บางกอกบล็อก,
กรุงเทพมหานคร.

เจริญ จันทลักขณา. 2527. **ควายในระบบไร่นาไทย**. ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพมหานคร.

ฝ่ายประมวลผลและสถิติ กองแผนงาน กรมปศุสัตว์. 2548. **สถิติข้อมูลการปศุสัตว์**.
www.dld.co.th. แหล่งที่มา: กรมปศุสัตว์, 11 พฤศจิกายน 2548.

สุวิษ บุญโปร่ง. 2547. **ความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินฟีนไทป์และชีรั่มโปรตีนกับการให้ผลผลิต
ของโคเนื้อในประเทศไทย**. การประชุมวิชาการครั้งที่ 43. 1 – 4 ก.พ. 2548.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรัช สุวรรณลี. 2548. **การผลิตโคกระบือเนื้อ**. เอกสารประกอบการสอน. มหาวิทยาลัย
อุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

อรพรรณ สังข์สัมฤทธิ์. 2546. **การศึกษาฟีนไทป์และคุณสมบัติทางเคมีของฮีโมโกลบินโคเนื้อพันธุ์
กำแพงแสนและกระบือปลัก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา
ทางสัตว). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อาภัสสร ชูเทศะ. 2547. **ชีวเคมี**. ภาควิชาสัตววิทยา. คณะสัตวแพทยศาสตร์,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Adams, W.H., I.L Graves and S. Pyakural. 1975. Hematologic observations on the
Yak. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 148; 701-705.

- Bachmann, A.W., R.S.F. Campbell and D. Yellowlees. 1978. Haemoglobins in cattle and buffalo: Haemoglobin types of *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos bangteng* and *Bubalis bubalis* in Northern Australia. **Aust. J. Exp. Boil. Med. Sci.** 56 (5): 623-629.
- Balini, A.S. and J. Branabas. 1965. Polypeptide Chains of Buffalo Hemoglobin. **Nature**. 205: 1019 - 1021.
- Bangham, A.D. and B.S. Blumberg. 1958. Distribution of electrophoretically different hemoglobins among some cattle breeds of Europe and Africa. **Nature**. 181: 1551 - 1552.
- Benesch, R. and E.R. Benesch. 1967. Differences in the Interaction of 2,3-Diphosphoglycerate with Certain Mammalian Hemoglobins. **Biochem Biophys.** 172: 1049-1050.
- Bio – Medical Laboratory. **Biuret method**. B. M. Lab. Limited Partnership. Thailand.
- Boonyarat, D. 1997. **Hemoglobin Thailand: Structural Characterization and Oxyhemoglobin Dissociation Studies**. M.S. Thesis. Mahidol University, Thailand.
- Braend, M. and C. Stormont. 1963. Hemoglobin and Transferrin Types in the American Buffalo. **Biochem. Genet.** 16: 910-911.
- Brewer, G. J. 1972. **Hemoglobin and Red Cell Structure and Function**. Plenum Press. New York, U.S.A.
- Brown and Barbara. 1993. **Hematology: Principles and Procedures**. 6 th ed. Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A.
- Bunn, H.F. 1971. Differences in the interaction of 2,3 - diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. **Science**. 172: 1049 - 1050.

- Chang, T.M.S. 1999. **Future prospects for artificial blood**. Trends Biotechnol.17 (2) 61 - 67.
- Di Luccia, A., L. Iannibelli., P.Ferranti., M. Iorio., M. Annunziata and L. Ferrara. 1989. Water buffalo (*Bubalus bubalis*) hemoglobin: an electrophoretic and chromatographic study. **Comp. Biochem. Physiol.** 94(1):71 - 77.
- Di Luccia, A., L. Iannibelli., E. Addato., B. Masala., L. Manca and L. Ferrara. 1991. Evidence for presence of two difference beta - globin chain in the hemoglobin of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.). **Comp. Biochem. Physiol.** 99 (4)1: 887 – 892.
- Fago, A., V. Carratore, G. D. Prisco, R. J. Feuerlein, L. Sottrup – Jensen and R. E. Weber. 1995. The cathodic hemoglobin of Anguilla: amino acid sequence and oxygen equilibrium of a reverse bohr effect hemoglobin with high oxygen affinity and high phosphate sensitivity. **J. Biol. Chem.** 270(32): 18897 - 18902.
- FAO. 1999. **Selected indicators of food and agriculture development in Asia – Pacific region (1988 – 1998)**. Regional Office of Asia and Pacific (RAPA). FAO. Bangkok Thailand.
- Ferranti, P., A. Di Luccia., A. Malorni., P. Pucci., M. Ruoppolo., G. Marino and L. Ferrara. 1992. River buffalo (*Bubalus bubalis* L.) AA phenotype hemoglobin: characterization by immobilized polyacrylamide gel electrophoresis and high performance liquid chromatography and determination of the primary structure of the constitutive chains by mass spectrometry. **Comp. Biochem. Physiol.** 101B: 91 - 98.
- Ferranti, P., A. Di Luccia., A. Malorni., L. Ferrara., G. Marino and P. Pucci. 1993. Electrospray mass spectrometric analysis of river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) hemoglobins re-examination of $\alpha 1$ and $\alpha 3$ globin chain sequences. **Comp. Biochem. Physiol.** 105 (3-4): 573 - 578.

