

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

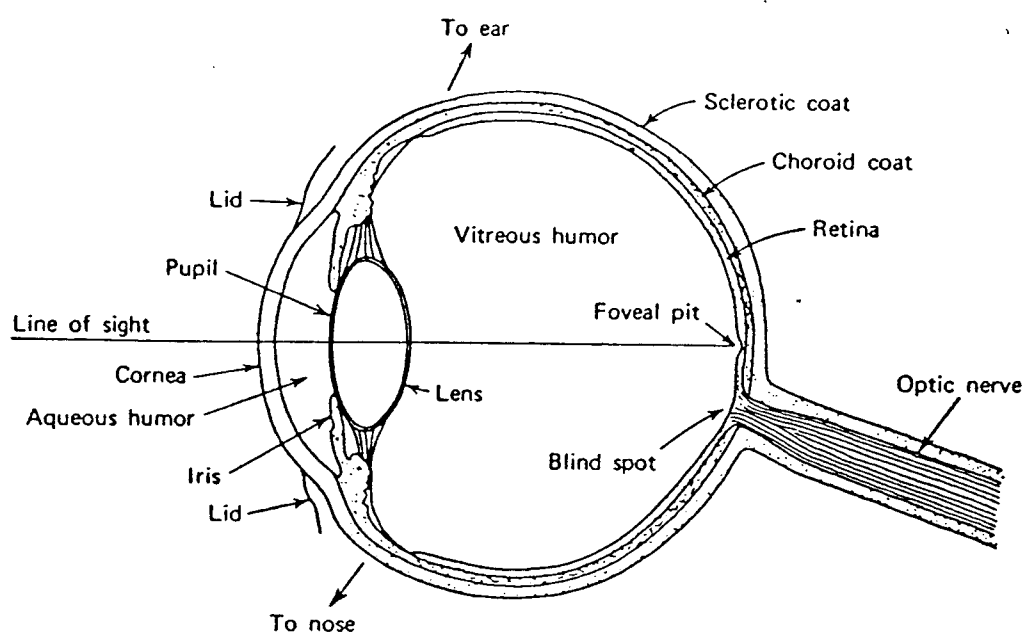
2.1 โครงสร้างของตา

โดยทั่วไปแล้วลูกตาดจะมีลักษณะเป็นทรงกลม โดยมีเฉพาะด้านหน้าของตาที่เป็นส่วนโป่งใส เรียกว่า กระจกตา (cornea) ส่วนที่เหลือจะทึบแสง ส่วนประกอบสำคัญของลูกตาแสดงได้ดังในภาพที่ 2.1 ทั้งนี้ ผนังของลูกตาสามารถแยกแยะออกได้เป็น 3 ชั้น ดังนี้ คือ

1. ชั้นนอกสุด มีหน้าที่ช่วยป้องกันอันตรายแก่ส่วนอื่นภายในตา ทางด้านหน้าของตาจะใส เรียกว่า กระจกตา ส่วนทางด้านหลังมีสีขาวขุ่น เรียกว่า คาขาว (sclera)
2. ชั้นกลาง เป็นส่วนที่ประกอบด้วยหลอดเลือดมากมาย เรียกว่า คอโรยด์ (choroid coat) จัดเป็นโครงสร้างที่ช่วยหล่อเลี้ยงอาหารให้แก่ลูกตา
3. ชั้นใน เป็นส่วนที่เรียกว่า เรตินา ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ประสาทจำนวนมากมาย และเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการรับภาพและส่งข้อมูลที่ได้ออกสู่สมอง

โดยปกติแล้วเรตินาจะมีการจัดตัวเรียงกันเป็นชั้นๆซึ่งแบ่งออกได้เป็น 10 ชั้นเรียงจาก sclera ถึง vitreal surface (Borwein, 1981) ตามลำดับดังนี้

1. pigment epithelium (PE) ประกอบด้วยเซลล์ pigment epithelium ซึ่งเรียงตัวเป็นชั้นของเซลล์เพียงเซลล์เดียวอยู่ด้านนอกสุด
2. bacillary layer (BL) ประกอบด้วยส่วน outer และ inner segments ของเซลล์ photoreceptor
3. outer limiting membrane (OLM) บริเวณนี้ไม่ใช่ membrane ที่แท้จริง แต่เป็นรอยต่อระหว่างเซลล์ glia และเซลล์ photoreceptor
4. outer nuclear layer (ONL) เป็นบริเวณที่มีนิวเคลียสของเซลล์ photoreceptor ปรากฏอยู่
5. outer plexiform layer (OPL) เป็นบริเวณที่อยู่ของ photoreceptor terminal ซึ่งเชื่อมโยงหรือติดต่อสื่อสารกับเซลล์ bipolar และเซลล์ horizontal
6. inner nuclear layer (INL) เป็นบริเวณที่ประกอบด้วย cell bodies ของเซลล์ horizontal, bipolar, amacrine และ interplexiform



ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของตา

7. inner plexiform layer (IPL) เป็นบริเวณที่เซลล์ bipolar และ amacrine ทำการเชื่อมโยงหรือติดต่อสื่อสารกับเซลล์ ganglion

8. ganglion cell layer (GCL) ประกอบด้วยเซลล์ ganglion เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังอาจพบเซลล์บางชนิดซึ่งเรียกว่า เซลล์ displaced amacrine

9. optic fibre layer (OFL) ประกอบด้วย axon ของเซลล์ ganglion ซึ่งจะรวมกันเป็นประสาทตา (optic nerve)

10. inner limiting membrane เป็นบริเวณที่แบ่งเขตระหว่าง vitreous surface และเรตินา จะเห็นได้ว่า เรตินา ประกอบด้วยชั้นที่มีเซลล์อยู่ 4 ชั้น ได้แก่ PE, ONL, INL และ GCL และเซลล์ประสาทที่สำคัญที่มีในเรตินามีอยู่ 6 ชนิด อันได้แก่เซลล์ photoreceptor, horizontal, bipolar, amacrine, interplexiform และ ganglion โดยมีเซลล์ photoreceptor ทำหน้าที่รับพลังงานแสง เปลี่ยนให้เป็นตัวกระตุ้นทางไฟฟ้า และในท้ายสุดอาศัยสารสื่อประสาทเพื่อติดต่อกับเซลล์ประสาทชนิดอื่นต่อไป

ในปัจจุบันมีสารสื่อประสาทหลายชนิดที่เชื่อว่าจะมีความสำคัญในการทำงานของเรตินา ตัวอย่างเช่น โดปามีน (dopamine) อะเซทิลโคลีน (acetylcholine) กลัยซีน (glycine) กรดแกมมาอะมิโนบิวทิริก (gamma-aminobutyric acid, GABA) เซโรโทนิน (serotonin, 5-hydroxytryptamine) และกรดกลูตามิก นอกจากนี้ยังมีสารพอกนิวโรเปปไทด์ (neuropeptides) อีกเป็นจำนวนมากที่อาจมีความสำคัญในการเป็นสารสื่อประสาท และ/หรือสารปรับประสาท (neuromodulator) ในเรตินา (Massey and Redburn, 1987)