- Ferranti, P., A. Facchiano., F. Zappacosta., D. Vincenti R. Rullo., B. Masala and A. Di Luccia. 2001. Primary structure of alpha - globin chains from river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) hemoglobins. **J. Protein Chem.** 20 (20): 171 – 179.
- Fisher, H. and E. Scheurmann. 1977. **Cytogenetic Investigations on Domestic and Wild Animal Populations in South and South-east Asia.** Animal research and development, vol 6. Institute for science co-operation.
- Guyton, A. C., and J. E. Hall. 1996. **Textbook of Medical Physiology.** 8th. ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A.
- Helena Laboratories. 1985. **Hemoglobin electrophoresis procedure.** Sweden.
- Horton, H. R., L.A. Moran, R.S. Ochs, J.D. Rawn and K.G. Scrimgeour. 2002. **Textbook of Principle of Biochemistry.** 3th ed. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, U.S.A.
- Iorio, M and M. Annunziata. 1986. Biochemical polymorphism studies in Italian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Genet. Agr.** 40: 137 – 144.
- Jain, NC. 1986. **Schalm's Veterinary Hematology 4th ed.** Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A.
- John, E.M., and J. Barnabas. 1978. Gene diversity of bovine hemoglobin. **Biochem. Genet.** 16 (7-8): 787-798.
- Kanko, S. and K. Autio. 1985. Electrophoretic studies of blood globin preparations. **J. Chromatogr.** 324 (2):295 - 406.
- Khanna, N.D. 1973. Biochemical polymorphism and blood groups in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Embassy Press, Delhi.** 6: 13-27.

- Laemmli, K.U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680 – 685.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993. **Principles of Biochemistry: Chapter 8 Protein Functions as Illustrated by Oxygen - Binding Proteins**. Worth Pub. New York, U.S.A. p 169 – 202.
- Leone, B.J. 1998. **Artificial blood**: Available source: <http://www.dcmsonline.org/jax-medicine/1998journals/december98/artificialblood.htm>, November 8, 2000.
- Masina, P., D. Iannelli., M. Iorio and L.Ramunno. 1977. Hemoglobin polymorphism in Italian water buffalo (*Bubalus bubalis* (Arnee)). **Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.** 8: 65 – 72.
- Moss, G.S., S.A. Gould., L.R. Sehgal., H.L. Sehgal and A.L. Rosen. 1984. Hemoglobin solution - from tetramer to polymer. **Surgery**. 95: 249.
- Naik, S.M. and P.K. Sukumatam. 1967. Hemoglobin polymorphism in water buffaloes. **Proc. XIth Eur. Conf. Anim. Blood Grp. Biochem. Polymorphism**. 401 – 405.
- Patil, MD., BA. Talvelkar., VG. Joshi and BT. Deshmukh. 1992a. Haematological studies in Murrah buffaloes. **Dairy Sci.** 32: 661 - 663.
-
- _____. 1992b. Haematological studies in Murrah buffaloes: TLC, DLC and micrometry of leucocytes. **Dairy Sci.** 32: 760-771.
- Perutz, M.F. and K. Imai. 1980. Regulation of oxygen affinity of mammalian hemoglobins. **J. Mol. Biol.** 136: 183-191.

- Prisco, G. D., B. Giardina and R.E. Weber. 2002. Hemoglobin function in vertebrates: Molecular adaptation in extreme and temperate environments. **Springer**. 6 (4): 285-307.
- Rapoport, S. and G.M. Guest. 1970. In red cell metabolism and function. **J. Biol. Chem.** 28: 255 – 269.
- Ritter, P. 1996. **Biochemistry: A Foundation**. Brooks/COLE Publishing Company. Pacific Grove, U.S.A.
- Roe, S. 2001. **Protein Purification Techniques**. 2nd ed. Oxford University Press. New York, U.S.A.
- Rosenberg, I.M. 1996. **Protein Analysis and Purification Bench Top Techniques**. Birkhauser. Boston, U.S.A.
- Rule, G. 2000. **Oxygen binding by myoglobin & hemoglobin**. Available Source: <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/hemoglobin-myoglobin.html>, November 28, 2000.
- Schroeder, W.A., J.R. Shelton., J.B. Shelton., B. Robberson and D.R. Babin. 1967. A comparison of amino acid sequences in the β -chain of adult bovine hemoglobins A and B. **Arch. Biochem. Biophys.** 120: 124-135.
- Shikama, K. and A. Matsuoka. 2003. Human haemoglobin: a new paradigm for oxygen binding involving two types of $\alpha \beta$ contacts. **Eur. J. Biochem.** 270: 4041–4051.
- Srichayanont, S. 1974. **Hemoglobin Siam ($\alpha 2^{15\text{ARC}} \beta 2$): A new α -chain variant**. M.S. Thesis. Mahidol University, Thailand.