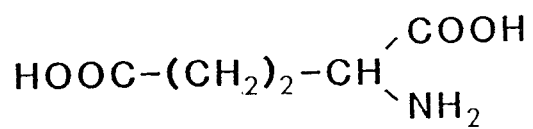
ในบรรดาสารสื่อประสาท และ/หรือสารปรับประสาทที่พบได้ในเรตินานั้น กรดกลูตามิก นับได้ว่าเป็นสารสื่อประสาทที่จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นที่มีความสำคัญ ทั้งนี้ เพราะนอกจากจะมีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทได้แล้ว ยังมีฤทธิ์เป็นสารพิษต่อเซลล์ประสาทอีกด้วย (Lucas and Newhouse, 1957) จากการศึกษาในเรตินาของสัตว์หลายชนิดทำให้เชื่อว่ากรดกลูตามิกเป็นสารสื่อประสาทที่หลั่งออกจากเซลล์ photoreceptors เพื่อติดต่อกับเซลล์ bipolar และ horizontal โดยที่จะมีการหลั่งสารสื่อประสาทจากเซลล์ photoreceptor ในระดับสูงในความมืด และถูกยับยั้งได้ด้วยแสง (Lasater, 1990) ซึ่งเชื่อว่า การที่มีกรดอะมิโนพอกกรดกลูตามิกในความเข้มข้นสูงในความมืดนั้น จะมีส่วนควบคุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ outer segments ของเซลล์ photoreceptor นอกจากนี้ จากข้อมูลหลาย ๆ อย่างยังมีการเสนอแนะว่ากรดกลูตามิกน่าจะเป็นสารสื่อประสาทในกลุ่มเซลล์ ganglion อีกด้วย โดยกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะส่งปลายประสาทไปสู่ชั้นที่ 1-7 ของสมองส่วน optic tectum (Ehinger, 1981)

2.2 กรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้น (Excitatory Amino Acids)

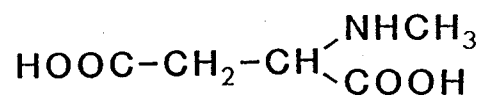
จากการศึกษาในสมองของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม พบว่า การให้กรดกลูตามิก และ กรดแอสปาดิก โดยวิธี iontophoresis มีฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์สมองได้ (Curtis and Watkin, 1960, 1965) กรดอะมิโนเหล่านี้จึงถูกจัดเป็นกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้น (excitatory amino acids; EAAs) นอกจากนี้ EAAs ยังกระตุ้นเซลล์ประสาทอื่น ๆ ได้ทั้งหมดในระบบประสาท (Coyle et al., 1981) จากหลักฐานต่าง ๆ ทำให้ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า กรดกลูตามิก และกรดแอสปาดิกทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทที่มีฤทธิ์เป็นสารกระตุ้น (excitatory neurotransmitters) พบมากใน จุดประสานประสาท (synapse) ในระบบประสาทส่วนกลางของ สัตว์มีกระดูกสันหลัง (Fagg and Foster, 1983)

ในปี ค.ศ.1957 Lucas และ Newhouse ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่า กรดกลูตามิกอาจเป็น สารพิษต่อเนื้อเยื่อประสาทนอกเหนือจากที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้น ทั้งนี้จากการฉีดกรดกลูตามิกเข้า ได้หัวหน้แก่หนูแรกคลอด (infant mice) พบว่ามีการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาทในเรตินา ชั้นใน (inner layer of retina) อย่างรวดเร็ว (Lucas and Newhouse, 1957) นอกจากนี้ยังมีการ ทดสอบ ผลของกรดกลูตามิกโดยให้ในรูปของเกลือโซเดียม (monosodium glutamate) เข้าไปใน ตัวหนู (Lucas and Newhouse, 1957; Cohen, 1967; Olney, 1969; Hansson, 1970 ; Olney et al., 1971; Karlsen and Fonnum, 1976) พบว่ากรดกลูตามิกสามารถชักนำให้มีการทำลายเรตินา โดยที่เรตินาชั้นในมีสภาพเลวลงอย่างมาก และจากการทดลองในหลอดทดลองพบว่า กรดกลูตามิก จะมีความไวในการทำลายเซลล์ประสาทชั้นในของเรตินาของตัวอ่อนไก่ (Reif-Lehrer, et al., 1975; Blanks et al., 1981; Casper et al., 1982 a,b)

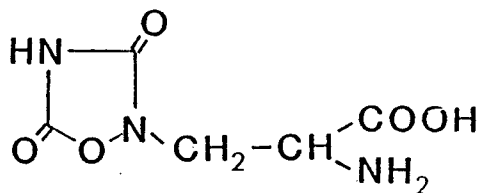
จากการนำเอาอนุพันธ์ของกรดกลูตามิกมาศึกษาพบว่า อนุพันธ์หลายๆ ตัวมีความแรงใน การกระตุ้นมากกว่ากรดกลูตามิก โดยออกฤทธิ์ที่ receptor subtype ของกรดกลูตามิกที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น กรดโคนิค ซึ่งแยกได้จาก seaweed *Digenea simplex* (Shinozaki and Konishi, 1970) จับกับ KA-preferring receptor subtype กรดควิสควาลิค ซึ่งแยกได้จาก *Quisqualis nut* (Shinozaki and Shibuya, 1974) จับกับ QUIS-preferring receptor subtype และ NMDA ซึ่งเป็น สารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้น (Curtis and Watkins, 1965) จับกับ NMDA-preferring receptor subtype โครงสร้างของกรดกลูตามิก และอนุพันธ์ดังกล่าว แสดงในภาพที่ 2.2 นอกจากนี้ยังมี รายงานว่ากรดกลูตามิกเป็น endogenous ligand ของ KA-preferring และ QUIS-preferring receptor subtypes ในขณะที่กรดแอสปาดิกเป็น endogenous ligand ของ NMDA-preferring receptor subtype



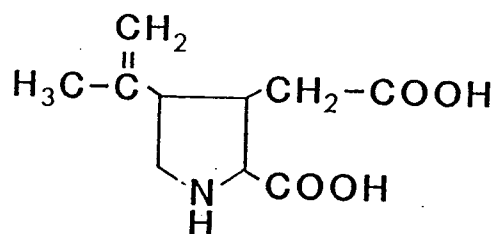
Glutamic acid



N-Methyl-D-aspartic acid



Quisqualic acid



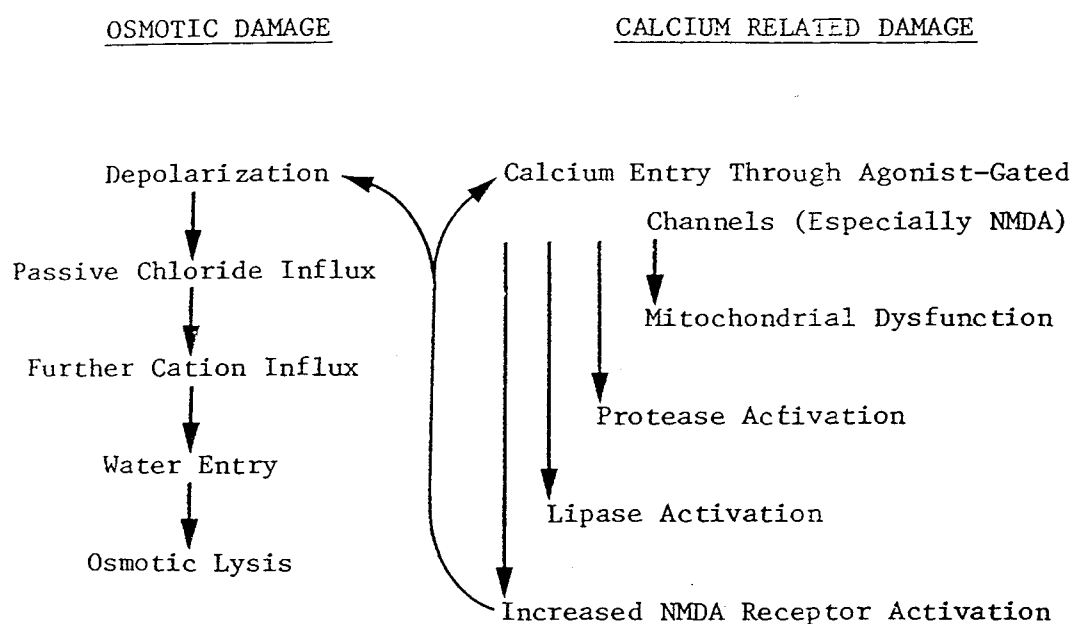
Kainic acid

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของกรดกลูตามิก และอนุพันธ์ของกรดกลูตามิก

จากการที่กรดกลูตามิกและอนุพันธ์ของกรดกลูตามิก เป็นกรดอะมิโน และมีคุณสมบัติเป็น toxins ที่มีผลทำให้เกิดการ damage ของเซลล์ประสาททั้งในระบบประสาทส่วนกลางและเรตินา ซึ่งการทำลายเซลล์ประสาทดังกล่าวเกิดขึ้นได้เชื่อว่าการที่มีไซโตเคียมและแคลเซียมเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยที่การกระตุ้นเซลล์มากเกินไป (over stimulation) จะทำให้ไซโตเคียมและน้ำเข้าสู่เซลล์มากเกินไปจนเกิดการบวมของเซลล์ จากนั้นแคลเซียมจะผ่านเข้าสู่เซลล์ทาง Agonist-Gated channels โดยเฉพาะใน NMDA receptor มีผลทำให้หน้าที่การทำงานของ mitochondria สูญเสียไป นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้นเอนไซม์ protease และเอนไซม์ lipase เกิดการย่อยสลายโปรตีนและไขมันทำให้เซลล์ตายในที่สุด และจากการที่กรดกลูตามิกรวมทั้งอนุพันธ์ของกรดกลูตามิก มีคุณสมบัติเป็นกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้น จึงทำให้ Olney เรียกสารกลุ่มนี้ว่า excitotoxins (Olney et al., 1971; Olney, 1980) กลไกการเกิด excitotoxic effects ของ EAAs แสดงในภาพที่ 2.3

สัตยาชัยและคณะ (Sattayasai et al., 1989; Barrington et al., 1989; Ehrlich et al., 1990) ได้ทำการศึกษาผลของอนุพันธ์ของกรดกลูตามิกที่มีต่อเซลล์ประสาทภายในเรตินา พบว่าอนุพันธ์ของกรดกลูตามิกแต่ละตัวมีความสามารถในการทำลายเซลล์ประสาทที่แตกต่างกัน โดยที่เซลล์ประสาทจะถูกทำลาย และกำจัดออกนอกเรตินาภายในเวลา 2-4 วัน และจากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า กรดไคโรนิกมีผลทำลายเซลล์ bipolar, amacrine, horizontal, displaced amacrine และบางส่วนของเซลล์ ganglion จากการตรวจดู photoreceptor terminal พบว่ามีการถูกทำลายอย่างรุนแรงเช่นเดียวกับ photoreceptor outer segment นอกจากนี้ยังพบการลดจำนวนลงของ pigment granules ใน pigment epithelium ส่วนผลของกรดควิสควาลิกที่มีต่อเรตินา พบว่ามีการทำลายเซลล์ amacrine, bipolar, horizontal และยังพบการเปลี่ยนแปลงของ photoreceptor synapses และ ribbons เช่นกัน กรดควิสควาลิกมีผลต่อ photoreceptor outer segment เล็กน้อยเท่านั้น ส่วน NMDA พบว่าจะทำลายเซลล์ amacrine และบางส่วนของเซลล์ ganglion ในขณะที่ไม่มีผลต่อ photoreceptor terminal และ outer segment

จากการศึกษาผลของ EAAs ที่มีต่อเรตินาของไก่โดยใช้ zinc-iodide-osmium (ZIO) technique และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยสัตยาชัย และคณะ (Sattayasai et al., 1989) พบว่ากรดไคโรนิก ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดกลูตามิกมีผลทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของเซลล์ photoreceptor เมื่อตรวจสอบ photoreceptor terminal พบว่า ZIO-positive vesicles หายไปหมดในขณะที่อนุพันธ์ของกรดกลูตามิกตัวอื่น เช่น กรดควิสควาลิก และ NMDA ไม่ค่อยมีผลดังกล่าว การสูญเสีย ZIO-positive vesicles ใน photoreceptor terminals เป็นอีกข้อมูลหนึ่งที่เสนอแนะว่ากรดไคโรนิกนอกจากจะมีผลทำลายเซลล์ประสาทในเรตินาซึ่งตรวจสอบได้โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะโครงสร้างแล้วยังอาจมีผลเปลี่ยนแปลงฟังก์ชันของ



ภาพที่ 2.3 กลไกการเกิด excitotoxic effects ของ EAAs

จากการกระตุ้นเซลล์ประสาทมากเกินไป EAAs จะมีผลเพิ่มโซเดียมและแคลเซียม ภายในเซลล์ทำให้เกิดการทำลายเซลล์จากทั้ง osmotic damage (ผลของโซเดียมและน้ำ) และ calcium-related damage (ผลของแคลเซียม)

photoreceptor โดยรบกวนเกี่ยวกับ synaptic transmission ที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ photoreceptor กับเซลล์อื่น ๆ อีกด้วย

จากการที่มีผู้เสนอแนะว่า ZIO-staining อาจเกิดจาก reactive sulfhydryl group (Pellegrino De Iraldi, 1975, 1977) สัตยาชัยและคณะ (Sattayasai *et al.*, unpublished result) จึงได้วัดหาปริมาณ total sulfhydryl ในเรตินาที่ได้รับกรดโคโคไนค กรดควิซควาลิก และ NMDA เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลที่ได้มีแนวโน้มว่าปริมาณ total sulfhydryl ในเรตินาที่ได้รับกรดโคโคไนค มีค่าลดลงแตกต่างจากกลุ่มอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้น ความผิดปกติของเซลล์ photoreceptor ที่เกี่ยวกับ ZIO-staining จึงอาจสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ total sulfhydryl ก็เป็นไปได้

2.3 การเจริญเติบโตของลูกตา

ตาเป็นอวัยวะที่สำคัญในการมองเห็น ซึ่งการมองเห็นภาพได้ชัดเจนนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับ การปรับความโค้ง-เว้าของเลนส์ตาแล้ว ยังขึ้นอยู่กับความสมดุลกันระหว่างความสามารถ ในการหักเหแสงและความยาวในแนวตั้งของลูกตา ถ้าเมื่อใดความไม่สมดุลในภาวะดังกล่าว เกิดขึ้น ก็จะทำให้การปรับภาพเกิดความผิดปกติ หรือเกิดภาวะสายตาสั้นผิดปกติ สำหรับสาเหตุ ของการเกิดสายตาสั้นผิดปกติ เช่น สายตาสั้น สายตาวน สายตาเอียง สายตาคอนสูงอายุ สายตาวน ในภาวะไม่มีแก้วตา และสายตาสองข้างไม่เท่ากัน สรุปได้ดังนี้

1. ความผิดปกติที่พื้นผิวการหักเห (refracting surface) เช่น กระจกตา หรือผิวของ แก้วตา มีความโค้งมากกว่าปกติ จะทำให้เกิดสายตาสั้น ชนิด curvature myopia ถ้ามีความโค้ง น้อยกว่าปกติจะทำให้เกิดสายตาวนชนิด curvature hyperopia

2. ความผิดปกติของดัชนีการหักเห (refractive index) เช่น ต้อกระจก มีดัชนีการหักเห ของแสงเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดสายตาสั้นชนิด index myopia

3. ความผิดปกติของความยาวของลูกตา (axial length) เช่น ลูกตาวนเกินไปเกิดสายตาสั้น ชนิด axial myopia ถ้าลูกตาสั้นมากเกินไปเกิดสายตาวนชนิด axial hyperopia