Sripanitan, R. 1983. **Structure characterization of the fourth component of hemoglobin constant spring**. M.S. Thesis. Mahidol University, Thailand.

Sulong, A., M. Hilmi and MR. Jainudeen. 1980. Haematology of the Malaysian swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Pertanika**. 3: 66 - 70.

Tamburrini, M., A. Riccio, M. Ro Griadina and G. Prisco. 2000. Structural and functional analysis of the two heamoglobins of the Antarctic seabird. **Eur. J. Biochem**. 267: 6089 – 6098.

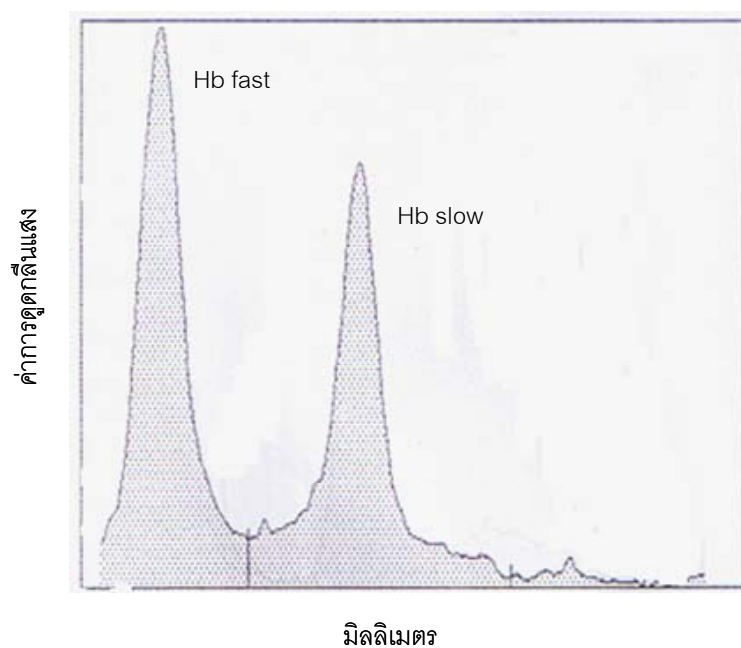
Vanderdon, T.L. and J.M. Colacino. 1989. Characterization of hemoglobin from *Phoronis architecta* (Phoronida). **Comp. Biochem. Physiol.** 94 (1):mano, B. 31 - 39.

Varjavand, N., J.M. Kaye., S. Wang and F.P. Primiano. 2000. **The interaction oxyhemoglobin dissociation curve**. Available Source: <http://www.ventworld.com/resources/oxydisso/dissoc.html>, January 8, 2001.

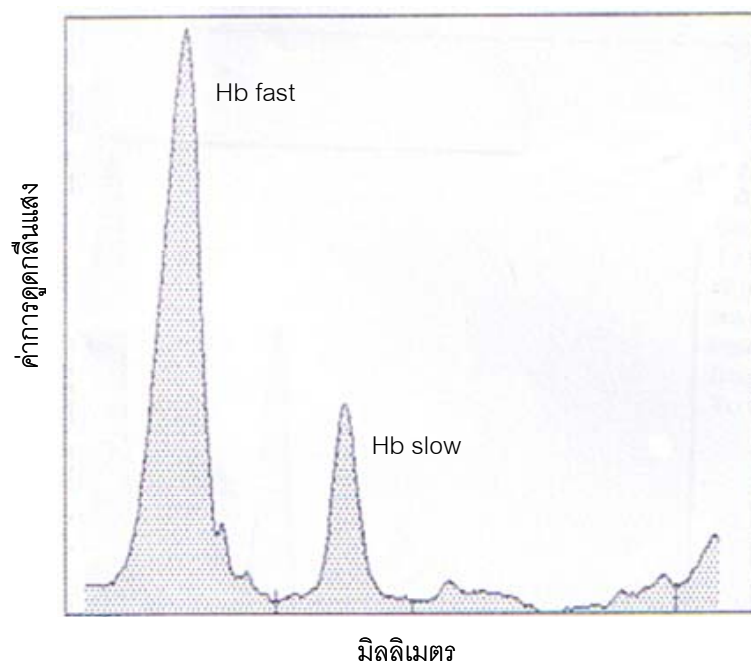
Whitaker J R. 1963. Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on sephadex. **Anal. Chem**. 35: 1950 – 3.