4. การเปลี่ยนแปลงระยะระหว่างพื้นผิวของการหักเห เช่น ระหว่างกระจกตา และแก้วตา เช่น ในกรณีแก้วตาเคลื่อนหลุดจากที่

ภาวะสายตาสั้น เป็นภาวะที่ลำแสงขนานจากวัตถุกระทบลูกตาดเกิดการหักเหของแสง และจะมีจุดรวมแสงตกลงด้านหน้าของเรตินาทำให้มองเห็นภาพไม่ชัด สำหรับสาเหตุการเกิดภาวะ สายตาสั้น เช่น ลูกตาวนเกินไป หรือความโค้งของพื้นผิวการหักเหของกระจกตาหรือแก้วตา

มากเกินไป หรือดัชนีการหักเหเพิ่มขึ้น ส่วนภาวะสายตาสั้น เป็นภาวะที่ลำแสงขนานจากวัตถุ กระทบลูกตาเกิดการหักเหของแสงและจะมีจุดรวมแสงตกลงด้านหลังของเรตินา ทำให้มองเห็น ภาพไม่ชัด สาเหตุการเกิดภาวะสายตาสั้น เช่น ลูกตาสั้นเกินไป หรือกำลังหักเหของลูกตาน้อยไป หรือภาวะไม่มีแก้วตา

ในสัตว์ทดลอง ได้มีการทำการศึกษาถึงภาวะสายตาสั้นที่ผิดปกติ โดยการรบกวนการมองเห็นของสัตว์ที่มีอายุน้อย ๆ โดยการปิดตา (eye occlusion) พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อลูกตา ในลักษณะคล้ายกับเกิดภาวะสายตาสั้น โดยลูกตามีการเจริญขยายใหญ่ขึ้นอย่างผิดปกติ (Criswell and Goss, 1983; Yinon, 1984; Raviola and Weisel, 1985) ซึ่งปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับแล้วว่า การปิดตาสัตว์ทดลองเป็นโมเดลที่ใช้ในการทำให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะสายตาสั้น (Barrington and Ehrlich, 1987) การกระตุ้นให้เกิดภาวะสายตาสั้นนั้น ได้มีผู้ทดลองในสัตว์หลายชนิด เช่น ลิง (Greene and Guyton, 1981) และแมว (Gollender and Thorn, 1979; Kirby et al., 1982; Yinon and Kosowe, 1984) อย่างไรก็ตามในสัตว์ทดลองดังกล่าวต้องใช้เวลาหลายเดือนจึงจะสามารถพบการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของลูกตาได้ เมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกันในลูกไก่ ปรากฏว่า การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถพบได้ในเวลา 1 สัปดาห์ (Barrington and Ehrlich, 1987) ทำให้ลูกไก่จัดเป็นสัตว์ทดลองที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาการเจริญของลูกตา

ในปี ค.ศ. 1978 Wallman และคณะ (Wallman et al., 1978) ได้ทำการทดลองปิดตา ลูกไก่เพียงบางส่วน และรายงานว่ พบการโตขึ้นของลูกตาในบริเวณที่ถูกจำกัดการมองเห็น จากผลดังกล่าว Wallman และคณะเสนอแนะว่า น่าจะมีสารหลังจากเรตินา ซึ่งตอบสนองต่อ ความผิดปกติของการปรับภาพและส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะการเจริญเติบโตของลูกตา ในช่วงการเจริญเติบโตตามปกตินั้นสารดังกล่าวจะช่วยควบคุมให้สายตายุบในสภาวะปกติ ดังนั้น จึงทำให้สารนี้เป็นที่สนใจกันมากในการที่จะพยายามหาลักษณะ, คุณสมบัติและแหล่งที่มาของสาร ดังกล่าว จากการที่เชื่อว่าสารควบคุมการเจริญของลูกตาน่าจะมาจากเรตินา โดยมีแหล่งที่มาจาก เซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังนั้น การที่เซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งในเรตินาถูกทำลายน่าจะมีความสัมพันธ์ กับการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของลูกตาได้

จากการศึกษาผลของกรดกลูตามิกและอนุพันธ์ของกรดกลูตามิกแต่ละตัว พบว่า มีความสามารถในการทำลายเซลล์ประสาทในเรตินาที่แตกต่างกัน (Sattayasai et al., 1989; Barrington et al., 1989; Ehrlich et al., 1990) โดยกรดไคโนนิคจะทำลายเซลล์ amacrine, เซลล์ bipolar, บางส่วนของเซลล์ ganglion และเซลล์ photoreceptor ในขณะที่ NMDA จะทำลายเซลล์ amacrine และกรดควิสควาลิกจะทำลายเซลล์ amacrine และบางส่วนของเซลล์ horizontal นอกจากนี้ จากการที่อนุพันธ์ของกรดกลูตามิกแต่ละตัวมีความสามารถในการจับกับ glutamate

receptor subtype ที่แตกต่างกัน และ Barrington และคณะได้รายงานว่า อนุพันธ์ของกรดกลูตามิก มีผลเปลี่ยนแปลงขนาดของลูกตา ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่คุณสมบัติในการเลือกทำลายเซลล์ประสาท เรตินาส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของลูกตาในลักษณะที่แตกต่างกัน โดยกรดโคนิคมีผลทำให้ลูกตามีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีการเพิ่มขึ้นทั้งน้ำหนักลูกตา และความยาวของลูกตา โดยเฉพาะความยาวในแนวนอน ในขณะที่การให้ NMDA ไม่มีผลทำให้ขนาดของลูกตาเปลี่ยนแปลง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากนัก ส่วนกรดควิสควาลิค พบว่า มีผลเพิ่มความยาวในแนวตั้ง (Barrington et al., 1989)

จากการที่กรดโคนิคมีผลเปลี่ยนแปลงฟังก์ชันของเซลล์ photoreceptor โดยการตรวจสอบ ZIO-positive vesicles ใน photoreceptor terminals (Sattayasai et al., 1989) และจากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนไมโครสโคป Barrington และคณะ (Barrington et al., 1989) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ photoreceptor ในการได้รับกรดโคนิค และกรดควิสควาลิค จึงเสนอแนะว่าเซลล์ photoreceptor น่าจะมีความสำคัญในการควบคุมการเจริญของลูกตา จึงมีผู้ทำการทดลองใช้ tunicamycin ซึ่งมีความสามารถในการทำลายเซลล์ photoreceptor มาทดลองฉีด intraocular ในสัตว์ทดลองหลายชนิด (Fliesler et al., 1984; Fliesler and Basinger, 1985; Anderson et al., 1988) รวมทั้งไก่ (Ehrlich et al., 1990) พบว่ามีการทำลายเซลล์ photoreceptor ภายในเรตินาเกือบหมด นอกจากนี้ เมื่อทำการทดลองโดยการฉีด tunicamycin พร้อมทั้งปิดตา พบว่า tunicamycin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของลูกตาจากการปิดตาได้

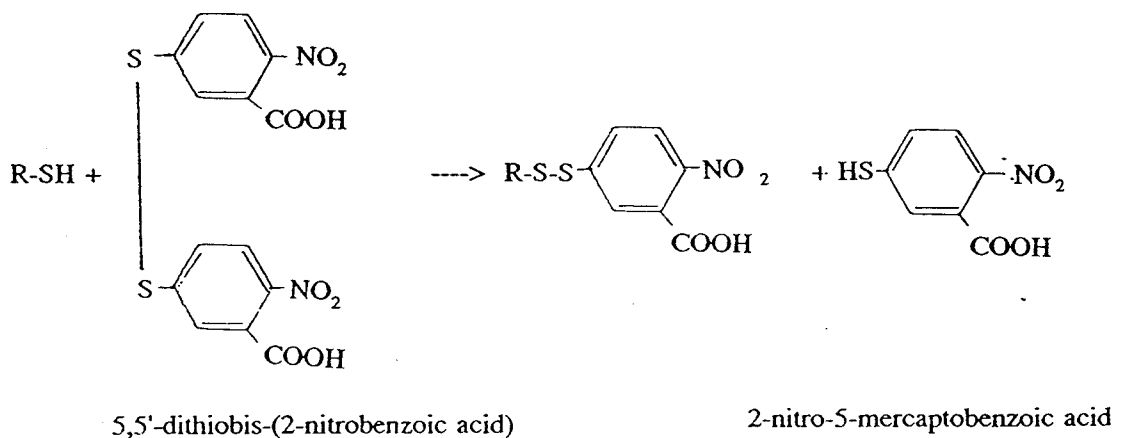
Tunicamycin เป็น N-acetylglycosamine-containing antibiotic ที่ได้จาก *Streptomyces lysosuperificus* ซึ่งสามารถรบกวน biosynthesis ของไกลโคโปรตีน โดยการยับยั้ง opsin glycosylation ภายใน inner segment ของ photoreceptor และยับยั้ง morphogenesis ในสภาวะปกติของ outer segment membranes ในทั้ง rods และ cones (Flisher and Basinger, 1985; Anderson et al., 1988) ดังนั้น ไกลโคโปรตีน ที่มีมากที่เซลล์ photoreceptor อาจเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของลูกตาที่หลั่งจากเซลล์ photoreceptor ก็เป็นไปได้

กรดกลูตามิกจัดเป็นกรดอะมิโนที่มนุษย์เรามีโอกาสได้รับเข้าสู่ร่างกายได้มากในชีวิตประจำวัน และยังเป็น endogenous ligand ที่จับได้กับ glutamate receptor subtypes หลาย ๆ ชนิด เป็นที่ยอมรับกันว่า กรดกลูตามิกเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญของเซลล์ photoreceptor และจะหลั่งออกมามากในความมืด กรดกลูตามิกจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีส่วนก่อให้เกิดภาวะสายตาผิดปกติได้ อย่างไรก็ตามยังมิได้มีผู้ศึกษาถึงผลของกรดกลูตามิกต่อการเจริญเติบโตของลูกตา นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่าความผิดปกติของเซลล์ photoreceptor, และปริมาณ total sulfhydryl

และการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของลูกตา จะมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ ในลูกตาที่ทำให้เกิดภาวะ สายตาสั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ total sulfhydryl หรือไม่ นอกจากนี้จากการที่ reactive sulfhydryl group จัดเป็น functional group ที่พบได้ในโปรตีนหลายชนิด การหาชนิดของโปรตีน ซึ่งมี reactive sulfhydryl group ยังอาจจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาถึงภาวะ สายตาสั้นต่อไป

2.4 การหาปริมาณ total sulfhydryl

จากความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติของเซลล์ photoreceptor กับการหายไปของ ZIO-positive staining ซึ่งมีผู้คาดว่าน่าจะมีความสัมพันธ์กับ reactive sulfhydryl group (Pellegrino De Iraldi, 1975, 1977) นั้น เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่า reactive sulfhydryl group เป็น functional group ที่พบได้ในโปรตีนหลายชนิด ดังนั้นการหาปริมาณ total sulfhydryl อาจจะเป็นตัวบ่งชี้อย่างหนึ่งในการบอกถึงความผิดปกติของเซลล์ photoreceptor ซึ่งจากการหาปริมาณ total sulfhydryl ทำได้ โดยนำ 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ทำปฏิกิริยากับ reactive sulfhydryl group ได้ 2-nitro-5-mecaptobenzoic acid ซึ่งจะให้สีเหลือง และสามารถนำไปวัด absorbance ที่ 412 นาโนเมตร โดยเครื่อง spectrophotometer เพื่อหาปริมาณ total sulfhydryl ต่อไป (Sedlak and Lindsay, 1968) สำหรับสมการในการเกิดปฏิกิริยาแสดงไว้ข้างล่างนี้



2.5 Polyacrylamide Gel Electrophoresis

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคทางด้าน polyacrylamide gel electrophoresis และ Western-blotting เพื่อแยกแถบโปรตีนและศึกษาถึงคุณสมบัติของโปรตีน จึงใคร่ขอกล่าวถึงหลักการที่เกี่ยวกับเทคนิคดังกล่าว (Hames and Rickwood, 1988) โดยปกติแล้วโปรตีนเมื่ออยู่ในสารละลายที่มี pH ใดๆ ที่ไม่ใช่เป็น isoelectric pH โปรตีนนั้นๆ จะมีประจุรวมที่ไม่ใช่ศูนย์ และเมื่ออยู่ท่ามกลางสนามไฟฟ้าก็จะเกิดการเคลื่อนที่ ถ้าสารละลายนั้นมี pH สูงกว่า isoelectric pH ของโปรตีนใดก็จะทำให้โปรตีนนั้นมีประจุรวมเป็นลบ และจะเคลื่อนที่สู่ด้านที่เป็นขั้วบวกของสนามไฟฟ้า ในทางตรงข้ามหาก pH ของสารละลายต่ำกว่า isoelectric pH โปรตีนก็จะมีประจุรวมเป็นบวก และเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วลบของสนามไฟฟ้า นอกจากนี้ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสนามไฟฟ้าจะขึ้นกับความหนาแน่นของประจุ (charge density) ซึ่งหมายถึงสัดส่วนประจุต่อมวล สารที่มีค่านี้สูงก็จะเคลื่อนที่ได้เร็ว

จากหลักการดังกล่าว นำมาใช้ในการสร้างเทคนิคการแยกสารโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในระยะต้น ๆ เป็นการทำให้ในสภาพที่เป็นสารละลาย แต่ผลที่ได้ ไม่ดีนัก ทั้งนี้เนื่องจากเกิดกระบวนการพาความร้อนในสารละลายและมีการแพร่ (diffusion) ของสารที่แยก ทำให้แถบของสารที่แยกได้มีขนาดกว้างและแยกไม่ชัดเจน ต่อมา มีการปรับปรุงวิธีการโดยการใส่ตัวกลางค้ำจุน (supporting medium) บางชนิดลงในสารละลายด้วย ตัวกลางนี้จะไปลดการพาความร้อนและลดการแพร่ของสารที่แยก ทั้งในระหว่างที่ทำการแยก และหลังการแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว

ตัวกลางค้ำจุนที่ใช้ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกได้แก่ กระดาษ, cellulose acetate และสารจำพวก silica gel, alumina หรือ cellulose ซึ่งเคลือบเป็นชั้นบาง ๆ ไว้บนแผ่นกระจกหรือแผ่นพลาสติก อิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้ตัวกลางค้ำจุนกลุ่มนี้ โมเลกุลต่าง ๆ จะถูกแยกออกจากกันด้วยความหนาแน่นประจุตามที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตามสารที่มีขนาดต่างกัน แต่มีความหนาแน่นประจุเท่ากันอาจแยกจากกันไม่ได้

ตัวกลางค้ำจุนกลุ่มที่สอง เป็นตัวกลางที่มีรูพรุนและยอมให้สารผ่านได้ตามรูพรุนเท่านั้น ขนาดของรูพรุนในตัวกลาง จะแตกต่างกันไปตามชนิดและความเข้มข้นของสารที่ใช้นำมาเป็นตัวกลางค้ำจุน ตัวกลางกลุ่มนี้ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า molecular sieving การใช้ตัวกลางค้ำจุนประเภทนี้ทำให้สารที่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากัน แต่ขนาดของโมเลกุลแตกต่างกัน สามารถถูกแยกออกจากกันได้ สารที่จัดอยู่ในประเภทของตัวกลางกลุ่มนี้คือ แป้ง (starch), agarose และ polyacrylamide แป้งเป็นสารราคาถูก แต่มีส่วนประกอบและความบริสุทธิ์ไม่คงที่

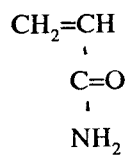
จึงทำให้การแยกสารแต่ละครั้งแปรผันได้ ส่วน agarose เป็นสารที่มีรูพรุนขนาดใหญ่จึงเหมาะกับการแยกสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น DNA, RNA ส่วนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงมา เช่น โปรตีน ต้องใช้ polyacrylamide ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ (polymer) สังกะระห์ ที่มีความเหนียวต่อปฏิกิริยาต่างๆ สารนี้เกิดจากการต่อต้านระหว่างโมเลกุลจำนวนมากของ acrylamide monomer สารโมโนเมอร์ (monomer) นี้สามารถทำให้มีความบริสุทธิ์สูงได้ และสภาวะในการเกิด polymerization ก็ควบคุมได้ ดังนั้นจึงสามารถเตรียม polyacrylamide ที่มีรูพรุนขนาดต่าง ๆ ตามที่ต้องการเพื่อใช้แยกสารได้ในวงกว้างโดยสามารถใช้แยกเส้นโพลีเปปไทด์ (polypeptide chain) ที่มีขนาดโมเลกุลเพียง 2,000 ดาลตัน (dalton) จนถึงขนาด 10^6 ดาลตัน เนื่องจาก polyacrylamide นี้มีลักษณะเป็นเจล (gel) อิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้สารนี้เป็นตัวกลางค้ำจุนจึงเรียกว่า polyacrylamide gel electrophoresis

ในการเตรียม polyacrylamide gel นั้น ถ้าใช้แต่ acrylamide monomer อย่างเดียว พอลิเมอร์ที่ได้จะมีลักษณะเป็นเพียงของเหลวชั้น ๆ เท่านั้น ถ้าจะให้มันเป็นเจลจะต้องใช้สาร N,N'-methylene bisacrylamide ซึ่งทำหน้าที่เป็น crosslinker มาร่วมในปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ด้วย

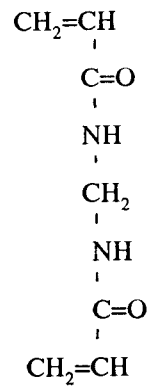
ความเข้มข้นรวมของโมโนเมอร์ (acrylamide และ bisacrylamide) จะมีผลต่อขนาดรูพรุนของ polyacrylamide gel ตลอดจนความแข็ง ความเปราะ การกระจายแสงและคุณสมบัติในการพองตัว อัตราส่วนของ bisacrylamide ที่ใช้ก็มีผลต่อขนาดของรูพรุนเช่นกัน ขนาดของรูพรุนจะเล็กลงถึงจุดต่ำสุด เมื่อความเข้มข้นของ bisacrylamide เพิ่มขึ้นจนถึง 5% ของปริมาณโมโนเมอร์ทั้งหมด ถ้าปริมาณของ bisacrylamide เพิ่มขึ้นมากกว่านี้ polyacrylamide ที่ได้จะมีลักษณะเป็นมัดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ ซึ่งมีช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ระหว่างแต่ละมัด ดังนั้น อัตราส่วนของ bisacrylamide ที่ใช้จึงไม่ควรเกิน 5%

สารอื่นที่จำเป็นต่อการเกิด polyacrylamide นอกจาก acrylamide และ bisacrylamide ก็คือ ammonium persulphate (ในบางกรณีใช้ riboflavin) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเริ่มต้น (initiator) และ N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง (accelerator) ในการเกิดพอลิเมอร์ TEMED ที่มีปฏิกิริยาว่องไวจะต้องอยู่ในรูปเบสอิสระไม่ใช่อนุมูลบวก ดังนั้นในสารละลายที่มี pH ต่ำ ปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์จะช้ากว่าในสารละลายที่มี pH สูง และเนื่องจากออกซิเจนสามารถยับยั้งการเกิดพอลิเมอร์ ในบางครั้งจึงต้องมีการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจละลายอยู่ในสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ polyacrylamide gel โดยการใช้เครื่องดูดอากาศ โครงสร้างของ acrylamide, bisacrylamide และ polyacrylamide แสดงไว้ในภาพที่ 2.4

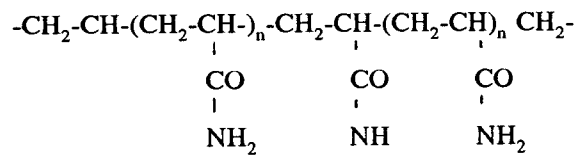
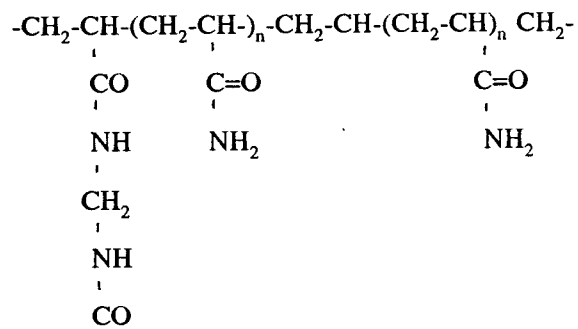
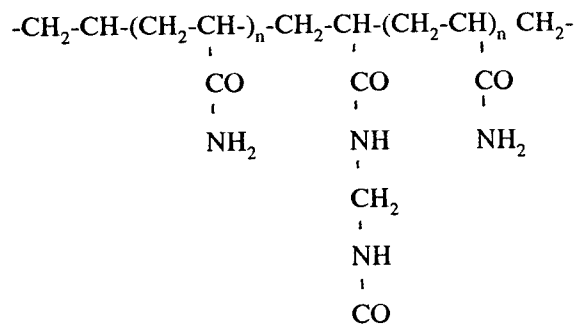
สารที่นิยมใช้ในการทำให้เกิดการแยกตัวของสาร โดยเฉพาะโพลีเปปไทด์ออกจากกัน คือ sodium dodecyl sulphate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent ชนิดหนึ่ง SDS จะยึดติดกับ



Acrylamide



N, N'-methylene bisacrylamide



Polyacrylamide

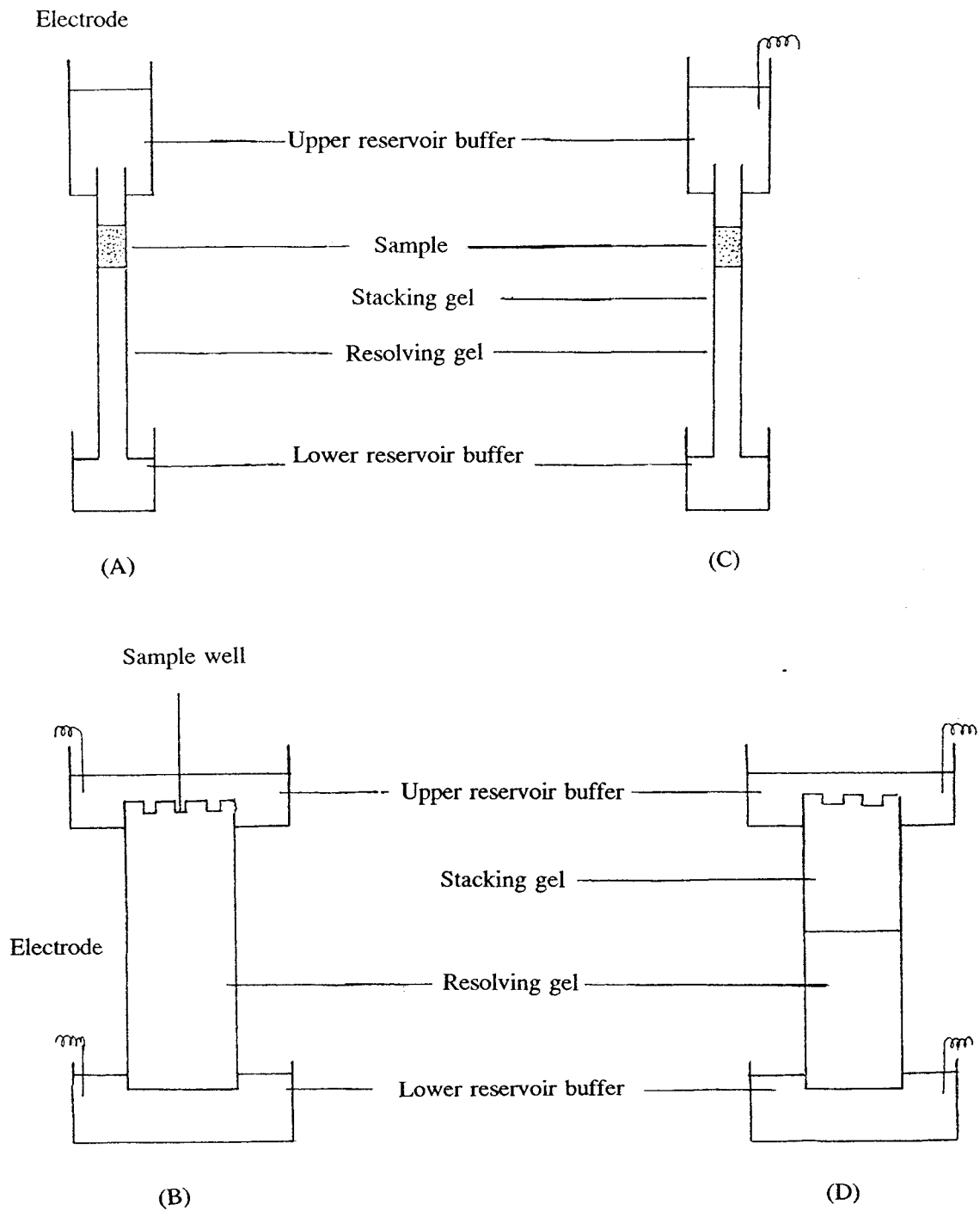
ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของ acrylamide, bisacrylamide และ polyacrylamide

เส้นโพลีเอปไทด์เกือบทุกชนิด ในอัตราส่วนที่เท่ากัน คือ ประมาณ 1.4 กรัม ของ SDS ต่อ 1 กรัมของโพลีเอปไทด์ เนื่องจาก ประจุของโพลีเอปไทด์เองมีน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับประจุลบที่ติดมากับหลาย ๆ โมเลกุลของ SDS ดังนั้นสารเชิงซ้อนของ SDS และโพลีเอปไทด์ (SDS-polypeptide complex) ใด ๆ จะมีความหนาแน่นประจุเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารเชิงซ้อนนี้จึงขึ้นกับขนาดของเส้นโพลีเอปไทด์เท่านั้น polyacrylamide gel electrophoresis ที่มี SDS อยู่ด้วยนี้เรียกว่า SDS - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถนำมาหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนหรือเส้นโพลีเอปไทด์ได้

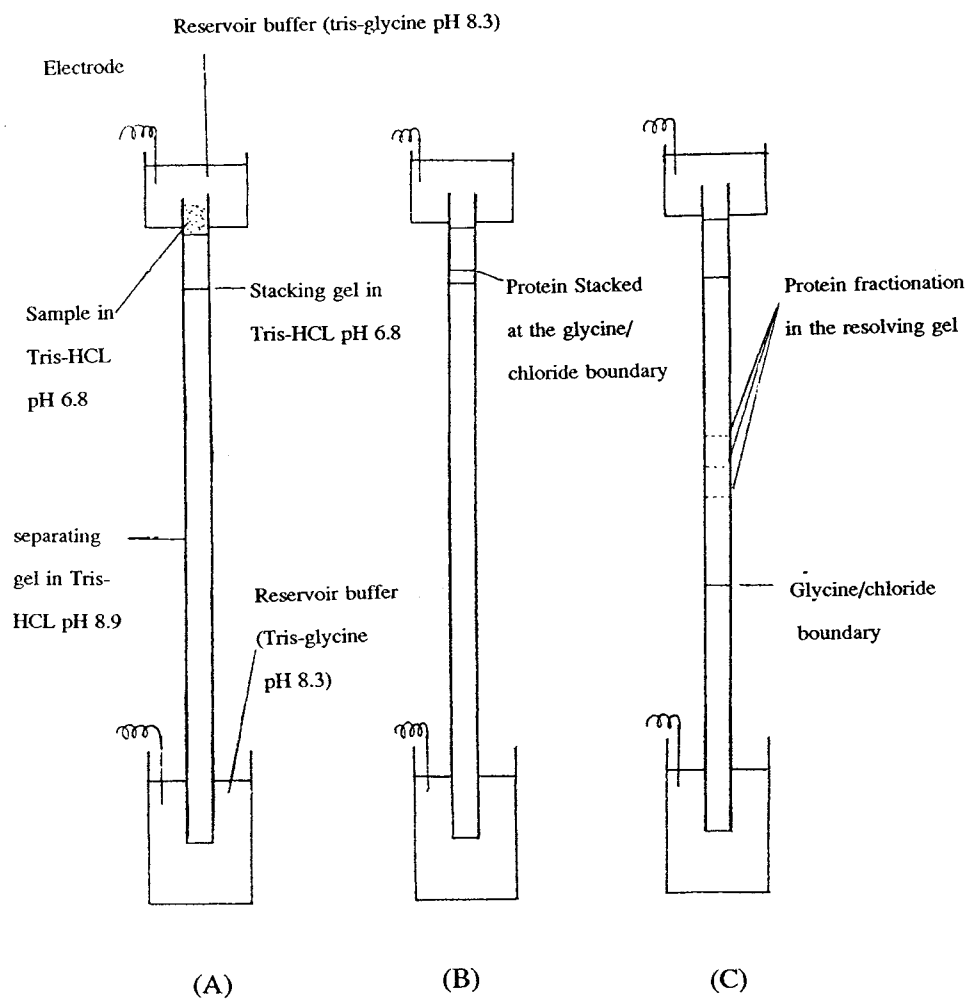
Polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งใช้บัฟเฟอร์เพียงชนิดเดียว ทั้งในการเตรียมตัวอย่าง เตรียมเจล และใน electrode reservoir จะเรียกว่า continuous buffer system อีกระบบหนึ่ง ซึ่งยุ่งยากกว่า แต่ผลการทดลองที่ได้ดีกว่าคือ discontinuous buffer system หรือ multiphasic buffer system ในระบบนี้จะมีความแตกต่างของ pH และส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่อยู่ในส่วนต่าง ๆ ยิ่งไปกว่านั้นตัว polyacrylamide gel เองยังแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ stacking gel ที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ และ separating gel ซึ่งมีรูพรุนเล็กกว่า บัฟเฟอร์ที่อยู่ในเจลทั้งสองส่วนนี้ก็แตกต่างกันด้วย discontinuous buffer system สามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำแต่มีปริมาณสูงได้ ทั้งนี้เนื่องจากภายใน stacking gel จะเกิดกระบวนการที่ทำให้สารหรือโปรตีนที่จะแยกมีความเข้มข้นสูงขึ้นก่อนที่จะมีการแยกออกเป็นแถบ ๆ ใน separating gel ระบบ continuous buffer system และ discontinuous system แสดงไว้ในภาพที่ 2.5

ในหลักการของ discontinuous buffer system นั้น ๆ ตัวสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการทำให้สารตัวอย่างเข้มข้นขึ้นคือ leading ion และ trailing ion ตัวอย่างของบัฟเฟอร์ระบบนี้ คือ Ornstein-Davis system แผนผังในการทำ polyacrylamide gel electrophoresis แสดงดังภาพที่ 2.6

ไกลซีนเป็นกรดอะมิโน (amino acid) ซึ่งมีค่า pK_a ประมาณ 5.97 ที่ pH สูงกว่า 5.97 เล็กน้อย เช่นที่ pH 6.8 ใน stacking gel (ภาพที่ 2.6) โมเลกุลของไกลซีนจะมีประจุรวมเป็นลบในช่วงเวลาอันสั้นเท่านั้น ช่วงเวลาที่เหลือ บนโมเลกุลจะมีประจุรวมเป็นศูนย์ ซึ่งทำให้ไกลซีนเคลื่อนที่ได้ช้าที่ pH ดังกล่าว ในขณะที่อออนคลอไรด์ยังคงเคลื่อนที่ได้เร็วที่ pH 6.8 ดังนั้น จะเกิดแนวของอออนลบสองแนวคือ แนวของอออนคลอไรด์ซึ่งวิ่งนำหน้า (leading ion) และแนวของอออนไกลซีนที่วิ่งตามหลัง (trailing ion) ส่วนโปรตีนที่อยู่ในสารตัวอย่าง ซึ่งมักมีประจุลบสูงกว่าไกลซีน แต่ต่ำกว่าอออนคลอไรด์ จะอยู่ตรงกลางระหว่างอออนทั้งสอง ด้วยเหตุนี้โมเลกุลที่อยู่ด้านหน้าจะวิ่งช้าลงเพราะถูกแรงผลักจากแนวอออนคลอไรด์ ส่วนโมเลกุล ของโปรตีนที่อยู่ด้านหลังจะเคลื่อนที่เร็วกว่า เนื่องจากถูกผลักไปข้างหน้าโดยแนวอออนลบของไกลซีน ดังนั้น โมเลกุลของสารตัวอย่างจึงถูกบีบเข้าหากันในระหว่างที่เคลื่อนอยู่ใน stacking gel สารตัวอย่างจึง



ภาพที่ 2.5 ระบบ continuous buffer system ใน rod (A) และ slab gel (B) และระบบ discontinuous buffer system ใน rod (C) และ slab gel (D) ใน polyacrylamide gel electrophoresis



ภาพที่ 2.6 Ornstein-Davis discontinuous system

(A) เริ่มต้น electrophoresis

(B) ระหว่างการเกิดกระบวนการทำให้สารเข้มข้น

(C) ระหว่างการแยกสารใน separating gel

มีความเข้มข้นสูงขึ้น เมื่อเคลื่อนที่ถึง separating gel ซึ่งมี pH 8.9 อีออนไกลซีนจะมีความเป็นประจุลบมากขึ้น ทำให้ไกลซีนเคลื่อนที่เร็วกว่าโปรตีน จึงไม่เกิดกระบวนการในการทำให้สารเข้มข้นอีกต่อไป ในขณะที่เดียวกันรูพรุนของ polyacrylamide gel มีขนาดเล็กลงโปรตีนแต่ละชนิดในสารตัวอย่างจึงถูกแยกออกเป็นแถบ ๆ

Discontinuous buffer system ที่ถูกนำมาใช้กับ SDS-PAGE จะเรียกว่า SDS-discontinuous system โดยอันแรกเริ่มและยังเป็นที่ยอมรับใช้กันคือระบบของ Laemmli ซึ่งก็คือ Ornstein-Davis buffer system ที่มี SDS อยู่ด้วย

สารตัวอย่างที่นำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเฉพาะถ้าเป็นจำพวกโปรตีนส่วนมากจะมีลักษณะโปร่งใส ดังนั้นจึงมีวิธีการต่าง ๆ ที่ทำให้เห็นได้ เช่น การตกตะกอนสารเชิงซ้อนของ SDS และโปรตีน (SDS-protein complex) ด้วยเกลือบางชนิด การย้อมด้วยสีย้อม (dye) และการย้อมด้วยธาตุเงิน (silver staining) ฯลฯ การจะใช้วิธีอะไรก็ขึ้นกับจุดประสงค์ของงานและความสะดวกของผู้ใช้ อย่างไรก็ตามวิธีที่ใช้กันมากเพราะสะดวก และเสียค่าใช้จ่ายไม่มากนัก คือ การย้อมด้วยสีย้อม (dye) สีย้อมที่ใช้กันมากคือ Coomassie blue R₂₅₀ ซึ่งมักจะทำให้ละลายอยู่ในสารละลายที่ประกอบด้วย น้ำ methanol และกรดอะซิติก (acetic acid) ในการย้อมแถบโปรตีนโดยสีนี้ อาจนำตัวเจลาแมแซในสารละลายของสีย้อมทันทีหลังจากเสร็จสิ้นการแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วหรือนำตัวเจลาไปแช่ในสารละลายที่เรียกว่าfixing solution ก่อน เพื่อป้องกันการแพร่ของแถบโปรตีน แล้วจึงนำไปแช่ในสารละลายของสีย้อม จากนั้นจึงนำเจลาไปแช่ในสารละลายที่เรียกว่า destaining solution ซึ่งสีย้อมจะถูกล้างออกจากส่วนต่าง ๆ ของเจลาเหลืออยู่แต่ส่วนที่เป็นแถบโปรตีน

เนื่องจากใน SDS-PAGE โปรตีนต่าง ๆ จะถูกแยกออกจากกันตามขนาดของโมเลกุล ดังนั้น ถ้าเขียนกราฟระหว่างการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) กับ $\log_{10}$ ของขนาดโมเลกุลหรือ $\log_{10}$ ของน้ำหนักโมเลกุล จะได้กราฟเส้นตรง ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์นี้หมายถึงการเคลื่อนที่ของโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานซึ่งมักใช้สีบางชนิดเช่น bromophenol blue ใส่รวมไปในสารละลายตัวอย่างและในสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ก่อนที่จะทำการแยกโดยวิธี SDS-PAGE อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ควรเหมาะสมด้วยจึงจะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ก็ขึ้นกับความเข้มข้นของ acrylamide monomer ที่ใช้และอาจสรุปได้คร่าว ๆ ดังนี้

- 15% acrylamide ใช้กับโมเลกุลขนาด 12,000- 15,000 daltons
- 10% acrylamide ใช้กับโมเลกุลขนาด 15,000- 70,000 daltons
- 5% acrylamide ใช้กับโมเลกุลขนาด 25,000-200,000 daltons

นอกจากเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสจะสามารถแยกโปรตีนออกเป็นแถบ ๆ แล้วยังสามารถดูคุณสมบัติอื่น ๆ ของโปรตีน เช่นการหาโปรตีนที่มีหมู่ sulfhydryl group (-SH) โดยการใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่เหมาะสมเช่น ^{14}C -iodoacetamide มาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง จากนั้นจึงนำสารตัวอย่างมาแยกแถบโปรตีน โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส และหาแถบโปรตีนที่มีสารกัมมันตภาพรังสี โดยวิธี autoradiograph (Chamberlain, 1979) นอกจากนี้โปรตีน ที่ถูกแยกบนเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสสามารถถูกเคลื่อนย้ายให้มาติดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) แถบโปรตีนที่อยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสนี้เหมาะที่จะนำมาทำปฏิกิริยาเพื่อหา คุณสมบัติต่าง ๆ เช่น หากคุณสมบัติในการเป็นไกลโคโปรตีน โดยใช้ concanavalin A (Furlan, et.al., 1979) นำมาทำปฏิกิริยาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นต้น