Zinoffsky, O. 1985. **On the size of the hemoglobin molecule**. Available Source: <http://www.udel.edu/chem/white/teaching/CHEM342/Zin1886.html>, November 3, 2000.

ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Hb BB ของกระป๋องปลั๊กแสดงอัตราส่วนระหว่างHb fast ต่อ Hb slow เท่ากับ 2:1



ภาพผนวกที่ 2 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Hb AB ของกระป๋องปลั๊กแสดงอัตราส่วนระหว่างHb fast ต่อ Hb slow เท่ากับ 5:1

ตารางผนวกที่ 1 สรุปค่าต่างๆและค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและของฮีโมโกลบิน กระป๋องปลัก ที่ผ่านคอลัมน์ Gel filtration Chromatography ของ Sephadex G-100 ด้วย ทริส – ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 อัตราการไหล 1.8 มิลลิลิตรต่อนาที

สารละลาย	หลอดที่สาร ถูกชะออกมา มากที่สุด	Kd	Log M.W.	M.W. (คาลตัน)
Blue dextran	11	0.000	6.30	2,000,000
BSA	16	0.174	4.83	68,000
Ovalbumin	20	0.319	4.64	44,000
Chymotrypsinogen A	24	0.468	4.39	25,000
Ribonuclease A	29	0.633	4.11	13,000
ฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก	19	0.293	4.664	46,131

การหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายฮีโมโกลบินโดยวิธีไบยูเรต (Biuret method, Bio-Medical Laboratory, Thailand)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV – visible recording spectrophotometer UV – 160 Shimadzu, Japan)

สารเคมี

1. น้ำยา color reagent (color reagent, Bio-Medical Laboratory, Thailand)
2. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Protein standard, Bio-Medical Laboratory, Thailand)

วิธีทำ

ทำการทดลองดังตารางที่ 5 และตารางที่ 6 โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตารางผนวกที่ 2 การเตรียมสารละลายในหลอด blank และหลอดตัวอย่าง

สารละลาย	หลอด Blank	หลอดตัวอย่าง
น้ำยา color reagent (ml)	5.0	5.0
สารละลายฮีโมโกลบินตัวอย่าง (ml)	-	0.1
น้ำกลั่น (ml)	0.1	-

ผสมให้เข้ากันและนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ภายใน 1-2 ชั่วโมง

ที่มา : Biuret method, Bio-Medical Laboratory, Thailand

ตารางผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

หลอดที่	Blank	1	2	3
สารละลาย (กรัมเปอร์เซ็นต์)		2.0	4.0	6.0
น้ำยา color reagent (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0
สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ml)	-	0.1	0.1	0.1

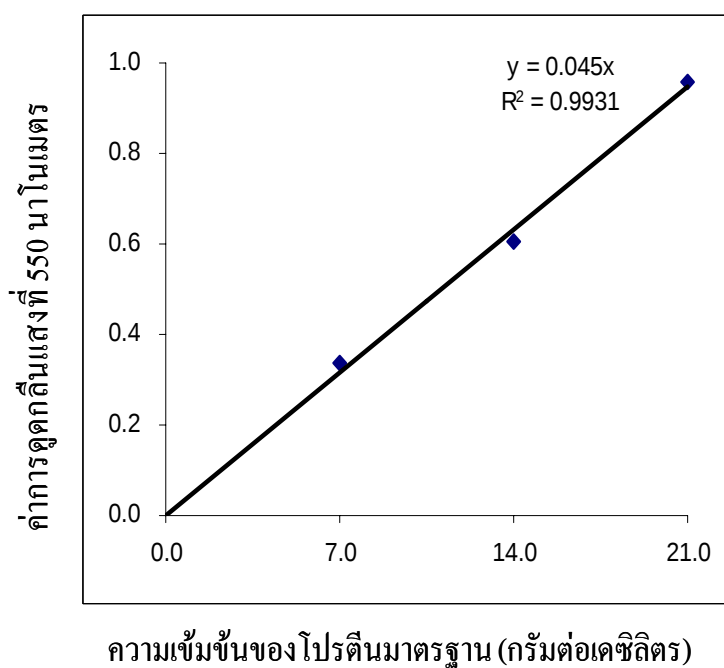
ผสมให้เข้ากันและนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ภายใน 1-2 ชั่วโมง

ที่มา : Biuret method, Bio-Medical Laboratory, Thailand

ตารางผนวกที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

(หน่วย : กรัมต่อเดซิลิตร)

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน
0.000	0.0
0.337	7.0
0.603	14.0
0.956	21.0



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน