



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.....
ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

.....
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

.....
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินและรูปแบบของซีรัมโปรตีนในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

The Comparison Study of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin and Serum Protein Patterns in Thai Ridgeback Dog and Thai Bangkaew Dog

นามผู้วิจัย นายจตุพร หนูสุค

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(รองศาสตราจารย์อภัสสร ชูเทศะ, Dr.rer.nat.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(อาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(อาจารย์ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ, ประ.ด.)

ประธานสาขาวิชา

.....
(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินและรูปแบบของซีรั่ม
โปรตีนในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

The Comparison Study of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin and Serum
Protein Patterns in Thai Ridgeback Dog and Thai Bangkaew Dog

โดย

นายจตุพร หนูสุด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จดุพร หนูสุด 2554: การศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของ
อีโมโกลบินและรูปแบบของซีรัมโปรตีนในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทย
บางแก้ว ปรินญาปรัชญาคุณฐิบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อภัสสร ชูเทศะ, Dr.rer.nat. 200 หน้า

อีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีฟิโนไทป์เดียว โดย
เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อนำสารละลายอีโมโกลบินของสุนัขที่ทำให้บริสุทธิ์
โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G-100 มาศึกษาโดยวิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส
พบสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีอีโมโกลบินฟิโนไทป์เพียงชนิดเดียว
ประกอบด้วย 2 แถบ วิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทย
หลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วประกอบด้วยพิกเดียว วิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลา
ไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบหน่วยย่อย 2 แถบของอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และ
สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว วิธีแมสสเปกโตรเมทรีพบน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์
ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วย 5 พิก วิธีรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี พบ
ลักษณะโครมาโทแกรมของอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว
ประกอบด้วยสองพิกเป็นสายเบต้าและสายอัลฟา ตามลำดับ วิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซ
ชัน แมสสเปกโตรเมทรี พบลำดับกรดอะมิโนของอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และ
สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วยสายอัลฟา 141 หน่วยและสายเบต้า 146 หน่วย ค่า pI ของ
อีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว อยู่ในช่วง 7.0-7.9 ค่าเม็ดเลียด
แคงอัดแน่นเฉลี่ยของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เท่ากับ 39.39 ± 1.23 และ
 36.38 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลัง
อานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เท่ากับ 13.75 ± 0.47 และ 13.10 ± 0.32 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ
รูปแบบซีรัมโปรตีนของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วย 6 แถบ
ของอัลบูมิน อัลฟา 1-กลอบูลิน อัลฟา 2-กลอบูลิน เบต้า 1-กลอบูลิน เบต้า 2-กลอบูลิน และแกมมา
กลอบูลินตามลำดับ

Jatuporn Noosud 2011: The Comparison Study of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin and Serum Protein Patterns in Thai Ridgeback Dog and Thai Bangkaew Dog. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Apassara Choothesa, Dr.rer.nat. 200 pages.

The hemoglobin phenotypes of Thai ridgeback dogs and Thai bangkaew dogs revealed one type (one band) by cellulose acetate electrophoresis. Native-PAGE of purified solution by sephadex G-100 column showed one two-banded phenotype for each species. By using gel filtration column chromatography, the isolated hemoglobins of Thai ridgeback dogs and Thai bangkaew dogs were consisted of a single peak. The denatured hemoglobins migrated into two distinct bands by SDS-PAGE both in Thai ridgeback dogs and Thai bangkaew dogs. Subsequently, the accurate molecular weights of Thai ridgeback dogs and Thai bangkaew dogs hemoglobins were composed of five peaks, which were determined by using MALDI-TOF mass spectrometry. The retention times from the reversed-phase high performance liquid chromatography showed the β -globin chain signal and followed by the α -globin chain signal both in Thai ridgeback dog and Thai bangkaew dog hemoglobins. The results of nano-electrospray ionization mass spectrometry revealed that α -chain and β -chain of hemoglobin molecules were composed of 141 amino acids and 146 amino acids, respectively both in Thai ridgeback dogs and Thai bangkaew dogs. The pI values of both Thai ridgeback dogs and Thai bangkaew dogs hemoglobins showed the ranges between 7.0-7.9. The mean hematocrit values were $39.39 \pm 1.23\%$ for Thai ridgeback dog and $36.38 \pm 0.77\%$ for Thai bangkaew dogs. The mean hemoglobin concentration values were 13.75 ± 0.47 g/dL for Thai ridgeback dogs and 13.10 ± 0.32 g/dL for Thai bangkaew dogs. Serum protein electrophoresis for Thai ridgeback dogs and Thai bangkaew dogs showed six bands by cellulose acetate electrophoresis. These serum protein bands were separated on the basis of their electrical charge as follow: albumin, α_1 -globulin, α_2 -globulin, β_1 -globulin, β_2 -globulin and γ -globulin, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. . อาภัสสร ชูเทศะ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก ที่ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ ในการตรวจ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆและให้กำลังใจสนับสนุนในการทำงานวิจัยด้วยความหวังดีตลอดมา ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล และอาจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ นอกจากนี้ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ แก้วโมกุล ประธานการสอบ และ ดร. สุวิช บุญโปร่ง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่กรุณาให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ในการสอบ วิทยานิพนธ์ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบพระคุณทุนโครงการพัฒนาอาจารย์ สาขาขาดแคลน (CRN) ประจำปี 2548 ที่จัดสรรทุนศึกษาต่อระดับปริญญาเอกภายในประเทศ และสถาบันวิจัยและพัฒนา แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนทุน บางส่วน ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้โอกาสในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ ตลอดจนสถานที่ในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้โอกาส ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้ แนวทางในการดำรง ชีวิต ด้วย จริยธรรมและจรรยาบรรณที่ดีงามเพื่อปฏิบัติและรับใช้สังคมได้อย่างมีความสุข ขอขอบพระคุณ บุคลากรภาควิชาเวชศาสตร์ คลินิกสัตว์เล็ก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุกท่าน ที่ทำงานหนักและ ช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดเวลาในช่วงที่ลาศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้มีพระคุณ ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ และญาติๆทุกคน ที่เป็นกำลังใจห่วงใยเสมอมาไม่เคยเปลี่ยนแปลงทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จตุพร หนูสุค

เมษายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	58
ผลและวิจารณ์	88
สรุปและข้อเสนอแนะ	175
สรุป	175
ข้อเสนอแนะ	177
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	178
ภาคผนวก	194
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	200

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โปรตีนระยะเฉียบพลัน (acute phase protein): ตัวบ่งชี้ของโรคที่เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammatory disease)	53
2	การจำแนกภาวะความผิดปกติของโปรตีนในกระแสเลือด (dysproteinemia) โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง A:G (A:G ratio) และรูปแบบซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิส	54
3	การเตรียมสารละลายฮีโมโกลบินตัวอย่าง	61
4	การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบิน	61
5	สูตรการเตรียมเจลวิธีเอนทิฟฟอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	67
6	สูตรการเตรียมเจลวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	73
7	การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน	87
8	ตารางแสดงค่าโลหิตวิทยาของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว	88
9	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว แบ่งตามวิธีการศึกษา	112
10	แสดงชนิดของโปรตีนแถบบนของน้ำหนักโมเลกุลหนอยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน ระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT	128
11	แสดงชนิดของโปรตีนแถบล่างของน้ำหนักโมเลกุลหนอยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน ระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT	137

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	แสดงชนิดของโปรตีนแถบบนของน้ำหนักรวมของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคไซโตเคมีคอล ลิวทอลิอะคริลามัลติเมอร์โพรตีนโดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนใน เซชัน ระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT	141
13	แสดงชนิดของโปรตีนแถบล่างของน้ำหนักรวมของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคไซโตเคมีคอล ลิวทอลิอะคริลามัลติเมอร์โพรตีนโดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ ไอออนในเซชัน ระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT	155
14	ตารางแสดงการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของซีรัมโปรตีนของสุนัข พันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว	168
ตารางผนวกที่		
1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน มาตรฐาน	195
2	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโปรตีน มาตรฐาน (BSA)	196
3	หลอดที่สารถูกชะออกมามากที่สุด ค่า Kd ค่า Log M.W. และค่าน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ผ่านเจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที	197
4	การเตรียมสารเคมีสำหรับการย่อยเจลด้วยทริปซิน	198

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การสร้างเม็ดเลือดแดง	8
2	การสร้างฮีโมโกลบิน	8
3	โครงสร้างของฮีโมโกลบิน	11
4	โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลฮีโมโกลบิน	12
5	โครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายอัลฟาสองสายและสายเบต้าสองสาย	14
6	สเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectra) ของฮีโมโกลบิน และส่วนผสมของ Hb/polymer/stabilizer ที่อิมัลชันด้วยอากาศที่มีออกซิเจนประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์	15
7	ขั้นตอนการพัฒนาของฮีโมโกลบินจนกระทั่งโตเต็มวัย	16
8	ฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ในระยะตัวอ่อน ระยะลูกอ่อน และระยะโตเต็มวัย	17
9	การเปลี่ยนโครงรูปของ ฮีโมโกลบิน จากโครง รูป แบบ T state ที่อยู่ในรูป คีออกซี ฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin form) ไปเป็น R state ที่อยู่ในรูป ออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin form) โดยมีการหมุนเคลื่อนที่ไปจากเดิมประมาณ 15 องศา	19
10	การเชื่อมโมเลกุลของฮีโมโกลบินแสดงความแตกต่าง 2 ชนิดในการเชื่อมของ $\alpha\beta$	20
11	กราฟของการอิมัลชันด้วยออกซิเจน (oxygen binding curve) ของฮีโมโกลบินและไมโอโกลบิน	23
12	กราฟแสดงการจับกันของออกซิเจนและฮีโมโกลบิน (HbO ₂ dissociation curve) การเปลี่ยนแปลงของกราฟไปทางขวาจากการเพิ่มความเข้มข้นของ H ⁺ (การลดลงของพีเอช) การเพิ่มขึ้นของ CO ₂ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ และการเพิ่มขึ้นของ 2,3-BPG	25

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	แสดงฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตต อิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 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	34
14	แสดงฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของปลานิล โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตต อิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที) เลนที่ 1 แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA2) ของคน เลนที่ 2-7 แสดงฮีโมไลเซตของปลานิล	35
15	แสดงฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของปลานิล โดยเทคนิคเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 12% T 4% C (200 โวลต์คงที่ 120 มิลลิแอมแปร์ 40 นาที) เลนที่ 1 แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA2) ของคน เลนที่ 2-7 แสดงฮีโมไลเซตของปลานิล	36
16	ค่า pI ของฮีโมโกลบินของปลานิล โดยวิธี IEF ด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป ขนาด 10 หลุม (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.) แอมโฟไลท์ พีเอช 3-10 เลนที่ 1 แสดง Broad Range IEF standard pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.) เลนที่ 2 แสดงฮีโมไลเซตของปลานิล เลนที่ 3 แสดงฮีโมโกลบินของปลานิลที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเดกซ์ G-100 และเลนที่ 4-5 แสดงฮีโมโกลบินของปลานิลที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ โดยใช้ DEAE-เซลลูโลส	37
17	แสดงผลน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลานิล โดยเทคนิคไซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 12% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 120 มิลลิแอมแปร์ เวลา 40 นาที) เลนที่ 1 แสดง low range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) และเลนที่ 2-8 แสดงฮีโมไลเซตของปลานิล	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	<p>แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักและกระป๋องแม่น้ำ โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 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 แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA2) ของคน (Helena Laboratories, France)</p>	39
19	<p>แสดงชนิดของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักโดยเทคนิคเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 12% T 4% C ที่พีเอช 8.3 (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมป์ต่อเจล 1 แผ่น 40 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ</p>	39
20	<p>แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสของคน (เลนที่ 1) ปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 4) และปลาดุก (เลนที่ 3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)</p>	40
21	<p>แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของปลาตะเพียน (เลนที่ 1 และ 3) และ ปลาดุก (เลนที่ 2 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่พีเอช 8.3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และเชื่อมด้วยโคแมสซึบลูอาร์-250</p>	41
22	<p>แสดงผลน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลาดุก (เลนที่ 2 และ 4) และปลาตะเพียน (เลนที่ 3 และ 5) และเลนที่ 1 แสดง broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 18% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมป์ต่อเจล 1 แผ่น เวลา 45 นาที)</p>	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	<p>แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินปลาควก โดยวิธี แมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมินิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วย ไนโตรเจนเลเซอร์</p>	43
24	<p>แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินปลาตะเพียน โดยวิธี แมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมินิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วย ไนโตรเจนเลเซอร์</p>	43
25	<p>แสดงค่า pI ของฮีโมโกลบินปลาควกและปลาตะเพียน โดยวิธีไอโซอิเล็ก ตริกโฟกัสซิง ด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) แอม ไพโลท์ พีเอช 3-10 เลนที่ 1 และ 3 แสดงฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนและ ปลาควก เลนที่ 2 และ 4 แสดงฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนและปลาควกที่ได้ จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชัน โครมาโทกราฟี และเลนที่ 5 แสดง broad range standard pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)</p>	44
26	<p>แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมโกลบินของคน (เลน ที่ 1) และสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (เลนที่ 2) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส บนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)</p>	94
27	<p>แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมโกลบินของคน (เลน ที่ 1) และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (เลนที่ 2) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส บนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)</p>	94

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	แสดงการเคลื่อนที่ของอีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (เล่นที่ 1 และ 2) และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (เล่นที่ 3 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (10% T 2.67% C ที่พีเอช 8.3) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซิบลูอาร์-250	99
29	แสดงผลการชะสารชนิดต่างๆ ของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและโปรตีนมาตรฐาน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที	102
30	แสดงผลการชะสารชนิดต่างๆ ของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วและโปรตีนมาตรฐาน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที	102
31	แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว จากกราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่างค่า K_d และ $\log M.W.$ ของโปรตีนมาตรฐาน	103
32	แสดงผลน้ำหนักโมเลกุลหยาบของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (เล่นที่ 1) และเล่นที่ 2 แสดง broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิค โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 15% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล 1 แผ่น)	105
33	แสดงผลน้ำหนักโมเลกุลหยาบของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (เล่นที่ 1) และเล่นที่ 2 แสดง broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิค โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 15% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล 1 แผ่น)	106

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
34	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ไซกรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงควายไนโตรเจนเลเซอร์	110
35	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ไซกรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงควายไนโตรเจนเลเซอร์	110
36	แสดงค่า pI ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) แอมโฟไลต์ พีเอช 3-10 เลนที่ 1 แสดง broad range standard pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) และ เลนที่ 2 และ 3 แสดงฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟีลเทรชันโครมาโทกราฟี เลนที่ 4 และ 5 แสดงฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟีลเทรชันโครมาโทกราฟี	114
37	แสดงโครมาโทแกรมของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี	117
38	แสดงโครมาโทแกรมของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี	117
39	แสดงโครมาโทแกรมแถบของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดคซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมทรี	123

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
40	แสดงโครมาโทแกรมแถบค่าของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดคซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอเล็กโตรโฟเรซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมทรี	124
41	แสดงโครมาโทแกรมแถบของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดคซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอเล็กโตรโฟเรซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมทรี	125
42	แสดงโครมาโทแกรมแถบค่าของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดคซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอเล็กโตรโฟเรซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมทรี	125
43	แสดงไดอะแกรมของแถบค่าของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน โดยโปรแกรม MASCOT	126
44	แสดงไดอะแกรมของแถบค่าของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยโปรแกรม MASCOT	126
45	แสดงการเปรียบเทียบสายลำดับ โปรตีนหลายสายพร้อมกัน (multiple alignment) โดยใช้ชุดโปรแกรม Clustal W จากลำดับกรดอะมิโนของสายอัลฟาเปรียบเทียบระหว่างคน (NP 000549) สุนัข (gi 122508 และ p 60529) สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว	162
46	แสดงการเปรียบเทียบสายลำดับ โปรตีนหลายสายพร้อมกัน (multiple alignment) โดยใช้ชุดโปรแกรม Clustal W จากลำดับกรดอะมิโนของสายเบต้าเปรียบเทียบระหว่างคน (NP 000509) สุนัข (gi 44887976 และ p 60524) สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว	163

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
47	แสดงการเคลื่อนที่ของซีรัมโปรตีนจากสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (เลนที่ 1, 3-8) และ คน (เลนที่ 2) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (180 โวลต์ 15 นาที)	165
48	แสดงการเคลื่อนที่ของซีรัมโปรตีนจากสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (เลนที่ 2-8) และคน (เลนที่ 1) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (180 โวลต์ 15 นาที)	166
49	แสดงอิเล็กโตรโฟรีโทแกรมของรูปแบบซีรัมโปรตีนสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน เมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน	167
50	แสดงอิเล็กโตรโฟรีโทแกรมของรูปแบบซีรัมโปรตีนสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน	167
ภาพผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน	195
2	กราฟโปรตีนมาตรฐานในการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายฮีโมโกลบินและซีรัม	196
3	กราฟแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที	197
4	รูปลักษณะสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน	199
5	รูปลักษณะสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว	199

การศึกษาเปรียบเทียบฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินและรูปแบบของ
ซีรัมโปรตีนในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

**The Comparison Study of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin
and Serum Protein Patterns in Thai Ridgeback Dog and Thai Bangkaew Dog**

คำนำ

สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานเป็นสุนัขไทยสายพันธุ์เดียวที่ผ่านการรับรองชั้นสูง ค่ายและจดทะเบียนไว้กับ สมาพันธ์สุนัขโลก (Federation Cynologique Internationale, FCI) เป็นลำดับที่ 338 ตามมาตรฐานฉบับล่าสุด เมื่อวันที่ 26 พฤษภาคม 2546 จัดอยู่ในกลุ่ม 5 สปีทซ์ และสุนัขล่าสัตว์พื้นเมือง ส่วนที่ 7 ยกเว้นการทดสอบใช้งาน และจดทะเบียนไว้กับสหพันธ์สุนัขแห่งเอเชีย เป็นลำดับที่ 329 เมื่อปี 2530 การเลี้ยงสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานเป็นที่นิยมแพร่หลายมากขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 เป็นต้นมา ซึ่งในปัจจุบันสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานได้รับการยอมรับว่าเป็นสุนัขที่ฉลาด ความจำดี มีไหวพริบว่องไว แข็งแรง มีความสามารถในการกระโดด มีความซื่อสัตย์ และจงรักภักดี เหมาะสำหรับเลี้ยงในครอบครัว จึงมีการพัฒนาสายพันธุ์ คัดเลือก และอนุรักษ์พันธุ์ให้ดียิ่งขึ้น การพัฒนาสายพันธุ์สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานให้มีลักษณะของอาน โครงสร้างของร่างกายสูงใหญ่ขึ้น มีขนสั้นเกรียนคล้ายกำมะหยี่ สามารถทำรายได้ให้กับผู้เพาะพันธุ์สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานเพื่อจำหน่ายได้เป็นอย่างดี ส่วนสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วได้รับการพัฒนาสายพันธุ์อย่างต่อเนื่องทำให้มีรูปร่างที่สวยงาม โครงสร้างใหญ่ ขนยาวกว่าในอดีต จึงเป็นที่นิยมเลี้ยงกันมาก แม้นิสัยค่อนข้างดุ แต่มีรูปร่างลักษณะและคุณสมบัติดี โดยมีข้อสันนิษฐานว่าสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเกิดจากสุนัขสามสายเลือด คือ สุนัขจิ้งจอก สุนัขป่า และสุนัขไทยพื้นบ้าน เมื่อมีการผสมข้ามพันธุ์กันตามธรรมชาติ และคัดเลือกพันธุ์จนมีลักษณะหลายสีเหมือนสุนัขบ้าน มีขนยาวปานกลาง ปากแหลม หางเป็นพวง เหมือนสุนัขป่า กะโหลกรูปสามเหลี่ยม ใบหูตั้งปลายแหลมป้องไปข้างหน้า มีขนยาวสองชั้นเหมือนสุนัขป่า นิสัยดุ รักถิ่นฐานเหมือนสุนัขบ้าน และกล้าหาญเหมือนสุนัขป่า ด้วยเหตุนี้เอง สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วจึงได้แพร่หลายออกไปทั่วประเทศ

กลุ่มของโปรตีนที่จับกับออกซิเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง คือ ฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีอยู่ในเม็ดเลือดแดง มีหน้าที่ สำคัญในการนำ ออกซิเจน และสาร

อาหารไปหล่อเลี้ยง เซลล์และเนื้อเยื่อตามอวัยวะ ต่างๆทั่วร่างกาย และนำผลผลิตจากเมแทบอลิซึม (metabolic end-products) เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และโปรตอน (proton, H^+) จากเนื้อเยื่อกลับสู่ปอดเพื่อขับออก โดยมีเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ลำเลียงฮีโมโกลบินซึ่งใช้ในการรับส่งออกซิเจนและทำหน้าที่หลักในการขนส่งออกซิเจนไปให้เซลล์ของเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะกล้ามเนื้อที่เป็นแหล่งที่มีการใช้พลังงานสูง นอกจากนี้ในกล้ามเนื้อจะมีไมโอโกลบินทำหน้าที่เป็นตัวเก็บออกซิเจน โดยทั้งฮีโมโกลบินและไมโอโกลบินเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการจับออกซิเจนโดยอาศัยหมู่ฮีมที่มีอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน หมู่ฮีมเป็นสารอินทรีย์ที่อยู่ตรงกลางของโมเลกุล ฮีโมโกลบินจึงมีความสำคัญต่อการทำงานของสรีรร่างกายของสัตว์ มีกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) โดยอาศัยการร่วมมือ (co-operativity) ระหว่างหน่วยย่อยในการจับกับออกซิเจนทำให้สามารถจับกับออกซิเจนได้สูงสุด (Jain *et al.*, 1986; Guyton and Hall, 2011) การทำงานของฮีโมโกลบินถูกควบคุมด้วยไอออน (ionic effectors) หลายชนิด เช่น แอนไอออนอินทรีย์ (inorganic anions) และ H^+ นอกจากนี้มีสารฟอสเฟตอินทรีย์ (organic phosphate) ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมความชอบต่อออกซิเจน (O_2 affinity) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ 2,3-บิสฟอสโฟกลีเซอเรต (2,3-bisphosphoglycerate, 2,3-BPG) ในนก ได้แก่ อินซิทอล เพนตะฟอสเฟต (inositol pentaphosphate) และในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ต่ำกว่า ได้แก่ ATP ในปลาบางชนิด นอกจาก ATP แล้ว GTP ยังมีผลควบคุมความชอบต่อออกซิเจนด้วย (Prisco *et al.*, 2000) คุณสมบัติของฮีโมโกลบินด้านความชอบต่อออกซิเจน พบว่าฮีโมโกลบินที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูงกว่าจะได้รับออกซิเจนจากสภาพแวดล้อมได้ง่ายกว่า แต่จะปล่อยออกซิเจนให้กับเซลล์ได้น้อยกว่า การที่ฮีโมโกลบินมีความชอบต่อออกซิเจนที่สูงนี้ เป็นกลไกที่ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนต่ำ (hypoxia) ได้ (Weber, 1982; Sauer and Harrington, 1988; Stryer, 1988)

นอกจากนี้รูปแบบซีรัมโปรตีนยังถูกใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงในทางชีวเคมีคลินิกการแพทย์ โดยใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบซีรัมโปรตีนในโรคต่างๆ ถึงแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเพียงเล็กน้อยในการพิจารณาวินิจฉัยโรคที่จำเพาะ แต่มีประโยชน์ในการพยากรณ์ความผิดปกติของโรค และการวินิจฉัยแยกโรค ความผิดปกติต่างๆของร่างกายร่วมกับใช้การตรวจอาการทางคลินิก และผลจากห้องปฏิบัติการอื่นๆประกอบการวินิจฉัยโรค

การศึกษาเปรียบเทียบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบิน และรูปแบบของซีรัมโปรตีนใน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับสายพันธุ์สุนัขพันธุ์ไทยหลัง อานและสุนัขพันธุ์

ไทยบางแก้ว รวมทั้งใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วต่อไป



วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินโดยวิธีไซยาโนเมทฮีโมโกลบิน (cyanomethemoglobin method) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว
2. เพื่อศึกษารูปแบบซีรัมโปรตีน โดยวิธีเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส (cellulose acetate electrophoresis) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว
3. เพื่อศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบิน โดยวิธีเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส (cellulose acetate electrophoresis) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว
4. เพื่อแยกฮีโมโกลบินให้บริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีเจลฟิวเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี (gel filtration column chromatography) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว
5. เพื่อศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบิน ที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีเนทีฟ พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (native-polyacrylamide gel electrophoresis, N-PAGE) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว
6. เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) แบบดิสคอนตินิวอัสเจล (discontinuous gel) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว
7. เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินและหน่วยย่อย โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

8. เพื่อหาค่าจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ของฮีโมโกลบิน โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing, IEF) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

9. เพื่อศึกษาชนิดของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี (reversed-phase high performance liquid chromatography, HPLC) และวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ของหน่วยย่อยของ ฮีโมโกลบิน ที่แยกได้ โดยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี (mass spectrometry) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

10. เพื่อศึกษากรดอะมิโนของสายกลอบินของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์จากวิธีโซเดียมไดซัลไฟด์เฟดพอลิอะคริลไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจลโดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโทรเมทรี (nano-electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS/MS) เปรียบเทียบระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

การตรวจเอกสาร

ลักษณะสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน

สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานได้จดทะเบียนไว้กับสมาพันธ์สุนัขโลกเป็นลำดับที่ 338 เป็นสุนัขที่ฉลาด ความจำดี ไหวพริบว่องไว แข็งแรง เพศผู้มีความสูงเฉลี่ยประมาณ 24-26 นิ้ว และน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 25-28 กิโลกรัม เพศเมียมีความสูงเฉลี่ยประมาณ 22-24 นิ้ว และน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 22-25 กิโลกรัม เอกลักษณะเด่น ตรงที่มีอานบริเวณหลังทำให้เห็นขนช่วงบนกระดูกสันหลังเรียงแผ่ออกด้านข้าง ขนชี้กลับไปทางหัว วนเป็นวงกลม ใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2.5 เซนติเมตร และค่อยๆ เรียวเล็กลง อานมีหลายรูปแบบ เช่น อานเข็ม อานธนูหรืออานลูกศร อานเทพพนมหรืออานพนม อานไบโพธิ์ อานพิณ อานไวโอลิน และอานโบว์ลิ่ง ลำตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม หัวเป็นรูปสามเหลี่ยมหรือรูปกลม หูอยู่ในตำแหน่งริมนอกของกะโหลกประมาณ 1 ใน 3 ตาเป็นรูปกลมรี จมูกได้สัดส่วนกับใบหน้า ออก กว้างและนูน ใหญ่สูงกว่าเส้นหลังหรือบนท้ายทำให้ เวลาเดินสง่างาม สันหลังเป็นเส้นตรง ขาใหญ่และแข็งแรง สะโพกมีกล้ามเนื้อสวยงามและแข็งแรง หางใหญ่เป็นลำแข็งแรง มีลักษณะเหมือนดาบ ปลายหางเรียว โกงงอเล็กน้อยและยาว สวมส่วนพอประมาณ สี่ที่นิยมเลี้ยงกัน คือ สีน้ำตาลแดง สีสวาดหรือ สีเทา สีดำ สีกลีบบัว และสีลายเสือ (วิจิต, 2540ก; สันต์, 2545)

ลักษณะสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

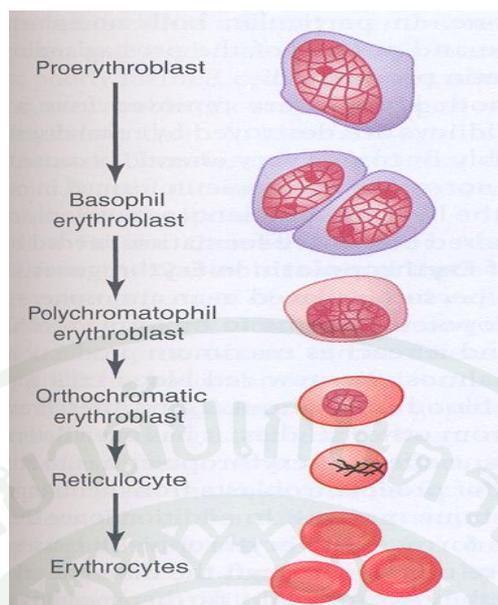
สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีลักษณะเด่นและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว มีขนปุยยาว มีความสง่างาม ว่องไวและแข็งแรง เพศผู้มีความสูงเฉลี่ยประมาณ 19-21 นิ้ว และน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 16-18 กิโลกรัม เพศเมียมีความสูงเฉลี่ยประมาณ 17-19 นิ้ว และน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 14-16 กิโลกรัม กะโหลกค่อนข้างใหญ่ได้สัดส่วนกับลำตัว หูและปาก ปากแหลม หูเป็นรูปสามเหลี่ยม ขนาดเล็ก ใบหูตั้งปลายแหลม ป้องไปข้างหน้า โคนหูห่างและปลายหูเบนเล็กน้อย ตาเล็กเป็นรูปสามเหลี่ยม จมูกสีดำได้สัดส่วนกับปาก ขาหน้าใหญ่กว่าขาหลัง หลังขามีขนยาวลักษณะเป็นแข็งสิงห์ ข้อมเท้าและนิ้วเท้าสั้นทำให้เท้ากลม ลำตัวหนาขนาดปานกลาง ช่วงหน้าใหญ่ ช่วงท้ายเล็ก ขนยาวมีสองชั้นหนา ชั้นในละเอียดอ่อนนุ่ม ชั้นนอกเส้นใหญ่และยาวปกคลุมบริเวณแผ่นหลัง โคนหางใหญ่ ขนหางยาวเป็นพวงเหมือนสุนัขจิ้งจอกหรือสุนัขป่า สี่ที่นิยมเลี้ยงมีหลายสี เช่น สีดำพื้นขาวสลับดำ สีดำพื้นขาวสลับสีน้ำตาล และสีดำล้วน (วิจิต, 2540ข; บัณฑิตย์, 2545; สันต์, 2545)

การสร้างเม็ดเลือดแดง (Genesis of Red Blood Cells)

เซลล์เม็ดเลือดแดงสร้างมาจาก เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด ที่มีศักยภาพหลายอย่าง ภายในไขกระดูก (pluripotential hematopoietic stem cell) โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้สร้างเม็ดเลือดแดงมาจาก colony forming unit-erythrocytes, (CFU-E) โดยอาศัยขบวนการอิริโทรพอยอิซิส (erythropoiesis) ที่ถูกควบคุมโดยระดับฮอร์โมนอิริโทรพอยิติน (erythropoietin, EPO) ในกระแสเลือด การสร้างเม็ดเลือดแดงเริ่มเกิดขึ้นที่ โปรอิริโทรบลาสต์ (proerythroblast) มีการแบ่งเซลล์หลายครั้งจนกระทั่งได้เม็ดเลือดแดงโตเต็มที่ (mature erythrocyte) โดยเซลล์ที่มีการแบ่งครั้งแรกเรียกว่า เบโซฟิล อิริโทรบลาสต์ (basophil erythroblast) ที่เรียกชื่อเช่นนี้เพราะสามารถย้อมติดสีประเภทต่างได้ (basic dye) เซลล์ในระยะนี้มีการสะสมของฮีโมโกลบินน้อยมาก และมีการพัฒนาต่อไปอย่างช้าๆ จาก โพลีโครมาโตฟิล อิริโทรบลาสต์ (polychromatophil erythroblast) ออร์โทโครมาติก อิริโทรบลาสต์ (orthochromatic erythroblast) ซึ่งระยะนี้เซลล์จะมีฮีโมโกลบินประมาณ 34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของนิวเคลียสเข้มข้นและมีขนาดเล็กลง จนถึงระยะเรติคูลไซต์ (reticulocyte) จะไม่มีนิวเคลียสและเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum) แต่มีส่วนของ สารเบโซฟิล เล็กน้อยที่ประกอบด้วย กอลจิ แอพพาราตัส (golgi apparatus) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และออร์แกนัลภายในไซโทพลาสซึมเพียงเล็กน้อย เมื่อเรติคูลไซต์เคลื่อนที่ออกจากไขกระดูกเข้าสู่ผนังหลอดเลือดฝอย (capillary) โดยวิธีการลอดผ่านช่องว่างของผนังหลอดเลือดฝอย (diapedesis) โดยปกติส่วนของสารเบโซฟิลในระยะเรติคูลไซต์จะหายไปภายใน 1-2 วัน ทำให้มีการพัฒนาไปเป็นเม็ดเลือดแดงโตเต็มที่ ซึ่งระบบไหลเวียนโลหิตจะสร้าง เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) ที่ใช้ในการลำเลียงฮีโมโกลบินเพื่อนำออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆทั่วร่างกาย ต่อไป (ภาพที่ 1) (Feldman *et al.*, 2000; Reed, 2009; Guyton and Hall, 2011)

การสร้างฮีโมโกลบิน (Formation of Hemoglobin)

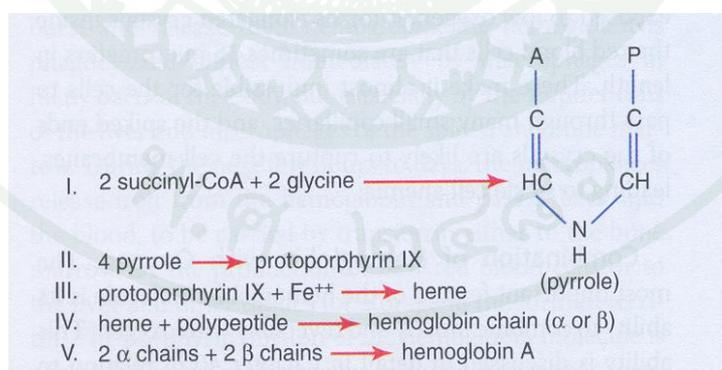
การสร้างฮีโมโกลบิน ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆทางเคมี ดังนี้ ในช่วงแรกซัคซินิลโคเอ (succinyl-CoA) ที่สร้างขึ้นในวัฏจักรเครบส์ (krebs cycle) จับกับไกลซีน (glycine) เป็น โมเลกุลไพร์รอล (pyrrole) (ภาพที่ 2) ซึ่งวงแหวนของไพร์รอล (pyrrole ring) 4 วง รวมกันเป็นโปรโตพอร์ไฟริน IX (protoporphyrin IX) จากนั้นจะเข้าจับกับ เหล็กหรือเฟอร์รัสไอออน (ferrous, Fe^{2+}) สร้างเป็น โมเลกุลฮีม (heme) ในช่วงท้ายโมเลกุลฮีมจับกับสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide chain) เรียกว่าสายกลอบิน (globin) โดยฮีมมีปัจจัยในการควบคุมการสร้างสายกลอบิน ซึ่งสังเคราะห์จากไรโบโซม (ribosome) และสร้างเป็นหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน เรียกว่าสายฮีโมโกลบิน (hemoglobin chain)



ภาพที่ 1 การสร้างเม็ดเลือดแดง

ที่มา: Guyton and Hall (2011)

การสร้างสายอัลฟาและสายเบต้ามีความสัมพันธ์กัน ถ้ามีการสร้างสายใดสายหนึ่งมากเกินไปจะมีการยับยั้งการสร้างสายนั้น ในขณะที่เดียวกันก็มีการกระตุ้น การสร้างอีกสายหนึ่ง (Feldman *et al.*, 2000; Guyton and Hall, 2011)



ภาพที่ 2 การสร้างฮีโมโกลบิน

ที่มา: Guyton and Hall (2011)

การทำลายเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบิน (Destruction of Red Blood Cells and Hemoglobin)

เม็ดเลือดแดงปกติในระบบไหลเวียนโลหิตมีอายุ (life span) เฉลี่ยประมาณ 140-145 วันในม้า 130 วันในวัว 120 วันในคน 100-115 วันในสุนัข 73 วันในแมว และ 43 วันในหนูไมค์ (mice) ซึ่งสปีชีส์ที่มีขนาดใหญ่จะมีอายุเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงยาวนานกว่าสปีชีส์ที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากสปีชีส์ที่มีขนาดเล็กจะมีอัตราการเมแทบอลิซึม (metabolism) และออกซิเดทีฟสเตรส (oxidative stress) ที่เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ สูงกว่าสปีชีส์ที่มีขนาดใหญ่ มีผลทำให้ช่วงชีวิตของเม็ดเลือดสั้นลงและมีอายุแก่ไวขึ้น เม็ดเลือดแดงโตเต็มที่ไม่มีนิวเคลียส เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม และไมโทคอนเดรีย จึงไม่มีเอนไซม์ในไซโทพลาสซึม ที่ใช้ในเมแทบอลิซึมของกลูโคสและสร้าง ATP ซึ่งเอนไซม์มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน เก็บเหล็กในรูปแบบเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) มากกว่าในรูปแบบเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) คงสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ในการขนส่ง ไอออน นอกจากนี้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงอาจเสื่อมจากการเสียดสีขณะที่อยู่ในระบบหมุนเวียนโลหิต จากเหตุผลดังกล่าวทำให้เม็ดเลือดแดงที่มีอายุมาก จึงแตกได้ง่าย (พิพัฒน์, 2536; Jain, 1993; Feldman *et al.*, 2000; Guyton and Hall, 2011)

การทำลายเม็ดเลือดแดงที่อายุมากส่วนใหญ่ถูกทำลายที่ม้ามใน ระบบเรติคูลเอนโดทีเลียล (reticuloendothelial system) การทำลายฮีโมโกลบิน เกิดขึ้นโดย กระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) อาศัย แมโครเฟจ (macrophages) จากส่วนต่างๆ ของร่างกายโดยเฉพาะ ม้าม ไช กระดูก และ ส่วนของคูปฟ์เฟอร์เซลล์ (kupffer cell) ในตับ ซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัด ฮีโมโกลบิน ในร่างกาย จากนั้น แมโครเฟจ จะมีการปล่อยเหล็กออกจากฮีโมโกลบินกลับไปยังเลือด โดยอาศัย ทรานส์เฟอร์ริน (transferrin) และกลับไปยังไขกระดูกเพื่อผลิตเม็ดเลือดแดงใหม่หรือเก็บสะสมในตับและเนื้อเยื่อในรูปแบบของเฟอร์ริทิน (ferritin) ส่วนพอร์ไฟริน (porphyrin) อาศัยแมโครเฟจ ในการเปลี่ยนเป็นบิลิเวอดิน (biliverdin) และเป็นบิลิรูบิน (bilirubin) เข้าสู่ตับ จากนั้นออกมากับ น้ำดี (bile) เข้าสู่ลำไส้ โดยที่ บางส่วน ถูกดูดซึม กลับเข้าสู่กระแสโลหิต และขับออกมากับปัสสาวะ ทางไต (พิพัฒน์, 2536; Feldman *et al.*, 2000; Guyton and Hall, 2011)

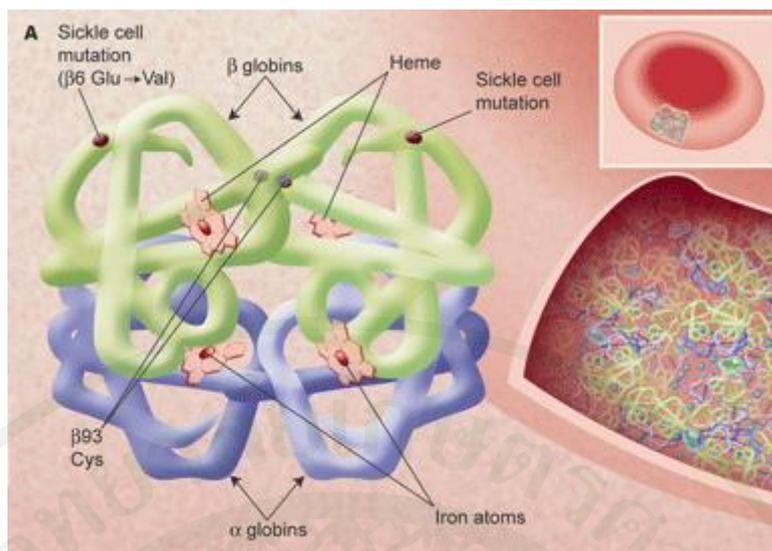
โครงสร้างของฮีโมโกลบิน (Structure of Hemoglobin)

การศึกษาโครงสร้างสามมิติ (three-dimension) ของฮีโมโกลบิน เริ่มขึ้นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1959 โดยมี Max Perutz นักชีวโมเลกุลชาวออสเตรีย เป็นผู้ริเริ่ม ในการศึกษาโครงสร้างระดับอะตอมโดยใช้เทคนิค การวิเคราะห์หลักขณะของอะตอมและ ประสบความสำเร็จในการศึกษาโครง

สร้างปฐมภูมิของฮีโมโกลบินคน ที่มีลำดับกรดอะมิโนในสายอัลฟาและสายเบต้ามีความเหมือนกันถึง 60.4 เปอร์เซ็นต์ และในปี ค.ศ. 1960 John Kendrew ประสบความสำเร็จในการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของฮีโมโกลบิน (Perutz *et al.*, 1960; Perutz, 1986) ดังนั้นเพื่อเป็นเกียรติในการศึกษาโครงสร้างโปรตีนชนิดกลอบูลาร์ในครั้งนั้นทำให้ Max Perutz และ John Kendrew ได้รับรางวัลโนเบล (nobel prize) สาขาเคมีในปี ค.ศ. 1962 (Guyton and Hall, 1996) การศึกษาโมเลกุลของฮีโมโกลบินโดยใช้รังสีเอกซ์ พบว่ามีลักษณะเป็นรูปทรงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 นาโนเมตร โครงสร้างจตุรภูมิ ของฮีโมโกลบินอาจจะเป็น วิวัฒนาการมาจากฮีโมโกลบิน โดยการรวมกลุ่มฮีโมโกลบิน 4 กลุ่มเข้าเป็นฮีโมโกลบิน 1 หน่วย (เลียงชัย, 2536; สมปอง, 2550; Guyton and Hall, 1996)

ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีน ที่สำคัญในเม็ดเลือดแดง ชนิดกลอบูลาร์ (globular protein) ขนาดประมาณ $65 \times 55 \times 50 \text{ \AA}$ พบว่าในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์จะมีฮีโมโกลบินประมาณ 400 ล้านโมเลกุลซึ่งคิดเป็นร้อยละ 95 ของน้ำหนักแห้งเม็ดเลือดแดง (Jain *et al.*, 1986; Voet and Voet, 2004) ฮีโมโกลบินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วยสาย พอลิเปปไทด์ 4 สาย ที่มี 4 หน่วยย่อย (tetrameric protein) ซึ่งจะมีสายของอัลฟา (α -chain) 2 สาย และไม่ใช่สายอัลฟา (β , δ และ γ -chain) 2 สาย (ภาพที่ 3) แต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน จับกันด้วยแรงดึงดูดแบบอ่อนที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ได้แก่ แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic force) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงระหว่างประจุ (electrostatic force) และแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลประกอบด้วยสาย พอลิเปปไทด์ ที่เรียกว่าสายกลอบิน ม้วนตัวหุ้มสี่กลุ่มของโมเลกุลของฮีม ซึ่งมีเหล็ก (ferrous, Fe^{2+}) 1 อะตอมอยู่ตรงกลาง มีลักษณะเป็นรูปทรงสี่หน้า (tetrahedron) (สมปอง, 2550; ปริยานันท์ และคณะ, 2553; Jain *et al.*, 1986; Ritter, 1996; Feldman *et al.*, 2000; Guyton and Hall, 2011)

ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลประกอบด้วยฮีม 4 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลของฮีมจับกันเป็นหมู่โปรสเทติก (prosthetic group) กับแต่ละสายของสายพอลิเปปไทด์ หมู่โปรสเทติกในฮีโมโกลบินคือ หมู่ฮีมที่ประกอบด้วยส่วนอะตอมของเหล็กในรูปเฟอร์รัสไอออน (ferrous, Fe^{2+}) อยู่กลางอะตอม และสารอินทรีย์โปรโตพอร์ไฟริน ประกอบด้วยหมู่ไพร์รอล 4 หมู่ ที่เชื่อมต่อกันด้วยสะพานเมธีน (methene bridge) เกิดเป็นทอระไพร์รอล (tetrapyrrol) ในโมเลกุลประกอบด้วยโซ่ข้างเป็นหมู่เมทิล (methyl group) 4 หมู่ หมู่ไวนิล (vinyl group) 2 หมู่และหมู่โพรปิโอเนต (propionate group) 2 หมู่ (ภาพที่ 4) (อภัสสรา, 2551; Horton *et al.*, 2002)

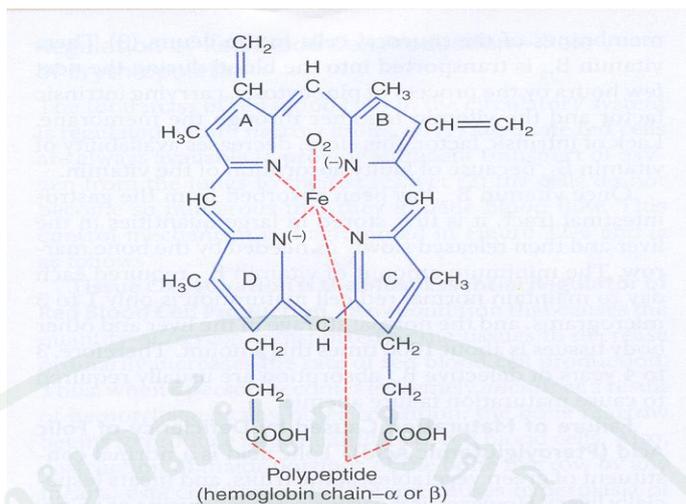


ภาพที่ 3 โครงสร้างของฮีโมโกลบิน

ที่มา: Schechter (2008)

ไนโตรเจนอะตอมทั้ง 4 ที่บริเวณศูนย์กลางของวงแหวนโปรโตพอร์ไฟริลกับอะตอมของเหล็กในฮีโมโกลบิน โดยที่ อะตอมของเหล็กสามารถสร้างพันธะได้ 6 พันธะ กับอะตอมอื่นๆ 4 พันธะกับไนโตรเจนอะตอมที่อยู่ในระนาบเดียวกับหมู่ฮีม พันธะที่ 5 และ 6 ตั้งฉากกับระนาบของฮีม ซึ่งพันธะที่ 5 หรือตำแหน่งโคออร์ดิเนชัน (coordination position) ที่ 5 จะจับกับไนโตรเจนอะตอมของกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine) ของโปรตีนที่เรียกว่า ฮิสทีดีน F8 (His F8) หรือพริกซึมอลฮิสทีดีน (proximal histidine) ส่วนพันธะที่ 6 หรือ ตำแหน่งโคออร์ดิเนชันที่ 6 จับกับโมเลกุลของออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าสารโมเลกุลเล็ก เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S) สามารถสร้างพันธะที่ 6 ของ Fe²⁺ ได้ ทำให้ทั้งฮีโมโกลบินและไมโอโกลบินมีความชอบต่อสารโมเลกุลเล็กๆเหล่านี้สูงกว่าออกซิเจน (อากัสตรา, 2551; Horton *et al.*, 2002)

ฮีโมโกลบินเป็นฮีโมโปรตีน (hemoprotein) มี 4 หน่วยย่อย (tetrameric protein) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 สาย โดยฮีโมโกลบินของคน 1 โมเลกุลประกอบด้วยอัลฟา 2 สาย และ สายเบต้า 2 สาย ($\alpha_2\beta_2$) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 64,000 ดาลตัน มีโครงสร้างเป็นรูปทรงกลม (spherical structure) แต่ละสายของพอลิเปปไทด์จับอยู่กับหมู่ฮีม 1 หน่วย เกาะภายในโมเลกุลบริเวณที่ไม่มีขั้ว (non-polar residues) สูง เหล็กของฮีมเชื่อมที่สองตำแหน่งกับอะตอมไนโตรเจนของหน่วยอิมิดาโซลของกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine imidazole nitrogen atom) ของสายพอลิเปป



ภาพที่ 4 โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลฮีโมโกลบิน

ที่มา: Guyton and Hall (2011)

ไทด์ เมื่อเอาฮีโมโกลบินออกจากฮีโมโกลบิน ความเสถียรของโมเลกุลฮีโมโกลบินจะลดลง ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมมีผลทำให้โมเลกุลฮีโมโกลบินแยกออกจากกันอย่างรวดเร็วเป็น 2 หน่วยย่อย (dimers) น้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินประมาณ 16,000 ดาลตัน โดยที่สายกลอบินมีจำนวนกรดอะมิโนในสายอัลฟา 141 หน่วย ส่วนสายเบต้า แกมมา และเดลต้า มี 146 หน่วย ซึ่งฮีโมโกลบินของสัตว์แต่ละชนิดมีความหลากหลายแตกต่างกัน (Sripanitan, 1983; Jain *et al.*, 1986; Voet and Voet, 2004; Guyton and Hall, 2011)

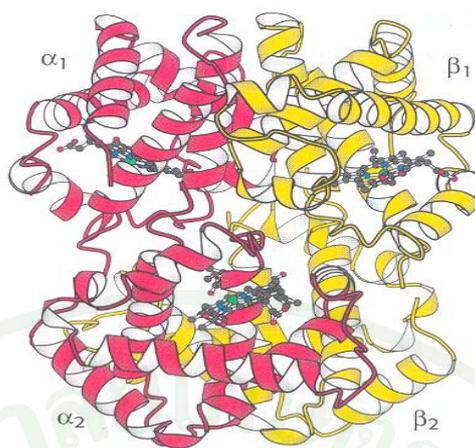
โครงสร้างปฐมภูมิ ของฮีโมโกลบิน มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรง (linear polymer) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) สายพอลิเมอร์นี้สามารถหมุนได้อิสระ จึงเกิดส่วนที่เป็นเกลียว (helical segment) และส่วนที่ไม่เป็นเกลียว (non-helical segment) กลายเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) (Sripanitan, 1983; Rodak *et al.*, 2007)

โครงสร้างทุติยภูมิของฮีโมโกลบินสามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และพบว่ามีส่วนที่เป็นเกลียวเฮลิคซ์ (helix) 80 เปอร์เซ็นต์ โดยสายเบต้ามี 8 เกลียวเฮลิคซ์ ได้แก่ A B C D E F G และ H ส่วนสายอัลฟามี 7 เกลียวเฮลิคซ์ ไม่มีเกลียวเฮลิคซ์ D โดยนับจากปลาย N (N-terminus) ไปยังปลาย C (C-terminus) ส่วนที่ไม่เป็นเกลียวเฮลิคซ์มี 20 เปอร์เซ็นต์ เช่น NA AB และ BC เป็นต้น (Sripanitan, 1983; Rodak *et al.*, 2007; Schechter, 2008)

โครงสร้างตติยภูมิ ของฮีโมโกลบินมีลักษณะการม้วนตัวของโครงสร้างทุติยภูมิ โดยหันส่วนมีขั้ว (polar side chain) สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำบริเวณผิวด้านนอก มีหมู่อิมอยู่ด้านในมีลักษณะแบบกระเป๋า (pocket) ซึ่งเชื่อมกับสายกลอบินส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic side chain) อะตอมของ Fe^{2+} ในฮีโมมีการสร้างพันธะโคเวเลนต์กับกรดอะมิโนฮิสทีดีน F8 (histidine F8) หรือกรดอะมิโนฮิสทีดีน ด้านใกล้ (proximal histidine) ที่ตำแหน่ง His 87 ของสายอัลฟาและตำแหน่ง His 92 ของสายเบต้าและยังมีตำแหน่งลิแกนด์ (ligand) ที่สำคัญคือ กรดอะมิโนฮิสทีดีน E7 (histidine E7) หรือกรดอะมิโนฮิสทีดีน ด้านไกล (distal histidine) ที่ตำแหน่ง His 58 ของสายอัลฟา และตำแหน่ง His 63 ของสายเบต้า ซึ่งเป็นตำแหน่ง ของกรดอะมิโนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งมีความสำคัญต่อการ จับกับออกซิเจน เมื่อเหล็กหรือเฟอร์รัสไอออนในหมู่อิมแต่ละหมู่อิมจับกับออกซิเจนแล้ว แต่ละสาย พอลิเปปไทด์ ของฮีโมโกลบินอยู่ในโครงสร้างตติยภูมิเช่นเดียวกับไมโอโกลบิน (อาภัสสร, 2551; ปรียานันท์ และคณะ, 2553; Boonyarat, 1977; Sripanitan, 1983; Rodak *et al.*, 2007)

โครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบิน ในคนอยู่ในรูปเตตระเมอร์ ที่มี 4 หน่วยย่อย ประกอบด้วย 4 สายพอลิเปปไทด์ และ 4 หมู่อิมซึ่งเป็นหมู่พอสเทติกที่มี เหล็กหรือเฟอร์รัสไอออนเป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 5) ซึ่งภายในโมเลกุลของฮีโมโกลบินมีการเชื่อมกัน 2 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบที่ 1 เป็นการเชื่อมระหว่างสายที่คล้ายกัน ได้แก่ $\alpha_1\alpha_2$ และ $\beta_1\beta_2$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการเชื่อมกันระหว่างหมู่อิม (heme-heme interaction) บอร์เอฟเฟกต์ (Bohr effect) และการขนส่งคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 carriage) (อาภัสสร, 2551; Sripanitan, 1983; Voet and Voet, 2004) และรูปแบบที่ 2 เป็นการเชื่อมกันระหว่างสายต่างกัน ได้แก่ $\alpha_1\beta_1$ หรือ $\alpha_2\beta_2$ ที่เกี่ยวข้องกับส่วนเกลียว B G H และส่วนมุม GH และ $\alpha_1\beta_2$ หรือ $\alpha_2\beta_1$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับเกลียว หลัค C G และส่วนมุม FG (Shikawa and Matsuoka, 2003) พบพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในโครงสร้างนี้ ที่เกิดขึ้นจากหมู่อิมไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine-SH group) ในสายฮีโมโกลบิน (Ritter, 1996) สายอัลฟาและสายเบต้าทั้งสองสายมาอยู่รวมกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ โดยแต่ละโซ่จับกับหมู่อิมซึ่งมีระยะห่างประมาณ 2.5 นาโนเมตร โมเลกุลออกซิเจนจับกับตำแหน่งโคออร์ดิเนชัน (coordination position) ที่ 6 ของอะตอม Fe^{2+} ในหมู่อิมแต่ละหมู่ (อาภัสสร, 2551; Voet and Voet, 2004)

การศึกษาการจับของหมู่อิมมีประโยชน์ต่อการศึกษา คุณสมบัติของหมู่อิมที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นในสายของ ฮีโมโกลบิน เหล็กที่อยู่ในรูป เฟอร์รัสของอิมในโปรตีนไซโตโครมจะทำให้เกิดออกซิเดชัน (oxidation) ในขณะที่มีออกซิเจน ทำให้เหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) กลายเป็นเหล็กในรูปเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ในสายโปรตีนของฮีโมโกลบิน ออกซิเจนจะถูกจับกับเหล็กแล้วทำให้อยู่



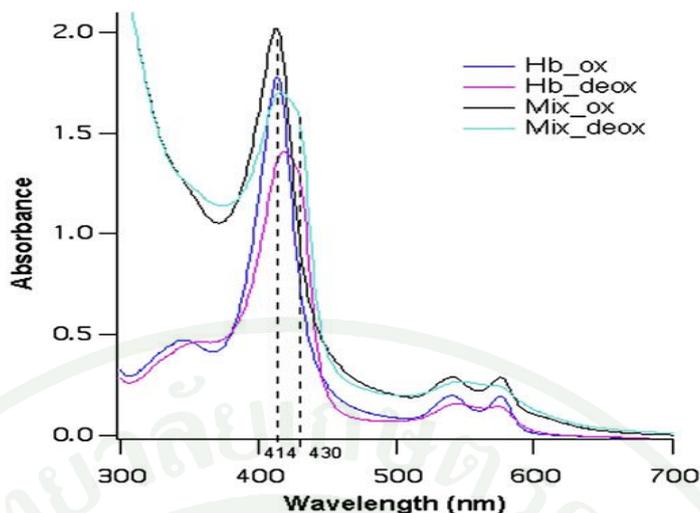
ภาพที่ 5 โครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายอัลฟาสองสายและสายเบต้าสองสาย

ที่มา: Berg *et al.* (2002)

ในรูปเหล็กเฟอร์รัส (สมปอง, 2550; Whitford, 2005) ฮีโมโกลบินมีสีแดง จากคุณสมบัติของหมู่ฮีม ทำให้ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร โดยอิทธิพลของหมู่โปรโตพอร์ไฟรินจับกับเหล็ก เหล็กจับกับออกซิเจนแบบหกหน้า (six coordination) ทำให้มีการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน (Piras *et al.*, 2008) (ภาพที่ 6) อะตอมของเหล็กในโมเลกุลของฮีมสามารถอยู่ใน รูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) หรือรูปเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ได้ เมื่ออยู่ใน รูปเฟอร์รัส เรียกว่า เฟอร์โรฮีโมโกลบิน (ferrohemoglobin) ถ้ารูปเฟอร์รัส ถูกออกซิไดส์ให้อยู่ใน รูปเฟอร์ริก เรียกว่า เมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) หรือเฟอร์ริฮีโมโกลบิน (ferrihemoglobin) ซึ่งไม่สามารถจับกับออกซิเจนได้ แต่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำ โดยปกติทั่วไปมีปริมาณเหล็กในรูปเฟอร์ริกในเลือดไม่มากนัก จึงมีผลลดจำนวนออกซิเจนที่จับกับฮีโมโกลบินเพียงเล็กน้อย ในเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์เมทฮีโมโกลบินรีดักเตส (methemoglobin reductase) ที่สามารถเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินปริมาณน้อยกลับเป็นเฟอร์โรฮีโมโกลบินได้ แต่ถ้ามีเมทฮีโมโกลบิน ปริมาณ มากในเลือดจะทำให้ผิวหนังมีสีเขียวคล้ำ (cyanosis) (พิพัฒน์, 2536; สมปอง, 2550; อภัสสร, 2551; Whitford, 2005; Piras *et al.*, 2008)

ฮีโมโกลบินฟีนไทป์

กลอบินเป็นโปรตีนในฮีโมโกลบิน ในคนพบมีความแตกต่างกัน 2 ชนิด ขึ้นอยู่กับระยะเวลา



ภาพที่ 6 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectra) ของฮีโมโกลบิน (Hb) และส่วนผสมของ Hb/polymer/stabilizer ที่อิมมัลชันด้วยอากาศที่มีออกซิเจนประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ (เส้นสีดำ; Mix_ox) deoxygenated บางส่วนภายใต้ไนโตรเจน (เส้นสีฟ้า; Mix_deox) Hboxygenated (เส้นสีน้ำเงิน; Hb_ox) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 414 นาโนเมตร Hb-deoxygenated (เส้นสีชมพู; Hb_deox) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 430 นาโนเมตร

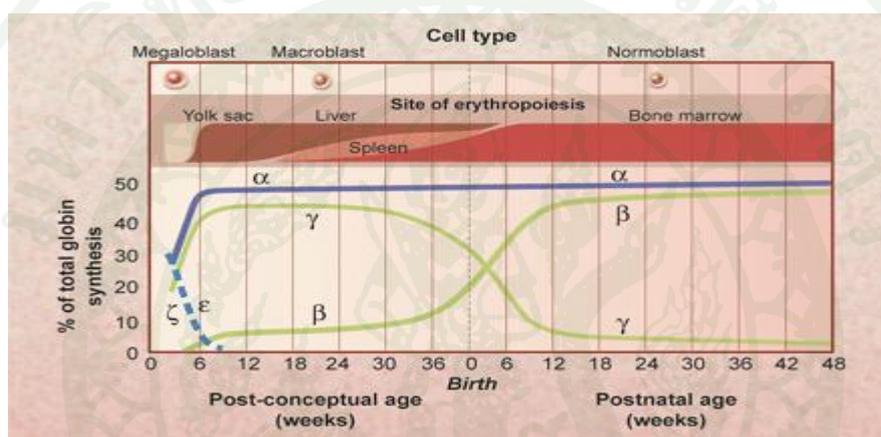
ที่มา: Piras *et al.* (2008)

เจริญเติบโต ได้แก่ สายเหมือนอัลฟา (α -like chain) รูปแบบการแสดงออกของยีน อัลฟาโกลบิน (α -globin) อยู่บนโครโมโซมคู่ 16 เช่น อัลฟา (α) และ ซีต้า (ζ) สายเหมือนเบต้า (β -like chain) รูปแบบการแสดงออกของยีน เบต้าโกลบิน (β -globin) อยู่บนโครโมโซมคู่ 11 เช่น เบต้า (β) แกมมา (γ) เดลต้า (δ) และเอพซิลอน (ϵ) การสร้างสายอัลฟาครั้งที่ยี่สิบในระยะเวลาแรกของการพัฒนาเป็นตัวอ่อน ส่วนสายที่ไม่ใช่สายอัลฟา มีความแตกต่าง กันขึ้นอยู่กับการสร้างและจำนวน ความแตกต่างของชนิดของ ฮีโมโกลบิน ในช่วงการพัฒนาและในช่วงโตเต็มวัย (Feldman *et al.*, 2000; Boron and Boulpaep, 2003; Rodak *et al.*, 2007; Schechter, 2008)

ฮีโมโกลบินฟิโนไทป์หลักในเม็ดเลือดแดงในระยะโตเต็มวัยของคนปกติ พบ 3 ชนิด ได้แก่ Hb A ($\alpha_2\beta_2$) ประมาณ 97 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย สายอัลฟา 2 สาย และสายเบต้า 2 สาย มีน้ำหนักโมเลกุล 64,458 ดาลตัน Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยสายอัลฟา 2 สาย และสายเดลต้า 2 สาย และ Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยสายอัลฟา 2 สาย

และสายแกมมา 2 สาย (Bunn, 1993; Jain, 1993, Feldman *et al.*, 2000; Boron and Boulpaep, 2003; Rodak *et al.*, 2007)

หลังจากการแยกวิวัฒนาการของ 2 สายกลอบิน มีการเปลี่ยนแปลง ที่ซับซ้อนขึ้นทำให้เกิด ยีนจำนวนมาก (multiple gene) และยีนที่ไม่แสดงออก (nonexpressed pseudogene) ในจีโนมคน ทำให้รูปแบบ การแสดงออกของยีนเหล่านี้เลื่อนจากตำแหน่ง 5' และ 3' ในสายดีเอ็นเอในช่วง ระหว่าง ระยะตัวอ่อน (embryonic state) และระยะลูกอ่อน (fetal state) โดยมีลำดับ ขั้นตอนการ พัฒนาจนกระทั่งโตเต็มวัย (adult development stage) (Schechter, 2008) (ภาพที่ 7)



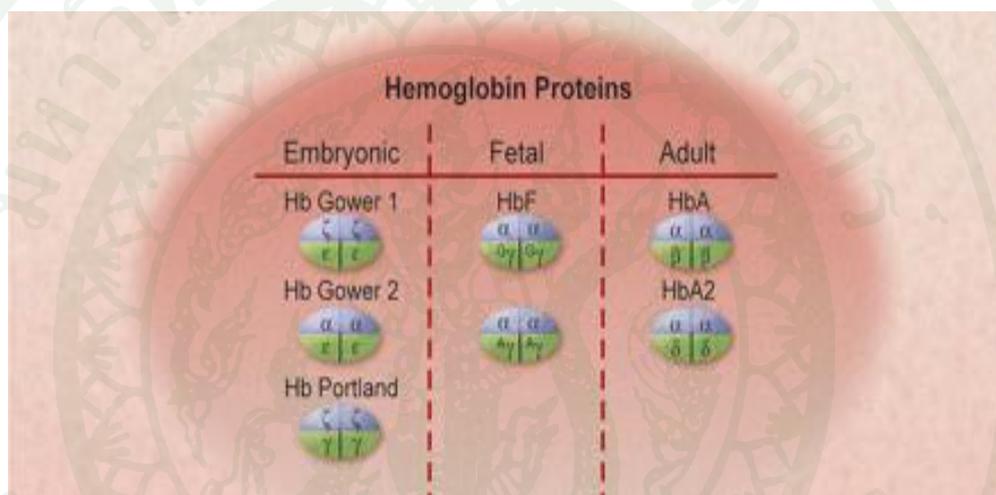
ภาพที่ 7 ขั้นตอนการพัฒนาของฮีโมโกลบินจนกระทั่งโตเต็มวัย

ที่มา: Schechter (2008)

ฮีโมโกลบิน ในระยะตัวอ่อน มีฮีน ซีต้าและฮีนเอฟซิลอน แสดงออกครั้งแรกในถุงไข่แดง (yolk sac) ข้างหลอดเลือดแดงใหญ่ (para-aortic region) และตับ ทำให้เกิดโครงสร้างของ ฮีโมโกลบิน 3 ชนิด คือ Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$) Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) และ Hb portland ($\zeta_2\gamma_2$) โดยที่ Hb Gower 1 สร้างขึ้นครั้งแรก ต่อมามีการพัฒนาสร้าง สายอัลฟา ทำให้พบฮีโมโกลบิน ชนิด Hb Gower 2 และเมื่อใกล้เข้าสู่ระยะลูกอ่อน มีการสร้างสายแกมมา ทำให้พบฮีโมโกลบิน ชนิด portland ช่วงระยะ 3 เดือนแรกของการเจริญเติบโตสามารถตรวจ พบฮีโมโกลบินทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ (Sripanitan, 1983; Bunn, 1993; Jain, 1993; Rodak *et al.*, 2007; Schechter, 2008)

การสร้างฮีโมโกลบินในระหว่างที่ตัวอ่อนอยู่ในช่วงอ้อมท้องจนกระทั่งโตเต็มวัย มีการพัฒนา เปลี่ยนแปลงในระยะตัวอ่อน 2 สายซีต้า (ζ chain) ที่สร้างขึ้นจะไปรวมกับ 2 สายเอฟซิลอน (ϵ chain)

ทำให้ฮีโมโกลบินอยู่ในรูป $\zeta_2\varepsilon_2$ ขณะเดียวกัน 2 สายเอพซิดอนที่ถูกสร้างชิ้นส่วนใหญ่จะไปรวมกับ 2 สายอัลฟา ทำให้ฮีโมโกลบินอยู่ในรูป $\alpha_2\varepsilon_2$ จากนั้นเมื่อตัวอ่อนเจริญไปเป็นลูกอ่อน มีการสร้าง 2 สายแกมมาแทน 2 สายเอพซิดอน ($^G\gamma$ chain และ $^A\gamma$ chain) ซึ่ง 2 สายแกมมานี้มีหน้าที่เหมือนกัน แต่ต่างกันที่ตำแหน่งที่ 136 เป็นไกลซีน (glycine) และอะลานีน (alanine) ซึ่งจะไปรวมกับ 2 สายอัลฟา ทำให้ฮีโมโกลบินอยู่ในรูป $\alpha_2\gamma_2$ (Hb F) พบมากในช่วงระยะกลางของการตั้งครรภ์และมีความชอบต่อออกซิเจนสูง ขณะเดียวกัน 2 สายเบต้าจะถูกสร้างเพิ่มขึ้นและไปรวมกับ 2 สายอัลฟา จึงทำให้ฮีโมโกลบิน อยู่ในรูป $\alpha_2\beta_2$ (Hb A) ไปจนกระทั่งโตเต็มวัย (ภาพที่ 8) (Boonyarat, 1977; Sripanitan, 1983; Bunn, 1993; Rodak *et al.*, 2007; Schechter, 2008)



ภาพที่ 8 ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ในระยะตัวอ่อน ระยะลูกอ่อน และระยะโตเต็มวัย

ที่มา: Schechter (2008)

ระยะลูกอ่อนในสัตว์ที่มี Hb F พบในสัตว์เคี้ยวเอื้อง จะมีการ ผสมของ Hb F และ adult Hb ในระยะแรกเกิด ต่อมา Hb F จะถูกแทนที่ด้วย Hb A ในช่วงเดือนแรกหลังเกิด ส่วนระยะลูกอ่อนในสัตว์ที่ไม่มี Hb F พบในแมว สุนัข ม้า และหมู พบว่า Hb E ถูกแทนที่ด้วย Hb A (Feldman *et al.*, 2000)

ในคนมีรายงานความผิดปกติของฮีโมโกลบิน มากกว่า 150 ชนิด ซึ่งเกิดจากความผิดปกติในโครงสร้างของสายกลอบินที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโน เช่น Hb S ที่พบในโรคเม็ดเลือดแดงรูปเคียว (sickle cell anemia) เกิดจากมีการแทนที่ (point mutation) ของกรดอะมิโน กรดกลูตามิก

(glutamic acid) ด้วยกรดอะมิโน วาลีน (valine) ที่ตำแหน่งที่ 6 ของสายเบต้า นอกจากนี้ พบความผิดปกติในอัตราการสร้างของสายอัลฟาและสายเบต้าไม่สมดุลกันที่พบในโรคทาลัสซีเมีย (thalassemia) ทำให้เกิดการสร้างสายกลอบินทั้งสองสาย มากเกินไปมีผลทำให้เกิดการตกตะกอนของสายกลอบินและมีการทำลายเม็ดเลือดแดงตามมา (Feldman *et al.*, 2000)

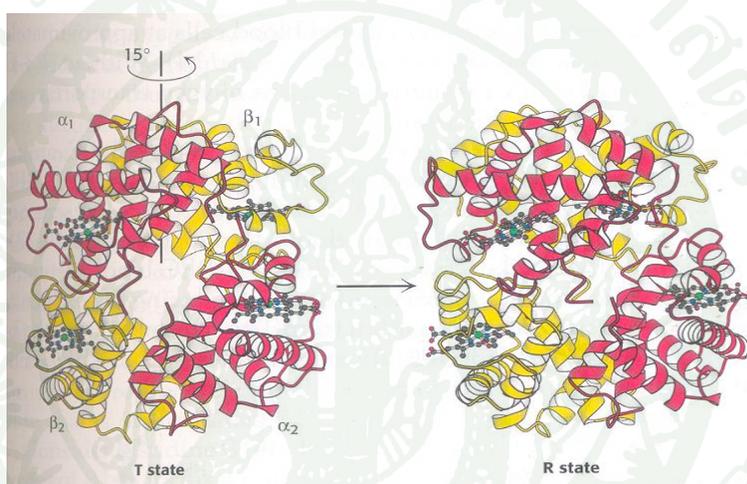
ฮีโมโกลบินฟีนไทป์มี 2 ชนิดหรือมากกว่าที่เกิดขึ้นเป็นปกติในสัตว์เลี้ยงหลายชนิด ซึ่งการเกิดความหลากหลายของฮีโมโกลบินในสัตว์เป็นผลมาจากพันธุกรรมและ เกี่ยวข้องกับการแทน ที่ของกรดอะมิโนในหลายตำแหน่ง แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในโครงสร้างของฮีโมโกลบิน ที่ทำให้เกิดความหลากหลายของฮีโมโกลบิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HbA_{1c} ที่เกิดจากขบวนการ ไกลโคซิเลชันของฮีโมโกลบิน โครงสร้างที่แตกต่างของฮีโมโกลบินในแมวมียลักษณะเฉพาะคือมีหมู่ไฮดรอกซิลที่เกิดปฏิกิริยา (reactive) ประมาณ 8-10 หมู่ ในขณะที่สัตว์ชนิดอื่นๆ มีหมู่ไฮดรอกซิลที่เกิดปฏิกิริยาประมาณ 2-4 หมู่ ในโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดออกซิเดชัน จึงทำให้แมวมักเกิด ไฮซัน บอดี้ (Heinz body) ได้ง่ายกว่าสัตว์ชนิดอื่นๆ (Feldman *et al.*, 2000)

ในแพะและแกะมีการสร้าง Hb C เป็นลักษณะเฉพาะ ที่ตอบสนองต่อภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง (severe anemia) มีผลทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนในเนื้อเยื่อ (anoxia) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนฮีโมโกลบิน (Hb switching) จาก Hb A เป็น Hb C ในแกะ และ Hb A และ Hb B เป็น Hb C ในแพะ ที่ควบคุมโดยอิทธิพลของยีน นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำให้ ความชอบต่อออกซิเจนของ Hb C ลดลงมากกว่าใน adult Hb ที่ปกติ (Feldman *et al.*, 2000)

กลไกการจับออกซิเจน (Mechanism of Oxygen-Binding Cooperativity)

กลไกการจับออกซิเจน เป็นความร่วมมือ (co-operativity) ระหว่างหน่วยย่อย ของฮีโมโกลบิน ในการจับกับออกซิเจน ตามแบบจำลองของ Max Perutz ฮีโมโกลบินจับกับโมเลกุลออกซิเจนได้ 4 โมเลกุล โมเลกุลของฮีโมทั้ง 4 โมเลกุลสามารถจับกับ ออกซิเจนได้ไม่พร้อมกัน เมื่อฮีโมโกลกุล แรกจับกับ ออกซิเจน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของฮีโมโกลบิน (conformation change) หมุนจากแกนเดิมไป 15 องศา ซึ่งส่งผลให้มีการสื่อสารสัญญาณไปยังหมู่อิมของโมโนเมอร์อื่นๆ (heme-heme interaction) ทำให้ฮีโมโกลกุล อื่นๆ มีความสามารถในการจับออกซิเจน ได้ดีขึ้นเป็นความร่วมมือแบบบวก (positive co-operativity) ซึ่งเป็นลักษณะการเพิ่มความชอบต่อออกซิเจน (Ritter, 1996; Horton *et al.*, 2002; Shikawa and Matsuoka, 2003; Whitford, 2005)

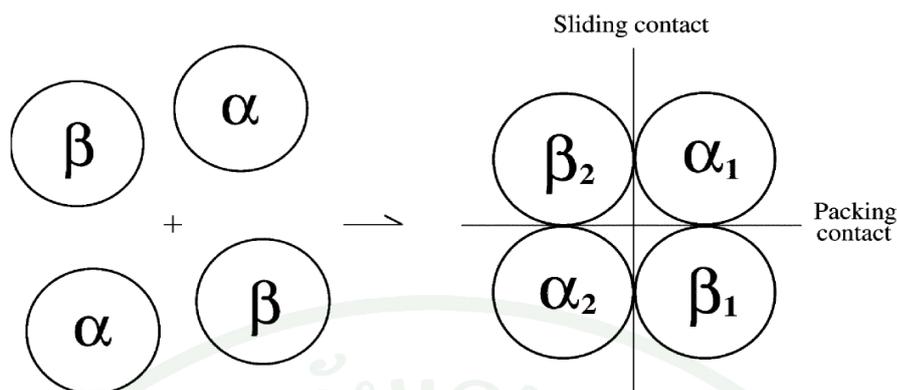
การเปลี่ยนโครงรูป (conformation) เกิดขึ้น เมื่อฮีโมโกลบินจับกับ ออกซิเจน ทำให้ รูป ดิโอออกซี ฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin form) เปลี่ยน ไปเป็น รูปออกซี ฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin form) โครงสร้างของฮีโมโกลบินจะมีการหมุน เคลื่อนที่ ไปจากเดิม ประมาณ 15 องศา และแปลเป็นต่างกันประมาณ 0.8 องศา เป็นผลจากการเชื่อมกัน ด้วยพันธะอ่อน (weak bond) ระหว่าง $\alpha_1\beta_2$ หรือ $\alpha_2\beta_1$ เรียกว่า sliding contacts ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความร่วมมือในการจับกับ ออกซิเจน โดยทำให้ช่องว่าง (gap) ระหว่างสายเบต้า ปรับให้เหมาะ ต่อการจับของ 2,3-บิสฟอสโฟกลีเซอเรต มีผลทำให้ฮีโมโกลบิน ลดความชอบต่อออกซิเจน ลง เรียกโครงรูปแบบนี้ว่า รูปแบบ R state (Relaxed state) (ภาพที่ 9) (Prisco *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2002; Shikawa and Matsuoka, 2003)



ภาพที่ 9 การเปลี่ยนโครงรูปของ ฮีโมโกลบิน จาก โครง รูปแบบ T state ที่อยู่ในรูป ดิโอออกซี ฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin form) ไปเป็น R state ที่อยู่ในรูปออกซี ฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin form) โดยมีการหมุนเคลื่อนที่ไปจากเดิมประมาณ 15 องศา

ที่มา: Berg *et al.* (2002)

นอกจากนี้การเชื่อมกันด้วยพันธะคงที่ (stable bond) ระหว่าง $\alpha_1\beta_1$ หรือ $\alpha_2\beta_2$ ที่เรียกว่า packing contacts ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 10) มีหน้าที่ในการควบคุมความคงตัว ต่อการจับกับออกซิเจน และยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน โดยเฉพาะกับ สายเบต้าที่มีค่าพีเอช เป็นกรด ทำให้เกิดการเติมออกซิเจนได้ยาก เรียกโครงรูปแบบนี้ว่า รูปแบบ T state (Tense state) (Prisco *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2002; Shikawa and Matsuoka, 2003)



ภาพที่ 10 การเชื่อมโมเลกุลของฮีโมโกลบินแสดงความแตกต่าง 2 ชนิดในการเชื่อมของ $\alpha\beta$

ที่มา: Shikawa and Matsuoka (2003)

ฮีโมโกลบินมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ โครงสร้างแบบ R state ไม่มี salt bridge อยู่ในสภาพคลาย เป็นโครงสร้างที่จับกับออกซิเจนหรือออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin) จึงเป็นกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูง (high oxygen affinity) และโครงสร้างแบบ Tense state มี salt bridge จำนวนมากยึดโครงสร้างไว้อยู่ในสภาพเครียดซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ได้จับกับ ออกซิเจน หรือ ดิโอออกซีฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin) จึงเป็นกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ (low oxygen affinity) โดยที่ CO_2 , H^+ และ Cl^- มีผลลดความชอบต่อออกซิเจนโดยทำให้เกิด salt bridge ที่แข็งแรง T state มีความเสถียรมากกว่า R state เนื่องจากมี ionic salt bridge จำนวนมากที่ $\alpha_1\beta_2$ ในสภาพปกติตามธรรมชาติทั้งสองรูปแบบนี้จะอยู่ในภาวะสมดุล (equilibrium) (Lehninger *et al.*, 1993; Whitford, 2005)

ความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูงและกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำอยู่ที่ปลาย N ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2 ($\text{NA}_2\beta$) ในสายเบต้า ส่วนที่ไม่ใช่เกลียวเฮลิคัล (non-helical segment) โดยกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูงเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophilic ได้แก่ กรดอะมิโนฮีสทีดีน กลูตามีน (glutamine) หรือ แอสพาราจีน (asparagine) ส่วนกลุ่มที่ชอบต่อออกซิเจนต่ำเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophobic ได้แก่ กรดอะมิโนลิวซีน (leucine) เมทไธโอนีน (methionine) หรือ เฟนิลอะลานีน (phenylalanine) (Perutz and Imai, 1980; Ritter, 1996; Horton *et al.*, 2002)

การวัดความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินใช้วัดค่า P_{50} ซึ่งเป็นความดันของออกซิเจนที่ทำให้มีปริมาณของฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจนครึ่งหนึ่งของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด ค่า P_{50} จึงเป็นค่าที่บ่งชี้ ฮีโมโกลบินมีความชอบต่อออกซิเจนมากน้อยเพียงใด ถ้าค่า P_{50} ต่ำ แสดงว่ามีความชอบต่อออกซิเจนสูง เนื่องจากแม้ความดันของออกซิเจนต่ำแต่ฮีโมโกลบินก็สามารถอิ่มตัวไปด้วยออกซิเจนถึงครึ่งหนึ่ง แต่ถ้าค่า P_{50} สูง แสดงว่ามีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ เนื่องจากต้องมีความดันของออกซิเจนสูงเพื่อให้ฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจนถึงครึ่งหนึ่ง ฮีมแต่ละตัวจับกับออกซิเจนได้ 1 โมเลกุล ทำให้ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลสามารถจับกับออกซิเจนได้ 4 โมเลกุล หรือออกซิเจน 8 อะตอม เมื่อฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุล จับกับออกซิเจนที่ตำแหน่งจับ (binding site) ครอบทั้ง 4 ตำแหน่ง เรียกว่าการอิ่มตัวของฮีโมโกลบิน (saturated hemoglobin) (Ritter, 1996 ; Horton *et al.*, 2002)

การสร้างกราฟ ของการอิ่มตัวด้วยออกซิเจน (oxygen binding curve หรือ oxygen dissociation curve) เป็นการแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างความดันออกซิเจน (PO_2) มีหน่วยเป็นทอร์รี่ (torr) หรือมิลลิเมตรปรอท (mm Hg) เป็นแกนตั้ง และค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน (oxygen saturation) ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิฮีโมโกลบินต่อปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด เป็นแกนอน (Ritter, 1996 ; Horton *et al.*, 2002)

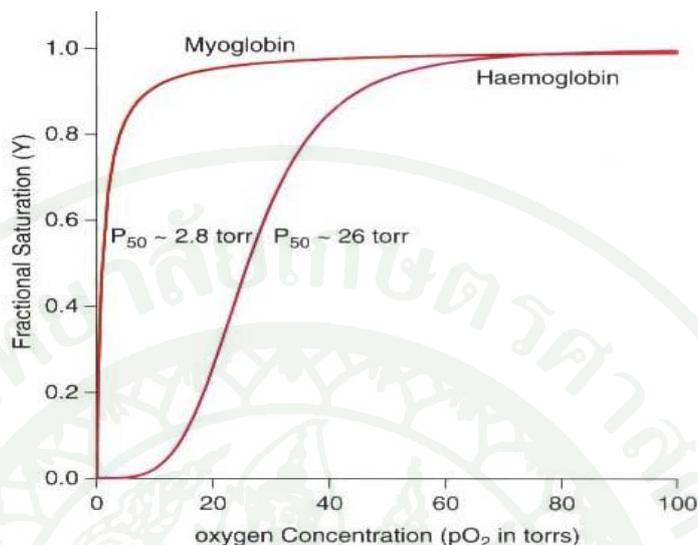
กราฟของการอิ่มตัวด้วยออกซิเจน ของฮีโมโกลบินมี รูปร่างของเส้นกราฟ เป็นแบบซิกมอยด์ (sigmoid) ที่พีเอช 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากไมโอโกลบิน (myoglobin) ซึ่งเป็น โปรตีนที่ทำหน้าที่เช่นเดียวกับฮีโมโกลบินแต่อยู่ในกล้ามเนื้อ และมีโครงสร้างที่คล้ายกับโมโนเมอร์ของฮีโมโกลบิน มี รูปร่างของเส้นกราฟ ของการอิ่มตัวด้วยออกซิเจน เป็นแบบไฮเพอร์โบลา (hyperbola) ที่เป็นไปตามสมการของไมคาลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten equation) ที่มีความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของปฏิกิริยา (V) กับความเข้มข้นของสับสเตรท (S) (ภาพที่ 11) ซึ่งบ่งชี้ถึงความแตกต่าง ที่เป็นลักษณะเฉพาะ และรูปร่างที่จำเพาะ (specifically shape) ของการทำงานของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ (Ritter, 1996) จากเส้นกราฟของ ฮีโมโกลบิน แสดงให้เห็นว่าออกซิเจนเข้าจับกับหมู่ฮีมที่ 1 จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของหมู่ฮีมที่ 1 ไปในทางที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของหมู่ฮีมที่ 2 ซึ่งมีผลทำให้การจับกับออกซิเจน โมเลกุลที่ 2 ดีขึ้น กราฟช่วงนี้จะชันขึ้น แสดงถึงการอิ่มตัวด้วยออกซิเจนของฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นเส้นกราฟตอนบนจะลาดลงจนขนานกับแกนอนที่ PO_2 มีค่าประมาณ 100 ทอร์รี่หรือ อิ่มตัวด้วยออกซิเจนที่ 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในช่วงนั้น ฮีโมโกลบิน ทุกตัวในเลือดจับกับออกซิเจน อย่างสมบูรณ์ ลักษณะซิกมอยด์ของกราฟการจับระหว่างฮีโมโกลบินกับออกซิเจนเกิดจากการร่วมมือกัน

ระหว่างบริเวณจับกับออกซิเจน ส่งผลให้มีการสื่อสัญญาณไปยังหมู่ฮีมของ โมโนเมอร์อื่นๆ ที่อยู่บนหน่วยย่อยทั้ง 4 ของฮีโมโกลบิน ซึ่งแตกต่างจากโมโนเมอร์ของไมโอโกลบิน (อาภัสตรา, 2551; Boonyarat, 1997) ที่ค่า PO_2 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 40 ทอร์รี่ ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้น้อยกว่าที่ไมโอโกลบินจับกับออกซิเจนได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้ออกซิเจนถูกปล่อยจากฮีโมโกลบินที่อยู่ในเส้นเลือดไปยังเนื้อเยื่อโดยรอบ (peripheral tissue) ค่า P_{50} ของฮีโมโกลบิน ประมาณ 26 ทอร์รี่ แสดงว่าฮีโมโกลบินจะจับได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีออกซิเจนประมาณ 26 ทอร์รี่ ขณะที่ค่า P_{50} ของไมโอโกลบิน ประมาณ 2.8 ทอร์รี่ แสดงว่าไมโอโกลบินจะจับได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีออกซิเจนประมาณ 2.8 ทอร์รี่ แสดงว่าฮีโมโกลบินมีความชอบต่อออกซิเจนต่ำกว่าไมโอโกลบิน ไมโอโกลบินจับ กับออกซิเจน ได้แน่น จากกราฟ ของการอิมิตัวด้วยออกซิเจน พบว่าเป็นแบบไฮเพอร์โบล่า ซึ่งมีการอิมิตัวด้วยออกซิเจนอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 11) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ฮีโมโกลบินที่ปอด จะจับกับออกซิเจนได้อย่างสมบูรณ์ พร้อมขนส่งไปให้เซลล์ต่างๆในร่างกาย ซึ่งเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆที่มีออกซิเจนต่ำ ออกซิเจนที่ขนส่งผ่านฮีโมโกลบินจะถูกจับอย่างรวดเร็วโดยไมโอโกลบินภายในเซลล์ เนื่องจากไมโอโกลบินสามารถจับได้แน่นกับออกซิเจนแม้จะมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีประโยชน์ในการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ในการขนส่งออกซิเจนจากปอดไปสู่กล้ามเนื้อหรือบริเวณที่มีออกซิเจนสูงไปสู่เนื้อเยื่อที่มีออกซิเจนต่ำ (Horton *et al.*, 2002; Boron and Boulpaep, 2003; Whitford, 2005; Cunningham and Klein, 2007; Nelson and Cox, 2008)

ฮีโมโกลบินที่อิมิตัว 1 กรัม สามารถจับออกซิเจนได้ 1.36-1.39 มิลลิลิตร ดังนั้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมปกติมี ฮีโมโกลบินเฉลี่ยประมาณ 10-15 กรัมต่อเดซิลิตรมีความจุออกซิเจน (oxygen capacity) ประมาณ 3.6-21 มิลลิลิตรต่อเดซิลิตรหรือปริมาตรเปอร์เซ็นต์ (vol%) ความจุออกซิเจนของเลือดคือปริมาณออกซิเจนมากที่สุดที่อยู่ในเล็ขิตมาณออกซิเจน (oxygen content) เป็นปริมาณของออกซิเจนในเลือดที่จับกับฮีโมโกลบินเกือบทั้งหมด ฮีโมโกลบินมีความสามารถที่จะจับกับออกซิเจนได้อย่างอิมิตัวในสภาวะที่มีออกซิเจน ทำให้ความจุออกซิเจนละปริมาณออกซิเจนในเลือดเท่ากัน เมื่อ ออกซิเจน ไปเลี้ยงส่วนของเนื้อเยื่อ ทำให้ปริมาณออกซิเจนในเลือดลดลง แต่ ความจุออกซิเจนในเลือดยังคงเหมือนเดิม (Cunningham and Klein, 2007)

มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อ กราฟของการอิมิตัวด้วยออกซิเจน ของฮีโมโกลบิน ทำให้ความสามารถในการจับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ความชอบออกซิเจนของฮีโมโกลบิน (hemoglobin-oxygen affinity) ขึ้นอยู่กับพีเอชในเลือด ความดันย่อยของ

CO₂ (PCO₂) อุณหภูมิ และ 2,3-บิสฟอสโฟกลีเซอเรต (บัวรอน, 2536; สมปอง, 2550; Murray *et al.*, 1996; Boron and Boulpaep, 2003; Cunningham and Klein, 2007; Nelson and Cox, 2008)

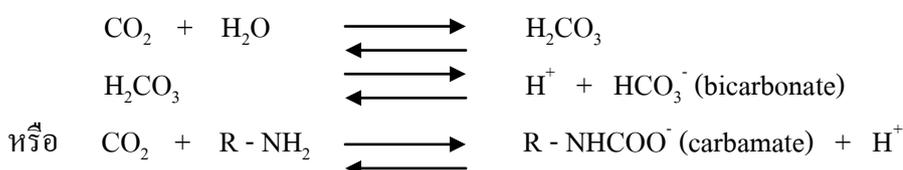


ภาพที่ 11 กราฟของการอิมตัวด้วยออกซิเจน (oxygen binding curve) ของฮีโมโกลบินและไมโอโกลบิน

ที่มา: Whitford (2005)

การที่พีเอชของเลือดลดลงมีความเป็นกรดมากขึ้นเนื่องจากความเข้มข้นของโปรตอน (H⁺) เพิ่มขึ้น หรือ PCO₂ เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้น้อยลงทำให้ความชอบต่อออกซิเจนลดลง ทำให้ HbO₂ dissociation curve เลื่อนไปทางขวา (ภาพที่ 12) จากการเพิ่มความเข้มข้นของ H⁺ หรือการเพิ่มความเป็นกรด หรือการลดค่าพีเอชทำให้มีการปลดปล่อยออกซิเจนออกจากโมเลกุลของฮีโมโกลบิน แล้วมีผลลดความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบิน ลง เช่นนี้เรียกว่า บอร์เอฟเฟกต์ (Bohr effect)

ปัจจัยที่ควบคุมพีเอชของเลือดและปริมาณของ H⁺ มาจาก CO₂ ที่อยู่ในเลือดและจากสายฮีโมโกลบิน เมื่อ CO₂ ทำปฏิกิริยากับน้ำจะได้กรดคาร์บอนิกซึ่งจะแตกตัวให้ H⁺ ดังสมการ



บอร์เอฟเฟกมีความสำคัญต่อการทำงานของฮีโมโกลบิน มีผลทำให้มีการปล่อยออกซิเจนจากฮีโมโกลบินในเลือดสู่เนื้อเยื่อที่กำลังมีความต้องการใช้ออกซิเจน และฮีโมโกลบินสามารถกลับมาทำหน้าที่ได้อีกครั้งจึงเกิดการทำงานอย่างต่อเนื่องขึ้น (บัวร์อง, 2536; Sripanitan, 1983; Ritter, 1996; Guyton and Hall, 2011)

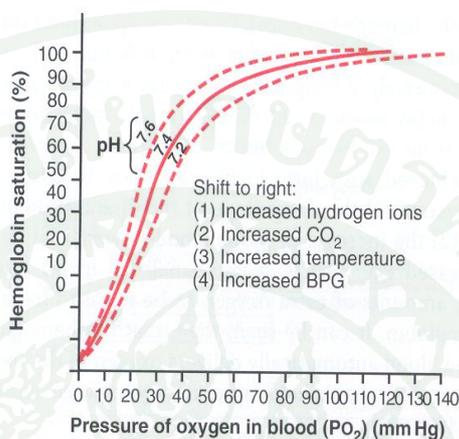
CO₂ ที่ปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่อที่กำลังทำงาน มีผลลดพีเอช ของเลือด ทำให้ HbO₂ dissociation curve เลื่อนไปทางขวา นอกจากนี้ CO₂ ที่เข้าจับกับโมเลกุลของฮีโมโกลบิน เกิดเป็นสารประกอบคาร์บามิโนฮีโมโกลบิน (carbamino Hb) ทำให้ HbO₂ dissociation curve เลื่อนไปทางขวาด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 12) ความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินลดลงเมื่อฮีโมโกลบินในรูปสารประกอบ carbamino Hb มาที่ปอด ซึ่งเป็นบริเวณที่มี CO₂ ต่ำ แต่มีออกซิเจนสูง มีผลทำให้ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจน และ ปล่อย CO₂ เข้าสู่ปอดเพื่อขับออกจากร่างกาย(บัวร์อง, 2536; Ritter, 1996 ; Horton *et al.*, 2002)

การเพิ่มอุณหภูมิมีผลให้ออกซีฮีโมโกลบินปล่อยออกซิเจนออกทำให้ HbO₂ dissociation curve เลื่อนไปทางขวา (ภาพที่ 12) เมื่อเลือดไหลผ่านเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิต่ำซึ่งเป็นเลือดที่มีออกซิเจนมาก ทำให้ออกซีฮีโมโกลบินมีการปล่อยออกซิเจนน้อยและเซลล์มีอัตราเมแทบอลิซึมลดลงทำให้มีความต้องการออกซิเจนน้อยลง โดยเฉพาะที่ปอดความเย็นมีส่วนช่วยในการทำให้ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้ดีขึ้นทำให้ HbO₂ dissociation curve เลื่อนไปทางซ้าย (บัวร์อง, 2536; Guyton and Hall, 2011)

ขบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ในเม็ดเลือดแดง ได้สาร 2,3-BPG เป็นแอนไอออนิกฟอสเฟตอินทรีย์ สามารถจับกับสายเบต้าทั้งสองของฮีโมโกลบินตรงตำแหน่งของหมู่อะมิโนที่ปลาย N และหมู่ฮิสติดีนของ β-143 ฮิสทีดีนของฮีโมโกลบิน 2,3-BPG ทำหน้าที่เป็น ตัวควบคุมแบบอัลโลสเตอริก (allosteric effector) ของฮีโมโกลบินจะจับกับฮีโมโกลบินทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ของฮีโมโกลบินส่งผลให้ความชอบต่อออกซิเจนลดลงดังนั้นเมื่อมี 2,3-BPG มากขึ้นออกซีฮีโมโกลบิน จะปล่อยออกซิเจนให้แก่เนื้อเยื่อ ทำให้ HbO₂ dissociation curve เลื่อนไปทางขวา (ภาพที่ 12) การทำงานในลักษณะนี้เป็นการปรับสมดุลทางโครงสร้างของฮีโมโกลบินระหว่างรูปฮีโมโกลบินและออกซีฮีโมโกลบิน ดังสมการ



ดังนั้นขบวนการไกลโคไลซิส ที่เกิดมากขึ้น จากการออกกำลังกาย การขึ้นไปบนที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล (high altitude) และการขาดออกซิเจนเป็นเวลานาน (chronic hypoxia) มีผลทำให้ระดับ 2,3-BPG ในเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ทำให้ร่างกายได้รับออกซิเจนมากขึ้น (บัวร์อง, 2536; อากัสตรา, 2551; Horton *et al.*, 2002)



ภาพที่ 12 กราฟแสดงการจับกันของออกซิเจนและฮีโมโกลบิน (HbO₂ dissociation curve) การเปลี่ยนแปลงของกราฟไปทางขวาจากการเพิ่มความเข้มข้นของ H⁺ (การลดลงของพีเอช) การเพิ่มขึ้นของ CO₂ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ และการเพิ่มขึ้นของ 2,3-BPG

ที่มา: Guyton and Hall (2011)

นอกจากนี้ยังมีสารฟอสเฟตอินทรีย์อื่นๆที่มีผลต่อการทำงานของฮีโมโกลบินในลักษณะเดียวกัน ได้แก่ อินซิทอล เฮกซาฟอสเฟต (inositol hexaphosphate; IHP) ทำหน้าที่แทน BPG ในนก อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate; ATP) ทำหน้าที่แทน BPG ในปลาและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibian) ส่วนใหญ่ และกวานโนซีน ไตรฟอสเฟต (guanosine triphosphate; GTP) ทำหน้าที่แทน BPG ในปลากระดูกแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าในเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี ATP ประมาณ 2 มิลลิโมลาร์ ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ฮีโมโกลบินจับกับ H⁺ เกิดเป็นคอมเพลกซ์ซึ่งซ่อน (อากัสตรา, 2551)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฮีโมโกลบินในต่างประเทศ

จากการศึกษาพีโนไทป์ของฮีโมโกลบินโค โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบกระดาษ (paper electrophoresis) พบฮีโมโกลบินมี 2 พีโนไทป์ คือ Hb AA และ Hb BB (Bangham and Blumberg, 1958) ซึ่ง Bangham and Blumberg (1958) ได้ศึกษาเพิ่มเติมพบฮีโมโกลบิน มี 3 พีโนไทป์ คือ Hb AA, Hb BB และ Hb AB ต่อมา Bachmann *et al.* (1978) รายงานพบฮีโมโกลบินชนิด AA, AB และ BB ในโคยุโรป ซึ่งลักษณะของ Hb มียีนคู่ที่มีรูปแบบต่างกันอยู่ที่ตำแหน่งโลกัส (locus) เดียวกัน เรียกว่าอัลลีล (allele) ซึ่ง Hb A ถูกควบคุมโดยอัลลีลหนึ่งขณะที่ Hb B ถูกควบคุมโดยอัลลีลตรงกันข้าม Hb AA และ Hb BB มีคู่ยีนเหมือนกัน (homologous) ส่วน Hb AB มีคู่ยีนต่างกัน (heterozygous) (Bachmann *et al.*, 1978)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสายเบต้าของ Hb A และ Hb B ในโคพันธุ์เจอร์ซี และโคพันธุ์เชียร์ฟอร์ด พบว่าลำดับกรดอะมิโนจาก 145 หน่วย (residues) ในตำแหน่งที่ 15 18 และ 119 มีความแตกต่างกันโดยสายเบต้าของ Hb A ตำแหน่งที่ 15 เป็นกรดอะมิโนไกลซีน สายเบต้าของ Hb B เป็นกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ตำแหน่งที่ 18 สายเบต้าของ Hb A เป็นกรดอะมิโนไลซีน (lysine) สายเบต้าของ Hb B เป็นกรดอะมิโนฮิสทีดีน และตำแหน่งที่ 119 สายเบต้าของ Hb A เป็นกรดอะมิโนไลซีน สายเบต้าของ Hb B เป็นกรดอะมิโนแอสพาราจีน นอกจากนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N (N-terminal) ของสายเบต้ามีกรดอะมิโนเป็นเมทไธโอนีน และ ลิวซีน (Schroeder *et al.*, 1967)

จากการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิ ของสายอัลฟาโกลบินในฮีโมโกลบินจากกระบือแม่ ม่น้ำจำนวน 4 ตัว พบว่ามีความแตกต่างกันของ ยีน A และ ยีน B ซึ่งโคดอนที่ 64 ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน หรือกรดอะมิโนแอสพาราจีน ยีน A ถอดรหัสได้ 2 สายอัลฟาโกลบิน คือ I alpha 1 และ II alpha 3 โดยอัลฟาทั้งสองสายมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันที่ตำแหน่ง 129 และ 131 ซึ่ง I alpha 1 ตำแหน่งที่ 64 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนอะลานีน (alanine), กรดอะมิโนเฟนิลอะลานีน และกรดอะมิโนแอสพาราจีน ตามลำดับ ขณะที่ II alpha 3 ตำแหน่งที่ 64, 129 และ 131 เป็นกรดอะมิโนอะลานีน กรดอะมิโนลิวซีน และกรดอะมิโนเซอรีนตามลำดับ (Ferranti *et al.*, 2001) ต่อมา Ferranti *et al.* (2001) ได้รายงานความแตกต่างของสายอัลฟาหนึ่งและสายอัลฟาสามที่ตำแหน่ง 129 และ 131 พบว่า I alpha 1 และ II alpha 3 คือ สายอัลฟาหนึ่งและสายอัลฟาสามตามลำดับ ใน Hb AA ส่วนยีน B ถอดรหัสได้ 2 สายอัลฟา คือ I alpha 2 และ II alpha 4 หรือ Hb 2 และ Hb 4 ใน Hb BB (Di Luccia, 1991) โดยสายอัลฟาหนึ่งและสายอัลฟาสองมีลำดับกรดอะมิโน

แตกต่างกันที่ตำแหน่ง 10 11 และ 64 คือ I alpha 2 ตำแหน่ง 10 11 และ 64 เป็นกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (isoleucine) กรดอะมิโนกลูตามีน และกรดอะมิโนแอสพาราจีนตามลำดับ ขณะที่ II alpha 4 ตำแหน่ง 10 11 และ 64 เป็นกรดอะมิโนวาเลิน (valine) กรดอะมิโนไลซีนและกรดอะมิโนแอสพาราจีนตามลำดับ ขณะที่ II alpha 4 ตำแหน่ง 10 11 และ 64 เป็นกรดอะมิโนวาเลิน กรดอะมิโนไลซีน และกรดอะมิโนแอสพาราจีนตามลำดับ ซึ่งในตำแหน่งที่ 64 อาจเป็นกรดอะมิโนอะลานีนหรือกรดอะมิโนแอสพาราจีนก็ได้ โดยกรดอะมิโนถูกแทนที่ในตำแหน่งโลกัสเดียวกันและไม่ใช้ตำแหน่งโลกัสเดียวกันในสายอัลฟา ซึ่งเป็นผลจากการเกิดการกลายแบบ single point mutation (Ferranti *et al.*, 2001)

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

การศึกษาฮีโมโกลบินของสุนัขในประเทศญี่ปุ่นมีสายพันธุ์สุนัขพื้นเมือง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ ฮ็อกไกโด (Hokkaido) อะคิตะ ไค (Kai) ไคชู (Kishu) ชิโกกุ (Shikoku) และ ชิบะ (Shiba) มีการเก็บตัวอย่างเลือด ของสุนัขพันธุ์พื้นเมืองเหล่านี้ เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาความถี่ของยีน พบว่าความแตกต่างที่เด่นชัดของความถี่ยีนระหว่างสายพันธุ์และประชากรของสุนัขส่วนใหญ่อยู่ที่ส่วนของฮีโมโกลบิน ความแตกต่างนี้เองทำให้เกิดลักษณะที่ต่างกันของแต่ละสายพันธุ์ (Tanabe, 1990)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินของสุนัข โดย เก็บตัวอย่างเม็ดเลือดแดงของสุนัขมาทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแป้งเจล (agar-starch gel electrophoresis) พบว่าความแตกต่างของ ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ถูกควบคุมด้วย คู่อัลลีลของ HbA และ HbB (Tanabe *et al.*, 1978)

การศึกษาฮีโมโกลบินของสุนัขพบว่าในสุนัขมีความหลากหลายของฮีโมโกลบิน จากการศึกษาฮีโมโกลบินโดยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งใช้พอลิอะคริลาไมด์เจล พบความแตกต่างของค่า pI ของโปรตีนฮีโมโกลบินทำให้ทราบว่าลำดับกรดอะมิโนของสาย อัลฟาและเบต้าเป็นตัวบ่งชี้ความหลากหลายของฮีโมโกลบิน เรียกความหลากหลายนี้ว่า “multiplicity polymorphism” (Braend, 1988)

การศึกษาฮีโมโกลบินของ กลุ่มตระกูลแมวน้ำมีหู (pinnipeds) จำนวน 7 สปีชีส์ คือ แมวน้ำช้าง (elephant seal; *Mirounga augustirostris*) แมวน้ำริบบอน (ribbon seal; *Histiophoca fasciata*) แมวน้ำทั่วไปหรือแมวน้ำท่าเรือ (harbor seal; *Phoca vitulina*) แมวน้ำเฟอร์ (fur seal; *Callorhinus ursinus*) แมวน้ำสีเทา (grey seal; *Halichoerus grypus*) แมวน้ำที่มิงาใหญ่ 1 คู่ (walrus; *Odobenus rosmarus divergens*) และ สิงโตทะเลแคลิฟอร์เนีย (california sea lion; *Zalophus californianus*) โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบแบ่งเจล ใช้ทริส EDTA บอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) พีเอช 8.6 พบแถบฮีโมโกลบินหลัก (major hemoglobin) 2 แถบ ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow โดยพบว่า elephant grey ribbon และ harbor seal มีอัตราส่วนระหว่าง Hb fast ต่อ Hb slow เท่ากับ 3 ต่อ 1 ในขณะที่ fur seal sea lion และ walrus มีอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 1 ตามลำดับ และมีแถบฮีโมโกลบินรอง (minor hemoglobin) 1 แถบ เมื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ ฮีโมโกลบิน ของ elephant seal โดยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้เซฟาเดกซ์ G-75 และ G-100 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65,000 ดาลตัน การศึกษาส่วนประกอบของกรดอะมิโนของ elephant seal รูปแบบโครมาโทแกรมของสายกลอบินจากส่วน Hb slow พบว่าส่วนของ Hb slow-1 เทียบเท่ากับสายอัลฟา และส่วนของ Hb slow-2 เทียบเท่ากับสายเบต้า ตามลำดับ ส่วนรูปแบบโครมาโทแกรมของสายกลอบินจากส่วน Hb fast พบว่าส่วนของ Hb fast-1 เทียบเท่ากับสายอัลฟา และส่วนของ Hb fast-2 เทียบเท่ากับสายเบต้า ตามลำดับ (Lincoln *et al.*, 1973)

การ ศึกษาฮีโมโกลบิน ของ เลือด ปลาทุกชนิด พบมี ฮีโมโกลบิน หลาก หลายชนิด (multiplicity) ฮีโมโกลบินของปลาสามารถจัดเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ประกอบด้วยฮีโมโกลบินทั้งแบบเดี่ยว (single) และแบบหลากหลาย (multiple) มีความไวต่ออุณหภูมิและพีเอช โดยฮีโมโกลบินแบบหลากหลายไม่ได้ ใช้ในการ จัดจำแนกตามความสัมพันธ์ด้านการทำหน้าที่ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยฮีโมโกลบินแบบหลากหลายโดยแต่ละแถบ ของฮีโมโกลบินมีความแตกต่างอย่างชัดเจนทางด้านการทำหน้าที่ และกลุ่มนี้ถือว่าเป็นกลุ่มที่พัฒนาแล้ว ตามวิวัฒนาการฮีโมโกลบินของปลา และกลุ่มที่ 3 เป็นฮีโมโกลบินที่ไวต่อพีเอช แต่ไม่มีผลจากอุณหภูมิ ซึ่งความหลากหลายนี้อาจเป็นประโยชน์ในการดำรงชีวิต (Martin *et al.*, 1979a)

การศึกษาฮีโมโกลบินจากปลาเทราท์ (cutthroat trout, *Salmo clarki*) พบมีฮีโมโกลบิน 9 ชนิด และเมื่อแยกฮีโมโกลบิน ให้บริสุทธิ์ พบมีฮีโมโกลบิน 8 ชนิด เมื่อศึกษาลักษณะของสายกลอบิน พบว่ามี 6 ชนิดเป็นแบบ $\alpha_2\beta_2$ และอีก 2 ชนิด เป็นแบบ $\alpha\alpha/\beta_2$ และ $\alpha\alpha/\beta\beta'$ ซึ่งเป็นลักษณะ heterotetramers และพบว่าฮีโมโกลบิน 5 ชนิด ที่มี pI ระหว่าง 7.1-9.1 และฮีโมโกลบินอีกชนิดหนึ่ง มีขนาดเล็ก มี pI เท่ากับ 5.9 ใช้จับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบินทุกแบบ นอกจากนี้พบว่าฮีโมโกลบินทุกแบบมีคุณสมบัติเกี่ยวกับการจับออกซิเจนเหมือนกัน โดยที่ไม่ขึ้นกับพีเอช และอุณหภูมิ และไม่ผลจากปริมาณ ATP นอกจากนี้ยังพบว่าฮีโมโกลบินขนาดเล็กอื่นๆ ที่มี pI น้อยกว่า 5.9 มีคุณสมบัติเกี่ยวกับการจับออกซิเจนเหมือนกัน ยกเว้นขึ้นอยู่กับ พีเอช และฮีโมโกลบินอีก 2 ชนิด ที่มี pI เท่ากับ 6.4 และ 6.5 มีคุณสมบัติคล้ายกันเกี่ยวกับการจับออกซิเจนที่ต้องขึ้นอยู่กับพีเอช และอุณหภูมิ ATP และ GTP จึงทำให้ความชอบต่อออกซิเจนลดลงแต่ไม่มีผลต่อ ความร่วมมือในการจับกับออกซิเจน โดยผลของ GTP จะน้อยกว่า ATP และเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา นี้มี ATP และ GTP จำนวนมาก ด้วยอัตราส่วน ATP:GTP เท่ากับ 3:1 แสดงว่าฟอสเฟตอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด เป็นตัวควบคุมที่สำคัญ แตกต่างจากปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ซึ่งมีปริมาณ GTP ต่ำกว่ามาก (Southard, 1986)

การศึกษาฮีโมโกลบินของปลาไหล (marbled swamp eel, *Synbranchus marmoratus*) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแบ่งเจล มีบัฟเฟอร์สำหรับเจลเป็น 42 มิลลิโมลาร์ ทริส 1.7 มิลลิโมลาร์ EDTA และอิเล็กโตรลิตบัฟเฟอร์ เป็น 6.1 มิลลิโมลาร์ บอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) พีเอช 8.8 พบฮีโมโกลบิน 3 แถบ คือ Hb I เป็นกลุ่มแคโทดิก (cathodic) Hb II และ Hb III เป็นกลุ่มแอนโอดิก (anodic) และเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 800 มิลลิโมลาร์ ทริส 2.1 มิลลิโมลาร์ EDTA พีเอช 8.9 ที่มี 6 โมลาร์ยูเรีย (urea) และ 2.25 มิลลิโมลาร์ เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) พบว่าฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายกลอบิน 4 สาย ได้แก่ สายอัลฟา 1 อัลฟา 2 เบต้า และแกมมา โดยลักษณะการจับกันเป็นเตตระเมอร์ของฮีโมโกลบิน คือ Hb I เป็นแบบ $\alpha_{(2)}\gamma_2$ HbII เป็นแบบ $\alpha_{(1)}\gamma_2$ และ HbIII เป็นแบบ $\alpha_{(1)}\beta_2$ (Nakamoto and Mochado, 1986)

ปลากลุ่ม Salmonids เช่น ปลาแซลมอนและปลาเทราท์ มีฮีโมโกลบิน หลายชนิดและมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน เรียกว่า Iso Hbs ประกอบด้วยฮีโมโกลบิน 8 -19 ชนิด จากความแตกต่างตั้งแต่ระดับยีน ทำให้ฮีโมโกลบินในปลา มีความหลากหลายและส่งผลให้มีการทำหน้าที่แตกต่างกัน การศึกษาฮีโมโกลบิน ของปลาโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแอนโอดิก มีค่า pI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 และกลุ่มแคโทดิก มีค่า pI มากกว่าหรือเท่ากับ 8 โดยกลุ่มแอนโอดิก

ดิก สามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆและในปลา กลุ่มแอนดิก ถือเป็นฮีโมโกลบินหลักในปลา ที่มีคุณสมบัติมีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ มีบอร์ออฟเฟคและรูทออฟเฟค ส่วนกลุ่มแคโรดิก จะพบในปลาเท่านั้น มีคุณสมบัติ ที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูง ไม่มีบอร์ออฟเฟคหรือ บางครั้งอาจมี รีเวิร์สบอร์ออฟเฟค ที่เกิดการลดค่า พีเอช เชื่อว่าเมื่อ กลุ่มแอนดิก ได้รับผลกระทบจากบอร์ออฟเฟคและ รูทออฟเฟค โดยรูทออฟเฟค มีความไวต่อพีเอช ในฮีโมโกลบินของปลาบางชนิด จากผลของโปรตอนที่เกี่ยวข้องกับกา รจับออกซิเจน ทำให้มีหน้าที่ทางสรีรวิทยาที่จำเพาะ กลุ่มแคโรดิกจะทำหน้าที่เป็นตัวเก็บออกซิเจน(oxygen carrier) ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและภาวะเลือดเป็นกรด(acidosis) (Prisco *et al.*, 2000)

การศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบินอูฐโหนกเดียว (one-humped camel, *Camelus dromedarius*) ในอิหร่าน จากตัวอย่างทั้งหมด 53 ตัวอย่าง เป็นตัวผู้ 35 ตัว และตัวเมีย 18 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 อายุน้อยกว่า 5 ปี จำนวน 25 ตัว กลุ่มที่ 2 อายุมากกว่า 5 ปี จำนวน 28 ตัว พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิด คือ A₁ และ A₂ ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ความเข้มข้นฮีโมโกลบิน และ Hb A₁ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศ (p<0.05) แต่อายุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mohri, 2000) นอกจากนี้ Nazifi *et al.* (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ อูฐโหนกเดียว (*Camelus dromedarius*) ในอิหร่าน และความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรูโลพลาสมิน และเหล็ก โดยเก็บตัวอย่างจาก อูฐโหนกเดียว จำนวน 100 ตัว แบ่งตามเพศ และช่วงอายุเป็น 1-2 ปี 2-4 ปี 4-6 ปี และ มากกว่า 6 ปี พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิด Hb A₁ มี 95.2 เปอร์เซ็นต์ และ Hb A₂ มี 4.8 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เพศและอายุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรูโลพลาสมิน และเหล็ก

การศึกษาความสัมพันธ์ ระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ ม้า Turkoman ในอิหร่าน และความเข้มข้นของ ฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรูโลพลาสมิน และเหล็ก โดยเก็บตัวอย่าง เลือดจากม้า จำนวน 50 ตัว แบ่งตามเพศ และช่วงอายุเป็น 2-3 ปี 3-5 ปี และ มากกว่า 5 ปี พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิด Hb A₁ มี 96.02 เปอร์เซ็นต์ และ Hb A₂ มี 3.98 เปอร์เซ็นต์ Hb A₁ เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้สูงและพบเป็นแถบหลัก และ Hb A₂ เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ต่ำกว่า โดยที่เพศและอายุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรูโลพลาสมิน และเหล็ก (Nazifi *et al.*, 2003)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของม้า Caspian miniature ในอิหร่าน และความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรัลโพลลาสมีน และเหล็ก โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากม้า จำนวน 50 ตัว ตามช่วงอายุ 1.5-3 ปี 3-5 ปี และ มากกว่า 5 ปี พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิด Hb A มี 66.58 เปอร์เซ็นต์ และ Hb B มี 33.42 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนของ Hb A และ Hb B เท่ากับ 1.99:1 ซึ่งต่ำกว่าอัตราส่วนของ ม้าพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ มีอัตราส่วนของ Hb A และ Hb B เท่ากับ 2.5:1 โดยที่เพศและอายุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน คอปเปอร์ ซีรัลโพลลาสมีน และเหล็ก (Nazifi and Rategh, 2005)

การศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบิน ของแกะ 2 สายพันธุ์ Moghani และ Makouei ที่สำคัญในอิหร่าน โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิดในพันธุ์ Moghani คือ Hb AA มี 71.6 เปอร์เซ็นต์ และ Hb AB มี 28.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในพันธุ์ Makouei คือ Hb AA มี 69.3 เปอร์เซ็นต์ และ Hb AB มี 30.7 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ฟีโนไทป์ AB มีปริมาณฮีโมโกลบิน B มากกว่า A แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับฮีโมโกลบิน A และ B ระหว่างทั้งสองสายพันธุ์ นอกจากนี้ปริมาณ ฮีโมโกลบินรวมในพันธุ์ Makouei มากกว่าพันธุ์ Moghani อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Esharatkah et al., 2007) ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของแกะประกอบด้วย Hb A Hb B Hb C Hb E Hb F โดยที่ Hb E เป็นฮีโมโกลบินใน ระยะตัวอ่อนคงอยู่ในมดลูกของแม่ในสภาพที่มีออกซิเจน และ Hb A เป็นฮีโมโกลบินในระยะเต็มวัย นอกสภาพมดลูก การเปลี่ยนจาก Hb E ไปเป็น Hb A เริ่มเกิดขึ้นในมดลูกและเกิดขึ้นสมบูรณ์ใน ระยะ 1 เดือนหลังคลอด โดยที่ Hb F เป็นฮีโมโกลบินใน ระยะลูกอ่อนจะแทนที่ Hb E ในมดลูก ต่อจากนั้น Hb F จะเปลี่ยนเป็น Hb A แต่มีลักษณะที่สำคัญพิเศษ ในแกะและแกะ ที่มีฮีโมโกลบิน ลักษณะเฉพาะ คือ Hb C ซึ่งจะแทนที่ Hb F ในระยะแรกเกิดภายใน 2-3 เดือน ก่อนที่จะเปลี่ยนไป เป็น Hb A โดยที่ในแกะที่มี Hb A ฟีโนไทป์ A ($\alpha_2\beta_2^A$) หรือ AB ($\alpha_2\beta_2^{A,B}$) จะแสดง Hb C มีประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมด ในขณะที่แกะที่มี Hb A ฟีโนไทป์ B ($\alpha_2\beta_2^B$) จะไม่แสดง Hb C พบว่าประมาณ 30 วันหลังเกิด Hb C จะเปลี่ยนไปเป็น Hb A (Hb A-to-C switching) โดยอาศัยอิริโทรพอยิติน (Jain, 1986) หน้าที่ของ erythropoietic stimulating factor (ESF) กระตุ้นการสร้าง Hb C ($\alpha_2\beta_2^C$) ในแกะและแกะ ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ A พบมากกว่า AB และ AB พบมากกว่า B เมื่ออาศัยหลักการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าพบว่า Hb A เคลื่อนที่ใน สนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกที่พีเอช 8.6 ได้เร็วที่สุด ส่วน Hb C เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้าที่สุด Hb F เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่า Hb B และ Hb B เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่า Hb C (Jain, 1986)

การศึกษาความหลากหลายในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กพันธุ์พื้นเมืองของไนจีเรีย ใช้แกะพันธุ์ west african dwarf จำนวน 50 ตัว และแพะพันธุ์ red sokoto จำนวน 150 ตัว โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแบ่งเจล พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 3 ชนิด คือ Hb AA 40 เปอร์เซ็นต์ Hb AB 16 เปอร์เซ็นต์ และ Hb BB 44 เปอร์เซ็นต์ในแกะ และ Hb AA 13 เปอร์เซ็นต์ Hb AB 36 เปอร์เซ็นต์ Hb BB 50 เปอร์เซ็นต์ และ Hb AC 1 เปอร์เซ็นต์ในแพะ ความถี่ของอัลลีล A และ B เท่ากับ 0.61 และ 0.40 ตามลำดับในแกะ และ ความถี่ของ อัลลีล A B และ C เท่ากับ 0.27 0.72 และ 0.003 ตามลำดับในแพะ ตามกฎสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg' s equilibrium) ที่กล่าวว่า ความถี่ของยีนในรุ่นลูกสามารถ ทำการวัดได้จากความถี่ในรุ่นพ่อแม่ ความถี่ของยีน และจีโนไทป์ มีค่าคงที่ จากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง เพื่อเข้าสู่สภาวะสมดุล โดยที่ค่าความถี่ของ homozygote เท่ากับกำลังสองของความถี่ของยีน พบความถี่จีโนไทป์แกะเพศเมีย (ewe) ของ Hb AA Hb AB และ Hb BB เท่ากับ 0.4 0.1 และ 0.5 ตามลำดับ ความถี่จีโนไทป์แกะเพศผู้ (ram) ของ Hb AA Hb AB และ Hb BB เท่ากับ 0.4 0.25 และ 0.35 ตามลำดับ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosities) ประมาณ 0.48 และ 0.43 ในแกะและแพะ ตามลำดับ (Salako *et al.*, 2007)

การศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบินของแกะ จำนวน 36 ตัว โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแบ่งเจล พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิด คือ Hb AA 89.9 เปอร์เซ็นต์ และ Hb AB 11.1 เปอร์เซ็นต์ ตามกฎสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ความถี่ของอัลลีล A และ B เท่ากับ 0.94 และ 0.06 ตามลำดับ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี เท่ากับ 0.218 ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ไม่ขึ้นกับลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait) เช่น ความยาวของขาและขน (Akinyemi and Salako, 2010)

Cigremis *et al.* (2008) ศึกษา รูปแบบของอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของฮีโมโกลบินของเม่น (*Hystrix cristata*) เปรียบเทียบกับคนปกติ พบว่าฮีโมโกลบินของเม่น มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ไกลกว่าฮีโมโกลบินของคน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินชนิดต่างๆมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าแตกต่างกันเนื่องจากมีประจุต่างกันการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินในครั้งนี้แสดงให้เห็นความแตกต่างของฮีโมโกลบินทั้ง ๒ สปีชีส์มีประจุต่างกัน แต่ผลที่ได้มีความแตกต่างจากการศึกษาฮีโมโกลบินเปรียบเทียบระหว่างคนและเม่นแคระ (*Erinaceus romanicus*) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแบ่งเจล พบว่าฮีโมโกลบินของเม่นแคระมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ใกล้กว่าฮีโมโกลบินของคนและมีการละลายต่ำกว่าของคน (Maisar, 1970)

การศึกษา ค่าโลหิตวิทยาและ ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของกระรอกเปอร์เซีย (*Sciurus anomalus*) จำนวน 30 ตัว พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย มีค่าเท่ากับ 46.0 ± 6 เปอร์เซ็นต์

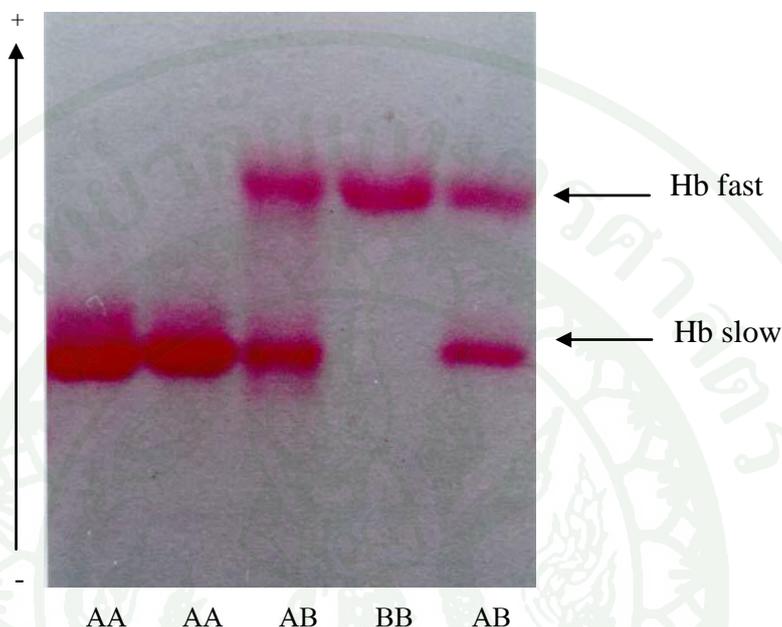
และความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.5 ± 1.5 กรัมต่อเดซิลิตรเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิด คือ Hb A มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และ Hb F ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของฮีโมโกลบินของกระรอกกับคนและกระต่าย พบว่ามีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าใกล้เคียงกับคนและมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกเร็วกว่ากระต่าย ฮีโมโกลบินของกระรอกมีประจุลบมากกว่ากระต่าย อาจเนื่องมาจากการที่มีกรดอะมิโนที่มีประจุลบในสายฮีโมโกลบิน (Khazraimnia *et al.*, 2008) Duffy *et al.* (1986) รายงานการศึกษาฮีโมโกลบินของกระรอกทั่วไป (ground squirrel) โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบิน ฟีโนไทป์ชนิดเดียวที่ประกอบด้วย 1 แถบ ซึ่งมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ไกลกว่าฮีโมโกลบินของคนเล็กน้อย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฮีโมโกลบินของสัตว์ชนิดต่างๆในประเทศไทย

Sittivilai *et al.* (2004) ศึกษาหน้าหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ของสัตว์ปีกเลี้ยง (domestic fowl) โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบ มีหน้าหนักโมเลกุล 51,784 คาลตันเมื่อใช้เทคนิคไซเดียม ไดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า หน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสัตว์ปีกเลี้ยงมีหน้าหนักโมเลกุล 12,519 และ 10,984 คาลตัน

อรพรรณ (2546) ศึกษาฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางเคมีของฮีโมโกลบิน โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน (Kamphaengsaen beef cattle) และกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*) โดยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส และเทคนิคไซเดียม ไดดีซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน และกระบือปลัก มีหน้าหนักโมเลกุล 64,565 คาลตัน เมื่อใช้ เทคนิค เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบแต่ละหน่วยย่อยของ โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลัก มีหน้าหนักโมเลกุล 11,150 คาลตัน เมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบิน ฟีโนไทป์ 3 ชนิดในโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน คือ Hb AA จำนวน 8 ตัว, Hb BB จำนวน 2 ตัว และ Hb AB จำนวน 5 ตัว ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ของแถบฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยที่ Hb AA ประกอบด้วย Hb slow เพียงอย่างเดียว และ Hb BB ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว ขณะที่ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow (ดังภาพที่ 13) พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิดในกระบือปลัก เมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ Hb BB 11 ตัว และ Hb AB 1 ตัว ซึ่งฮีโมโกลบินทั้งสองประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow โดยมีอัตราส่วนเป็น 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ จากการศึกษาด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

แอมโฟไลต์ พีเอช 3-10 พบว่าฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน Hb AA มีค่า pI เท่ากับ 7.27 และ 7.48 และ Hb BB มีค่า pI เท่ากับ 6.8 และ 6.9 ขณะที่ Hb AB มีค่า pI เท่ากับ 6.82, 7.05, 7.27 และ 7.48 ส่วนฮีโมโกลบินของกระบือปลัก Hb BB และ Hb AB มีค่า pI เท่ากับ 6.82 และ 7.27 ตามลำดับ



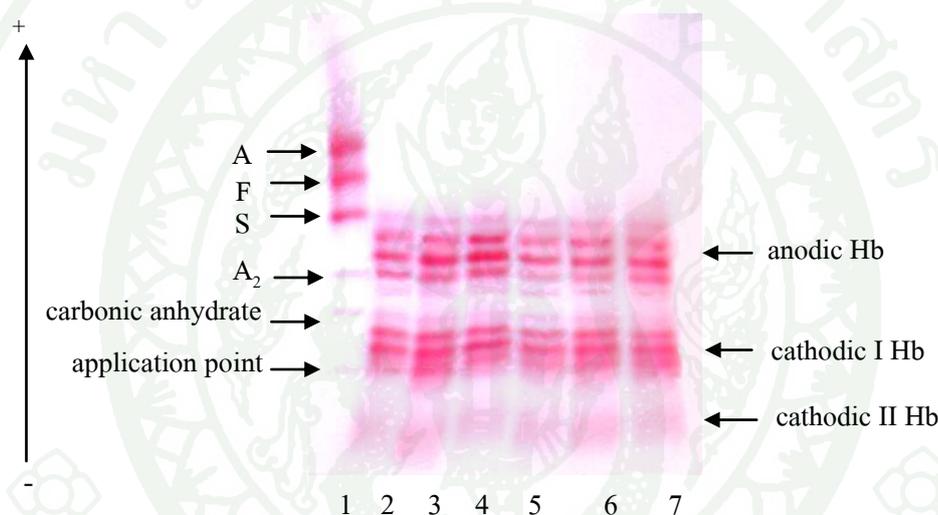
ภาพที่ 13 แสดงฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที) Hb AA ประกอบด้วย Hb slow เพียงอย่างเดียว Hb BB ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว ขณะที่ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow

ที่มา: อรพรรณ (2546)

สุวิษ และคณะ (2548) ศึกษาฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของโคเนื้อ โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบ Hb C เพิ่มเติม มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เท่ากับ Hb fast ของกระบือปลัก นอกจากนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ฮีโมโกลบิน กับผลผลิตของโคพื้นเมืองและโคพันธุ์ผสมชิมเมนทัลผสมบราห์มัน (Simmental×Brahman crossbred) โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 5 ชนิด ในโคพื้นเมืองประกอบด้วย Hb AA 35.59 เปอร์เซ็นต์ Hb AB 28.81 เปอร์เซ็นต์ Hb AC 20.34 เปอร์เซ็นต์ Hb BB 11.6 เปอร์เซ็นต์ และ Hb BC 3.39 เปอร์เซ็นต์ และพบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 3 ชนิด ในโคพันธุ์ผสมชิม

เมณฑลผสมบราห์มัน ประกอบด้วย Hb AA 50.98 เปอร์เซ็นต์ Hb AB 45.10 เปอร์เซ็นต์ และ Hb BB 3.92 เปอร์เซ็นต์ โคพื้นเมือง Hb AB ให้น้ำหนักแรกเกิดสูงที่สุด Hb BB ให้น้ำหนักแรกเกิดต่ำที่สุด และ Hb AC ให้อัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนโคพันธุ์ผสมชิมเมณฑลผสมบราห์มัน Hb AA ให้น้ำหนักมากกว่า Hb AB ที่แรกเกิด 200 วัน 400 วัน และ 600 วัน (Boonprong *et al.*, 2007)

เกรียงไกร (2548) ศึกษาคุณสมบัติ ทางชีวเคมีบางประการ ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย ของปลานิลมีค่า เท่ากับ 25.80 ± 3.71 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลานิลมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.05 ± 1.08 กรัมต่อเดซิลิตรเมื่อใช้เทคนิค เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ 9-11 ชนิดในปลานิล (ดังภาพที่ 14)



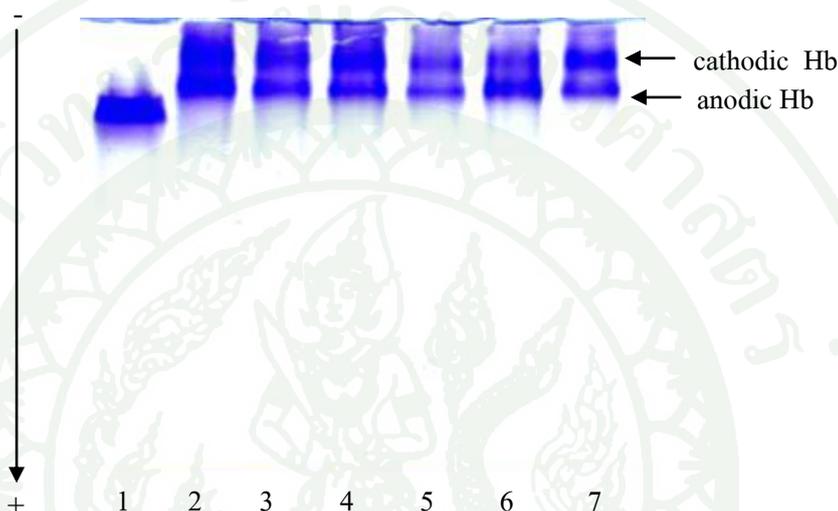
ภาพที่ 14 แสดงฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของปลานิล โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที) เลนที่ 1 แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA2) ของคน เลนที่ 2-7 แสดงฮีโมโกลบินของปลานิล

ที่มา: เกรียงไกร (2548)

เนทีฟพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสามารถแบ่งฮีโมโกลบินเป็น 2 กลุ่ม ตามการเคลื่อนที่ในระบบอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ กลุ่มแอโนดิก และกลุ่มแคโทดิกมีประมาณ 45.72 และ 54.28 เปอร์เซ็นต์ ของฮีโมโกลบินทั้งหมด เมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถแบ่งกลุ่มแคโทดิกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือกลุ่มแคโทดิก I และกลุ่มแคโทดิก II มีประมาณ 47.62 และ

6.66 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมด กลุ่มแคโทดิก เคลื่อนที่ในระบบบัลลิสต์อิเล็กโตรโฟรีซิส สจากขั้วลบไปยังขั้วบวกได้ ช้ากว่ากลุ่ม แอนโอดิก (เกรียงไกร, 2548) (ดังภาพที่ 15)

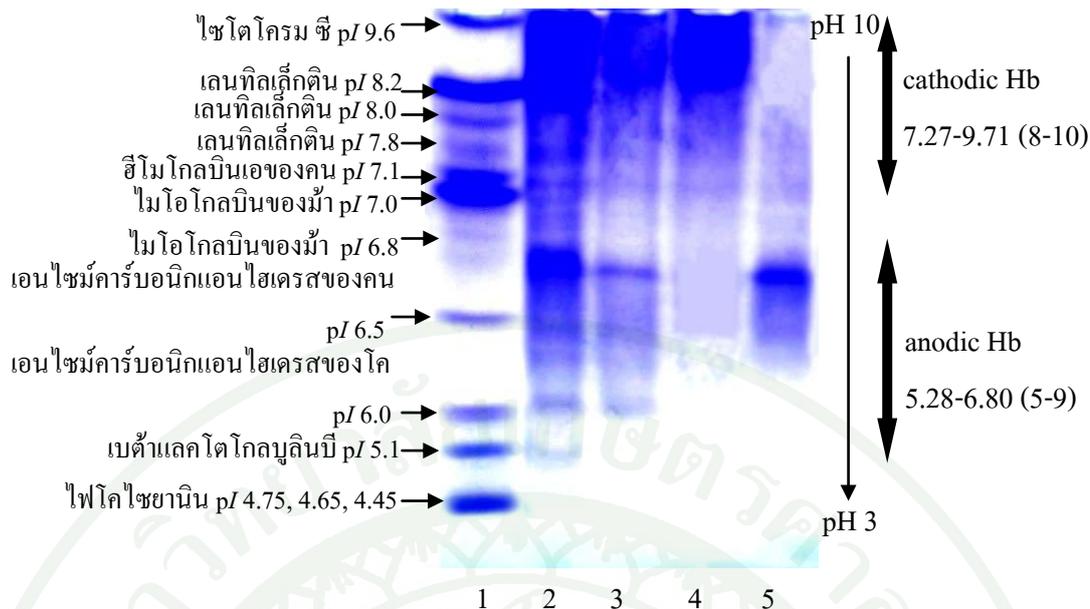
จากการศึกษาด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง พบว่าฮีโมโกลบินกลุ่มแอนโอดิกมีค่า pI 5-9 ค่า ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 5.28-6.80 และกลุ่มแคโทดิก มีค่า pI 8-10 ค่า มีค่าอยู่ในช่วง 7.27-9.71 (เกรียงไกร, 2548) (ดังภาพที่ 16)



ภาพที่ 15 แสดงฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของปลานิล โดยเทคนิคเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 12% T 4% C (200 โวลท์คงที่ 120 มิลลิแอมแปร์ 40 นาที) เลนที่แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA2) ของคน เลนที่ 2-7 แสดงฮีโมโกลบินของปลานิล

ที่มา: เกรียงไกร (2548)

การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินโดยเทคนิค เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเดกซ์ G-100 พบว่าฮีโมโกลบินของปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุล 50,792 ดาลตัน โดยเทคนิค โซเดียมโดดีลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลานิล มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 5,415 ดาลตัน (ดังภาพที่ 17) และโดยเทคนิคแมสเปกโตรเมทรีพบว่าฮีโมโกลบินของปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุล 62,954 ดาลตัน ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 15,340 15,621 และ 16,126 ดาลตัน ซึ่งเป็นสายของกลอบิน 3 ชนิด คือ α_1 , α_2 และ β ตามลำดับ (เกรียงไกร, 2548)

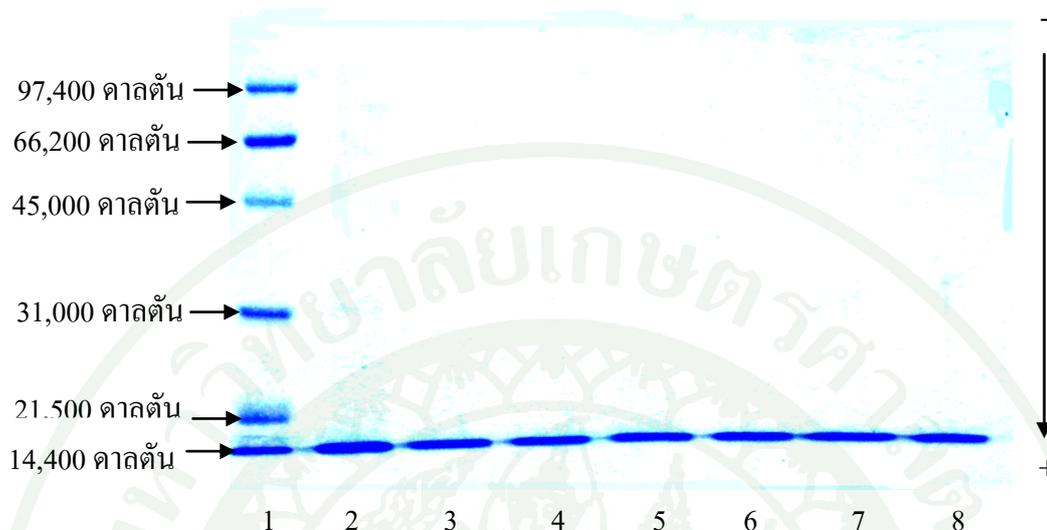


ภาพที่ 16 ค่า pI ของฮีโมโกลบินของปลานิล โดยวิธี IEF ด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป ขนาด 10 หลุม (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.) แอมโฟไลท์ พีเอช 3-10 เลนที่ 1 แสดง Broad Range IEF standard pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.) เลนที่ 2 แสดงฮีโมโกลบินของปลานิล เลนที่ 3 แสดงฮีโมโกลบินของปลานิลที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเดกซ์ G-100 และเลนที่ 4-5 แสดงฮีโมโกลบินของปลานิลที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ โดยใช้ DEAE-เซลลูโลส

ที่มา: เกรียงไกร (2548)

นันทวรรณ (2549) ศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินกระบือปลัก โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระบือปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ ส่วนฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระบือแม่น้ำมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB ซึ่งตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับเช่นเดียวกัน (ดังภาพที่ 18) เนื่องจาก Hb fast มีประจุสุทธิเป็นลบมากกว่า Hb slow และ Hb slow ประกอบด้วยกรดอะมิโนส่วนใหญ่เป็นอาร์จินีน หรือไลซีน นอกจากนี้สายอัลฟาสองที่พบใน Hb slow มีค่า pI สูงกว่าสายอัลฟาหนึ่ง ที่พบใน

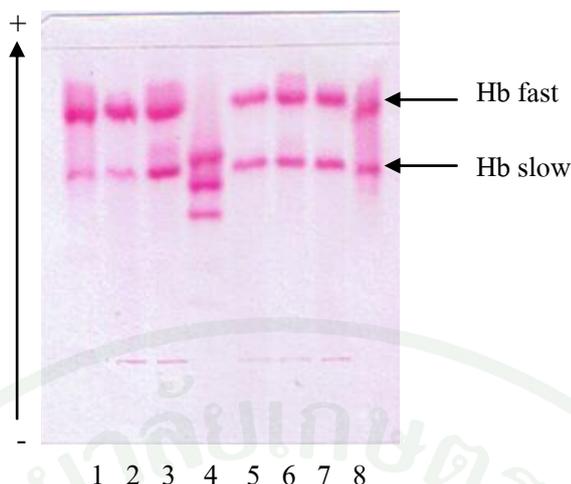
Hb fast เพราะสายอัลฟาหนึ่งมีกรดอะมิโนทริปโตเฟน ซีสเตอีน และไลซีนที่ต่างจากสายอัลฟาของ Hb fast จึงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วบวกได้เร็วกว่า Hb slow



ภาพที่ 17 แสดงผลน้ำหนักรโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลานิล โดยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 12% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 120 มิลลิแอมแปร์ เวลา 40 นาที) เลนที่ 1 แสดง low range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) และเลนที่ 2-8 แสดงฮีโมโกลบินของปลานิล

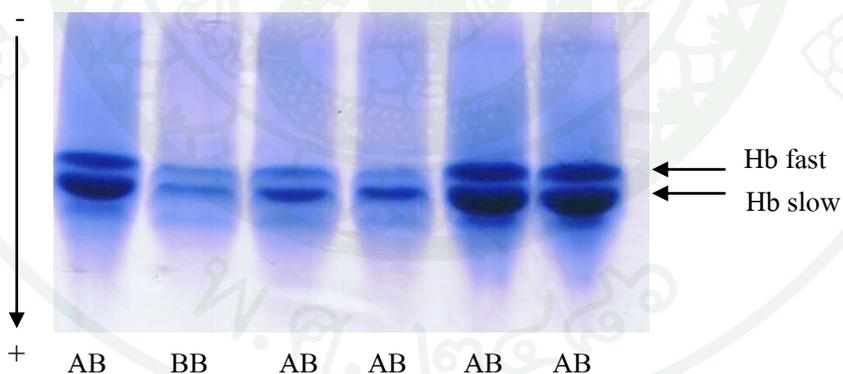
ที่มา: เกรียงไกร (2548)

การศึกษาฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของกระบือปลักและกระบือแม่น้ำ โดยใช้วิธีเพปไทด์อะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของกระบือปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB จำนวน 59 ตัว (เพศผู้ 27 ตัวและเพศเมีย 32 ตัว) และ Hb AB จำนวน 12 ตัว (เพศผู้ 4 ตัวและเพศเมีย 8 ตัว) ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ (ดังภาพที่ 19) ส่วนฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของกระบือแม่น้ำมี 2 ชนิด คือ Hb BB จำนวน 3 ตัว (เพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว) และ Hb AB จำนวน 2 ตัว (เพศผู้ 1 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว) ซึ่งตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก พบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับเช่นเดียวกัน ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับผลที่ได้จากเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส (นันทวรรณ, 2549)



ภาพที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักและกระป๋องแม่น้ำ โดยเทคนิคเซลล์โลสอะซีเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 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 เลขที่ 1 และ 2 แสดง Hb AB เลขที่ 3, 5, 6, 7 และ 8 แสดง Hb BB และเลขที่ 4 แสดงสารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA2) ของคน (Helena Laboratories, France)

ที่มา: นันทวรรณ (2549)

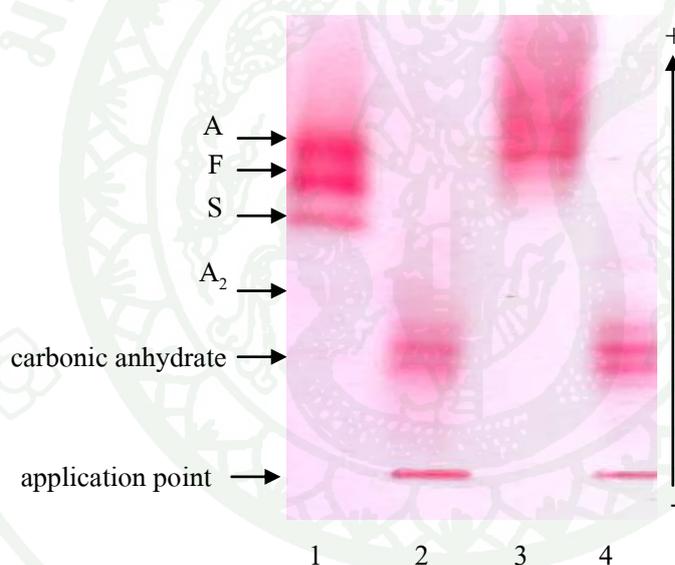


ภาพที่ 19 แสดงชนิดของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักโดยเทคนิคเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 12% T 4% C ที่พีเอช 8.3 (200 โวลท์คงที่ 60 มิลลิแอมป์ต่อเจล 1 แผ่น 40 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ

ที่มา: นันทวรรณ (2549)

จากเทคนิคเจลอิเล็กโตรเฟอริสซิส คอสม์โครมาโตกราฟี พบว่าฮีโมโกลบินกระบือปลัก มีน้ำหนักโมเลกุล 46,209 คาลตัน จากเทคนิคไซเดียม โดดีซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าแต่ละหน่วยย่อย ของฮีโมโกลบินกระบือปลักและกระบือแม่น้ำ มีน้ำหนักโมเลกุล 13,227 คาลตัน และ 13,525 คาลตัน จากเทคนิคเมสสเปกโตรเมตรี พบว่า ฮีโมโกลบินของกระบือปลักมีน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินแบบ monomer dimer trimer และ tetramer มีค่าเท่ากับ 15,359.67 30,894.40 45,912.42 และ 60,942.79 คาลตัน ตามลำดับ (นันทวรรณ, 2549)

คมสัน (2551) ศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในปลาชุก (*Clarias batrachus*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*) ชนิดละ 30 ตัว โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต (ดังภาพที่ 20) พบว่าฮีโมโกลบินของปลาชุกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียน

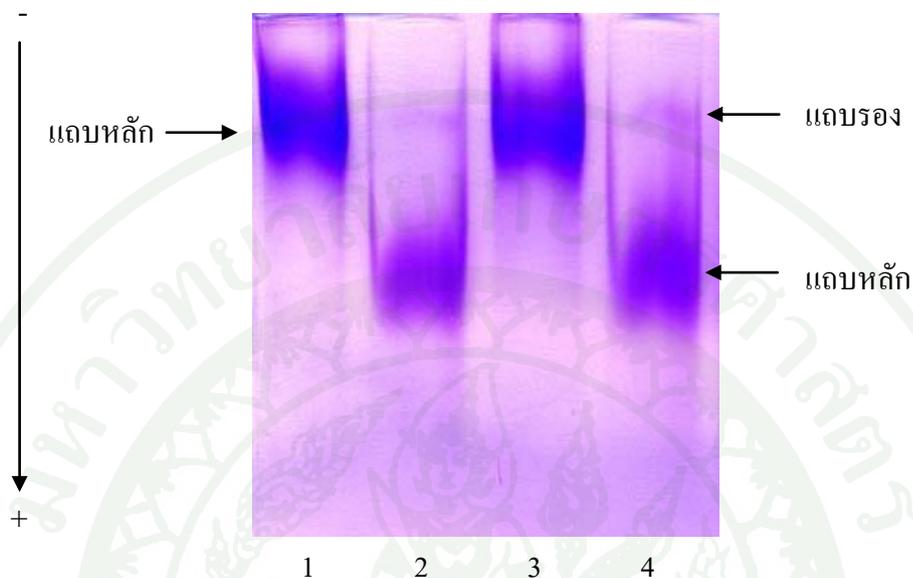


ภาพที่ 20 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมโกลบินของคน (เลนที่ 1) ปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 4) และปลาชุก (เลนที่ 3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)

ที่มา: คมสัน (2551)

การศึกษาฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของปลาชุกและปลาตะเพียน โดยใช้วิธีที่พอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากสารละลายฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G-

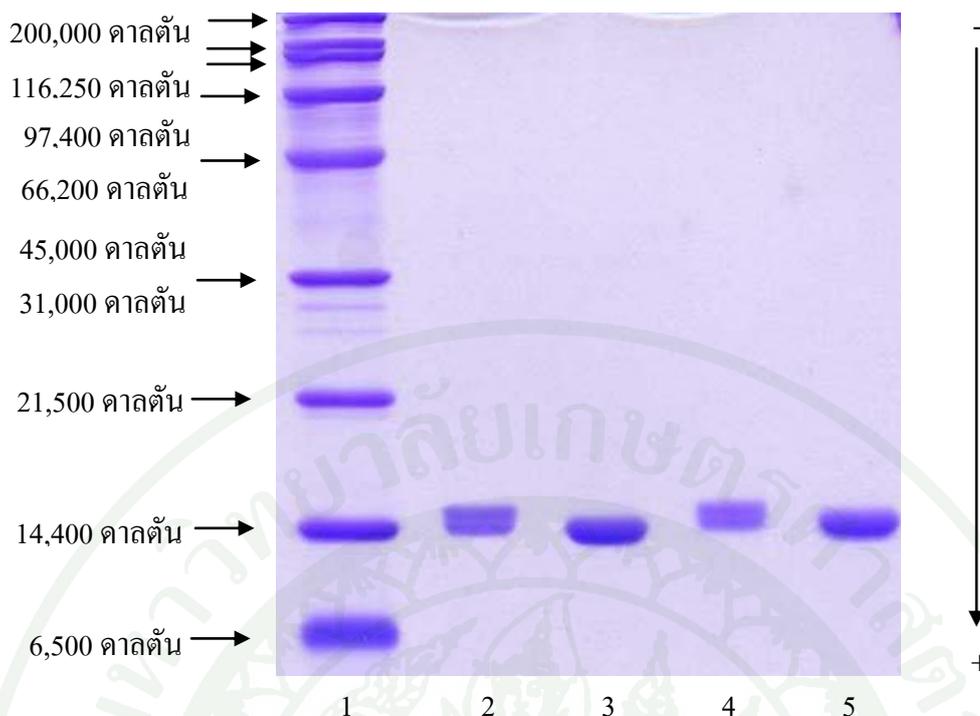
100 พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของ ทั้งปลาฉลามและปลาตะเพียน มีเพียงชนิดเดียว ฮีโมโกลบิน ฟีโนไทป์ของปลาฉลามมี 2 แถบที่ประกอบด้วยฮีโมโกลบินหลัก 98 เปอร์เซ็นต์ และฮีโมโกลบินรอง 2 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของปลาตะเพียนมี 1 แถบ (ดังภาพที่ 21) (คมสัน, 2551)



ภาพที่ 21 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของปลาตะเพียน (เลนที่ 1 และ 3) และ ปลาฉลาม (เลนที่ 2 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่พีเอช 8.3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซึบดูอาร์-250

ที่มา: คมสัน (2551)

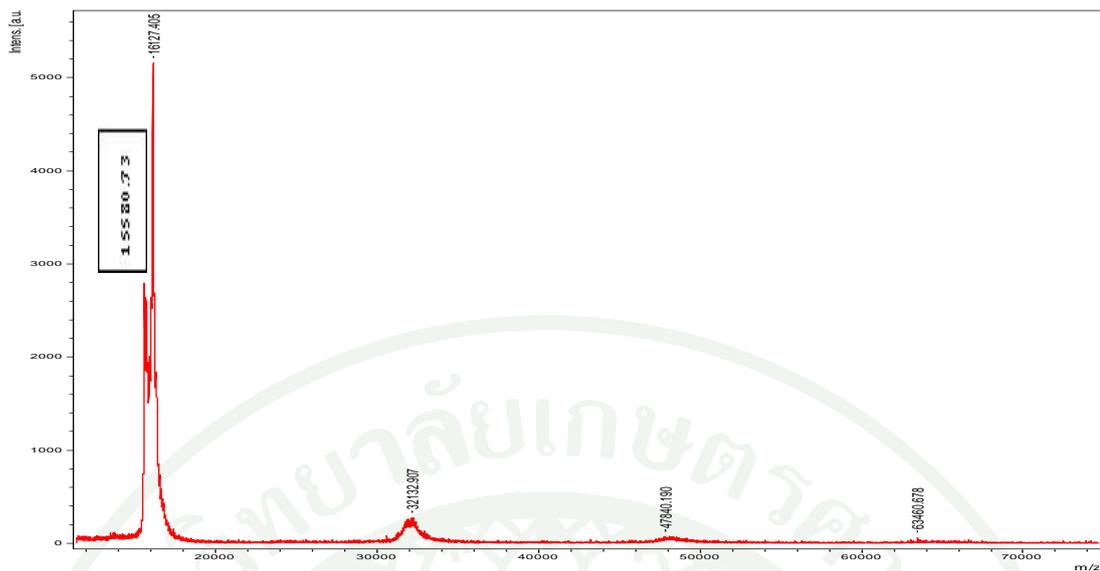
เมื่อใช้วิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสศึกษาหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน พบว่าหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลาฉลามมีน้ำหนักโมเลกุล 15,260 ดาลตันและ 14,740 ดาลตัน และหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 14,630 ดาลตัน (ดังภาพที่ 22) (คมสัน, 2551)



ภาพที่ 22 แสดงผลน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลาฉลาม (เลนที่ 2 และ 4) และปลาตะเพียน (เลนที่ 3 และ 5) และเลนที่ 1 แสดง broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 18% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมป์ต่อเจล 1 แผ่น เวลา 45 นาที)

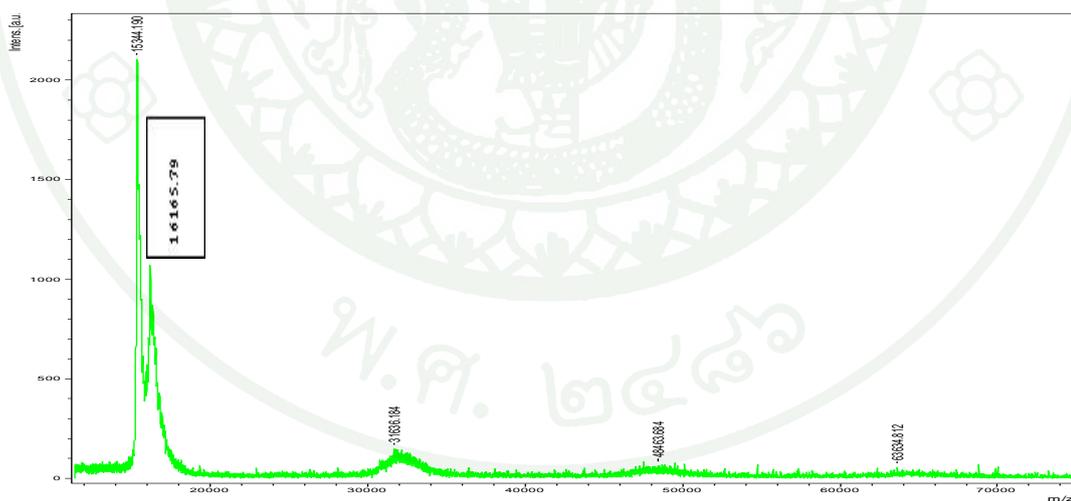
ที่มา: คมสัน (2551)

วิธีแมสสเปกโตรเมทรีพบว่าฮีโมโกลบินของปลาฉลามมีน้ำหนักโมเลกุล 63,460.678 ดาลตัน (ดังภาพที่ 23) ส่วนของปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 63,634.812 ดาลตัน (ดังภาพที่ 24) วิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าฮีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 63,096 ดาลตัน และ 64,565 ดาลตัน ตามลำดับ ปลาฉลามมีความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ยเท่ากับ 8.17 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าปลาตะเพียนที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.83 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร แต่ค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยของปลาฉลามเท่ากับ 30.17 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ซึ่งต่ำกว่าของปลาตะเพียนที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.45 ± 1.70 เปอร์เซ็นต์ (คมสัน, 2551)



ภาพที่ 23 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยอีโมโกลบินปลาตุก โดยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

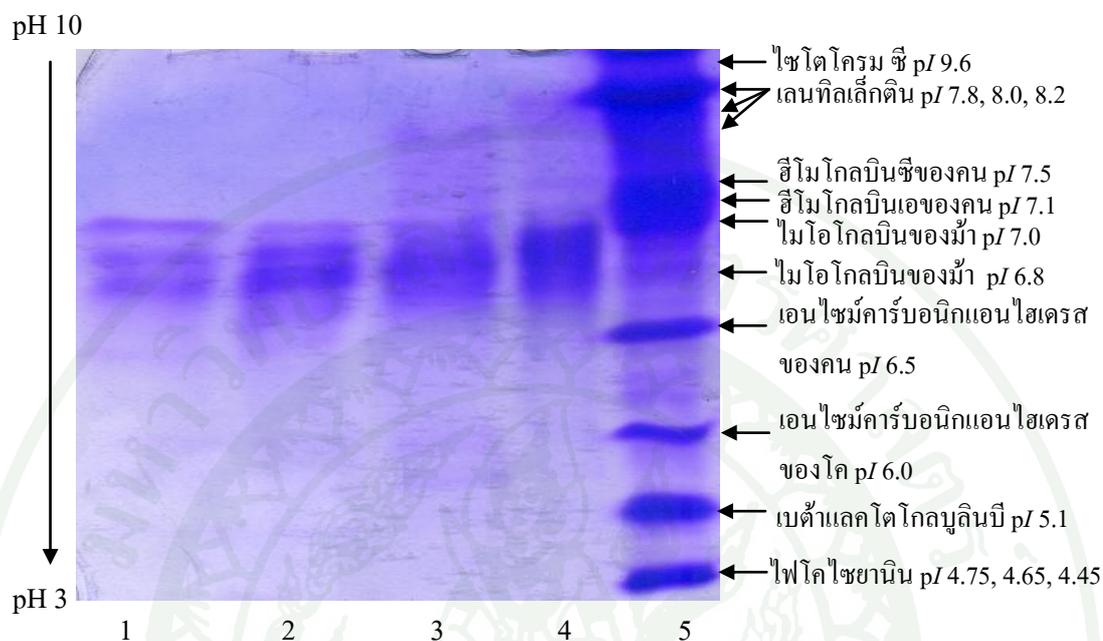
ที่มา: คมสัน (2551)



ภาพที่ 24 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยอีโมโกลบินปลาตะเพียน โดยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

ที่มา: คมสัน (2551)

อีโมโกลบินของปลาตุกและปลาตะเพียน มีค่า pI อยู่ในช่วง 5.5-8.0 และ 5.8-7.0 ตามลำดับ (ดังภาพที่ 25) (คมสัน, 2551)



ภาพที่ 25 แสดงค่า pI ของอีโมโกลบินปลาตุกและปลาตะเพียน โดยวิธีไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซึ่งด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) แอมโฟไลต์พีเอช 3-10 เลนที่ 1 และ 3 แสดงอีโมโกลบินของปลาตะเพียนและปลาตุก เลนที่ 2 และ 4 แสดงอีโมโกลบินของปลาตะเพียนและปลาตุกที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี และเลนที่ 5 แสดง broad range standard pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

ที่มา: คมสัน (2551)

โปรตีน

โปรตีนจำแนกได้หลายประเภท เช่น จำแนกตามโครงสร้าง, จำแนกตามองค์ประกอบทางเคมี
 3. จำแนกตามกายภาพ

โครงสร้างโปรตีนสามารถจำแนกตามลักษณะและองค์ประกอบได้ดังนี้คือ 1. โครงสร้างปฐมภูมิ เป็นโครงสร้างของกรดอะมิโนของสายพอลิเปปไทด์แบบเดี่ยว (single polypeptide chain) 2. โครงสร้างทุติยภูมิ เป็นโครงสร้างของเฮลิกซ์มีลักษณะเป็นเกลียวของสายอัลฟาเฮลิกซ์ (α -helix chain) 3. โครงสร้างตติยภูมิ เป็นโครงสร้างที่ม้วนพับกันของ เฮลิกซ์ ทำให้เกิดเป็นรูปแบบที่แตกต่างกัน เช่น เป็นก้อนกลม (globular) ที่พบในเส้นใยกล้ามเนื้อ (myoglobin) และ เป็นเส้นตรง (linear) ที่พบในไฟบริโนเจน (fibrinogen) ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นลักษณะของ มอโนเมอร์ 4. โครงสร้างจตุรภูมิ เป็นโครงสร้างที่รวมกันของ มอโนเมอร์ตั้งแต่สองหรือมากกว่า เช่น ไคเมอร์ ที่พบในครีอะติน ไคเนส (creatine kinase) และ เตตระเมอร์ ที่พบในฮีโมโกลบิน

โปรตีนจำแนกตามองค์ประกอบพบเคมีได้ดังนี้คือ 1. โปรตีนเชิงเดี่ยว (simple protein) ประกอบด้วยธาตุพื้นฐานของกรดอะมิโน เช่น คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน และ ซัลเฟอร์โปรตีนเชิงผสม (conjugate protein) เป็นการจับกันอย่างแน่นของธาตุพื้นฐานเป็นหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) หรือ สารประกอบอื่นๆ เช่น เมทัลโลโปรตีน (metalloproteins) เช่น เฟอร์ริติน (ferritin) จับกับเหล็ก (iron) ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) ในเคซีน (casein) ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ในไกลโคฮีโมโกลบิน (glycohemoglobin) นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) เช่น โปรตีนในไรโบโซม (ribosomal protein) และไลโปโปรตีน (lipoprotein) ในส่วนของไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (high-density lipoprotein) เช่น ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) โคเลสเตอรอล (cholesterol) และโคเลสเตอรอล เอสเทอร์ (cholesterol ester)

โปรตีนจำแนกตามกายภาพ เช่น การละลายน้ำและเกลือ (water and salt solubility) ความหนาแน่น (density) น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) (Kaneko *et al.*, 1997)

ซีรัมโปรตีน (Serum Protein)

ซีรัมโปรตีน มีองค์ประกอบเหมือนกับพลาสมาโปรตีนเกือบทุกชนิดแต่ไม่มีปัจจัยการแข็งตัวของเลือดชนิดไฟบริโนเจน (fibrinogen) ปัจจัยที่ 5 และ 8 (factor V และ VIII) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ใช่เอนไซม์ส่วนใหญ่ใช้ไปในขบวนการแข็งตัวของเลือด มีประจุสุทธิเป็นลบ ที่พีเอชเป็นค่า (pH 8.6) จึงมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า จากขั้วลบ (cathod) ไปยังขั้วบวก (anode) เพราะความหนาแน่นประจุของโปรตีนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันจึงสามารถแยกออกจากกัน โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส สติทิส ทางและอัตราการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับชนิดของประจุบวกหรือลบของโปรตีน ขนาดของโปรตีน ความเข้มข้น (intensity) ของสนามไฟฟ้า และตัวค้ำจุน (support medium) (Kaneko *et al.*, 1997) ซีรัม

โปรตีนใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงในชีวเคมีคลินิก เป็นวิธีที่นิยมใช้ทางคลินิกการแพทย์ ใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบซีรัมโปรตีนในโรคต่างๆ ถึงแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเพียงเล็กน้อยในการพิจารณาวินิจฉัยโรคที่จำเพาะ ในบางรายทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญช่วยทำให้การพิจารณาโรคบางโรคแคบลงซึ่งอาจแสดงลักษณะที่จำเพาะของโรคได้ มีประโยชน์ในการช่วยในการวินิจฉัยโรค (Kaneko *et al.*, 1997; Thrall *et al.*, 2004) วิธีการทดสอบซีรัมโปรตีนเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส มีหลายชนิด ขึ้นกับตัวค้ำจุน เช่น เซลลูโลสอะซีเตต อะกาโรส (agarose) แป้ง (starch gel) และพอลิอะครีลาไมด์เจล (Kaneko *et al.*, 1997)

เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส

เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไปและ ง่ายตรง แต่อะกาโรส อิเล็กโตรโฟรีซิส ให้ผลดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามทั้ง เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส และอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสยังกนิยมนำใช้อย่างกว้างขวางในชีวเคมีคลินิก อนุภาคโปรตีนจะมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วบวกและขั้วลบ ขึ้นกับปัจจัยหลายชนิดที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งประจุและตัวค้ำจุน ซีรัมโปรตีนมีประจุเป็นลบ ในบัฟเฟอร์บาร์บิตอล (barbital buffer) ที่พีเอช 8.6 จึงมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ไปยังขั้วบวก โดยอัลบูมิน เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ได้ไกลที่สุด เนื่องจากมีประจุเป็นลบมากในสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่เข้าใกล้ขั้วบวก ในขณะที่ กลอบูลินมีประจุเป็นลบน้อยจึงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ได้ช้ากว่าอัลบูมินและสามารถแยกออกมาเป็น อัลฟา เบต้า และแกมมา-กลอบูลินตามลำดับ โดยที่แกมมา-กลอบูลินอาจจะไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ไป ยังขั้วลบ กลอบูลินสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามการ เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า คือ อัลฟา เบต้า และแกมมา-กลอบูลินตามลำดับ ในสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างของกลอบูลินขึ้นอยู่กับสปีชีส์ ของสัตว์แต่ละชนิด เช่น บางชนิดอาจมี 1 หรือ 2 อัลฟา เบต้า หรือ แกมมา-กลอบูลิน (Kaneko *et al.*, 1997; Rocco, 2005)

หลังจากแยกด้วย อิเล็กโตรโฟรีซิส โปรตีนสามารถย้อมด้วยสีจำเพาะ เมื่อทำการย้อมโปรตีนและทำพื้นหลังให้ใส หลังจากล้างสีย้อมออกจะพบโปรตีนปรากฏเป็นแถบของอัลบูมิน และหลายๆแถบของกลอบูลิน จากนั้นทำการวัดโดยใช้ densitometer แต่ละส่วนคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด และคำนวณกลับเป็นปริมาณ หรือความเข้มข้น สุทธิ หลังจากทำการวัดความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนทั้งหมด การเคลื่อนที่ของอัลบูมินและกลอบูลินในสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้สัดส่วนของอัลบูมินต่อกลอบูลิน (Albumin-to-Globulin, A:G Ratio) เพื่อพยากรณ์ความผิดปกติของโรคต่างๆได้ (Kaneko *et al.*, 1997)

รูปแบบซีรัมโปรตีน

โปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถบ่งชี้ภาวะโรคต่างๆได้ โดยที่โปรตีนของสัตว์ชนิดต่างๆสังเคราะห์ขึ้นภายใต้การควบคุมทางพันธุกรรม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเกิดขึ้นเฉพาะตัวและสปีชีส์ การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นผลสะท้อนที่เกิดขึ้นจากความแตกต่างของสัตว์แต่ละสปีชีส์ ถึงแม้จะเป็นรูปแบบซีรัมโปรตีนที่ปกติตาม รูปแบบซีรัมโปรตีนที่ปกติสามารถแบ่งตามลักษณะการแยกได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นพรีอัลบูมิน อัลบูมิน และกลอบูลิน (Jain, 1993, Kaneko *et al.*, 1997)

1. พรีอัลบูมิน (Prealbumin)

พรีอัลบูมิน สังเคราะห์ขึ้นจากตับ มีน้ำหนักโมเลกุล 54,500 ดาลตัน มีการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าได้เร็วที่สุด พบได้ในคนและสัตว์ปีกบางชนิด แต่ไม่พบในสัตว์เลี้ยง พรีอัลบูมินมีหน้าที่ในการจับและขนส่ง ไทรอกซิน (thyroxine binding prealbumin-TBPA) ดังนั้นจึงมีชื่ออีกชื่อ เรียกว่าทรานส์ไทรีติน (transthyretin) (Kaneko *et al.*, 1997, 2008) อย่างไรก็ตามมีโปรตีนเหมือนพรีอัลบูมิน (prealbumin-like protein) ที่เคลื่อนที่ในส่วนอัลฟา₂ ทำหน้าที่ในการขนส่งไทรอกซินในสุนัข (Jain, 1986) นอกจากนี้พรีอัลบูมินมีหน้าที่ในการจับกับวิตามิน เอ หรือเรตินอล (retinol) และขนส่งวิตามิน เอ จากตับ (Jain, 1986) การลดลงของระดับพรีอัลบูมินสามารถเกิดได้จากประสิทธิภาพหน้าที่การทำงานของตับลดลง (impaired liver function) และโรคตับ (liver disease) ภาวะพร่องโปรตีน (protein deficiency) (Jain, 1986; Kaneko *et al.*, 2008) การเพิ่มขึ้นของระดับพรีอัลบูมินพบได้ในกลุ่มอาการของโรคไต (nephritic syndrome) ในม้าที่มีการติดเชื้อเฉียบพลัน (acute infection) ไข้ลงกีบ (laminitis) และเนื้องอกชนิดร้ายแรง (malignant tumor) (Jain, 1986; Kaneko *et al.*, 2008)

2. อัลบูมิน (Albumin)

2.1 โครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมี

อัลบูมินเป็นส่วนที่พบเด่นชัดมากที่สุดของซีรัมโปรตีนเมื่อแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ในสัตว์มีส่วนประกอบประมาณ 5-50 เปอร์เซ็นต์ของซีรัมโปรตีนทั้งหมด แต่ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ไม่ใช่คน (nonhuman primate) มีส่วนประกอบประมาณ 60-67 เปอร์เซ็นต์ของซีรัมโปรตีนทั้งหมด โครงสร้าง เป็นรูปแบบตติยภูมิ ลักษณะเป็นรูปทรงกลม (globoid) หรือ รูปกลมรี (ellipsoid) ซีรัมอัลบูมินในวัว (bovine serum albumin) สังเคราะห์และหลั่งมาจากเซลล์ตับ ประกอบด้วย

กรดอะมิโน 585 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 66,400 ดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 5.6 (Jain, 1986; Kaneko *et al.*, 2008) จากการศึกษาทางด้านผลึกวิทยา (x-ray crystallography) ของซีรัมอัลบูมินในคน พบโครงสร้างเป็นโปรตีนรูปหัวใจที่มี 3 โดเมน (domain) ที่เหมือนกัน ประกอบด้วยอัลฟา เฮลิกซ์ (α -helix) 67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่มีเบต้าชีต (β -sheet) ลักษณะโครงสร้างปฐมภูมิของอัลบูมิน ประกอบด้วยหน่วยกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) ทั้งหมด 35 หน่วย มีเป็นจำนวนลซึ่ ซึ่งหลังจากการ สร้างพันธะไดซัลไฟด์ภายในโครงสร้างระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอีนหน่วยที่ 14 กรดอะมิโนซิสเตอีน ที่เป็นอิสระอยู่ในส่วนที่ไม่ได้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ดังนั้นอัลบูมินอาจจะเป็้สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญเลือด (Kaneko *et al.*, 2008)

อัลบูมินเมื่อแยกด้วยเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสจะเห็นเป็นแถบเดียวกัน แต่ถ้าใช้วิธี แอ่งเจลสามารถแยกและ พบลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) ของอัลบูมิน อัลบูมินเห็นเป็นแถบเด่นชัดและเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวก ซีรัมโปรตีนในเกือบ ทุกสปีชีส์มีส่วนของ กรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด (acidic) สูงและมีขนาดเล็ก ดังนั้นการผันแปร ระหว่างสปีชีส์เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของอัลบูมินบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ขึ้นกับ สัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรดหรือเบส (basic) อัลบูมินในหมู่มีกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด 97 หน่วย และเบส 83 หน่วย ขณะที่อัลบูมินในแมวมีกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด 100 หน่วย และเบส 75 หน่วย ทำให้การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของอัลบูมินในแมวเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าอัลบูมินใน (Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

สิ่งสำคัญที่พบขีดสูงสุดของกราฟของอัลบูมินมีความคมชัดเป็นการบ่งบอกถึงคุณภาพของส่วน เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ความชัน (slope) หรือ ความคมชัดของ ขีดสูงสุดของกราฟ ของอัลบูมินมีประโยชน์สำหรับแยกความแตกต่างจากขีดสูงสุดของกราฟของมอนอโคลนอลโกลบูลิน (monoclonal globulin) ออกจากขีดสูงสุดของกราฟของพอลิโคลนอล (polyclonal) (Kaneko *et al.*, 1997)

2.2 น้ำที่และสรีรวิทยา

อัลบูมินทำหน้าที่ในการควบคุมและรักษาระดับออสโมติกของคอลลอยด์ (colloid osmotic pressure) ปริมาตรเลือด (blood volume) และขนส่งกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) โคลเลสเตอรอลกรดน้ำดี (bile acid) บิลิรูบิน พอร์ไฟริน คีโตสเตียรอยด์ (ketosteroid) ยาต่างๆ เช่น ยา

ปฏิชีวนะ เพนิซิลลิน แอสไพริน และ บาร์บิทูเรต (barbiturate) ฮิสตามีน (histamin) แคลอีน และ ธรรมชาติต่างๆ เช่น แคลเซียม คอปเปอร์ และ ซิงค์ (Jain, 1986; Thrall *et al.*, 2004; Kaneko *et al.*, 2008)

อัลบูมินสังเคราะห์ขึ้นที่ตับ ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อัลบูมินขึ้นกับ สารอาหาร ความสมดุลของฮอร์โมน และสภาพทั่วไปของตับ ตัวอย่างเช่นการสังเคราะห์อัลบูมินลดลงในกรณีที่อดอาหาร (fasting) หรือภาวะการขาดแคลนอาหาร (malnutrition) ไฮโปไทรอยดิซึม (hypothyroidism) และ โรคตับแข็ง (cirrhosis) (Jain, 1986) อัตราการเกิดเมแทบอลิซึมแตกต่างกันระหว่างสปีชีส์และมีค่าครึ่งชีวิต (half life) ในสัตว์ชนิดต่างๆอยู่ระหว่าง 1.9-19.40 วัน ค่าครึ่งชีวิต 1.9 วันในหนูเมาส์ (mouse) 2.5 วันในหนูแรท (rat) 2.8 วันในหนูตะเภา 7 วันในกระต่าย 8.20 วันในสุนัขและหมู 14.28 วันในแกะ 15.0 วันในคน 16.0 วันในลิงทโมน 16.5 วันในวัว และ 19.4 วันในม้ามีการศึกษาใช้สารไอโซโทป (radioactive isotope, I^{131}) เป็นเครื่องหมาย (marker) ในการติดตามอัตราการหมุนเวียนของซีรัมโปรตีน ที่มีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค ในอนาคตปริมาณอัลบูมินที่สังเคราะห์ขึ้นในแต่ละวันในสัตว์ทุกสปีชีส์รวมทั้งคนค่อนข้างคงที่ประมาณ 150-200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (Jain, 1993, Kaneko *et al.*, 2008)

การหมุนเวียนของอัลบูมิน (albumin turnover) มีความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ แต่ความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างการหมุนเวียนของอัลบูมินกับขนาดร่างกาย (body size) เนื่องจากมีนัยสำคัญทางคลินิก เกี่ยวกับการบวมขึ้นเนื่องจากมีความเข้มข้นของอัลบูมินในกระแสเลือดต่ำ (hypoalbuminemic edema) ซึ่งเกิดขึ้นเฉพาะในสัตว์ขนาดใหญ่ เนื่องจากมีการแทนที่ของอัลบูมินต่ำ ในสัตว์ขนาดเล็กมีการเกิดการบวมขึ้นเนื่องจากความเข้มข้นของอัลบูมินในกระแสเลือดต่ำ โดยเฉพาะในรายที่เกิดความดันโลหิตสูงในเส้นเลือดดำเวโน คาว (posterior vena caval hypertension) (Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

อัลบูมินเป็นส่วนที่ละลายได้ของพลาสมาโปรตีนทั้งหมด แต่ยกเว้นอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) และสลายเมื่อเนื้อเยื่อถูกเมแทบอลิซ (metabolized) (Kaneko *et al.*, 1997) ดังนั้นภาวะโรคที่ทำให้อัลบูมินลดลงอย่างมาก มีผลทำให้น้ำเคลื่อนที่ออกจากเส้นเลือด เข้าสู่ช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ (interstitial space) ทำให้เกิดการบวมขึ้น ความดันลดต่ำลง และเกิดการสะสมของของเหลวภายในช่องว่างของร่างกาย เช่น น้ำในช่องปอด (pleural effusion) และน้ำในช่องท้องหรือท้องมาน (ascites) อัลบูมินเป็นโปรตีนระยะเฉียบพลัน (negative acute phase protein) และมีความเข้มข้นต่ำลงเมื่อมีโรคติดเชื้อ (infectious) และอักเสบ (inflammation) เกิดขึ้น (เจลิเยว 2548; Kaneko *et al.*, 2008)

ภาวะอัลบูมินในเลือดต่ำ (hypoalbuminemia) เกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ 1. การสูญเสีย (selective loss) อัลบูมิน พบในกรณีการสูญเสียโปรตีนจากภาวะโรคไต (protein-losing nephropathy) มีการ

สูญเสียอัลบูมิน แต่อัตราส่วนA:G ratio ปกติ พบได้ในกรณีการเสียเลือด(blood loss) ความผิดปกติของของเหลวที่ออกมาที่หลอดเลือด(exudative disorders) เช่น การเกิดแผลไฟไหม้รุนแรง(severe burn)

2. การสร้างอัลบูมินลดลง พบในกรณีโรคตับ (hepatic disease) ภาวะการย่อยและการดูดซึมไม่ดี (maldigestion/malabsorption) ภาวะการขาดแคลนอาหาร, การแยกตัวของอัลบูมิน (sequestration) ออกมาอยู่ในช่องว่างของร่างกาย เช่น ของเหลวที่ออกมาอยู่ในช่องว่างของร่างกาย(body cavity effusion) และ โรคของเส้นเลือด(vasculopathy) (เฉลียว, 2548; Feldman *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2008)

ภาวะอัลบูมินในเลือดสูง(hyperalbuminemia) เกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่. การสูญเสียน้ำของร่างกาย (dehydration) จากการขาดน้ำทำให้เลือดเข้มข้น นอกจากนี้มีผลทำให้กลอบูลินเพิ่มขึ้นด้วย ควรคำนึงถึงภาวะไขมันในเลือดสูง(lipemia) อาจมีผลทำให้โปรตีนรวมสูงกว่าปกติได้(เฉลียว, 2548; Feldman *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2008)

3. กลอบูลิน (globulin)

3.1 อัลฟา-กลอบูลิน

อัลฟา-กลอบูลินเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วที่สุดในส่วนของกลอบูลิน ทั้งหมดเกือบจะทุกสปีชีส์ ยกเว้นในสัตว์เคี้ยวเอื้อง พบว่าส่วนอัลฟา หนึ่ง (α_1) เคลื่อนที่เร็ว และอัลฟาสอง (α_2) เคลื่อนที่ได้ช้า กลอบูลินสังเคราะห์ขึ้นที่ตับ ยกเว้นส่วนของอัลฟา หนึ่ง-ฟีโตโปรตีน (α_1 -fetoprotein) สังเคราะห์ขึ้นจากเซลล์ตับของทารก มีน้ำหนักโมเลกุล 65,000 ดาลตัน ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด การเพิ่มขึ้นของอัลฟาหนึ่ง-ฟีโตโปรตีน พบได้ในกรณีการตั้งครรภ์ (pregnancy) และการเกิดมะเร็งของเซลล์ตับ(hepatoma) ใช้เป็นสิ่งแจ้งเตือนมะเร็งของตับได้ การลดลงของอัลฟาหนึ่ง-ฟีโตโปรตีน พบได้ในโรคตับ โรคปอดเรื้อรัง(chronic pulmonary disease) โดยทั่วไปอัลฟาหนึ่ง-กลอบูลินมีขนาดเล็กกว่า อัลฟาสอง ส่วนของโปรตีนที่สำคัญคือ อัลฟา-ไลโปโปรตีน (α -lipoprotein, HDL) เคลื่อนที่ในส่วนของ อัลฟาหนึ่ง และส่วนของพรี-เบต้า-ไลโปโปรตีน (pre- β -lipoprotein, VLDL) ซึ่งเคลื่อนที่ในส่วนของ อัลฟาสอง เบต้า-ไลโปโปรตีน (β -lipoprotein, LDL) เคลื่อนที่ในส่วนของเบต้า (β) และจะเคลื่อนที่ในส่วน อัลฟาสองของแผ่นเซลล์ลูโลสอะซีเตต ต่อมาไลโปโปรตีนทั้งสองจะรวมตัวกับ อัลฟาสอง -แมคโครกลอบูลิน (α_2 -macroglobulin) ทำให้เพิ่มปริมาณขึ้นในส่วน ของอัลฟา สอง-กลอบูลิน (α_2 -globulin) อัลฟา-ไลโปโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 200,000 ดาลตัน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งไขมัน (lipid transport) การเพิ่มขึ้นของอัลฟา-ไลโปโปรตีน พบได้จากการตอบสนองระยะเฉียบพลัน

(acute phase response) ฟรี-เบต้า-ไลโปโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 1,000,000 ดาลตัน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งไขมัน การเพิ่มขึ้นของฟรี-เบต้า-ไลโปโปรตีน พบได้ในกลุ่มอาการของโรคไต (nephritic syndrome) โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) ไฮโปไธรอยดิซึมและการรักษาด้วยสเตียรอยด์อัลฟาสอง-แมคโครกลอบูลิน มีน้ำหนักโมเลกุล 62,000 ดาลตัน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการจับกับอินซูลิน และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส การเพิ่มขึ้นของอัลฟาสอง-แมคโครกลอบูลิน พบได้ในภาวะโรคตับเรื้อรังระยะสุดท้าย (chronic active liver disease) และกลุ่มอาการของโรคไต ในกลุ่มอาการของโรคไต (nephritic syndrome) ส่วนของอัลฟาสอง-แมคโครกลอบูลิน แอสโตกลอบิน (haptoglobin) ซีรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) และอะไมรอยด์ เอ (amyloid A) เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการวินิจฉัย โปรตีนระยะเฉียบพลัน (acute phase protein) ที่บ่งชี้ของโรคที่เกิดการอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammatory disease) (Kaneko *et al.*, 1997, 2008) (ดังตารางที่ 1)

3.2 เบต้า-กลอบูลิน (β -globulin)

เบต้า-กลอบูลินเคลื่อนที่ออกเป็นเบต้าหนึ่งและเบต้าสอง ซึ่งส่วนของเบต้าหนึ่งเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเร็วกว่าเบต้าสอง พบได้ในสัตว์เลี้ยงเกือบทั้งหมด ยกเว้นในสัตว์เคี้ยวเอื้อง โปรตีนที่สำคัญในส่วนนี้คือ คอมพลีเมนต์ (complement, C3, C4) ฮีโมเพกซิน (hemopexin) ทรานส์เฟอรัริน (transferrin) เฟอรัริน (ferritin) โปรตีนซี (c-reactive protein, CRP) ไลโปโปรตีนจะเคลื่อนที่อยู่ในส่วนของเบต้าสองเล็กน้อย และมีหน้าที่ที่สำคัญในโปรตีนระยะเฉียบพลัน อิมมูโนกลอบูลินบางชนิด เช่น IgM และ IgA อยู่ในส่วนของเบต้าสองจนถึงส่วนแกมมาหนึ่งและสอง ดังนั้นจึงมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นของแอนติเจนจากการติดเชื้อหรือมะเร็งของเซลล์พลาสมา (plasma cell malignancy) ทำให้พบอิมมูโนกลอบูลินเพิ่มขึ้นในส่วนเบต้าสองเช่นเดียวกับส่วนของแกมมาหนึ่งและแกมมาสอง (Kaneko *et al.*, 1997)

คอมพลีเมนต์สาม (C3) มีน้ำหนักโมเลกุล 75,000 ดาลตัน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเป็นปัจจัยของ C3 เพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย การเพิ่มขึ้นของพบได้ในโรคที่เกิดการอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammatory disease) โรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนังอักเสบ (atopic dermatitis) การลดลงของ C3 พบได้ในโรค การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนของตนเอง (autoimmune disease) คอมพลีเมนต์สี่ (C4) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเป็นปัจจัยของ C4 การเพิ่มขึ้นของ C4 พบได้ในโรคที่เกิดจากการตอบสนองระยะเฉียบพลัน (acute phase response) การลดลงของ C3 พบได้ในโรค การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนของตนเอง ฮีโมเพกซินมีน้ำหนักโมเลกุล 80,000 ดาลตัน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งฮีโมโกลิน การเพิ่มขึ้นของฮีโมเพกซินพบได้ในโรค

intravascular coagulation) แต่จะไม่สอดคล้องกับการลดลงของภาวะการจับลิ่มภายในหลอดเลือดที่แพร่กระจายไปที่ซึ่งการตรวจโดยใช้ซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิสไม่พบความผิดปกติ (Kaneko *et al.*, 1997; Feldman *et al.*, 2000)

3.3 แกมมา-กลอบูลิน (γ -globulin)

ส่วนของแกมมา-กลอบูลินของสัตว์เกือบทุกชนิด แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือแกมมาหนึ่งเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด และแกมมาสองเคลื่อนที่ได้ช้าที่สุด ส่วนของ อิมมูโนกลอบูลินที่พบในสัตว์ชนิด IgA IgM และ IgE พบอยู่ในส่วนของแกมมาหนึ่งเป็นหลัก ส่วน IgG พบอยู่ในส่วนของแกมมาสองเป็นหลัก แกมมา-กลอบูลินผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในการตอบสนองต่อการกระตุ้นของแอนติเจน การจำแนกชนิดและปริมาณของ อิมมูโนกลอบูลินใช้เทคนิคอิมมูโนเคมีคอลที่จำเพาะ (immunochemical technique) (Kaneko *et al.*, 1997; Thrall *et al.*, 2004)

ตารางที่ 1 โปรตีนระยะเฉียบพลัน (acute phase protein): ตัวบ่งชี้ของโรคที่เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammatory disease)

ชนิดโปรตีนระยะเฉียบพลัน	ตัวอย่าง
1. positive acute phase protein	α 1-globulins เช่น α 1-antitrypsin, α 1-acid glycoprotein (orosomucoid, seromucoid) α 2-globulins เช่น α 2-macroglobulin, ceruloplasmin, serum amyloid A, haptoglobin β -globulins เช่น fibrinogen, complement, C3, C4, protein C, C-reactive protein, ferritin, amyloid A
2. negative acute phase protein	prealbumin, albumin, transferrin

ที่มา: Feldman *et al.* (2000)

การแปลผลซีรัมโปรตีน

ซีรัมโปรตีนมีส่วนสำคัญในการช่วยวินิจฉัยโรคทางชีวเคมีคลินิก ความผิดปกติของซีรัมโปรตีนบ่งบอกถึงภาวะความผิดปกติของกระบวนการเกิดโรค การเปลี่ยนแปลงของ A:G ratio ใช้เป็นเครื่องแสดงความผิดปกติของโปรตีน (Kaneko *et al.*, 2008) มีส่วนช่วยในการแปลผลค่าโปรตีนรวม โดยที่ A:G ratio ปกติ แสดงว่าทั้งอัลบูมินและกลอบูลินมีการเปลี่ยนแปลงทั้งสองค่า ถ้า A:G ratio ผิดปกติ แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่าใดค่าหนึ่งเพียงอย่างเดียว (เฉลี่ย 2.548; Kaneko *et al.*, 2008) ดังตารางที่ 2

มีรายงานความผิดปกติของซีรัมอิเล็กโตรโฟรีซิสใน สุนัขที่ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ โปรโตซัว ลิชมาเนียซิส (leishmaniasis) นับเป็นโรคที่มีความสำคัญสามารถติดต่อสู่คนได้ (zoonosis) ทำให้เกิดอัตราการตายสูงและเป็นโรคแบบเรื้อรังในอเมริกา พบว่าอัลบูมินมีค่าลดลงอย่างมาก ส่วนเบต้า-กลอบูลิน และแกมมา-กลอบูลิน มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งอาจจะเป็นผลให้ค่าโปรตีนในเลือดสูง (hyperproteinemia) จากการผลิตกลอบูลินเพิ่มมากขึ้น (Kiral *et al.*, 2004) นอกจากนี้มีการศึกษาในแมวที่เป็นโรคติดเชื้อรีโทรไวรัส (retrovirus) พบมีการเพิ่มขึ้นของเบต้า-กลอบูลิน และมีการลดลงของแกมมา-กลอบูลินในแมวที่เป็นโรคลิวคีเมีย (FeLV) และแกมมา-กลอบูลินลดลงในแมวที่เป็นโรคเอดส์แมว (FIV) ซึ่งสามารถใช้ซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิสในการแยกความแตกต่างระหว่างโรค โรคลิวคีเมียและโรคเอดส์แมว ได้ (Kaneko *et al.*, 1997)

ดังนั้นซีรัมโปรตีนประกอบด้วยหลายส่วน ถ้าพบความผิดปกติเกิดขึ้นที่ส่วนใดส่วนหนึ่ง ต้องทำการตรวจเพิ่ม เพื่อวินิจฉัยสาเหตุของโรคต่อไป เนื่องจากสาเหตุการเกิดมีความเกี่ยวข้องกับอวัยวะ ส่วนต่างๆ ร่วมด้วย (เฉลี่ย 2.548; Kaneko *et al.*, 2008)

ตารางที่ 2 การจำแนกภาวะความผิดปกติของโปรตีนในกระแสเลือด (dysproteinemia) โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง A:G (A:G ratio) และรูปแบบซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิส

อัตราส่วนระหว่าง A:G (A:G ratio) และรูปแบบซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิส	ตัวอย่าง
1. normal A:G-normal serum protein electrophoresis profile	hyperproteinemia เช่น dehydration hypoproteinemia เช่น overhydration, acute blood loss

ตารางที่ 2 (ต่อ)

อัตราส่วนระหว่าง A:G (A:G ratio) และ รูปแบบซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิส	ตัวอย่าง
2. decreased A:G-abnormal serum protein electrophoresis profile	<p>external plasma loss เช่น extravasation from burns, abrasions, exudative lesions, exudative dermatopathies, external parasites, gastrointestinal disease including parasites</p> <p>internal plasma loss เช่น vasculitis</p> <p>decreased albumin</p> <p>-selective loss of albumin เช่น glomerulonephritis, nephrosis, nephritic syndrome, gastrointestinal disease, internal parasites</p> <p>-decreased synthesis of albumin เช่น chronic liver disease, malnutrition, chronic inflammatory disease, malnutrition</p> <p>increased globulins</p> <p>-increased α1-globulin</p> <p>- กรณี acute inflammatory disease เช่น α1-antitrypsin, α1-acid glycoprotein (orosomuroid, seromuroid)</p> <p>-increased α2-globulin</p> <p>- กรณี acute inflammatory disease เช่น α2-macroglobulin, ceruloplasmin, haptoglobin</p> <p>- กรณี severe active hepatitis เช่น α2-macroglobulin</p> <p>- กรณี acute nephritis เช่น α2- macroglobulin</p> <p>- กรณี nephrotic syndrome เช่น α2- macroglobulin, α2-lipoprotein (VLDL)</p>

ตารางที่ 2 (ต่อ)

อัตราส่วนระหว่าง A:G (A:G ratio) และ รูปแบบซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิส	ตัวอย่าง
	<p>increased β-globulin</p> <ul style="list-style-type: none"> - กรณี acute nephritis เช่น transferrin, hemopexin - กรณี nephrotic syndrome เช่น β2-lipoprotein (LDL), transferrin - กรณี suppurative dermatopathies เช่น IgM, C3 bridging - กรณี chronic active hepatitis เช่น IgA, IgM <p>increased γ-globulin (broad increase)-polyclonal gammopathies เช่น IgG, IgM, IgA</p> <ul style="list-style-type: none"> - กรณี chronic inflammatory disease, infectious disease, collagen disease - กรณี chronic hepatitis - กรณี hepatic abscess - กรณี suppurative disease เช่น feline infectious dermatitis, suppurative dermatitis, tuberculosis - กรณี immune-mediated disease เช่น autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thrombocytopenia, Aleutian disease of mink, equine infectious anemia, systemic lupus erythematosus, autoimmune polyarthritis, autoimmune glomerulonephritis, autoimmune dermatitis, allergies - กรณี lymphoid tumors

ตารางที่ 2 (ต่อ)

อัตราส่วน ระหว่าง A:G (A:G ratio) และ รูปแบบซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟรี ซิส	ตัวอย่าง
3. increased A:G-abnormal profile	<p>increased γ-globulin (sharp increase)- monoclonal gammopathies เช่น IgG, IgM, IgA</p> <ul style="list-style-type: none"> - กรณี lymphoid tumors - กรณี plasma cell dyscrasias เช่น multiple myeloma, aleutian disease of mink <p>polyclonal)</p> <ul style="list-style-type: none"> - กรณี macroglobulinemia - กรณี canine ehrlichiosis (usually benign) <p>increased albumin: does not occur except in dehydration</p> <p>decreased globulins เช่น fetal serum, precolostral neonate, combined immunodeficiency of Arabian foals, A gamma globulinemia</p>

ที่มา: Kaneko *et al.* (2008)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือดสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาเบอร์ 23 ความยาว 1.0 นิ้ว
2. กระบอกฉีดยาขนาด 5 ซีซี
3. หลอดเก็บตัวอย่างเลือด
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

สารเคมี

1. กรดเอธิลีน ไดเอมีน เตตระอะซิติก (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid, EDTA)
2. เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)

สัตว์ทดลอง

สุนัขที่นำมาใช้ในการทดลอง เป็นสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน จากฟาร์มเลี้ยงในเขตจังหวัด กรุงเทพมหานครและบริเวณ ใกล้เคียง และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว จากโรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ไม่จำกัดเพศ มีอายุอยู่ในช่วง โตเต็มวัย จำนวนพันธุ์ละ 30 ตัว โดยสุนัขทุกตัวมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี มีโปรแกรมการฉีดวัคซีนและถ่ายพยาธิตามคำแนะนำของสัตวแพทย์เป็นประจำทุกปี สุนัขทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยทางคลินิกในวันที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากสุนัข โดยเจาะเก็บจากเส้นเลือดดำ cephalic vein หรือ saphenous vein ตัวละ 5 มิลลิลิตร ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA เคลือบอยู่ เพื่อทำการเก็บเลือด (whole blood) โดยแบ่งเลือดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใส่เลือดประมาณ 2 มิลลิลิตร ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA เคลือบอยู่เพื่อตรวจค่าทางโลหิตวิทยา และเพื่อศึกษาฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบิน และส่วนที่ 2 ใส่เลือดประมาณ 3 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเคลือบอยู่ทิ้งไว้ให้ เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปปั่น ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ให้ได้ซีรัมออกมา แล้วนำมาหาค่า ความเข้มข้นของ ซีรัม โปรตีนด้วยวิธีไบยูเรต โดยเทียบกับสารละลาย โปรตีนมาตรฐาน ก่อนจะทำการแยกชนิดของซีรัม

โปรตีนด้วยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโทรโฟริซิส ร่วมกับการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) เพื่อหาความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนโดยแยกเป็นอัลบูมิน และ กลอบูลิน

การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือด ส่วนแรก ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มา ทำการศึกษาดังนี้

ส่วนที่ 1 นำมาวิเคราะห์เป็น 3 ขั้นตอน คือ

1.1 การศึกษาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit, Hct หรือ Packed cell volume, PCV) โดยวิธี ของ Brown (1993)

อุปกรณ์

1. หลอดไมโครแคปิลลารี (micro-capillary tube)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (microhematocrit centrifuge, Biomed Group Co., Ltd. Thailand)
3. ดินน้ำมัน (critoseal)
4. แผ่นเทียบค่าฮีมาโตคริต (hematocrit chart)
5. เครื่องรีเฟกโตมิเตอร์ (refractometer)

สารตัวอย่าง

เลือดสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

วิธีการ

1. เอียงหลอดไมโครแคปิลลารีและหลอดบรรจุเลือดพร้อมกัน เลือดจะไหลเข้าไปในหลอด ด้วยแรง capillary attraction ปล่อยให้เลือดไหลเข้าสู่หลอดไมโครแคปิลลารี จนห่างจากปลายข้าง หนึ่งประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้นิ้วอุดปลายหลอดไมโครแคปิลลารีด้านบนไว้ ใช้กระดาษเช็ดเลือด

ส่วนที่เกินออก อุณหภูมิห้องข้างหนึ่งที่เหลือด้วยดินน้ำมัน พร้อมกับปล่อยนิ้วชี้ออกจากปลายหลอดออกเพื่อไม่ให้มีเม็ดเลือดแดงแตกเพราะความดันภายในหลอดเพิ่มขึ้น

2. นำหลอดไมโครแคปิลลารีไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยหันด้านที่อุปลายด้วยดินน้ำมันออกด้านนอกชิดกับขอบจานเครื่องปั่นเหวี่ยง และวางหลอดไมโครแคปิลลารีให้สมดุลกัน

3. อ่านค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น โดยใช้หลอดไมโครแคปิลลารี ไปอ่านเทียบค่ากับแผ่นเทียบค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น เลือดแต่ละตัวอย่างจะทำ 2 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย และนำพลาสมาในหลอดไมโครแคปิลลารีมาอ่านค่าพลาสมาโปรตีนโดยใช้เครื่องรีเฟคโตมิเตอร์

1.2 การศึกษาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินโดยวิธีไซยาโนเมทีโมโกลบิน (Cyanomethemoglobin method, Bio-Medical Laboratories, Thailand)

อุปกรณ์

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

สารเคมี

1. น้ำยาฮีโมโกลบิน (hemoglobin reagent; Drabkin's solution, Bio-Medical Laboratories, U.S.A.) ประกอบด้วย โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) 1 กรัม โพแทสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide, KCN) 50 มิลลิกรัม โพแทสเซียมเฟอร์ริคไซยาไนด์ (potassium ferricyanide) $[K_3Fe(CN)_6]$ 200 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

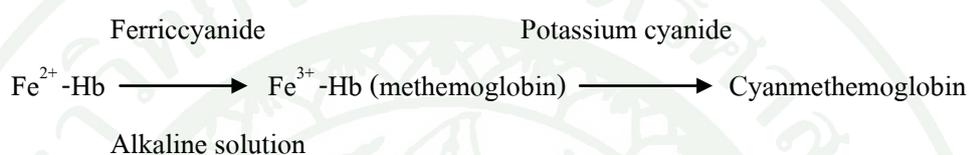
2. สารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐาน (hemoglobin standard, Bio-Medical Laboratory, Thailand)

สารตัวอย่าง

เลือดสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

วิธีการ

ทำการทดลองดังตารางที่ 3 และตารางที่ 4 โดยทำซ้ำ 2 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย ปฏิบัติการเกิดขึ้น
ดังนี้



ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายฮีโมโกลบินตัวอย่าง^a

สารละลาย	blank	ตัวอย่างเลือด
น้ำยาฮีโมโกลบิน (มิลลิลิตร)	5.0	5.0
ตัวอย่างเลือด (มิลลิลิตร)	-	0.02
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	0.02	-

ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

^aที่มา: cyanmethemoglobin, Bio Medical Laboratories, Thailand

ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบิน^b

หลอดที่	blank	1	2	3	4	5
สารละลาย (กรัมต่อเดซิลิตร)	-	4	8	12	16	20
สารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	-	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
น้ำยาฮีโมโกลบิน (มิลลิลิตร)	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	-

ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

^bที่มา: cyanmethemoglobin, Bio-Medical Laboratories, Thailand

1.3 การเตรียมสารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลเสต (Hemolysate)

อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge, Hermle Z 233 MK-2)
2. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer, Vortex Genie-2 TM)
3. ครอบเปอริไปเปต (dropper pipette)
4. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารเคมี

1. สารละลายฮีโมไลเสต (hemolysate reagent) ประกอบด้วย 0.005 โมลาร์ EDTA และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ โพแตสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide)
2. โซเดียมคลอไรด์ 0.90 เปอร์เซ็นต์ (0.90% sodium chloride, NaCl)

สารตัวอย่าง

เลือดสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

วิธีการ

1. นำตัวอย่างเลือดมาปั่นเพื่อแยกพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
2. ล้างเม็ดเลือดแดง ด้วย 0.90 เปอร์เซ็นต์ NaCl ด้วยปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่างเลือด จำนวน 3 ครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง
3. จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงที่ได้มาเติมสารละลายฮีโมไลเสต ที่ประกอบด้วย 0.005 โมลาร์ EDTA และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ โพแตสเซียมไซยาไนด์ในอัตราส่วน 1:5 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง

ผสมสารละลาย เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ (cell debris) และผนังเซลล์ (cell membrane)

4. เก็บสารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลสที่อยู๋ดำนบนไวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป (คัดแปลงจาก Di Luccia *et al.*, 1991; Fago *et al.*, 1995; Tamburrini *et al.*, 2001)

1.4 การศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยวิธี เซลลูโลสอะซี เตตติเล็กโตรโฟรีซิส และวิธีเฟฟอลิอะคริลไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.4.1 วิธีเซลลูโลสอะซีเตตติเล็กโตรโฟรีซิส (Helena Laboratories, 2001)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือเซลลูโลสอะซีเตตติเล็กโตรโฟรีซิส (Helena Laboratories, France)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Titan Plus, Helena Laboratories, France)
3. แผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (TITAN III-H) ขนาด 76 x 60 มิลลิเมตร
4. จานแก้ว
5. ตู้อบ (Mettert UM 500, Germany)
6. กระดาษกรอง เบอร์ 1
7. แผ่นสไลด์
8. กระดาษกรองแผ่นยาว (wick)
9. โปรแกรมวิเคราะห์แผนเจล ควอนติตีวัน (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-EDTA-กรดบอริก (Supre-Heme Buffer) พีเอช 8.2-8.6
2. สีย้อมฟองโซเอส (Ponceau S) ประกอบด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ ฟองโซเอส ในสารละลาย 3.5 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulfosalicylic acid) และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ กรดไทรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid)

3. สารล้างสีขอม (destaining reagent) ประกอบด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก (acetic acid)
4. สารละลาย clearing ประกอบด้วย กรดอะซิติก 30 ส่วน เมทานอล (methanol) 70 ส่วน และ Clear aid 4 ส่วน (Helena Laboratories, France)
5. สารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐาน [hemoglobin control (AFSA₂)] (Helena Laboratories, France)

สารตัวอย่าง

สารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลสของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

วิธีการ

1. แช่แผ่นเซลล์โลสอะซีเตดในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 5 นาที
2. เทสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในอ่างอิเล็กทรอนิกส์ของชุดเครื่องมืออิเล็กทรอนิกส์ ไทโรฟริซีส ไซกระดาชกรองเป็นสะพานเชื่อม(wick) สวมไฟฟ้าระหว่างแผ่นเซลล์โลสอะซีเตด และสารละลายบัฟเฟอร์โดยแช่ให้ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์และวางพาดลงในอ่างอิเล็กทรอนิกส์ ไทโรดทั้ง 2 อย่าง
3. บรรจุสารละลายฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วและสารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐานปริมาตร 8 ไมโครลิตรในช่องใส่ตัวอย่าง ปิดด้วยแผ่นสไลด์เพื่อป้องกันการระเหย
4. นำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตดที่แช่ ในบัฟเฟอร์ ครบ 5 นาทีมาจับด้วยกระดาชกรองให้หมาด วางแผ่นเซลล์โลสอะซีเตดบนเพลทแอปพลิเคชัน (applicator plate) ที่ตำแหน่งขั้วลบ (cathode application) แล้วใช้แอปพลิเคชัน (applicator) เคลือบสารละลายฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วและสารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐานที่บรรจุไว้ในช่องใส่ตัวอย่างมาลงบนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตด
5. นำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตดที่ใส่ตัวอย่างแล้วมาวางคว่ำหน้าบนอ่างอิเล็กทรอนิกส์ ไทโรด โดยหัน

คานที่ใส่ตัวอย่างไว้ทางซ้ายบน ไซแผนสไลด์วางทับลงบนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตเพื่อให้ผิวหน้าสัมผัสกับกระดาษกรองและปดฝาอ่างอิเล็กโทรด

6. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 350 โวลต์ เป็นเวลานาน 25 นาที

7. เมื่อครบกำหนดเวลานำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตมาย้อมสีในสารละลายสีย้อมฟองโซเอสเป็นเวลา 8 นาที

8. ล้างสีย้อมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก จนมองเห็นแถบของฮีโมโกลบินชัดเจนหรือสังเกตจากแถบของสารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐาน

9. แช่แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตในเมธานอล 4 นาที หลังจากนั้นแช่ในสารละลาย clearing เป็นเวลา 9 นาที

10. ให้ความร้อนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตโดยนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตเปลี่ยนจากแผ่นทึบแสงเป็นแผ่นโปร่งแสง

11. วิเคราะห์แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตเพื่อศึกษาฟิโนไทป์หรือชนิดของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน

1.4.2 วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ดัดแปลงจาก Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมืออิเล็กโทรโฟรีซิส (Mini Protein III, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power PAC 200, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
3. ไมโครไซริงค์ (microsyringe, Fortuna[®], Transferpette[®]-digital) ขนาด 25 ไมโครลิตร
4. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)
5. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช่เตรียมแผนเจล ประกอบด้วย

1.1 สารละลายอะคริลาไมด์และบิส 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 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8

1.3 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)

1.4 N, N, N', N' เทตราเมทิลีนไดเอมีน (N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine; TEMED)

2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer) ประกอบด้วย

2.1 0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8

2.2 99.5 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล

2.3 1 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue)

2.4 น้ำกลั่น

3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 (electrode buffer, pH 8.3) ประกอบด้วย

3.1 ทริส

3.2 ไกลซีน (glycine)

3.3 น้ำกลั่น

4. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย

4.1 กรดอะซิติก 10 ส่วน

4.2 เอทานอล 25 ส่วน

4.3 น้ำกลั่น 65 ส่วน

5. สีย้อม ประกอบด้วยโคมัสซีบลูอาร์-250 (coomassie blue R-250) ในสารละลายล้างสี
ย้อม

สารตัวอย่าง

สารละลายอีโมโกลบินหรืออีโมไลเซตของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

วิธีการ

1. ทำการเตรียมแผ่นเจลดังนี้

1.1 เตรียมสารละลายสำหรับ เจล (10% T 2.67% C) ยกเว้น TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตดังตารางที่ 5 ดูดอากาศออกด้วยปั๊มสุญญากาศ

1.2 ประกอบชุดเตรียมเจล ใส่หวี (comb) ในช่องวางระหว่างกระจกเอียงทำมุมประมาณ 10 องศา

1.3 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลายเจลที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 แลวเปิดใสของวางระหว่างกระจกทันทีจนถึงขอบกระจก

1.4 จัดหวีให้อยู่ในแนวเส้นตรง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้เจลแข็งตัว (polymerization) ประมาณ 30-45 นาที

ตารางที่ 5 สูตรการเตรียมเจลวิธีหนึ่งที่ฟออลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

สารในการเตรียมเจล	ปริมาณสารในการเตรียมเจล
	10% T
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	8.12
1.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8 (มิลลิลิตร)	5
30 เปอร์เซ็นต์ สารละลายอะครีลาไมด์คอปิส (มิลลิลิตร)	6.67
10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ไมโครลิตร)	200
TEMED (ไมโครลิตร)	10

หมายเหตุ สูตรสำหรับเจล 4 แผ่น

1.5 ดึงหวีอย่างระมัดระวังแล้ววางหลุมเจดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรดพีเอช 8.3 จะไดเจลที่พร้อมใช้งาน จากนั้นประกอบแผ่น เจลเข้ากับชุดอิเล็กโทรด เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 ในอ่างอิเล็กโทรดบนและล่างให้ท่วมผิวหน้าเจล

2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยผสมสารละลายอีโมไลเซอร์กับสารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับตัวอย่างเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ โปรตีนที่เหมาะสม ประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบรรจุใส่หลุมเจดด้วยไมโครไซริงค์

3. ต่อบุขอิเล็กโทรดโพสิทีฟที่พร้อมทำงานกับเครื่องจ่ายกระแสไฟ โดยตั้งคา ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 200 โวลต์คงที่และค่ากระแสไฟฟ้าที่ 60 มิลลิแอมแปร์ ต่อเจล 1 แผ่น ใชเวลา 45 นาที

4. นำแผ่นเจลออกมาขอมสี เป็นเวลา 30 นาที โดยเขาด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะขอม

5. ล้างสีขอมด้วยสารละลายล้างสีขอม โดยเขาด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะล้างสีขอม จนกระทั่งเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจลใส

6. เก็บแผ่นเจลในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

7. วิเคราะห์แผ่นเจลเพื่อศึกษาอีโมโกลบินฟีนไทป์ของ สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วโดยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตีวัน

1.5 การทำอีโมโกลบินให้บริสุทธิ์และการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วโดยวิธีเจลฟลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ดัดแปลงจาก Vanderdon and Colacino, 1989)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือ Econo System (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
2. ตู้เย็น Kelvinator Scientific Model ETBB39RGCH-2 (U.S.A.) ที่ 4 องศาเซลเซียส
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible recording spectrophotometer UV-160, Shimadzu, Japan)

4. ไซริงค์ขนาด 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 ทริสบัฟเฟอร์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) พีเอช 7.4
3. สารละลายมาตรฐาน (standard solution) ประกอบด้วย
 - 3.1 บลูเดกซ์แทรน (blue dextran) น้ำหนักโมเลกุล 2,000,000 คาลตัน
 - 3.2 ซีรัมอัลบูมินของโค (bovine serum albumin; BSA) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 คาลตัน
 - 3.3 โอวัลบูมิน (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000 คาลตัน
 - 3.4 ไซโตโครม ซี (cytochrome C) น้ำหนักโมเลกุล 12,384 คาลตัน
 - 3.5 ดีเอ็นพี-แอสปาร์เตต (DNP-aspartate) น้ำหนักโมเลกุล 299.2 คาลตัน

สารตัวอย่าง

สารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลเสตของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

วิธีการ

1. การเตรียมคอลัมน์
 - 1.1 ชั่งเซฟาเดกซ์ G-100 ในปริมาณที่ต้องการ (5 กรัม ได้ปริมาตรเจล 30 มิลลิลิตร) ทำให้พองอิมด้ว (swelling) ด้วย 0.05 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ พีเอช 7.4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
 - 1.2 เตรียมคอลัมน์ไว้ในตู้เย็น ปิดปลายล่างของคอลัมน์ เดิมบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์สูงประมาณหนึ่งในสามของคอลัมน์ รินบัฟเฟอร์ในเจลทิ้งให้เหลือบัฟเฟอร์ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของเจล แล้วทำการบรรจุเจลลงในคอลัมน์ โดยคนและเทเบาๆ ให้หมดในครั้งเดียว

1.3 เมื่อเจลเรียงตัวในคอลัมน์ ใส่ adapter และ equilibrate ด้วยทริสบัฟเฟอร์ที่อัตราไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาทีจนปริมาตรของเจลคงที่แล้วหาปริมาตรเจลที่แน่นอนจากนั้น equilibrate ต่อไป ประมาณ 1.5 เท่าของปริมาตรเจลจะได้คอลัมน์เจลที่พร้อมใช้งาน

2. แยกโปรตีนมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และแยกโปรตีนในฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและ สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 50 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชะด้วย ทริสบัฟเฟอร์ที่อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

3. เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.8 มิลลิลิตร นำมาวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรสำหรับโปรตีน และที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรสำหรับ ฮีโมโกลบิน

4. สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกับปริมาตร (มิลลิลิตร) ของแต่ละหลอด (fraction) ที่ได้ จากกราฟ หาปริมาตรที่ใช้ในการชะสารแต่ละชนิดหรือ V_e คำนวณหาค่า V_t และ V_o เพื่อนำมาคำนวณหาสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient, K_d) ดังสมการ

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

โดยที่ V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ที่บรรจุเม็ดเจล (total volume)

V_e คือ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ไซในการชะสารออกมา (elution volume)

V_o คือ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ล้อมรอบเม็ดเจล (void volume)

5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การกระจายกับคาลอการลิทึมของน้ำหนัก โมเลกุล (log molecular weight) ของสารมาตรฐานเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

1.6 ศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล (Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini Protein III, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power PAC 200, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
3. ไมโครไซริงค์ขนาด 25 ไมโครลิตร
4. เครื่องไทความร้อน (Stuart Scientific รุ่น SHT 1, UK)
5. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)
6. โปรแกรมวิเคราะห์แผนเจลควอนติตีวัน (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารเคมีที่เตรียมแผนเจล ประกอบด้วย
 - 1.1 30 เปอร์เซ็นต์ สารละลายอะคริลาไมด์ และบิส จำนวน 50 มิลลิลิตร (30% T 2.67% C) ประกอบด้วย อะคริลาไมด์ 14.6 กรัม และบิส 0.4 กรัม
 - 1.2 1.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8
 - 1.3 0.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8
 - 1.4 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต
 - 1.5 N, N, N' , N' เตตราเมทิลลีนไดเอมีน
 - 1.6 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (10% sodium dodecylsulfate; 10% SDS)
2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง
 - 2.1 0.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8
 - 2.2 99.5 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล
 - 2.3 1 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟีนอลบลู
 - 2.4 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)
 - 2.5 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด พีเอช 8.3 ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- 3.1 ทริส
- 3.2 ไกลซีน
- 3.3 โซเดียมโคดีซิลซัลเฟต
- 3.4 น้ำกลั่น

4. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย

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

5. สีย้อม ประกอบด้วยโคแมสซึบลูอาร์-250 ในสารละลายล้างสีย้อม

6. โปรตีนมาตรฐานชนิด broad range molecular weight (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

ประกอบด้วย

- 6.1 ไมโอซิน (myosin) น้ำหนักโมเลกุล 200,000 ดาลตัน
- 6.2 เบตากลาคโตไซด์ (β-galactosidase) น้ำหนักโมเลกุล 116,250 ดาลตัน
- 6.3 ฟอสโฟไรเลส บี (phosphorylase b) น้ำหนักโมเลกุล 97,400 ดาลตัน
- 6.4 ซีรัมอัลบูมินของโค (bovine serum albumin, BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,200 ดาลตัน
- 6.5 โอวัลบูมิน (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน
- 6.6 คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) น้ำหนักโมเลกุล 31,000 ดาลตัน
- 6.7 ตัวยับยั้งทริปซินของถั่วเหลือง (soy bean trypsin inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 21,500 ดาลตัน
- 6.8 ไลโซไซม์ (lysozyme) น้ำหนักโมเลกุล 14,400 ดาลตัน
- 6.9 อะโปรตีนิน (aprotinin) น้ำหนักโมเลกุล 6,500 ดาลตัน

สารตัวอย่าง

สารละลายสีโมไกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. ทำการเตรียมแผ่นเจลดังนี้

1.1 เตรียมสารละลายสำหรับ separating gel (15% T 2.67% C) ยกเว้น TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ดังตารางที่ 6 แลวดูดอากาศออกด้วยปั๊มสูญญากาศ

1.2 ประกอบชุดเตรียมเจลและทำเครื่องหมายแสดงความสูงของ separating gel บนแผ่นกระจก

1.3 เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลายเจลแล้วเปิดฝาของวาระหว่างกระจกทันทีจนถึงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมาย ปิดฝิวหนาเจลด้วยน้ำกลั่นเบาๆ

1.4 ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30-45 นาที

1.5 เตรียม stacking gel (4% T 2.67% C) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับการเตรียม separating gel ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สูตรการเตรียมเจลวิธีโซเดียมไดคิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส

สารในการเตรียมเจล	ปริมาณสารในการเตรียมเจล	
	15% T	4% T
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	4.7	6.1
1.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8 (มิลลิลิตร)	5	-
0.5 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 (มิลลิลิตร)	-	2.5
10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไดคิลซัลเฟต (ไมโครลิตร)	200	100
30 เปอร์เซ็นต์ สารละลายอะคริลาไมด์ตอบิส (มิลลิลิตร)	10	1.3
10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ไมโครลิตร)	200	100
TEMED (ไมโครลิตร)	10	5

หมายเหตุ สูตรสำหรับเจล 4 แผ่น

1.6 เมื่อเจลแข็งตัวจะเกิดแนวเส้นตรงบริเวณผิวหนาเจล ชับน้ำบนผิวหนาเจลแล้วใส่หัวในช่องว่างระหว่างกระจกเอียงทำมุมประมาณ 10 องศา

1.7 เดิม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ ซัลเฟต ลงในสารละลาย stacking gel ปเปตสารละลายเจลงลงในช่องวางระหว่างกระจกทันทีจนเต็ม แล้วจัดหัวใให้อยู่ในแนวเส้นตรง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30-45 นาที

1.8 ดึงหัวอย่างระมัดระวังแล้วล้างหลุมเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรด พีเอช 8.3 จะได้เจลพร้อมใช้งาน จากนั้นประกอบแผ่นเจลเข้ากับชุดอิเล็กโตรด เดิมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรด พีเอช 8.3 ในอ่างอิเล็กโตรดบนและล่างให้ท่วมผิวหน้าเจล

2. เตรียมสารละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยผสมละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับสารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับตัวอย่างเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความร้อนสารละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหยอดใส่ หลุมเจลด้วยไมโครไซริงค์

3. ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสกับเครื่องจ่ายกระแสไฟ โดยตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 200 โวลต์คงที่และค่ากระแสไฟฟ้าที่ 60 มิลลิแอมแปร์ ต่อเจล 1 แผ่น ใช้เวลา 45 นาที

4. นำแผ่นเจลออกมาขย้อมสีเป็นเวลา 30 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะขย้อม

5. ล้างสีขย้อม โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะล้างสีขย้อม จนกระทั่งเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจลอใส

6. เก็บแผ่นเจลในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

7. วิเคราะห์แผ่นเจลเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน

1.7 ศึกษาหน้าหนักโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วโดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี

อุปกรณ์

1. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.)
2. เพลตตัวอย่าง (sample plate) ที่มีโปรตีนฮีโมโกลบินจับอยู่กับเมทริกซ์

สารเคมี

1. 0.01 โมลาร์ กรดไซแนพินิก (sinapinic acid) เป็นเมทริกซ์
2. 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, ACN)
3. 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid, TFA)

สารตัวอย่าง

สารละลายฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. ผสมสารละลายฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านเจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของเซฟาเดกซ์ G-100 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) กับกรดไซแนพินิก ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ที่อิมัลชันด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ในสไลด์บนเพลตตัวอย่างผสมกันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดเบาๆ ปล่อยให้แห้งในที่อุณหภูมิห้อง
2. นำไปวิเคราะห์หน้าหนักโมเลกุลด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้ linear positive mode ที่ 20 kV เมื่อยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์ (nitrogen laser) เครื่องจะรายงานผลตามน้ำหนักโมเลกุลผ่านทางหน้าจอคอมพิวเตอร์

1.8 ศึกษาค่า pI ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยวิธีไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini Protein III, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power PAC 200, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
3. ไมโครไซริงค์ขนาด 25 ไมโครลิตร
4. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)
5. โปรแกรมวิเคราะห์แผนเจลกาวอนดีตีวัน (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด broad range pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) ซึ่งประกอบด้วย
 - 1.1 ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) pI 4.45, 4.65 และ 4.75
 - 1.2 เบต้าแลคโตกลอบูลินบี (β -lactoglobulin B) pI 5.10
 - 1.3 เอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรตของโค (bovine carbonic anhydrase) pI 6.00
 - 1.4 เอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรตของคน (human carbonic anhydrase) pI 6.50
 - 1.5 ไมโอโกลบินของม้า (equine myoglobin) pI 6.80 และ 7.00
 - 1.6 ฮีโมโกลบินเอของคน (human hemoglobin A) pI 7.10
 - 1.7 ฮีโมโกลบินซีของคน (human hemoglobin C) pI 7.50
 - 1.8 เลนทิลเลกติน (lentil lectin) pI 7.80, 8.00 และ 8.20
 - 1.9 ไซโตโครมซี (cytochrome C) pI 9.60
2. แผ่นเจล IEF สำเร็จรูป ช่วงพีเอช 3-10 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรด ได้แก่
 - 3.1 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับขั้วแคโทด (cathode buffer) ประกอบด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ไลซีนและอาร์จินีน (20 mM lysine และ 20mM arginine)
 - 3.2 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับขั้วแอโนด (anode buffer) ประกอบด้วย 7 เปอร์เซ็นต์กรดฟอสฟอริก (7% phosphoric acid)

4. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง ประกอบด้วย 50 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล (50% glycerol)
5. สารละลายที่ใช้ในการตรึง (fixing solution) ประกอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรอะซิติก (10% trichloroacetic acid)
6. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย กรดอะซิติก 10 ส่วน เอทานอล 25 ส่วนและน้ำกลั่น 65 ส่วน
7. สีย้อม ประกอบด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์ โคแมสซีบลูอาร์-250 ในสารละลายล้างสีย้อม

สารตัวอย่าง

สารละลายฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิลาเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่าง โดยผสมสารละลายฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วในสารละลายสำหรับตัวอย่าง อัตราส่วน 1:5 ผสมให้เข้ากัน
2. นำเจลสำเร็จรูปใส่ในชุดเตรียมเจล
3. เทสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับขั้วแคโทดภายในอ่างจนท่วมแผ่นเจล และเทสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับขั้วแอโนดภายนอกอ่างจนท่วมขั้วแอโนด
4. ทำการต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าและ prerun ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์คงที่ กระแสไฟฟ้าที่ 10 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 60 นาที
5. หยอดสารตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานในหลุมเจล อย่างละ 10 ไมโครลิตร และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ

6. ปรับค่าการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนี้

6.1 ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์คงที่ ค่ากระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมป์ เวลา 60 นาที

6.2 ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์คงที่ ค่ากระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมป์ เวลา 60 นาที

6.3 ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 300 โวลต์คงที่ ค่ากระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมป์ เวลา 60 นาที

7. เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสครบตามลำดับแล้ว นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก แล้วตรึงโดยแช่แผ่นเจลใน 20 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรอะซิติกเป็นเวลา 30 นาทีพร้อมกับเขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ

8. นำแผ่นเจลมาล้างด้วยสารละลายล้างสีข้อมและแช่เป็นเวลา 5 นาที เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ

9. ทำการล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ

10. ข้อมเจลด้วยสีข้อม เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะข้อม

11. ล้างสีข้อม เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติจนเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจลใส หลังจากนั้นเก็บเจลในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

12. วิเคราะห์แผ่นเจลเพื่อหาค่า pI ของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตัววัน

1.9 ศึกษาชนิดของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี

อุปกรณ์

1. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) แบบ Ultraflex III MALDI-TOF MS

(Bruker, Germany)

2. เพลทตัวอย่าง (sample plate) ที่มีโปรตีนฮีโมโกลบินจับอยู่กับเมทริกซ์
3. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC Waters 600E System Controller)
4. ปั๊มของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Waters 600 LCD HPLC Pump)
5. เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด photodiode array detector (Water 996 PAD detector)
6. เครื่องฉีดสารอัตโนมัติ (autoinjector) (Waters 717 plus autosampler)
7. คอลัมน์ Jupiter C₄ (250 x 4.60 mm, 300Å; Fortune Scientific)
8. การ์ดคอลัมน์ (Phenomenex, SecurityGuard™, Fusion-RP 4x2.0 mm HPLC Guard

Cartridge)

9. ฟิลเตอร์กรองสาร (Filtrex/Nylon Syringe Filter, 0.45 ไมโครเมตร)

สารเคมี

1. กรดไซแนปินิก (sinapinic acid) 0.01 โมลาร์เป็นเมทริกซ์
2. 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, ACN); Burdick & Jackson Brand High Purity Solvent, U.S.A.)
3. 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid (TFA); Peptide Synthesis Grade, UK)
4. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (proteoMass™ peptide & protein MALDI-MS Calibration Kit (Sigma, U.S.A.)) ซึ่งประกอบด้วย
 - 4.1 ส่วนของบราดีไคนิน (bradykinin fragment) น้ำหนักโมเลกุล 757.3997 คาลตัน
 - 4.2 แองจิโอเทนซิน ทู ของคน (human angiotensin II) น้ำหนักโมเลกุล 1,046.5422 คาลตัน
 - 4.3 เปปไทด์สังเคราะห์ พี 14 อาร์ (P₁₄R synthetic peptide) น้ำหนักโมเลกุล 1,533.85822 คาลตัน
 - 4.4 ส่วนของ ACTH ของคน (human ACTH fragment) น้ำหนักโมเลกุล 2,465.1989 คาลตัน
 - 4.5 สายอินซูลินออกซิไดซ์ บี ของโค (bovine insulin oxidized B chain) น้ำหนักโมเลกุล 3,494.6513 คาลตัน
 - 4.6 อินซูลินของโค (bovine insulin) น้ำหนักโมเลกุล 5,735 คาลตัน
 - 4.7 ไซโตโครมซี (cytochrome C) น้ำหนักโมเลกุล 12,362 คาลตัน

4.8 อะโปไมโอโกลบินของม้า (equine apomyoglobin) น้ำหนักโมเลกุล 16,952 ดาลตัน

4.9 อัลโดเลส (aldolase) น้ำหนักโมเลกุล 39,212 ดาลตัน

4.10 ซีรัมอัลบูมินของโค (bovine serum albumin, BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,430 ดาล

ตัน

สารตัวอย่าง

สารละลายอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิลาเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่าง โดยนำสารละลายอีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีเจลฟิลาเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว นำมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.25 ไมโครเมตร
2. นำสารละลายอีโมโกลบิน ที่ได้ไปแยก หน่วยย่อยหรือสายกลอบิน โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ C_4 ซึ่งต่อกับการ์ดคอลัมน์ ใช้เครื่องตรวจวัด ชนิด photodiode array detector ตรวจวัดโปรตีนด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ปริมาณสารละลายอีโมโกลบินที่ใช้ฉีด (injection volume) เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วยเครื่องฉีดสารอัตโนมัติ
3. สภาพที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด สารละลายอีโมโกลบิน สารละลายเอ เป็นสารละลายผสมของ 70 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์ เกรด HPLC กับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก สารละลายบี เป็นสารละลายผสมของ 30 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์ เกรด HPLC กับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีองค์ประกอบคงที่ตลอดการทดลอง (isocratic elution) เป็นสารละลายผสมของ 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และอะซีโทไนไตรล์ในน้ำ (70:30) โดยใช้อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที เวลา 30 นาที
4. เก็บสารละลายของสายกลอบินของอีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งแยกได้จากคอลัมน์ของรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี ไวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

5. นำสารละลายชนิดของหน่วยย่อยของ ฮีโมโกลบิน ที่แยกได้ นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี

6. ดูดสารละลายของสายกลอบินของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ผสมกับกรดไซแนมินิก ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ลงบนเพลตตัวอย่างผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดเบาๆ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

7. นำเข้าเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ ยิงด้วยไนโตรเจน เลเซอร์ นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์หา น้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดต่อไป

1.10 ศึกษาลำดับกรดอะมิโน(amino acid sequence) ของสายกลอบินของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี

อุปกรณ์

1. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ต่อเชื่อมกับเครื่องรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี (Ultimate 3000 LC system (Dionex, U.S.A.) coupled to ESI-Ion Trap MS (HCT ultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik, Germany) with electrospray)
2. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)
3. ตู้บ่ม (incubator)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Centurion Scientific, UK)
5. เครื่อง shaking incubator (VS-84805FN, Korea)

สารเคมี

1. 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (100% acetonitrile, ACN)
2. 50 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (50% acetonitrile, ACN)
3. 30 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ (30% acetonitrile, ACN)
4. 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก (0.1% acetic acid)
5. 10 มิลลิโมลาร์ ไดไซโอไธรตอล (10 mM Dithiothreitol, DTT)

6. 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต (10 mM ammonium bicarbonate)
7. 100 มิลลิโมลาร์ ไอโอโดอะเซตาไมด์ (100 mM iodoacetamide)
8. 10 นาโนกรัม ทริปซิน (10 ng trypsin)
9. 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก (0.1% formic acid)
10. โปรตีนมาตรฐานซีรัมอัลบูมินของโค (Bovine Serum Albumin, BSA)

สารตัวอย่าง

แถบของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินที่ได้จากการแยกด้วยวิธีโซเดียม ไดดีซัลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

วิธีการ

1. ตัดชิ้นเจลบริเวณแถบของโปรตีนขนาดประมาณ 1×1×1 มิลลิเมตร ใส่ใน 96-well plate
2. ล้างสีโคแมสซึบลูอาร์-250 ด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น
3. เติม 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
4. ดูดอะซิโตไนไตรล์ทิ้งไป แล้วปล่อยให้เจลแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที
5. เติมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ ไดโซโอไซเตรตอล ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. ดูดสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ ไดโซโอไซเตรตอล ทิ้งไป
7. เติมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 100 มิลลิโมลาร์ ไอโอโดอะเซตาไมด์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8. คูดสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 100 มิลลิโมลาร์ ไอโอโดอะเซตาไมด์ ทิ้งไป

9. เดิม 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วคูดอะซิโตไนไตรล์ทิ้งไป ทำซ้ำ 3 รอบ

10. เดิมสารละลาย 10 นาโนกรัม ทริปซิน ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ที่มี 50 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อย่อยโปรตีน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

11. เดิม 30 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

12. คูดของเหลวแต่ละตัวอย่างใส่ใน 96-well plate อันใหม่

13. เดิมสารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ในน้ำกลั่น ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใน 96-well plate อันเดิม เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที คูดตัวอย่างแต่ละชนิดใส่ใน 96-well plate อันใหม่ ทำซ้ำ 3 รอบ

14. ทำตัวอย่างให้แห้งด้วย ตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือ 1 คืน เก็บรักษาตัวอย่างที่ได้ที่ -80 องศาเซลเซียส รอนำไปวิเคราะห์ผลด้วย LC/MS/MS

15. ละลายตัวอย่างที่ย่อยได้ด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ปริมาตร 6 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

16. คูดของเหลวที่ได้ใส่ insert tube เพื่อวิเคราะห์ผล ด้วย LC/MS/MS ที่อัตราเร็ว 20 ไมโครลิตรต่อนาที ต่อ μ -precolumn (Acclaim PepMap 100 C 18, 5 μ m, 100 A, 300 μ m i.d. x 5 mm) ตัวอย่างถูกแยกด้วย นาโนคอลัมน์ (Acclaim PepMap 100 C18, 3 μ m, 100 A, 75 μ m id x 150 mm) ด้วยอัตราเร็ว 300 นาโนลิตรต่อนาที โดยใช้สารละลายเกรเดียนต์ (solvent gradient) (Solvent A: 0.1% formic acid in water; Solvent B: 0.1% formic acid in 80% ACN) เป็นเวลา 20 นาที

17. นำผล LC/MS/MS มาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม MASCOT จาก Matrix Science Ltd. (London, UK) (Perkin *et al.*, 1999)

18. นำข้อมูลสเปกตรัมพีคที่ได้ในรูปแบบ MASCOT generic-format (mgf) ทำการระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม MASCOT ค้นหาใน MASCOT MS/MS ion search เลือกค้นจากฐานข้อมูลจาก NCBI ในอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของคลาส (Class) แมมมาเลีย (Mammalia) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals) โดยเลือกใช้เอนไซม์ทริปซินในการย่อยโปรตีนและให้โอกาสทริปซินในการตัดผิหลังหมู่คาร์บอกซิลของไลซีนและอาร์จินีนเพียง 1 ตำแหน่ง เลือกใช้วิธีการบามิโดเมทิลเลชัน (carbamidomethylation) ที่กรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นการปรับแต่งแบบคงที่ (fixed modification) เลือกใช้การออกซิเดชันของเมทไธโอนีน เป็นการปรับแต่งแบบตัวแปร (variable modification) นอกจากนี้ตั้งค่าพารามิเตอร์ ในการหาประจุเปปไทด์ที่ 1+ 2+ 3+ เลือกเครื่องมือที่ใช้เป็น ESI-Trap ซึ่งจากข้อมูล MASCOT ที่ได้ มีค่า Ion score เท่ากับ $-10 \cdot \log(P)$ โดยที่ P เป็นค่าความน่าจะเป็นในเหตุการณ์ที่เกิดเป็นอิสระ ถ้าค่า Ion score แต่ละส่วนมีค่ามากกว่า 45 แสดงว่ามีความเหมือนกัน (identity หรือ extensive homology) ($P < 0.05$)

ส่วนที่ 2 นำมาวิเคราะห์เป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.1 แยกรูปแบบซีรัมโปรตีนจากตัวอย่างซีรัมของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยใช้เทคนิคเซลล์โลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส (วิธีของ Helena Laboratories, 1994)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือเซลล์โลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสพร้อมกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Helena Laboratories, France)
2. จานแก้ว (plate)
3. ตู้อบ (Memmert, Germany)
4. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
5. กระดาษกรอง
6. แผ่นสไลด์

สารเคมี

1. แผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (Titan[®] III Cellulose Acetate Plate) ขนาด 94 x 76 มิลลิเมตร
2. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-บาร์บิทอล-โซเดียม บาร์บิทอล (Electra[®] HR buffer) พีเอช

8.8

3. สีย้อมฟองโซเอส (Ponceau S) ประกอบด้วย
 - 3.1 0.5 เปอร์เซ็นต์ ฟองโซเอส ในสารละลาย 3.5 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลโฟซาลิไซลิก และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรอะซีติก
4. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย
 - 4.1 5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซีติก
 - 4.2 เมทานอล
5. สารละลาย clearing ประกอบด้วย
 - 5.1 30 ส่วน กรดอะซีติก
 - 5.2 70 ส่วน เมทานอล
 - 5.3 4 ส่วน Clear Aid

วิธีการ

1. นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 5 นาที
2. เทสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในอ่างอิเล็กโทรด ทั้ง 2 อ่างใช้กระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เป็นสะพานเชื่อมระหว่างแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตและสารละลายบัฟเฟอร์
3. นำซีรัม จำนวน 8 ไมโครลิตร ใส่ลงใน sample plate
4. นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่แช่ในบัฟเฟอร์มาซับด้วยกระดาษกรอง
5. นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่ใส่ตัวอย่างแล้วมาวางคว่ำหน้าบนอ่างอิเล็กโทรด ใช้แผ่นสไลด์วางทับบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตเพื่อให้ผิวหน้าสัมผัสกับกระดาษกรองและปิดฝาอ่างอิเล็กโทรด

6. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 180 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที

7. ย้อมสีโปรตีนโดยแช่แผ่นเซลลูโลสอะซีเตตในสารละลายสีย้อมฟองโซเอส เป็นเวลา 5 นาที

8. ล้างสีย้อมในกรดโดยนำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตมาแช่ลงในกรดอะซีติก 2 ครั้งๆละ 3 นาที

9. แช่แผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ในเมธานอล 2 ครั้งๆละ 3 นาทีและแช่ลงในสารละลาย clearing เป็นเวลา 9 นาที

10. อบแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

11. นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตมาหารูปแบบของซีรัมโปรตีน (serum protein patterns) โดยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

2.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีไบยูเรต (Biuret Method) ดัดแปลงจากวิธีของ Gornall *et al.* (1949)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible recording spectrophotometer UV-160, Shimadzu, Japan)
2. อ่างน้ำอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐานของซีรัมอัลบูมินของโค 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว
3. สารละลายไบยูเรต (biuret reagent) เตรียมโดยละลาย 1.5 กรัม ของคอปเปอร์ซัลเฟต

(copper sulfate) 6 กรัม ของโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (sodium-potassium tartrate) ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ค่อยๆเติม 300 มิลลิลิตร ของ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) กวนสารละลายผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ลิตร เขย่าสารละลายให้ผสมเข้ากันดี

วิธีการ

1. บรรจุสารละลายโปรตีนมาตรฐานลงในหลอดทดลองปริมาตร (ทำซ้ำ 2 ชุดที่เหมือนกัน) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

หลอดที่	blank	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ปริมาตรโปรตีน (มิลลิลิตร)	-	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0
ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	-	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.2	0

2. เตรียมสารละลายอีโมโกลบินและซีรัม จากนั้นนำสารละลายที่ได้บรรจุหลอดทดลอง 2 หลอด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายไบยูเรต 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรทันที

4. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน จากกราฟหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายอีโมโกลบินและซีรัม

ผลและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย (PCV) และค่าความเข้มข้นของ ฮีโมโกลบิน เฉลี่ย (Hb) ร่วมกับการพิจารณาค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (RBC indices) ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่นำมาศึกษามีค่าอยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ (normal reference range) ดังแสดงในตารางที่ 8 จึงสามารถนำตัวอย่างเลือดไปศึกษาในขั้นต่อไปได้

ตารางที่ 8 ตารางแสดงค่าโลหิตวิทยาของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

ค่าโลหิตวิทยา	สุนัขพันธุ์ไทย หลังอาน	สุนัขพันธุ์ไทย บางแก้ว	พิสัยค่าอ้างอิงปกติ (ค่าเฉลี่ย) (Tvedten, 1989)
PCV (%)	39.39±1.23 ^a	36.38±0.77 ^b	36.8-54.4 (45.34)
Hb (g/dl)	13.75±0.47	13.10±0.32	13.3-19.2 (16.44)
Red blood cell (10 ⁶ /μl)	6.57±0.20 ^a	6.06±0.13 ^b	5.57-7.98 (6.69)
MCHC (%)	34.79±0.34	36.09±0.65	33.6-38.3 (36.07)
MCH (pg)	20.87±0.20	21.66±0.38	21.5-27.2 (24.45)
MCV (fl)	59.95±1.87	60.03±1.27	59.0-75.2 (67.7)
Plasma protein (g/dl)	7.04±0.03	7.06±0.03	6.0-7.8

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่มีอักษรตัวยกกำกับต่างกัน (a,b) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างพันธุ์สุนัขทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1998)

โดยทั่วไปพบว่าค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และค่าจำนวนเม็ดเลือดแดง (Red blood cell number หรือ Erythrocyte number) มีความสัมพันธ์กัน ในสุนัขปกติที่เม็ดเลือดแดงมีขนาดปกติจะมีค่าความเข้มข้นของ Hb ประมาณ 1 ใน 3 ของค่า PCV หรือค่า PCV เท่ากับ 3 เท่าของค่าความเข้มข้นของ Hb พบว่าสอดคล้องกับ PCV และค่าความเข้มข้นของ Hb ที่เป็นค่าเฉลี่ยของสุนัขพันธุ์

ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว สายพันธุ์ละ 30 ตัว สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน มีค่า PCV (39.39 ± 1.23 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าค่า PCV (36.38 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์) สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเล็กน้อย ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม และค่าความเข้มข้นของ Hb (13.75 ± 0.47 กรัมต่อเดซิลิตร) ในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน สูงกว่าค่าความเข้มข้นของ Hb (13.10 ± 0.32 กรัมต่อเดซิลิตร) ในสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม จากการศึกษาค่าปกติทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิกในสุนัขโตเต็มวัยขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ พบว่าค่า PCV เฉลี่ยของสุนัขขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ เท่ากับ 42.82 39.49 และ 41.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นของ Hb เฉลี่ยของสุนัขขนาด เล็ก กลาง และใหญ่ เท่ากับ 15.13 13.89 และ 14.54 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ (พัทธวรรณ และคณะ, 2546) นอกจากนี้จากการศึกษา ค่าโลหิตวิทยาและซีรัมโปรตีนในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน โดยแบ่งสุนัขออกเป็น 2 กลุ่มตามช่วงอายุ กลุ่มที่ 1 อายุไม่เกิน 1 ปี มีอายุเฉลี่ย 4 เดือน (ช่วงระหว่าง 2-7 เดือน) จำนวน 6 ตัวและกลุ่มที่ 2 อายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไปแต่ไม่เกิน 6 ปี มีอายุเฉลี่ย 2 ปี 9 เดือน (ช่วงระหว่าง 1-6 ปี) จำนวน 43 ตัว พบว่าสุนัขในกลุ่มอายุไม่เกิน 1 ปี มีค่า PCV (30.23 ± 2.14 เปอร์เซ็นต์) ค่าความเข้มข้นของ Hb (9.83 ± 0.99 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่า RBC (4.65 ± 0.35 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร) ต่ำกว่าสุนัขในกลุ่มอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไปแต่ไม่เกิน 6 ปี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่มีค่า PCV (38.56 ± 1.18 เปอร์เซ็นต์) ค่าความเข้มข้นของ Hb (13.93 ± 0.34 กรัมต่อเดซิลิตร) และค่า RBC (6.35 ± 0.13 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร) (จตุพร และคณะ, 2550) จากการศึกษาค่าโลหิตวิทยาในลูกสุนัข โดยแบ่งลูกสุนัขออกเป็น 2 กลุ่มตามช่วงอายุ กลุ่มที่ 1 อายุระหว่าง 0-6 สัปดาห์ มีอายุเฉลี่ย 32 วัน จำนวน 22 ตัว และกลุ่มที่ 2 อายุระหว่าง 6-12 สัปดาห์ มีอายุเฉลี่ย 61 วัน จำนวน 25 ตัว พบว่าลูกสุนัขอายุระหว่าง 0-6 สัปดาห์ มีค่า PCV (26.7 ± 2.99 เปอร์เซ็นต์) ค่าความเข้มข้นของ Hb (9.24 ± 0.99 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่า RBC (3.68 ± 0.49 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร) ต่ำกว่าค่า PCV (30.11 ± 4.91 เปอร์เซ็นต์) ค่าความเข้มข้นของ Hb (10.39 ± 1.53 กรัมต่อเดซิลิตร) และค่า RBC (4.39 ± 0.65 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร) ของลูกสุนัขอายุระหว่าง 6-12 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีแนวโน้มต่ำกว่าในสุนัขโตเต็มวัย (จันทร์จิรา และคณะ, 2544)

ค่า PCV จากการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงมีความแม่นยำสูง มีโอกาสเกิดความผิดพลาดเพียง ± 1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของ Hb ที่วัดด้วยวิธี ไชยาโนเมทีโมโกลบิน มีความแม่นยำสูง มีโอกาสเกิดความผิดพลาดเพียง ± 5 เปอร์เซ็นต์ ค่าที่ได้อาจมีค่าสูงกว่าความเป็นจริงได้ในกรณีที่มีไขมันในเลือด (lipemia) และพบ Heinz body ที่อาจเกิดจากความไม่เสถียรภาพของฮีโมโกลบิน (unstable Hb) ที่ไม่มีโอกาสเกิดได้ในสุนัขที่สุขภาพดี (Brunk, 1969) นอกจากนี้เทคนิคการเก็บตัวอย่างเลือดเมื่อใช้ EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ควรระวังการมี EDTA

ที่มากเกินไป ดังนั้นถ้าเก็บตัวอย่างเลือดน้อยกว่า 0.25 มิลลิลิตรในหลอดเก็บเลือด 3 มิลลิลิตร อาจทำให้เกิดการหดตัวของเม็ดเลือดแดง มีผลทำให้ค่า PCV น้อยกว่าปกติได้ (เจเลียว, 2548; Jain, 1993) ค่า RBC มีประมาณ 1 ใน 6 ของ PCV ค่า RBC ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเท่ากับ 6.57 ± 0.20 และ 6.06 ± 0.13 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ มีค่า อยู่ในพิสัย ค่าอ้างอิงปกติ 5.57-7.98 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร เมื่อมีภาวะโรคหรือมีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงเกิดขึ้นจะทำให้ไม่เป็นไปตามความสัมพันธ์นี้ เช่นในกรณีสุนัข พันธุ์อลาสกัน มาลามิวท์ (Alaskan malamute) ที่เกิดภาวะเตี้ยแคระ (dwarfism) ที่เกิดจากกระบวนการผลิต โกรทฮอร์โมน (growth hormone) ผิดปกติ มีสัดส่วนของค่า PCV ต่อความเข้มข้นของ Hb เท่ากับ 4:1 หรือ 5:1 แทนที่จะเป็น 3:1 เหมือนสุนัขปกติทั่วไป ค่าพลาสมาโปรตีนของสุนัขพันธุ์ไทยหลัง อานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเท่ากับ 7.04 ± 0.03 และ 7.06 ± 0.03 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ มีค่า อยู่ในพิสัยค่า อ้างอิงปกติ 6.0-8.0 กรัมต่อเดซิลิตร เมื่อเกิดภาวะร่างกายขาดน้ำ (dehydrate) จะมีผลทำให้ค่า PCV Hb และ RBC สูงขึ้น นอกจากนี้ภาวะร่างกายมีน้ำเกิน (overhydration) จากการให้สารน้ำมีผลทำให้ ค่า PCV Hb และ RBC ต่ำลง (Jain, 1986, 1993)

ดัชนีของเม็ดเลือดแดงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการดูความผิดปกติของ เม็ดเลือดหรือ ภาวะโลหิตจางได้ ซึ่งประกอบด้วย 1. ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) สามารถคำนวณหาค่า MCHC จากค่าฮีโมโกลบิน และ PCV ตามสูตร คือ $MCHC (g/dl) = \frac{Hb (g/dl) \times 100}{PCV (\%)}$

2. ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (Mean corpuscular hemoglobin, MCH) สามารถคำนวณหาค่า MCH ตามสูตร คือ $MCH (pg) = \frac{Hb (g/dl) \times 10}{RBC \text{ count } (10^6/\mu l)}$

3. ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (Mean corpuscular volume, MCV) สามารถคำนวณหาค่า MCV ตามสูตร คือ $MCV (fl) = \frac{PCV (\%) \times 10}{RBC \text{ count } (10^6/\mu l)}$

ค่า MCHC ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเฉลี่ยเท่ากับ 34.79 ± 0.34 และ 36.09 ± 0.65 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่า MCHC มีค่าอยู่ในพิสัยค่าอ้างอิงปกติ (33.6-38.3 เปอร์เซ็นต์) แต่ถ้าค่า MCHC ที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 36 กรัมต่อเดซิลิตร อาจเกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย (*in vivo*) หรือภายนอกในร่างกาย (*in vitro*) ทำให้ค่า PCV ที่ปั่นได้ต่ำกว่าความเป็นจริง เป็นผลให้เมื่อนำค่า PCV ไปหารจึงทำให้ค่า MCHC เพิ่มขึ้นแบบลวง โดยทั่วไป

ในสภาพปกติค่า MCHC ไม่ควรเพิ่มขึ้น เพราะเม็ดเลือดแดงไม่สามารถเพิ่มการสร้างฮีโมโกลบินได้ แต่ค่า MCHC เพิ่มขึ้นได้เพียงเล็กน้อยจากกรณีที่มีการเพิ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิดสเฟียร์โรไซต์ (spherocyte) เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีผลทำให้ค่า PCV ลดลง เมื่อนำไปหารจึงทำให้ค่า MCHC เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ค่า MCHC ที่ลดลง น้อยกว่า 32 กรัมต่อเดซิลิตร อาจเกิดจากเม็ดเลือดแดงติดสีของ ฮีโมโกลบินน้อยกว่าปกติ (hypochromasia) ทำให้ติดสีขาวกลางเซลล์กว้าง (central pallor) ทำให้ค่า MCHC ต่ำ สามารถพบได้ในกรณีการขาดธาตุเหล็ก การขาดโปรตีนรุนแรง และการมีเรติคิวโลไซต์ จำนวนมากทำให้ความเข้มข้นของ Hb ต่ำ ส่งผลให้ค่า MCHC ต่ำลง จะเห็นได้ว่าค่า MCH ขึ้นกับ ปัจจัยที่มีผลคล้ายกับ MCHC ในทางปฏิบัตินิยมใช้ค่า MCHC มากกว่า (เจเลียว, 2548; Tvedten, 1989; Jain, 1993)

ค่า MCV ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเท่ากับ 59.95 ± 1.87 และ 60.03 ± 1.27 เฟมโตลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่า MCV มีค่าอยู่ในพิสัยค่าอ้างอิงปกติ (59.0-75.2 เฟมโตลิตร) แต่ถ้าค่า MCV ที่เพิ่มขึ้น เกิดจากการมีเรติคิวโลไซต์มากกว่าปกติ ในสุนัขพันธุ์ พุดเดิ้ล (poodle) โดยปกติจะมีค่า MCV มากกว่า 80 แสดงว่ามีเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดใหญ่ผิดปกติ (macrocytic) แต่มีการติดสีของเม็ดเลือดแดงปกติ (normochromic) และมีรูปร่างของเม็ดเลือดแดงผิดปกติ เช่นมี ชิ้นส่วนของนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงที่มี นิวเคลียส (nucleated erythrocyte) และมีส่วนของ โฮเวล จอลลีบอดี (Howell-Jolly body) ในเม็ดเลือดแดงที่โตเต็มวัย ส่วนพันธุ์ เจแปนนิส อะคิตะ (Japanese akita) โดยทั่วไปมีค่า MCV เท่ากับ 55-65 เฟมโตลิตร แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็กกว่า สายพันธุ์อื่นๆ เป็นลักษณะประจำพันธุ์ ของพันธุ์นี้ นอกจากนี้ในกลุ่มสุนัข อายุขัยน้อยเม็ดเลือดแดงมี ขนาดเล็ก (microcytic) มีค่า MCV ต่ำอาจแปลผลว่าเกิดภาวะการ ขาดธาตุเหล็ก ได้ (Jain, 1986; Tvedten, 1989; Jain, 1993)

ค่าโลหิตวิทยา มีส่วนสำคัญ ในการวินิจฉัยโรคและประเมินสภาพของสุนัข การเปลี่ยนแปลงค่า โลหิตวิทยาขึ้นอยู่กับ อายุ เพศ พันธุ์ การเลี้ยงดูและอาหาร แต่การใช้ค่าอ้างอิง มาตรฐานจากสุนัขที่มีสุขภาพแข็งแรงเป็นปกติของสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งยังคงมีข้อจำกัดอยู่บ้าง ตรงที่ค่าที่ใช้อ้างอิงอาจมีผลจากความแตกต่างจาก สภาพการเลี้ยงดู อาหาร และปัจจัยจากสภาวะ แวดล้อมของตัวสัตว์ เช่น อายุ เพศ และพันธุ์ นอกจากนี้วิธีที่ใช้ในตรวจและความไวในการตรวจ มี ผลต่อค่าอ้างอิงทั้งสิ้น โดยเฉพาะสภาพร่างกายรวมถึงความแข็งแรงของสุนัขแต่ละตัว กิจกรรม ของ สัตว์ ลักษณะทางสรีรวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของสุนัขที่เห็นจากภายนอกกว่าปกตินั้นจริงๆแล้วอาจจะมี ความผิดปกติบางประการเกิดขึ้นกับสุนัข ดังนั้นเพื่อจำกัดความคลาดเคลื่อนจากตัวสุนัขที่ใช้เป็น ค่าอ้างอิงในตำราโลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์และเพื่อลดปัญหาจากตัวสัตว์มักนิยมใช้สุนัขพันธุ์บีเกิ้ล

สายพันธุ์อเมริกัน อังกฤษ หรือฝรั่งเศส นำมาใช้เป็นค่าอ้างอิงมาตรฐาน (Brunk, 1969; Jain, 1986, 1993)

ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดง (red cell parameter) เช่น ค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และ ค่า RBC มีความสัมพันธ์กับอายุ พบว่าในช่วงแรกเกิดมีค่าสูงต่อมาจะค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งลูกสุนัขอายุ 1 เดือน การเปลี่ยนแปลง นี้เกิดจากการเพิ่มการทำลายเม็ดเลือดแดงในช่วงทารก จากนั้นเมื่ออายุ 2 เดือน ค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และค่า RBC จะค่อยๆเพิ่มขึ้น จนกระทั่งระดับเท่ากับในช่วงโตเต็มวัยเมื่ออายุประมาณ 1 ปี ในสุนัขพันธุ์บีเกิ้ลค่า PCV จะเพิ่มขึ้น 43 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออายุ 2-8 เดือน โดยมีรูปแบบ ที่เพิ่มขึ้นเหมือนกับ ความเข้มข้นของ Hb และ ค่า RBC ที่ค่อยๆเพิ่มขึ้นเช่นกัน จากการศึกษาค่าโลหิตวิทยาในสุนัขพันธุ์เยอรมันเชพเพิร์ด (German shepherd) 73 ตัว อายุระหว่าง 6 เดือน และ 7 ปี พบว่าอายุไม่มีผลต่อความแตกต่างของ ค่า RBC และ เม็ดเลือดขาว แต่พบความแตกต่างของความเข้มข้นของ Hb, MCV, MCH และ MCHC (Jain, 1986, 1993)

ความแตกต่างของพันธุ์สุนัข บางสายพันธุ์ มีผลต่อค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และ ค่า RBC พบว่า สุนัขพันธุ์ พุดเดิ้ล เยอรมันเชพเพิร์ด บ็อกเซอร์ (boxer) บีเกิ้ล (beagle) คัชชุน (dachshund) และชิวาว่า (chihuahua) มีค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และ ค่า RBC สูงกว่าค่าอ้างอิงปกติในสุนัข ส่วนสุนัขพันธุ์เกรย์ฮาวด์ (Greyhound) มีค่า PCV และความเข้มข้นของ Hb สูงกว่าสุนัขสายพันธุ์อื่นในช่วงวัยเดียวกัน ค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีในพันธุ์ดัลเมเชียน (dalmatian) มีค่าใกล้เคียงกับพันธุ์บีเกิ้ล มีค่า PCV อยู่ระหว่าง 50-55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเกิดจากความกลัวจากการตรวจและบังคับสัตว์เพื่อเจาะเลือด ทำให้มีมีการหดตัวบีบเม็ดเลือดแดงเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตมากขึ้น ซึ่งกรณีนี้จะไม่พบในสัตว์ที่คัดค้าน นอกจากนี้พบได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงสูง (hemoconcentration) จากกรณี ที่ร่างกายขาดน้ำ ทำให้มีปริมาตรของพลาสมาลดต่ำกว่าปกติ มีผลทำให้ค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และค่า RBC สูงขึ้น (Jain, 1986, 1993)

ความแตกต่างของเพศ ในระบบหมุนเวียนของเม็ดเลือดแดง มีความเห็นไม่ตรงกันเกี่ยวกับการที่เพศมีผลต่อค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และค่า RBC จากการศึกษาในสุนัขพันธุ์ บีเกิ้ล เพศผู้ 46 ตัว และเพศเมีย 68 ตัว พบว่าในเพศผู้มีความเข้มข้นของ Hb (16 กรัมต่อเดซิลิตร) สูงกว่าเพศเมีย (15.6 กรัมต่อเดซิลิตร) เล็กน้อย นอกจากนี้ในสุนัขพันธุ์ บีเกิ้ลเพศผู้มีค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และค่า RBC สูงกว่าเพศเมีย จากการติดตามค่า PCV ในช่วงตั้งท้องพบว่าจะลดลงจากค่าเฉลี่ย

ประมาณ 53 เปอร์เซ็นต์ลงไปถึง 32 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้น 42 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 6 สัปดาห์ต่อมา จนกระทั่งกลับมาปกติใน 9 สัปดาห์ จากการศึกษาเพิ่มเติมในสุนัขพันธุ์บีเกิ้ล เพศผู้ 101 ตัว และเพศเมีย 101 ตัว พบว่ามีค่า PCV เฉลี่ย 42.5 เปอร์เซ็นต์ ในเพศผู้ และ 44.6 เปอร์เซ็นต์ ในเพศเมีย ตามลำดับ ส่วน ความเข้มข้นของ Hb และ ค่า RBC ก็ให้รูปแบบเหมือนกันกับค่า PCV นอกจากนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมในสุนัขพันธุ์ บีเกิ้ล เพศผู้ 382 ตัว และเพศเมีย 382 ตัว อายุระหว่าง 8 ถึง 16 เดือน พบว่าอายุมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และค่า RBC แต่เพศไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าว ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าความแตกต่างระหว่างเพศเป็นค่าที่ทำให้ค่า PCV ความเข้มข้นของ Hb และ ค่า RBC มีความแตกต่างในทางปฏิบัติ น้อยมาก (Jain, 1986, 1993)

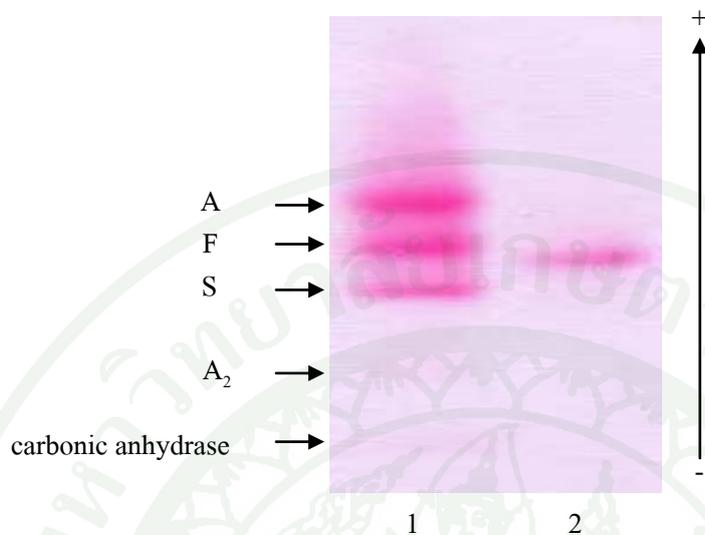
จากการวิเคราะห์ ค่า PCV Hb ร่วมกับค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีค่าอยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิง ปกติ จึงนำตัวอย่างเลือดไปศึกษาในขั้นต่อไปได้

2. การศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

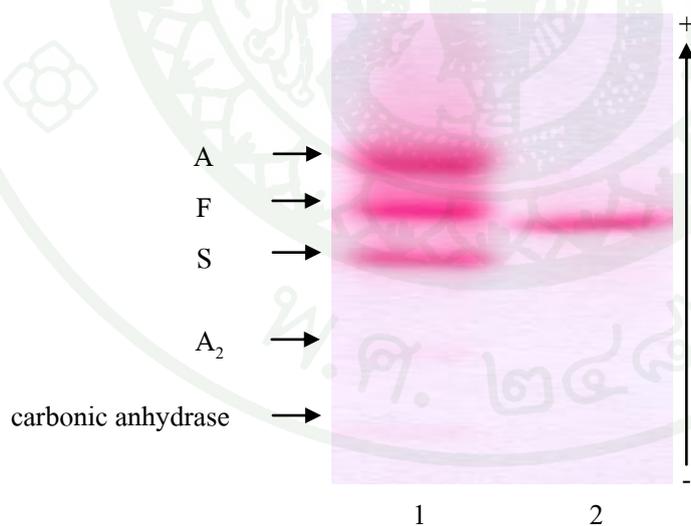
2.1 วิธีเซลล์โลสอะซีเตตอเล็กโตรโฟรีซิส

จากการศึกษาฟิโนไทป์ และชนิดของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วโตเต็มวัย โดยใช้เทคนิคเซลล์โลสอะซีเตตอเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีของ Helena Laboratories (U.S.A.) โดยใช้สารละลายฮีโม โกลสแต พบว่าฮีโมโกลบินของ สุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์ มีฟิโนไทป์เดียว ที่มีแถบความคมชัด เมื่อเทียบกับ สารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบินของคน ซึ่งแยกออกจากกันชัดเจน (เลนที่ 1) ประกอบด้วย Hb A ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ระยะทางไกลที่สุด รองลงมาคือ Hb F Hb S Hb A₂ และ carbonic anhydrase ตามลำดับ ฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน ประกอบด้วย 1 แถบ (เลนที่ 2) (ดังภาพที่ 26) และฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทย บางแก้ว ประกอบด้วย 1 แถบ (เลนที่ 2) (ดังภาพที่ 27) ให้ผลการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า จากขั้วลบไปหาขั้วบวกเหมือนกัน โดย เคลื่อนที่อยู่ระหว่าง Hb F และ Hb S แสดงให้เห็นว่าที่พีเอช 8.2-8.6 ฮีโมโกลบินของสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์มีประจุลบเหมือนกัน ทำให้มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก เหมือนกัน สอดคล้องกับอมรรัตน์และคณะ (2548) ที่ทำการศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินระหว่างสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์และสุนัขที่ป่วยเป็นโรคบาบีเซีย (babesia) โดยไม่ระบุ

สายพันธุ์เพศ และอายุ โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตดอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าสุนัขทั้งสองกลุ่มมีฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ 1 แบบที่ประกอบด้วย 1 แถบเหมือนกัน



ภาพที่ 26 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลเสตของคน (เลนที่ 1) และสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (เลนที่ 2) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตด ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)



ภาพที่ 27 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลเสตของคน (เลนที่ 1) และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (เลนที่ 2) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตด ที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)

ให้ผลการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก เหมือนกัน โดยเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง Hb F และ Hb S เหมือนกัน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการไม่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในสายกลอบิน ทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์กับ ภาวะการเกิดโรคบาบิเซีย แต่มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบินและความต้านทานต่อโรคที่เกิด จากเชื้อโปรโตซัวในเลือดโค โดยโคที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb AA แสดงความต้านทานต่อการติดเชื้อทริปพาโนโซม (trypanosome) ได้สูงกว่าโคที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb BB (Bachmann *et al.*, 1978) เช่นเดียวกับ Francis and Little (1964) ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฮีโมโกลบินในโค และความต้านทานต่อเห็บ ความแตกต่างของฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ในสุนัขถูกควบคุมโดย ตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมร่างกาย (autosomal locus) 1 ตำแหน่ง ที่มี 2 อัลลีล ประกอบด้วย Hb A และ Hb B จากผลการศึกษาฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว พบมีเพียงฟีโนไทป์เดียว ที่เหมือนกัน ประกอบด้วย 1 แถบ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เปรียบเทียบกับผลการศึกษา ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ในสุนัขที่มีก่อนหน้า นี้ พบว่ามีความ สอดคล้องกับการศึกษาฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ในสุนัข ประกอบด้วย 1 แถบ (Naik *et al.*, 1971; Simonsen, 1976) และยังสอดคล้องกับการศึกษาของอมรรัตน์และคณะ (2548) ที่ทำการศึกษาในสุนัขเลี้ยงใน ไทย และพบว่าปรากฏเพียง แถบเดียวเช่นเดียวกัน ซึ่งการพบลักษณะของ ฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ที่มี แถบของฮีโมโกลบิน ปรากฏเพียง แถบเดียวนั้นน่าจะเป็นผลมาจาก ยีนที่ควบคุมลักษณะของ ฮีโมโกลบิน นั้นๆ มีลักษณะเป็น โฮโมไซกัส อัลลีล (homozygous allele) ในขณะที่แตกต่างจากผล การศึกษาของ Tanabe *et al.* (1978) ที่ศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบินใน สุนัขพันธุ์พื้นเมือง ของญี่ปุ่น 7 สายพันธุ์ โดยใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแ่งเจล พบ 2 ชนิดของฮีโมโกลบินคือ A และ B และมีฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 3 ชนิด คือ Hb AA Hb AB และ Hb BB นอกจากนี้ในสุนัขสายพันธุ์ ยุโรป 25 สายพันธุ์และสุนัขพันธุ์พื้นเมืองจากประเทศทางตะวันออกอีก 5 สายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ พื้นเมืองของญี่ปุ่น พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ เพียงชนิดเดียว คือ Hb BB ซึ่งเป็นแบบที่มี 2 แถบ ในขณะที่ Hb AA พบในสุนัขพันธุ์พื้นเมืองของญี่ปุ่น เกาหลี และเอสกีโม (Tanabe *et al.* 1978; Erdogan and Ozbeyaz, 2004; Dimitrijevic *et al.*, 2005, 2007)

การศึกษาฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบิน โดยการใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้หลักการการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้า ซึ่งตัวกลางค้ำจุนเป็นแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่มีหมู่ไฮดรอกซิลส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่อะซีเตต ทำให้มีคุณสมบัติไม่ดูดซับสาร ทำให้ผลการแยกดีขึ้น สามารถแยกออกเป็นแถบๆที่มีความคมชัด รวดเร็ว แม้ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ จากคุณสมบัติของเซลลูโลสอะซีเตตที่ไม่ดูดซับ สารทำให้หลังจากการย้อมสีจะเกิดพื้นหลังน้อย มีผลทำให้แผ่นใสจึงเพิ่มความไวในการตรวจวัด สามารถตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีสเปกโทรโฟโต

เมทรีได้ และสามารถชี้ สารละลายหลายชนิดในการชะสารที่แยกออกจากแผ่นเมมเบรนนี้ได้ (อาภัสตรา, 2537) ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่มีประจุเป็นลบจึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปหาขั้วบวก โดยระยะทางของการเคลื่อนที่ที่แตกต่าง กันนี้ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของประจุต่อมวล (charge per mass ratio) ของฮีโมโกลบินชนิดนั้นๆ และเนื่องจากฮีโมโกลบินแต่ละชนิด มีมวล (mass) ที่ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดมีการเคลื่อนที่ได้ระยะทางแตกต่างกันก็คือ ประจุสุทธิของฮีโมโกลบิน โดยพบว่าฮีโมโกลบินที่มีประจุสุทธิเป็นลบมากกว่าจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางไกลกว่าในเวลาเท่ากันและในกรณีที่เป็นฟิโนไทป์ที่ประกอบด้วยฮีโมโกลบินมากกว่า 1 ชนิดนั้นจะมีการเคลื่อนที่แยกออกจากกันของฮีโมโกลบินตามประจุสุทธิที่ต่างกัน พบว่าฮีโมโกลบินในระยะตัวอ่อน ลูกอ่อน และ โตเต็มวัยมีความหลากหลายในสัตว์แต่ละสปีชีส์เช่นเดียวกับที่พบในคน แต่มีจำนวนฟิโนไทป์ที่แตกต่างกัน โดยฮีโมโกลบินในระยะ ตัวอ่อน (Hb E) ในแพะและกระต่ายมี 1 ชนิด ในแกะและคนมี 2 ชนิด ในวัวมี 2-3 ชนิด ในแมวและหนูเมาส์มี 3 ชนิด ในหมูมี 2-4 ชนิด และในสุนัข ม้า หนูแกสบี้ (guinea pig) หนูแรท และกวาง (white-tailed deer) ไม่พบ Hb E ส่วนฮีโมโกลบินในระยะ ลูกอ่อน (Hb F) ในวัว แพะ แกะ กระต่าย หมู หนู แรท คน และ subhuman primate มี 1 ชนิด ใน white-tailed deer มี 1-2 ชนิด แต่ Hb E หรือ Hb F ในสุนัขและม้า ไม่สามารถแยกในสนามไฟฟ้า ออกจากฮีโมโกลบินในระยะโตเต็มวัย ได้ ซึ่ง Lecrone (1970) รายงานว่า ฮีโมโกลบินในระยะ โตเต็มวัย ในหมูมี 1 ชนิด ในสุนัข แมว ม้า และหนูแกสบี้มี 1-2 ชนิด ในแกะ และกระต่ายมี 1-4 ชนิด ในวัวมี 1-5 ชนิด ในแพะมี 1-6 ชนิด ใน white-tailed deer มี 1-8 ชนิด ในหนูเมาส์มี 2-6 ชนิด (Jain, 1993)

มีรายงานการศึกษา ความหลากหลายของฮีโมโกลบิน ฟิโนไทป์ ของ สัตว์สปีชีส์ต่างๆ จำนวนมาก โดยใช้ เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส อรพรรณ (2546) รายงานพบ ฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนมี 3 ชนิด คือ Hb AA Hb BB และ Hb AB ซึ่ง Hb AA ประกอบด้วย Hb slow ในขณะที่ Hb BB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ส่วนฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ ของกระบือปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB โดยที่แต่ละ ฟิโนไทป์ มีอัตราส่วนของ Hb fast และ Hb slow ไม่เท่ากัน ซึ่ง Hb BB มีอัตราส่วนของ Hb fast และ Hb slow เท่ากับ 2:1 ในขณะที่ Hb AB มีอัตราส่วนเท่ากับ 5:1 นอกจากนี้พบความแตกต่างในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของ Hb fast ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนเคลื่อนที่ ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกเร็วกว่า Hb fast ของกระบือปลัก สอดคล้องกับที่นนทวรรณ (2549) รายงานพบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระบือปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB สามารถแยก ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจาก ขั้วลบไปหาขั้วบวกพบว่า Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2:1

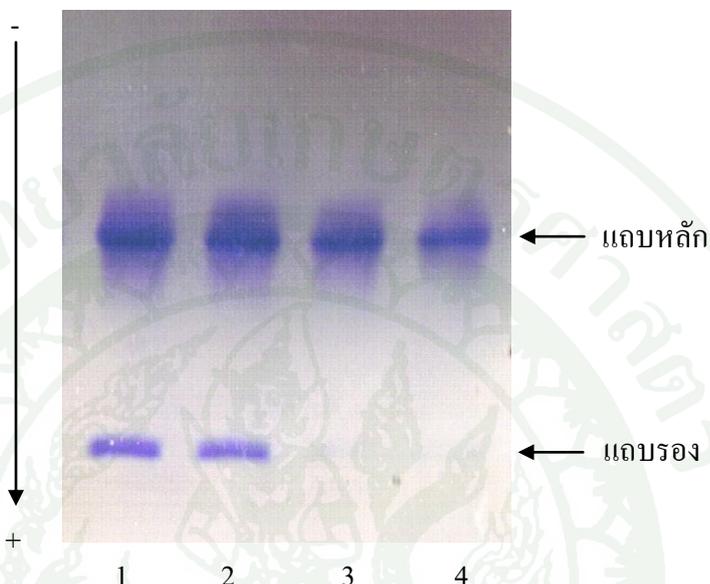
และ 5:1 ตามลำดับ สุวิชและคณะ (2548) รายงานพบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของโคเนื้อ ชนิด Hb C เพิ่มเติม มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เท่ากับ Hb fast ของกระบือปลัก นอกจากนี้พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 5 ชนิด ใน โคพื้นเมืองประกอบด้วย Hb AA Hb AB Hb AC Hb BB และ Hb BC และ พบฮีโมโกลบิน ฟีโนไทป์ 3 ชนิด ใน โคพันธุ์ผสม ซิมเมนต์ ลผสมบราห์มัน ประกอบด้วย Hb AA Hb AB และ Hb BB (Boonprong *et al.*, 2007) มีรายงานความหลากหลายของฮีโมโกลบินของแกะ 2 สายพันธุ์ Moghani และ Makouei ในอิหร่าน พบฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ 2 ชนิดในพันธุ์ Moghani ประกอบด้วย Hb AA และ Hb AB ส่วนในพันธุ์ Makouei ประกอบด้วย Hb AA และ Hb AB (Esharatkah *et al.*, 2007) จากรายงานการศึกษาฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ของกระรอกเปอร์เซียมี 2 ชนิด ประกอบด้วย Hb A และ Hb F เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของฮีโมโกลบินของกระรอกกับคนและกระต่าย พบว่า มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าใกล้ เคียงกับคนและมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกเร็วกว่ากระต่าย แสดงว่าฮีโมโกลบินของกระรอกมีประจุลบมากกว่ากระต่าย อาจเนื่องมาจากการที่มีกรดอะมิโนที่มีประจุลบในสาย ของฮีโมโกลบิน (Khazraimnia *et al.*, 2008) เกรียงไกร (2548) รายงาน ลักษณะฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบินของปลานิล พบว่าฮีโมโกลบินของปลานิลมีฟีโนไทป์เหมือนกันและมีฮีโมโกลบินจำนวนมาก ฮีโมโกลบินของปลานิล พบมี 9-11 ชนิด คมสัน (2551) รายงานความแตกต่างของฮีโมโกลบินของปลาน้ำจืด 2 ชนิดของไทย คือ ปลาตุ๊กและปลาตะเพียนที่มีความแตกต่างทั้งสายพันธุ์ พันธุกรรม รูปร่างลักษณะ และพฤติกรรมการดำรงชีวิต เมื่อศึกษาฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบินในสารละลายฮีโมไลเซตโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิสแบบเซลลูโลสอะซิเตด ฟีโนไทป์และชนิดของฮีโมโกลบินของปลาตุ๊กและปลาตะเพียนแสดงการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกที่ต่างกัน พบว่าฮีโมโกลบินปลาตุ๊กมีฟีโนไทป์ 1 ชนิด ประกอบด้วย 7 แถบ ส่วนฮีโมโกลบินปลาตะเพียน มีฟีโนไทป์ 1 ชนิด ประกอบด้วย 5 แถบ ซึ่งฮีโมโกลบินของปลาตุ๊กมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า ฮีโมโกลบินของปลาตะเพียน พบจำนวนแถบของโปรตีนจำนวนมากแต่มีแบบที่เหมือนกันในทุกตัวอย่างปลา ซึ่งจากรายงานการศึกษาพบว่า ปลามีฮีโมโกลบิน จำนวนมาก หลายชนิด ที่มีความสำคัญ ในการดำรงชีวิต อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ได้ดีซึ่งไม่เหมือนกับ สัตว์บก โดยที่ในพวกปลากระดูกอ่อน (Elasmobranchs) พบมีฮีโมโกลบิน 12-13 ชนิด ที่เรียกว่า Iso Hbs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน และมีโครงสร้างคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในพวกปลาแซลมอนและปลาเทราท์ (Salmonids) ฮีโมโกลบินมี 8-19 ชนิด มีฟีโนไทป์ที่มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน ในปลาแต่ละชนิด ทำให้มีความแตกต่างใน ความหลากหลายของฮีโมโกลบิน ปลาตั้งแต่ระดับอิน และ การทำหน้าที่ (Martin *et al.*, 1979a; Perry and Tufts, 1998; Prisco *et al.*, 2000; Weber, 2000a, 2000b)

เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโพรีซิส นิยมใช้แยกฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ ได้ผลรวดเร็ว แต่ประสิทธิภาพในการแยก ไม่ดีเท่ากับวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพรีซิส เนื่องจากเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโพรีซิส ยังไม่สามารถแยกฮีโมโกลบินที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม จึงจำเป็นต้องใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพรีซิส ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือ แมสสเปกโตรเมทรี (สุกัญญา, 2549) ชวดี และคณะ (2551) กล่าวว่า การแยกฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต เพื่อทดสอบแยกชนิดและวัดปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ในคนยังคงได้รับการแนะนำให้ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยัน จากข้อมูลการใช้งานของหน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตั้งแต่ พ.ศ. 2543-2549 หลังจากนำเครื่องอัตโนมัติที่ใช้หลักการโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง รุ่น VARIANT II (Biorad, U.S.A.) มาใช้งาน พบว่ามีข้อจำกัดในการใช้เครื่องนี้ ที่ไม่สามารถรายงานผล ฮีโมโกลบินเอช หรือฮีโมโกลบินบาร์ทได้ ต้องทำการทดสอบซ้ำด้วย ชุดคอลัมน์ α -thal short ทำให้เพิ่มต้นทุนและเวลาในการทดสอบมากขึ้น ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงยังคงใช้วิธีแยกฮีโมโกลบิน ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต เพื่อตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินเอช หรือฮีโมโกลบินบาร์ทเฉลี่ย 9.15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณงานทั้งหมด (ชวดี และคณะ, 2551)

2.2 วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพรีซิส

จากการศึกษาฟีโนไทป์ ของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วโตเต็มวัย โดยวิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพรีซิส (10% T 2.67% C ที่พีเอช 8.3) เมื่อนำสารละลายฮีโมโกลบินไปแยกฮีโมโกลบินในบริสุทธ์โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโตกราฟี สารละลายฮีโมโกลบินบริสุทธ์ที่แยกได้นำมาศึกษาฟีโนไทป์ และชนิดของฮีโมโกลบินโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโพรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่าฮีโมโกลบินของสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์ มีฟีโนไทป์เดียวและเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก เหมือนกับวิธีเซลลูโลสอะซีเตต จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตีวัน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน แสดงฮีโมโกลบิน ฟีโนไทป์ 1 ชนิด ประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดหลัก เฉลี่ยเท่ากับ 84.37 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ และชนิดรองเฉลี่ยเท่ากับ 15.63 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วแสดงฮีโมโกลบิน ฟีโนไทป์ 1 ชนิดเช่นเดียวกัน ประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดหลัก เฉลี่ยเท่ากับ 93.93 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ และชนิดรองเฉลี่ยเท่ากับ 6.07 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ดังภาพที่ 28) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโพรีซิสพบว่า วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพรีซิส มีตัวกลางค้ำจุนเป็น พอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งเนื้อต่อสารเคมี จึงทนต่อสภาพ

ความเป็นกรด-ด่าง ทนต่ออุณหภูมิและความแรงไอออน (ionic strength) อัตราการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของสารที่มีประจุ ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ ซึ่งเป็นอัตราส่วนของประจุต่อมวล ถ้าอัตราส่วนนี้สูง โมเลกุลจะเคลื่อนที่ได้รวดเร็ว เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับสารละลาย ฮีโมโกลบิน ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกันทำให้แยกออกจากกันได้



ภาพที่ 28 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของศูนย์พันธุวิทยาหลังอาณ (เลนที่ 1 และ 2) และ ศูนย์พันธุวิทยาบางแก้ว (เลนที่ 3 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (10% T 2.67% C ที่พีเอช 8.3) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซึบลูอาร์-250

การแยกโปรตีนจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่น ของประจุของโปรตีนที่ค่าพีเอช หนึ่งๆที่เลือก ส่วนตัวกลางค้ำจุนเป็น พอลิอะคริลาไมด์เจล สามารถลดการแพร่และป้องกันการเกิดการพาได้ดีทำให้การแยกได้แถบที่คมชัด นอกจากนี้ยังเป็นตัวกลางที่มีรูพรุนทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อน โมเลกุลได้เมื่อปรับขนาดของรูพรุนให้เหมาะสม ดังนั้นการแยกฮีโมโกลบินโดยใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล ลจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุและขนาดของสารที่ต้องการแยก จากเหตุผลนี้ทำให้โปรตีนผสมที่มีขนาดแตกต่างกัน แต่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากันจึงไม่ถูกแยกออกจากกันเมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบกระดาษ แต่ถ้าใช้ วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ขนาดของรูพรุนของเจลที่เหมาะสมจะมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดใหญ่ช้าลงกว่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดเล็กกว่า ทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากกันได้ (อาภัสสร, 2537; สุภัญญา, 2549)

จากการศึกษาฮีโมโกลบิน ฟ โนไทป์ สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทย บางแก้ว พบว่ามีฟิโนไทป์ 1 ชนิด ประกอบด้วย 2 แถบ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Jain (1993) กล่าวว่าฮีโมโกลบิน สุนัขในระยะโตเต็มวัย มี 1-2 ชนิด นอกจากนี้ มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ฮีโมโกลบิน สุนัข โดยการใช้ เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบแป้งเจล พบความแตกต่างของ ฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ ที่ถูกควบคุมด้วย คู่อัลลีลของ Hb A และ Hb B (Tanabe *et al.*, 1978) จาก การศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบินสุนัข จำนวน 114 ตัว โดยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจล แบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ 3 ชนิดในช่วงพีเอช ระหว่าง 7.0-7.6 มีความหลากหลายของฮีโมโกลบินที่ ถูกควบคุมโดยยีน Ht₈₃ และ Ht₈₅ ความแตกต่างของค่า pI ของ ฮีโมโกลบินทำให้ทราบ ลำดับกรดอะมิโนของสายอัลฟาและเบต้า ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ความหลากหลาย ของฮีโมโกลบิน ที่เรียกว่า “multiplicity polymorphism” (Braend, 1988) จากการศึกษาวิวัฒนาการ ของสายพันธุ์สุนัข ในประเทศญี่ปุ่น โดยการใช้ฮีโมโกลบินของสุนัขพื้นเมือง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ ฮ็อกไกโด อะคิตะ ไค โคชู ชิโกกุ และ ชิเบะ พบความถี่ของยีนมีความแตกต่างที่เด่นชัดระหว่างสาย พันธุ์และประชากรของสุนัขส่วนใหญ่อยู่ที่ส่วนของฮีโมโกลบิน ความแตกต่างนี้เองทำให้เกิด ลักษณะที่ต่างกันของวิวัฒนาการแต่ละสายพันธุ์ (Tanabe, 1990)

มีรายงานการศึกษาความหลากหลายของฮีโมโกลบิน ฟ โนไทป์ ของสัตว์สี่ขี้นต่าง ๆ จำนวนมาก เมื่อ ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล อรพรรณ (2546) รายงานพบฮีโมโกลบิน ฟ โนไทป์ ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนมี 3 ชนิด คือ Hb AA Hb BB และ Hb AB ซึ่งสอดคล้องกับเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน 3 ชนิดเหมือนกัน และมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไป ขั้วบวก ส่วนฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ ของกระบือปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB ซึ่ง สอดคล้องกับเมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ ของ กระบือปลัก 2 ชนิดเหมือนกันและมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก นันทวรรณ (2549) รายงานพบฮีโมโกลบิน ฟ โนไทป์ ของกระบือปลัก และกระบือแม่น้ำ โดยเทคนิค เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสและพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อใช้ความเร็วใน การเคลื่อนที่ของแถบฮีโมโกลบินในอิเล็กโตรโฟรีซิสจากขั้วลบไปยังขั้วบวก พบว่าทั้งสองเทคนิค ให้ผลเช่นเดียวกันพบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ ของกระบือปลักมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB และ พบฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ของกระบือแม่น้ำมี 2 ชนิด คือ Hb BB และ Hb AB ไม่พบ Hb AA ที่ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2:1 และ 5:1 ตามลำดับ นอกจากนี้เกรียงไกร (2548) ศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบิน ของปลานิล โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล ฮีโมโกลบินของปลา

นิลในสารละลายอีโมไลเสดแสดงฟิโนไทป์เดียวเช่นกัน ประกอบด้วยอีโมโกลบิน 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม แอนโอดิกและกลุ่มแคโรดิก พบว่ากลุ่มแอนโอดิกเป็น กลุ่มอีโมโกลบินหลัก ที่พบในคนและสัตว์บก มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกได้เร็วกว่ากลุ่ม แคโรดิกที่พบเฉพาะในปลา (เกรียงไกร, 2548; Weber, 2000a) จากผลการศึกษาของคมสัน (2551) เมื่อศึกษาฟิโนไทป์ของ อีโมโกลบินในสารละลายอีโมไลเสดโดย ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์ เจล ศึกษาฟิโนไทป์ของอีโมโกลบินในสารละลายอีโมไลเสด พบจำนวนแถบของโปรตีนลดลง แต่ยังคงมีแบบที่ เหมือนกันในทุกตัวอย่างปลา เมื่อทำให้อีโมโกลบินในสารละลายอีโมไล เสด บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟีพบอีโมโกลบินของปลาคะเพียนมี 1 ฟิโน ไทป์ที่มีอีโมโกลบิน 1 ชนิด ในขณะที่ปลาคูกมีอีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์เช่นกันแต่มีอีโมโกลบิน 2 ชนิด ประกอบด้วยชนิดหลักและชนิดรอง เมื่อศึกษาผลการทดลองทั้งหมดมีความเป็นไปได้ว่าทั้ง ปลาคูกและปลาคะเพียนน่าจะมีอีโมโกลบินกลุ่มแอนโอดิกไม่มีอีโมโกลบินกลุ่มแคโรดิก ซึ่งต่างจาก ปลานิลที่มีทั้ง 2 กลุ่ม

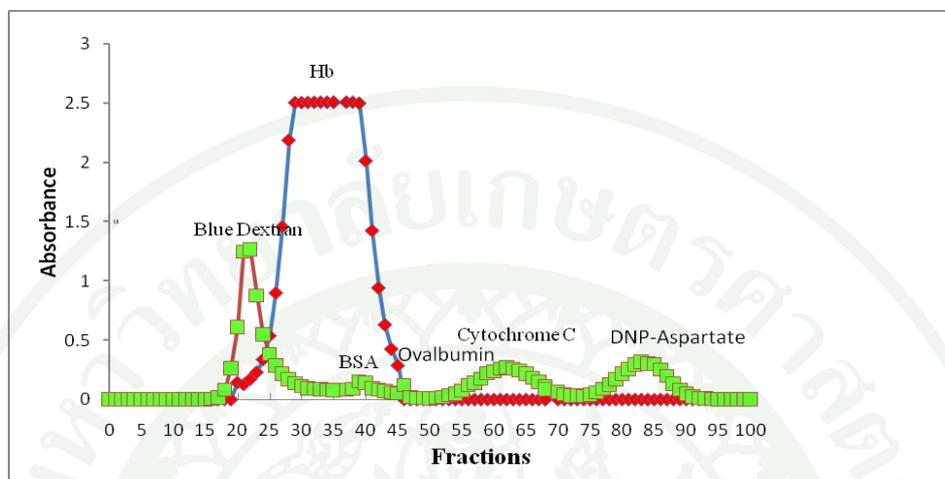
3. การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินและน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของอีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

3.1 วิธีเจลฟิลเตรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

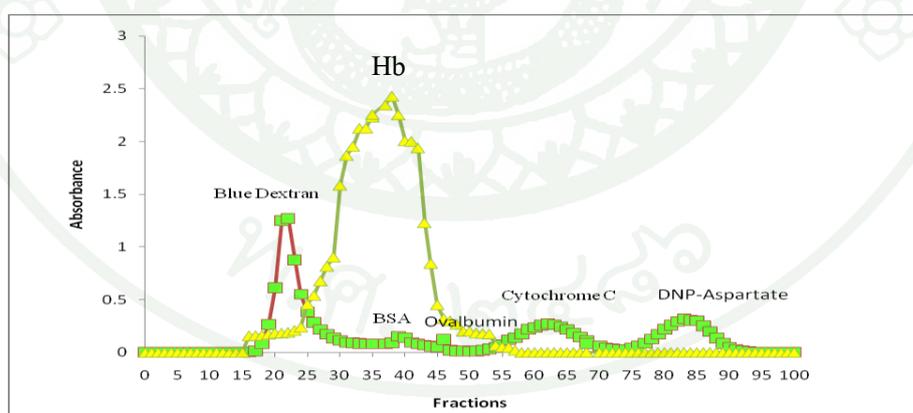
การทำเจลฟิลเตรชันคอลัมน์ โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 เกรดละเอียด ซึ่งมี ระดับการเชื่อมโยงเป นตาข่ายร่างแหอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,000-150,000 ดาลตัน ผลการชะสารของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและโปรตีนมาตรฐาน ดังภาพที่ 29 และสุนัข พันธุ์ไทยบางแก้วและโปรตีนมาตรฐาน ดังภาพที่ 30 ที่ผ่านเจลฟิลเตรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทรಿಸัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซนต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง รางคา K_d ของสารและ โปรตีนมาตรฐานและ ค่าลอการิทึมน้ำหนักโมเลกุล (Log M.W.) ของอีโมโกลบิน และ โปรตีนมาตรฐาน ดังภาพที่ 31 การหาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยการ สรางกราฟระหว่างรางคา K_d และค่า Log M.W. จากกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุล ของอีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และ สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ได้น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 64,000 ดาลตัน และ 65,956 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบิน ในสภาพ

ธรรมชาติ ที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย โดยน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินในสภาพธรรมชาติที่ได้ น้อยกว่าที่ Whitaker (1963) รายงานการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 68,000 ดาลตัน

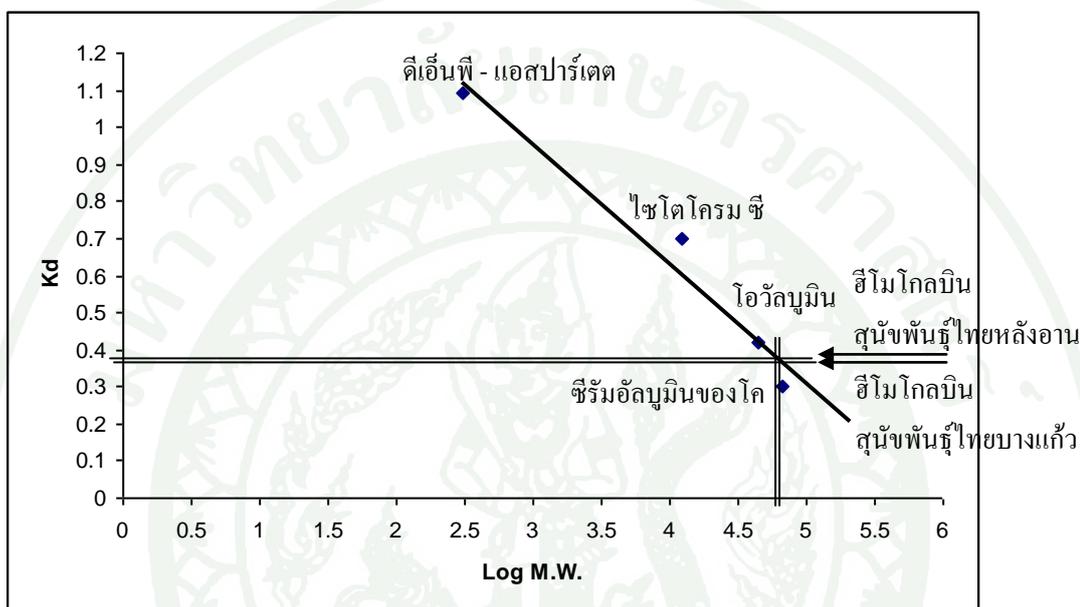


ภาพที่ 29 แสดงผลการชะสารชนิด ่างๆ ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและโปรตีนมาตรฐาน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพที่ 30 แสดงผลการชะสารชนิด ่างๆ ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว และโปรตีนมาตรฐาน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

น้ำหนักโมเลกุลที่ได้ต่ำกว่าจากที่เคยมีการศึกษาซึ่งอาจเกิดจากความเสถียรของโมเลกุลฮีโมโกลบิน มีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดการแยกตัวออกจากกันของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินหรือ เกิดจาก เจลมีการควบแน่นกับ โปรตีนตัวอย่างที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ที่มีความแรงไอออน (ionic strength) และพีเอชที่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน (Whitaker, 1963; Voet and Voet, 2004)



ภาพที่ 31 แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว จากกราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่างค่า Kd และ Log M.W. ของโปรตีนมาตรฐาน

หมายเหตุ น้ำหนักโมเลกุลของสารและโปรตีนมาตรฐาน

บลูเดกซ์แทรน	2,000,000	คาลตัน
ซีรัมอัลบูมินของโค	68,000	คาลตัน
โอวัลบูมิน	45,000	คาลตัน
ไชโตโครม ซี	12,384	คาลตัน
คีเอ็นพี-แอสปาร์เตต	299.2	คาลตัน

จากรายงานการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสัตว์ชนิดต่างๆที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน Lincoln *et al.* (1973) รายงานน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน elephant seal โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้

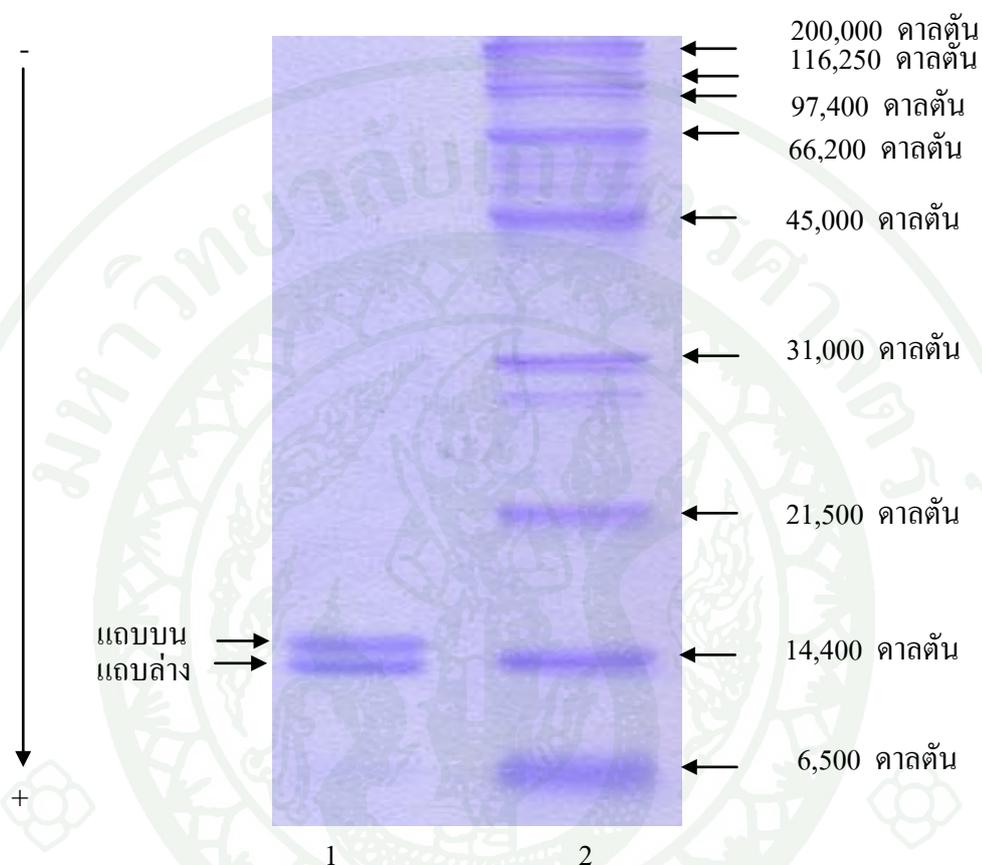
เซฟาเดกซ์ G-75 และ G-100 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 65,000 ดาลตัน Martin *et al.* (1979b) รายงาน น้ำหนักโมเลกุลของ ซีโมโกลบิน ของปลาตุ๊กอเมริกาใต้ (*Pseudodoras*) และปลาตุ๊กแถบเขตร้อน (*Brachyplatystoma spp.*) พบมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 66,000 และ 69,000 ดาลตัน ตามลำดับ Falk *et al.* (1998) รายงาน น้ำหนักโมเลกุลของ ซีโมโกลบิน ของปลานิล 2 สกุล (สกุล *Oreochromis* และสกุล *Sarotherodon*) พบมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65,000-70,000 ดาลตัน Sittivilai *et al.* (2004) รายงาน น้ำหนักโมเลกุลของ ซีโมโกลบิน ของสัตว์ปีกเลี้ยง โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชัน คอลัมน์โครมาโตกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 พบมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 51,784 ดาลตัน อรพรรณ (2546) รายงาน น้ำหนักโมเลกุลของ ซีโมโกลบิน ของโคเนื้อกำแพงแสนและกระบือปลัก โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี ของเซฟาเดกซ์ G-100 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 64,565 ดาลตัน นันทวรรณ (2549) รายงาน น้ำหนักโมเลกุลของ ซีโมโกลบิน ของกระบือปลัก โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี ของเซฟาเดกซ์ G-100 พบมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46,209 ดาลตัน เกรียงไกร (2548) รายงาน น้ำหนักโมเลกุลของ ซีโมโกลบิน ของปลานิล โดยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 พบมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 60,792 ดาลตัน คมสัน (2551) รายงาน น้ำหนักโมเลกุลของ ซีโมโกลบิน ของปลาตุ๊กและปลาตะเพียนโดยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 พบมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 63,096 และ 64,565 ดาลตัน ตามลำดับ

3.2 วิธีโซเดียมไดซัลไฟด์เฟดพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล

จากการทำ เทคนิคโซเดียมไดซัลไฟด์เฟดพอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบดิสคอนทินูอัสเจลของสารละลายซีโมโกลบินที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบหน่วยย่อยของซีโมโกลบินจำนวน 2 แถบ ในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว จากการ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ แผนเจลควอนติตี้ วัน พบหน่วยย่อยของซีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ $13,637.5 \pm 229.65$ และ $15,087.5 \pm 52.81$ ดาลตัน ($n=4$) ตามลำดับ (ดังภาพที่ 32) และหน่วยย่อยของซีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ $13,030 \pm 75.93$ และ $15,115 \pm 314.89$ ดาลตัน ($n=4$) ตามลำดับ (ดังภาพที่ 33)

จากเทคนิคโซเดียมไดซัลไฟด์เฟดพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล ของแต่ละหน่วยย่อยของซีโมโกลบิน พบว่า

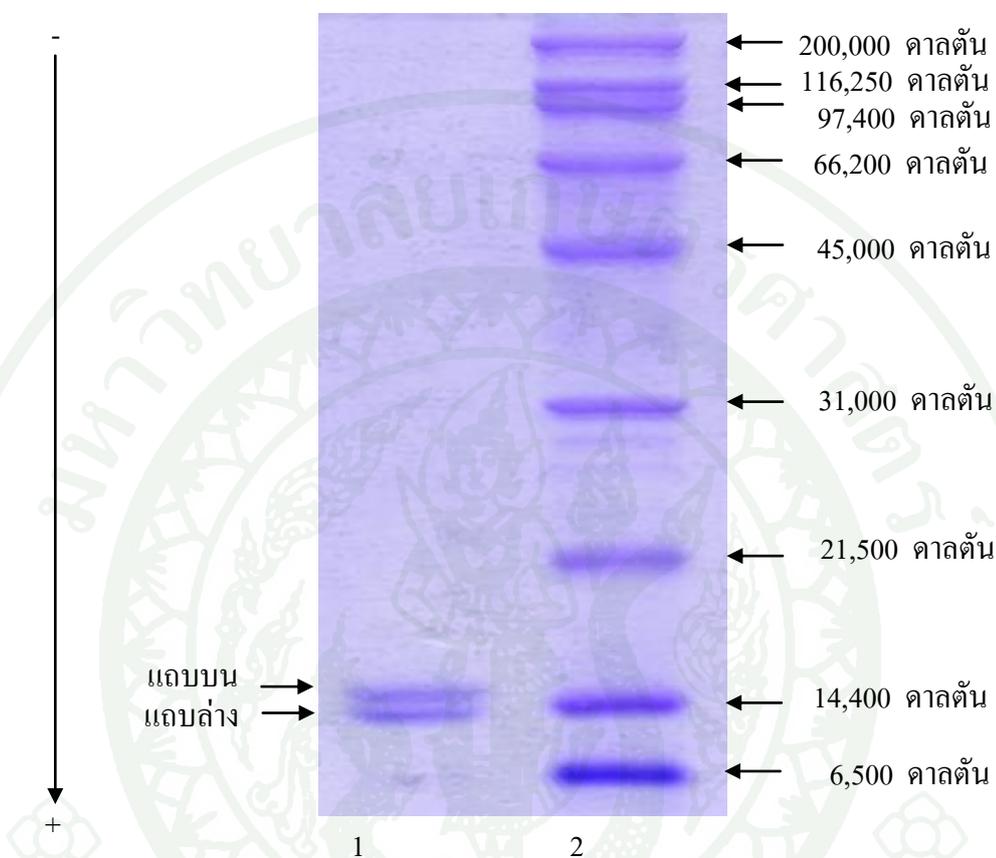
อีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วย 2 แถบ เมื่อกำหนดน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายกลอบินดี วยโปรแกรม วิเคราะห์แผ่น เจลควอนติตี้ วันพบว่าอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานมีน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินเฉลี่ย ของแถบล่าง และแถบบนเท่ากับ $13,637.5 \pm 229.65$ และ $15,087.5 \pm 52.81$ คาลตัน ตามลำดับ



ภาพที่ 32 แสดงผลน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน(เลนที่1) และเลนที่ 2 แสดง broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิค โซเดียม ไดอซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์จลลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 15% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล 1 แผ่น เวลา 45 นาที)

ส่วนอีโมโกลบินของ สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินเฉลี่ย ของแถบล่างและแถบบนเท่ากับ $13,030 \pm 75.93$ และ $15,115 \pm 314.89$ คาลตัน ตามลำดับ แสดงว่าหน่วยย่อยหรือสายกลอบินทั้งสี่ของอีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วยหน่วยย่อยหรือสายกลอบิน 2 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ในคนพบว่าอีโมโกลบิน

เตตระเมอร์ประกอบด้วยหน่วยย่อยของสายอัลฟา 2 สาย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,126 ดาลตัน มีกรดอะมิโน 141 หน่วย สายเบต้า 2 สาย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,867 ดาลตัน มีกรดอะมิโน 146 หน่วย



ภาพที่ 33 แสดงผลน้ำหนักโมเลกุลหยาบของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว(เลนที่ 1) และเลนที่ 2 แสดง broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิค โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.3 ด้วย separating gel 15% T 2.67% C และ stacking gel 4% T 2.67% C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล 1 แผ่น เวลา 45 นาที)

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

ไมโอซิน	200,000 ดาลตัน
เบต้ากาแลคโตซิเดส	116,250 ดาลตัน
ฟอสโฟริเลส บี	97,400 ดาลตัน
ซีรัมอัลบูมินของโค	66,200 ดาลตัน

โอวัลบูมิน	45,000 ดาลตัน
คาร์บอนิกแอนไฮเดรส	31,000 ดาลตัน
ตัวยับยั้งทริปซินของถั่วเหลือง	21,500 ดาลตัน
ไลโซไซม์	14,400 ดาลตัน
อะโพรทินิน	6,500 ดาลตัน

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินในคน โดยใช้วิธีอิเล็กโตรสเปย์ไอออนไนเซชันแมสสเปกโตรเมทรี (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS/MS) พบว่าสายอัลฟามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,216 ดาลตัน สายเบต้ามีนน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,867 ดาลตัน (Troxler *et al.*, 2002) และสอดคล้องกับรายงานของ Adamczyk and Gebler (1997) ที่ได้ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินสุนัข โดยใช้เทคนิค ESI-MS พบว่าสายอัลฟาหนึ่งและอัลฟาสองมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,217.3 และ 15,247.3 ดาลตันตามลำดับ สายเบต้ามีนน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,996.3 ดาลตัน จากเหตุผลดังกล่าว สามารถกล่าวได้ว่าแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าเป็นแถบสายเบต้า ส่วนแถบที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าและมีการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวกได้ไกลที่สุดเป็นแถบสายอัลฟา ซึ่งสามารถยืนยันน้ำหนักโมเลกุลที่ถูกต้องของฮีโมโกลบินโดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ต่อไป

นอกจากนี้มียุทธการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน โดยใช้เทคนิค โครมาโตกราฟีคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน-แมสสเปกโตรเมทรี (ion-exchange chromatography-mass spectrometry) ของสัตว์ชนิดต่างๆที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน Martin *et al.* (1979b) รายงานน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลาตุ๊กอเมริกาใต้ (*Pseudorasbora*) เท่ากับ 14,300 ดาลตัน Sittivilai *et al.* (2004) รายงานน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสัตว์ปีกเลี้ยง เท่ากับ 12,519 และ 10,984 ดาลตัน อรพวรรณ (2546) รายงานน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลัก เท่ากับ 11,150 ดาลตันเท่ากัน นันทวรรณ (2549) รายงานน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน เท่ากับ 13,227 ดาลตัน เกรียงไกร (2548) รายงานน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลานิล เท่ากับ 15,415 ดาลตัน โดยมีค่าในช่วง 14,021-16,561 ดาลตัน คมสัน (2551) รายงานน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลาดุกเท่ากับ 15,260 และ 14,750 ดาลตันตามลำดับ ส่วนฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินเฉลี่ยเท่ากับ 14,630 ดาลตัน

3.3 วิธีแมสสเปกโทรเมทรี

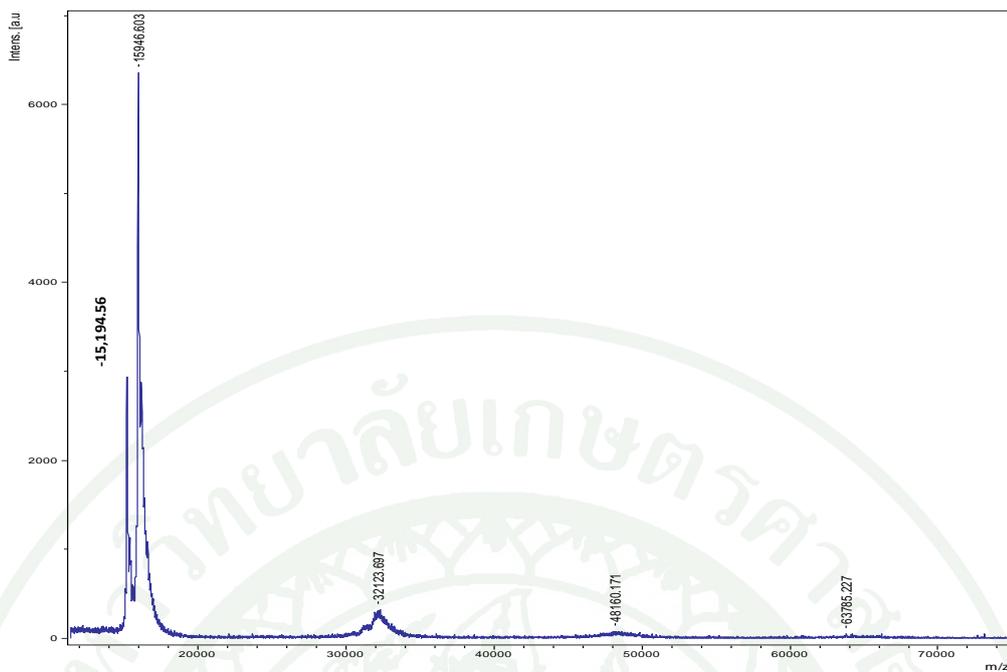
สารละลายฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ เซฟาเดกซ์ G-100 นำมาหาคำน้ำหนักโมเลกุล โดยผ่านเครื่อง MALDI-TOF แมสสเปกโทรมิเตอร์ (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ใช้กรดไซแนเนฟริกเป็นเมทริกซ์ซึ่งเป็นการตรึงโปรตีนหรือเปปไทด์กับผลึกของเมทริกซ์ (crystalline matrix) และยิงควายแสงเลเซอร์ โดยอาศัยหลักการยิงแสงเลเซอร์ลงไปบนเพลทที่มีตัวอย่างโปรตีนจับอยู่กับเมทริกซ์ซึ่งเมทริกซ์จะดูดพลังงานจากแสงเลเซอร์และถ่ายเทพลังงานให้กับตัวอย่างให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนแล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้า ภายใต้สภาวะดังกล่าวสารที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปไวกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมากและตกกระทบกับส่วนของดีเทกเตอร์ (detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับดีเทกเตอร์ เรียกว่า time-of-flight (TOF) ได้เป็นพีคบนสเปกตรัมตามขนาดมวลต่อประจุของไอออน (m/z peak) ซึ่งจะส่งสัญญาณต่อไปยังซอฟต์แวร์คอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป โดยสามารถนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละเปปไทด์ที่อยู่ในแต่ละโปรตีนตัวอย่างได้ นำไปสู่การค้นหาโดยเทียบกับสายเปปไทด์ในฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์เพื่อระบุชนิดของโปรตีน ซึ่งวิธีการนี้ได้ ถูกพัฒนาในการวิเคราะห์ตัวอย่างให้ง่ายและมีความรวดเร็ว พบว่าฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานประกอบด้วย 5 พีค ที่มี น้ำหนักโมเลกุลที่ต้องเฉลี่ยเท่ากับ $15,216.84 \pm 8.25$ $15,969.62 \pm 8.46$ $31,785.13 \pm 206.44$ $47,955.10 \pm 240.39$ และ $63,486.75 \pm 389.42$ ดาลตัน ($n=4$) ตามลำดับ ซึ่ง Adamczyk and Gebler (1997) ได้ทำการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของสุนัขโดยใช้เทคนิค ESI-MS พบว่าสายอัลฟาหนึ่งและอัลฟาสองมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $15,217.3$ และ $15,247.3$ ดาลตัน ตามลำดับสายเบต้ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $15,996.3$ ดาลตันจากเหตุผลดังกล่าวทำให้รูปแบบมอโนเมอร์ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายอัลฟาเท่ากับ $15,216.84 \pm 8.25$ ดาลตัน และสายเบต้าเท่ากับ $15,969.62 \pm 8.46$ ดาลตัน ส่วนรูปแบบไดเมอร์ ไตรเมอร์ และเตตระเมอร์ มี น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ $31,785.13 \pm 206.44$ $47,955.10 \pm 240.39$ และ $63,486.75 \pm 389.42$ ดาลตัน ตามลำดับ (ดังภาพที่ 34) ส่วนฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วประกอบด้วย 5 พีค ที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต้องเฉลี่ยเท่ากับ $15,230.11 \pm 15.96$ $15,980.23 \pm 16.67$ $31,752.16 \pm 194.91$ $48,018.41 \pm 303.74$ และ $63,728.82 \pm 488.21$ ดาลตัน ($n=4$) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Adamczyk and Gebler (1997) ทำให้กล่าวได้ว่ารูปแบบมอโนเมอร์ของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายอัลฟาเท่ากับ $15,230.11 \pm 15.96$ ดาลตัน และสายเบต้าเท่ากับ $15,980.23 \pm 16.67$ ดาลตัน ส่วนรูปแบบไดเมอร์ ไตรเมอร์ และเตตระเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ $31,752.16 \pm 194.91$ $48,018.41 \pm 303.74$ และ $63,728.82 \pm 488.21$ ดาลตัน ตามลำดับ (ดัง

ภาพที่ 35) แสดงว่าโมเลกุลของฮีโมโกลบินของทั้งสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วยสายกลอบิน 2 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินในคน มีน้ำหนักโมเลกุลของสายอัลฟาเท่ากับ 15,126 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของสายเบต้าเท่ากับ 15,867 ดาลตัน (Troxler *et al.*, 2002)

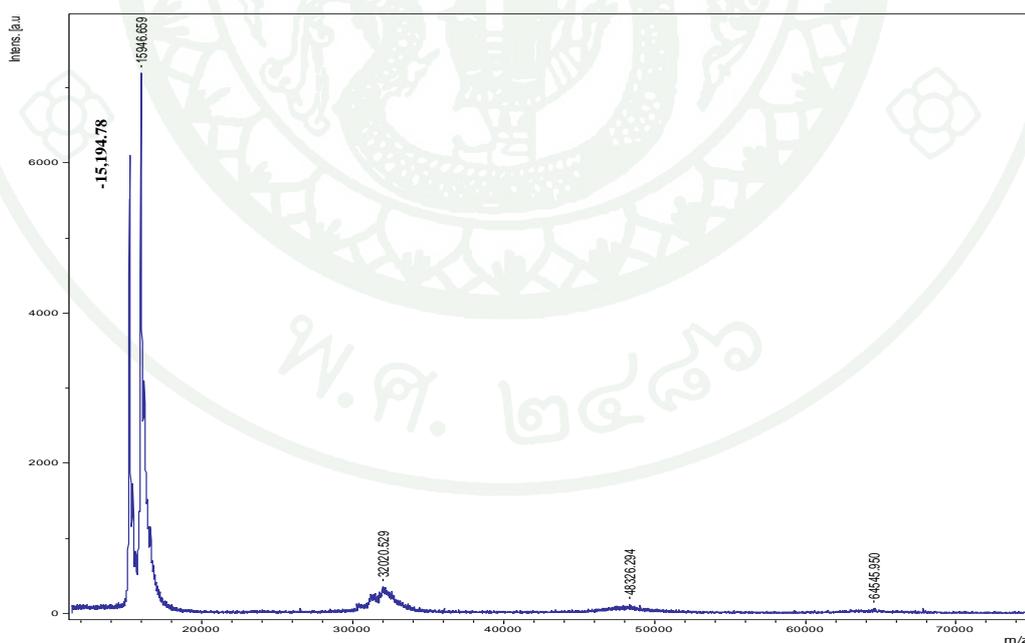
น้ำหนักโมเลกุลในรูปแบบไดเมอร์ของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $31,785.13 \pm 206.44$ ดาลตัน เกิดจากการจับกันของสายกลอบินที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $15,216.84 \pm 8.25$ และ $15,969.62 \pm 8.46$ ดาลตัน เมื่อรูปแบบที่เป็น ไดเมอร์จับกับสายกลอบินอีกสายหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $15,216.84 \pm 8.25$ ดาลตัน และ/หรือ $15,969.62 \pm 8.46$ ดาลตัน ได้เป็นรูปแบบไตรเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $47,955.10 \pm 240.39$ ดาลตัน และรูปแบบเตตระเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $63,486.75 \pm 389.42$ ดาลตัน เกิดจากการจับกันของสายกลอบินที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $15,216.84 \pm 8.25$ ดาลตัน และ $15,969.62 \pm 8.46$ ดาลตัน อย่างละ 2 สาย

ส่วนฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว พบว่ารูปแบบไดเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $31,752.16 \pm 194.91$ ดาลตัน เกิดจากการจับกันของสายกลอบินที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $15,230.11 \pm 15.96$ และ $15,980.23 \pm 16.67$ ดาลตัน เมื่อรูปแบบที่เป็น ไดเมอร์จับกับสายกลอบินอีกสายหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $15,230.11 \pm 15.96$ ดาลตัน และ/หรือ $15,980.23 \pm 16.67$ ดาลตัน ได้เป็นรูปแบบไตรเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $48,018.41 \pm 303.74$ ดาลตัน และรูปแบบเตตระเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $63,728.82 \pm 488.21$ ดาลตัน เกิดจากการจับกันของสายกลอบินที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $15,230.11 \pm 15.96$ ดาลตัน และ $15,980.23 \pm 16.67$ ดาลตัน อย่างละ 2 สาย

เมทริกซ์ที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์ด้วย เครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF ในครั้งนี้ คือ กรดไซแนพติก เป็นเมทริกซ์ที่เหมาะสมในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ซึ่งการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF ทำให้สารละลายฮีโมโกลบินไม่ถูกดูดกลืนพลังงานจากแสงเลเซอร์ที่ความยาวคลื่นในช่วง 10^3 - 10^4 ลิตรต่อโมลเซนติเมตร ($L/mol.cm$) แต่เมทริกซ์จะดูดกลืนพลังงานจากแสงเลเซอร์ทำให้มีการถ่ายเทพลังงานไปให้กับสารละลายฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นการใช้แสงเลเซอร์ในการดีซอร์บ โมเลกุลหรือ ไอออนที่ไม่ดูดกลืนพลังงานจากแสงเลเซอร์ออกจาก เมทริกซ์ที่ดูดกลืนพลังงานจากแสงเลเซอร์ได้ดี รวมทั้งอัตราส่วนในการผสมเมทริกซ์กับสารละลายฮีโมโกลบินในครั้งนี้นี้มีความเหมาะสมทำให้ได้แมสสเปกตรัมที่คมชัด (แม่น และคณะ, 2553; สุภสร และ ณรงค์, 2553)



ภาพที่ 34 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ไซกรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์



ภาพที่ 35 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF (Bruker Reflex IV, U.S.A.) ไซกรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

โดยทั่วไปแมสสเปกตรัมเป็นกราฟที่มีแกนเอ็กซ์ แทนค่า m/z และแกนวาย แทนค่าปริมาณของไอออน ส่วนของดีเทกเตอร์จะส่ง สัญญาณ อนุาล็อก (analogue) จากไอออนที่แตกตัว และเปลี่ยนเป็นสัญญาณดิจิทัล (digital) เพื่อส่งไปคำนวณด้วย เครื่องคอมพิวเตอร์ ต่อไป ซึ่งข้อมูลถูกปรับแต่งให้เหมาะสมโดยการทำให้ฟิคเรียบขึ้น (smoothing) การแยก พื้นหลัง แยกกราวด์ (background subtracting) การคำนวณตำแหน่ง (m/z) ของฟิค ค่าความเข้มข้นของแต่ละฟิค และการปรับค่า m/z เทียบกับมาตรฐาน (calibration) (แม็น และคณะ, 2553; ศุภสร และ ณรงค์, 2553)

แนะนำการใช้ ZipTip® sampling เมื่อสารละลายตัวอย่างมีการปนเปื้อนจากเกลือบัฟเฟอร์ หรือสารซักฟอก (detergent) จำพวก SDS เนื่องจากสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างไม่ต้องการวิเคราะห์จะมีผลต่อการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค MALDI ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง อาจพิจารณาใช้ ZipTip® sampling เพื่อกำจัดเกลือและ SDS ออกจากตัวอย่าง ซึ่ง ZipTip® sampling จะมีลักษณะเป็นปิเปตทิปบรรจุด้วยตัวค้ำจุน พวก C18 หรือ C4 การใช้ ZipTip® sampling ในการเตรียมตัวอย่างเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และลดปัญหาการเกิดแมสสเปกตรัมของสารปนเปื้อนอื่น ที่อาจปนมาได้ (Vekey *et al.*, 2008)

จากวิธีโซเดียมไดอิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อพิจารณา น้ำหนักโมเลกุลของสายกล อบินทั้ง 4 สายที่ได้ พบว่าสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน มีน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินเฉลี่ยเท่ากับ 57,450 ดาลตัน ส่วนสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 56,290 ดาลตัน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลรวมของฮีโมโกลบินที่ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค คเจลฟิล เทรชัน คอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเท่ากับ 64,000 และ 65,956 ดาลตัน ตามลำดับ และวิธีแมสสเปกโตรเมตรี ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเท่ากับ 63,486.75±389.42 และ 63,728.82±488.21 ดาลตัน ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงว่าน้ำหนักโมเลกุลรวมของสายกลอบินทั้ง 4 สายที่ได้ต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการใช้ โซเดียม ไดอิลซัลเฟต เป็นสารซักฟอกแอนไอออนิกที่มีประจุลบ สามารถจับกับสายกลอบินเป็นคอมเพลกซ์ ทำให้สายกลอบินมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) การที่สายกลอบินถูกจับด้วย โซเดียม ไดอิลซัลเฟต ทำให้เกิดการ ขม้วนออกเป็นสายยาว คอมเพลกซ์นี้มีประจุเป็นลบ มีอัตราส่วนของประจุต่อมวลหรือมีความหนาแน่นของประจุคงที่เท่ากัน และมีรูปร่างเหมือนกัน จึงทำให้การเคลื่อนที่ของ สายกลอบินขึ้นกับมวลโมเลกุลของสายกลอบินและทุกคอมเพลกซ์จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันโดยเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก นอกจากนี้สายกลอบินซึ่งอยู่ในรูปโปรตีนก่อนกลมที่มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) อยู่ภายในโมเลกุล สามารถถูกทำ

ให้เสียดสภาพธรรมชาติ โดยการให้ความร้อนแก่สาขกลอบินในขณะที่ละลายอยู่ในสารละลาย โซเดียมไดไธซัลไฟด์ และเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล ทำหน้าที่รีดิวซ์พันธะ ไดซัลไฟด์ให้เป็นหมู่ ซัลฟ์ไฮไดรล (sulfhydryl group) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอีโมโกลบินไปมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลรวมของสาขกลอบินทั้ง 4 สายต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลรวมของอีโมโกลบิน

ตารางที่ 9 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว แบ่งตามวิธีการศึกษา

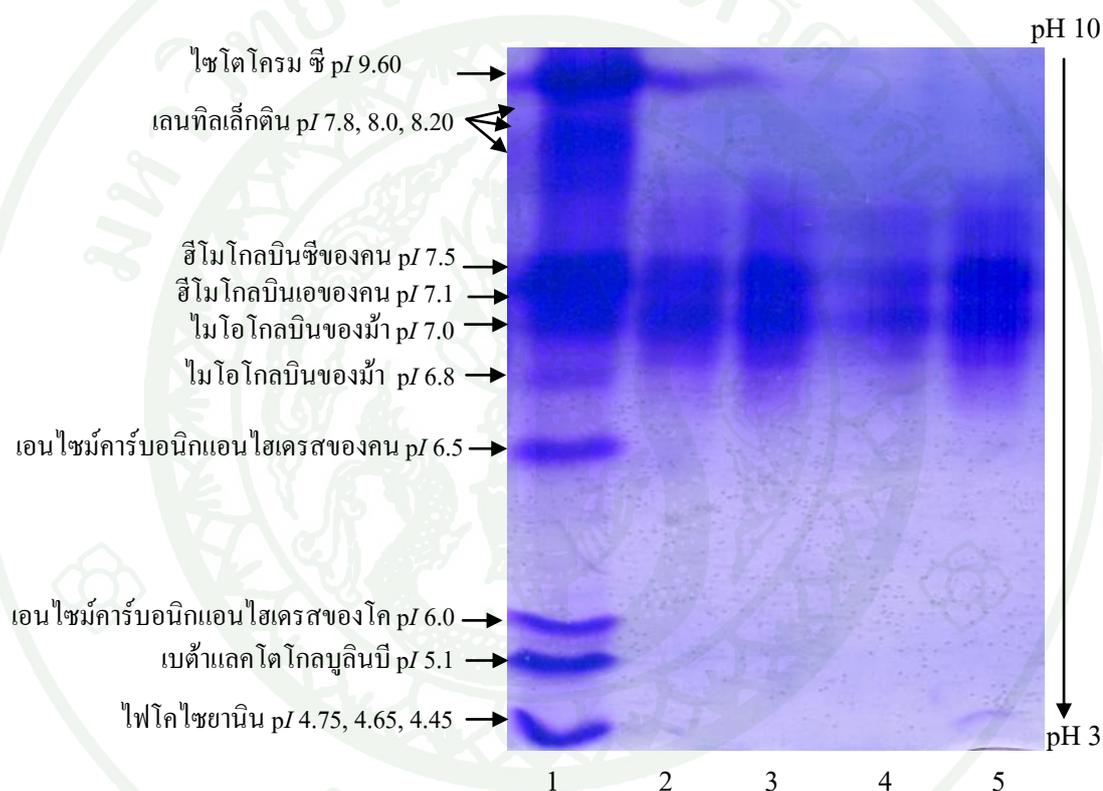
โมเลกุล ของ อีโมโกลบิน (ดาลตัน)	วิธีการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินสุนัข					
	Gel filtration		SDS-PAGE		Mass spectrometry	
	ไทยหลัง อาน	ไทยบาง แก้ว	ไทยหลังอาน	ไทยบางแก้ว	ไทยหลัง อาน	ไทยบาง แก้ว
เตตระเมอร์	64,000	65,956	-	-	63,486.75 ±389.42	63,728.82 ±488.21
ไตรเมอร์	-	-	-	-	47,955.10 ±240.39	48,018.41 ±303.74
ไดเมอร์	-	-	-	-	31,785.13 ±206.44	31,752.16 ±194.91
โมนอเมอร์	-	-	13,637.5±229.65 และ 15,087.5±52.81	13,030±75.93 และ 15,115±314.89	15,216.84 ±8.25 และ 15,969.62 ±8.46	15,230.11 ±15.96 และ 15,980.23 ±16.67

น้ำหนักโมเลกุล ของอีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว จาก ตารางที่ 9 เมื่อพิจารณาการศึกษาด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี วิธีโซเดียมไดไธซัลไฟด์และวิธีแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าโดยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี อีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน มีน้ำหนักโมเลกุล น้อยกว่าอีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ดังนั้นเมื่อ พิจารณาผลที่ได้จากวิธีแมสสเปกโตรเมทรี และน้ำหนักโมเลกุล หน่วยย่อยหรือสาขกลอบิน ของ อีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ด้วยวิธีโซเดียมไดไธซัลไฟด์

ซึ่งแสดง 2 ค่า สอดคล้องกับวิธีแมสสเปกโทรเมทรี ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ของ สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว จึงใช้ค่าที่ได้จากวิธีแมสสเปกโทรเมทรีเพื่อให้ ค่าที่ได้มีความแม่นยำมากที่สุด เนื่องจากวิธีแมสสเปกโทรเมทรีมีความไวและแม่นยำมากกว่าวิธีการ อื่นๆ ความถูกต้องประมาณ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ของสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักตั้งแต่ 40,000 ดาลตัน จึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารที่มี น้ำหนัก โมเลกุลใหญ่และระเหยได้ยาก แมสสเปกโทรมิเตอร์ เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวัดน้ำหนักโมเลกุลต่อประจุของไอออนหรือของสารตัวอย่างในสภาวะที่ เป็นไอออนไนซ์ ซึ่งวิธี MALDI ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็น วิธีการที่ทำให้ สารตัวอย่างเกิด ไอออนไนเซชัน จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้สารละลายฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิล เทรชัน คอลัมน์โค รมาโทกราฟีของ เซฟาเดกซ์ G-100 เกิด ไอออนไนเซชัน โดยการให้แสง เลเซอร์ ที่ความยาวคลื่นประมาณ 337 นาโนเมตรผ่านไปที่สารละลายฮีโมโกลบิน ที่ผสมอยู่กับ กรดไซแนพติก ซึ่งใช้เป็นแมทริกซ์ที่มีสมบัติในการดูดกลืนแสงเลเซอร์ได้ดี โดยผสมสารละลาย ฮีโมโกลบินต่อกรดไซแนพติกในความเข้มข้นที่ต่ำ เพื่อให้สารแมทริกซ์ ส่งผ่านพลังงานของแสง เลเซอร์ที่ดูดกลืนไว้ไปให้ สารละลายฮีโมโกลบิน เพื่อทำให้เกิดพลังงานกระตุ้น (excitation energy) ทำให้สารละลายฮีโมโกลบินเกิดเป็นกลุ่มของไอออนของสารตัวอย่างและของสารแมทริกซ์ การใส่ กรดไตรฟลูออโรอะซิติกลงไปเล็กน้อย เพื่อให้สารละลายฮีโมโกลบิน ละลายในสารละลายที่ระเหย ได้ง่าย การตรวจวัดประจุบวก ที่ผสมอยู่กับสารแมทริกซ์ สำหรับการ วิเคราะห์โปรตีน ใช้กรด ไซแนพติก เป็นแมทริกซ์ สารละลายฮีโมโกลบิน และแมทริกซ์จะถูกทำให้แห้งก่อนที่จะใส่เข้า เครื่องเพื่อทำให้เกิด ไอออนไนเซชัน ของสารละลายฮีโมโกลบิน ได้ดีขึ้น โดยเทคนิคนี้สามารถทำ การวิเคราะห์ได้ดีในกลุ่มของสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน เปปไทด์ โกลโคโปรตีน โอลิโกนิวคลีโอ ไทด์ และ โอลิโกแซคคาไรด์ แมสสเปกโทรเมทรีสามารถวิเคราะห์มวลของไอออนที่เกิดขึ้น จากการศึกษาในครั้งนี้ วิเคราะห์มวลด้วย วิธี TOF โดยทำให้เกิดสเปกตรัมของไอออนได้อย่าง สมบูรณ์ โดยเครื่องตรวจวัดมวลเป็น TOF จะแยกไอออนโดย ใช้อัตราส่วนของมวลต่อประจุ เครื่อง แมสสเปกโทรมิเตอร์จะ วัดเวลาของแต่ละไอออนที่วิ่งผ่านสนามไฟฟ้า เมื่อความเร่งคงที่ ทำการ ตรวจวัดไอออนที่เกิดขึ้นและปรากฏเป็นพีคบนสเปกตรัมตามขนาดมวลต่อประจุของไอออน ทำให้ ไอออนที่มีน้ำหนักมากจะวิ่งช้ากว่าไอออนที่มีน้ำหนักน้อย ดังนั้นจึงใช้แมสสเปกโทรเมทรีศึกษา น้ำหนักโมเลกุลและอธิบายโครงสร้างทางเคมี (structure elucidation) ของสารได้ ข้อดีของการ วิเคราะห์มวลด้วย วิธี TOF คือ การวิเคราะห์ค่ามวลของไอออนได้รวดเร็ว และบันทึกค่ามวลของ ไอออนได้ทั้งหมด ทำให้ลดเวลาในการวิเคราะห์และ ผลการวิเคราะห์เชื่อถือได้ (ชุตินา, 2548; สมปอง, 2550; Veenstra, 2006; Kraj and Macht, 2008)

4. ค่า pI ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

สารละลายฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเดกซ์ G-100 นำมาหาค่า pI ของฮีโมโกลบินสุนัขทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงด้วยเจลสำเร็จรูป (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) แอมโฟไลท์ พีเอช 3-10 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม วิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตีวัน พบว่าฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีค่า pI ที่ใกล้เคียงกัน มีค่า pI อยู่ระหว่าง 7.0-7.9 (ดังภาพที่ 36)



ภาพที่ 36 แสดงค่า pI ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) แอมโฟไลท์ พีเอช 3-10 เลนที่ 1 แสดง broad range standard pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) และ เลนที่ 2 และ 3 แสดงฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี เลนที่ 4 และ 5 แสดงฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี

ค่า pI ของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีค่าใกล้เคียงจากฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ของ NCBI โดยลำดับโปรตีนฮีโมโกลบินในฐานข้อมูลบนคอมพิวเตอร์ของสุนัข (accession number) ที่ gi|57113367 beta globin [*Canis familiaris*] gi|116666787 Chain B, Hemoglobin From *Cercopithecus thomasi*, A Canidae From Brazil และ gi|44887976 Hemoglobin subunit beta แสดงค่า pI ที่คำนวณได้ (calculated pI value) เท่ากับ 7.96 ส่วน gi|122508 Hemoglobin subunit alpha (Hemoglobin alpha chain) [*Vulpes vulpes*] แสดงค่า pI ที่คำนวณได้เท่ากับ 7.98

เกรียงไกร (2548) รายงานค่า pI ของฮีโมโกลบินปลานิลโดยใช้เทคนิคไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง ในช่วงพีเอช 3-10 พบว่าฮีโมโกลบินของปลานิลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแอโนดิก มีค่า pI อยู่ระหว่าง 5.28-6.80 และกลุ่มแคโทดิก มีค่า pI อยู่ระหว่าง 7.27-9.71 จากการเปรียบเทียบผลการศึกษาของคมสัน (2551) ฮีโมโกลบินของปลาดุกและปลาดุกเทศมีค่า pI หลายค่า ปลาดุกเทศมีค่า pI อยู่ระหว่าง 5.8-7.0 ส่วนปลาดุกมีค่า pI อยู่ระหว่าง 5.5-8.0 ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบฮีโมโกลบินของปลาดุกในกลุ่มแคโทดิกพบเฉพาะกลุ่มแอโนดิกเท่านั้น ทั้งนี้ ปลาดุกและปลาดุกเทศที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ นำมาจากปลาที่อาศัยอยู่ในบ่อ น้ำตามธรรมชาติที่มีน้ำใส ทำให้มีปริมาณออกซิเจนละลาย ในน้ำสูง สามารถ แบ่งฮีโมโกลบินปลา ออกเป็น 2 กลุ่มตามโครงสร้างและหน้าที่ต่างกัน ประกอบด้วย กลุ่มแอโนดิกเป็นฮีโมโกลบินหลัก มีค่า pI ต่ำ ค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 พบในปลาหลายชนิด เป็นกลุ่มที่แสดงความสามารถในการจับกับออกซิเจนและฮีโมโกลบินต่ำ มีคุณสมบัติ ความชอบต่อออกซิเจนต่ำ และพีเอช มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกับออกซิเจนมาก และกลุ่มแคโทดิกเป็นฮีโมโกลบินรอง มีค่า pI สูงค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 พบในปลาบางชนิดที่อยู่ในน้ำลึก น้ำขุ่น ในบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำ ทำหน้าที่สำคัญในการเก็บสำรองและขนส่งออกซิเจนในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและสภาวะเป็นกรด ทำให้มีความสามารถในการจับกับออกซิเจนสูง มีคุณสมบัติความชอบ ต่อออกซิเจนสูง และพีเอช มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกับออกซิเจนน้อย (Prisco *et al.*, 2000; Weber, 2000a, 2000b)

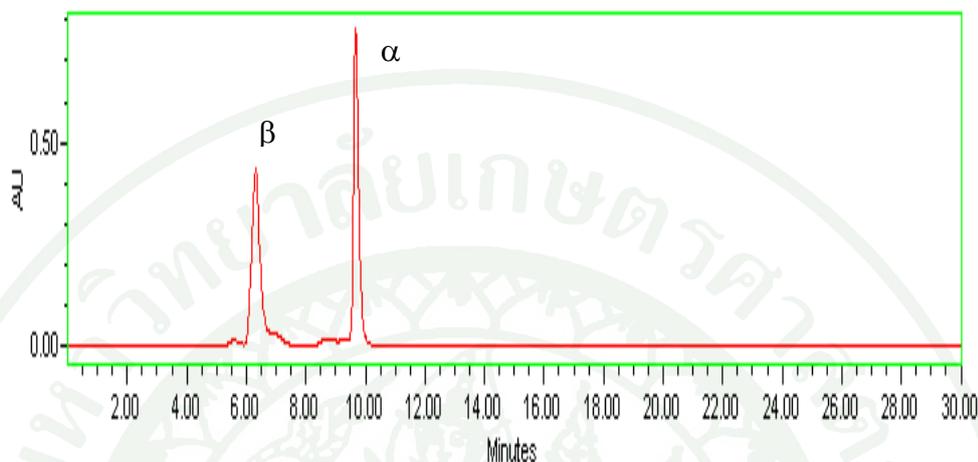
จากรายงานการศึกษาค่า pI ของฮีโมโกลบินของปลาหลายชนิดในต่างประเทศ เช่น ปลานิล 5 สปีชีส์ ในจีนัส (*Oreochromis* และ *Serotherodon*) ฮีโมโกลบินมีค่า pI อยู่ระหว่าง 5.94-8.06 ค่าที่ได้ต่างกันเนื่องจากมีสายกลอบินที่ไม่เหมือนกัน (Falk *et al.*; 1998) ปลา cutthroat trout (*Salmo clarki*) ฮีโมโกลบินมีค่า pI หลายชนิด โดยที่ฮีโมโกลบิน 5 ชนิด มีค่า pI อยู่ระหว่าง 9.10-7.10 และมีฮีโมโกลบินขนาดเล็ก มีค่า pI 5.90 ทำหน้าที่สำคัญในการจับกับออกซิเจน (Southard *et al.*; 1986)

นอกจากนี้ปลาไหลยุโรป (*Anguilla anguilla*) ฮีโมโกลบินในกลุ่มแอนดิก มีค่า pI ต่ำ แต่กลุ่มแคโรติกมีค่า pI สูง (Fago *et al.*; 1995) ปลาไหลมอร์เรย์ (moray eel) (*Muraena helena*) ฮีโมโกลบินมีค่า pI 3 ชนิด ฮีโมโกลบินในกลุ่มแคโรติก ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินหลัก (Hb I) มีค่า pI 8.2 และฮีโมโกลบินในกลุ่มแอนดิก (Hb II และ Hb III) มีค่า pI 5.92 และ 6.34 ตามลำดับ ปลาโมร์เรย์สีน้ำตาล (brown moray) (*Gymnothorax unicolor*) ฮีโมโกลบินมีค่า pI 2 ชนิด ประกอบด้วยฮีโมโกลบินในกลุ่มแคโรติกและแอนดิก โดยที่ฮีโมโกลบินในกลุ่มแคโรติกของปลาโมร์เรย์สีน้ำตาล มีค่า pI ต่ำกว่าของปลาไหลมอร์เรย์ ส่วนฮีโมโกลบินในกลุ่มแอนดิก ของปลาโมร์เรย์สีน้ำตาลมีค่า pI ใกล้เคียงกับ ของปลาไหลมอร์เรย์ ฮีโมโกลบินในกลุ่ม แอนดิก ที่มีค่า pI ต่ำ มีความสัมพันธ์ กับความชอบ ต่อออกซิเจนต่ำและมีความไวต่อค่าพีเอช สูง แต่ฮีโมโกลบินในกลุ่มแคโรติก เมื่อพีเอช ต่ำจะมีความชอบต่อออกซิเจนสูง (Weber, 2000a) ปลาไหลแท้ ที่พบในมหาสมุทรลึกแถบแอตแลนติกและแปซิฟิก (pugnose eel หรือ slime eel) (*Symenchelid parasitica*) และปลาไหล ที่มีริมฝีปากยื่นพบใต้มหาสมุทรลึก บริเวณรอยแยกของเปลือกโลก ที่มีหินละลาย (magma) จากใต้พื้นโลก ทำให้น้ำทะเล มีอุณหภูมิสูง ปลาไหลพวกนี้จึงมีรูระบายความร้อน (hydrothermal vent eelpout หรือ vent-endemic eelpout) (*Thermarces cerberus*) พบว่าฮีโมโกลบินของปลาไหล (*S. parasitica*) มีค่า pI ประมาณ 8.0 และ 9.0 ในกลุ่มแคโรติกซึ่งเป็นฮีโมโกลบินหลัก (Hb II) และรอง (Hb I) ตามลำดับ แต่กลุ่มแอนดิก มีค่า pI ประมาณ 6.5 (Hb III) และ 5.2 (Hb IV) ที่มีปริมาณเล็กน้อย สัดส่วนของ Hb I ต่อ Hb II ต่อ Hb III เท่ากับ 13:82:5 ตามลำดับ ความแตกต่างระหว่าง ฮีโมโกลบิน ในกลุ่มแอนดิก (pI น้อยกว่า 8.6) และฮีโมโกลบิน ในกลุ่มแคโรติก (pI มากกว่า 8.6) ทำหน้าที่สำคัญ ในการจับกับออกซิเจน โดยเฉพาะใน Hb I และ Hb II ในปลาไหล (*T. cerberus*) ฮีโมโกลบินหลักอยู่ในกลุ่มแอนดิก 3 ชนิด มีค่า pI ประมาณ 7.0 (Hb I) 6.8 (Hb II) และ 6.5 (Hb III) ตามลำดับ และฮีโมโกลบินรองอยู่ในกลุ่มแอนดิก 5 ชนิด มีค่า pI น้อยกว่า 6.5 และมากกว่า 7.0 ซึ่งมี Hb I Hb II และ Hb III ทำหน้าที่สำคัญในการจับกับออกซิเจน โดยที่อุณหภูมิ ไม่มีผลต่อคุณสมบัติความชอบต่อออกซิเจน ของฮีโมโกลบินของปลาไหลทั้งสองสายพันธุ์ (Weber *et al.*, 2003)

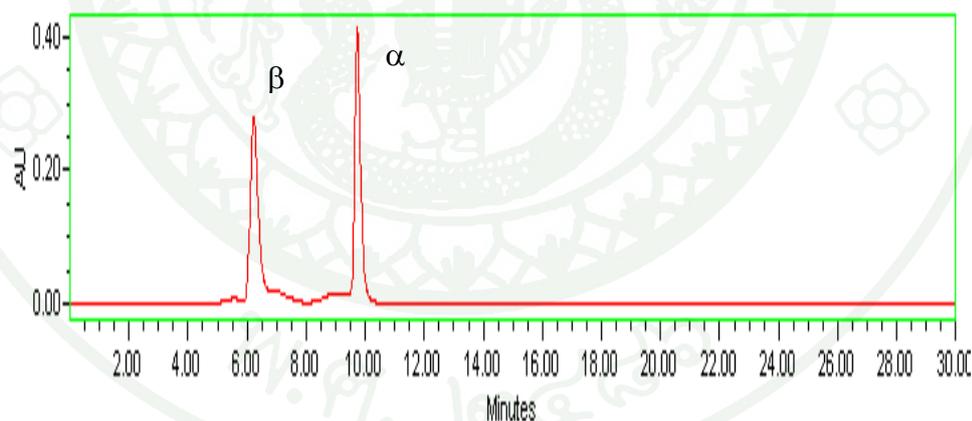
5. ชนิดของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี (reversed-phase high performance liquid chromatography, HPLC)

นำสารละลายฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโท กราฟิ โดยใช้เซฟาเดกซ์ G-100 มาแยกหาชนิดของ หน่วยย่อยของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี วัดความยาวคลื่นที่ 280 นา

โนเมตร พบสารละลายอีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีลักษณะโครมาโทแกรม ประกอบด้วยสองพีคที่มีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 6.23 และ 9.72 นาที ตามลำดับ (ดังภาพที่ 37 และ 38)



ภาพที่ 37 แสดงโครมาโทแกรมของหน่วยย่อยของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี



ภาพที่ 38 แสดงโครมาโทแกรมของหน่วยย่อยของอีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี

สารละลายหน่วยย่อยของ อีโมโกลบิน ที่แยกได้ นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี เพื่อแยกชนิดของหน่วยย่อยของอีโมโกลบินที่ได้ระหว่างสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานกับสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว พบว่าพีคแรกและพีคที่สองของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน มีน้ำหนัก

โมเลกุลเท่ากับ 16,018.56 และ 15,269.63 คาลตัน ตามลำดับ ส่วนพิกแรกและพิกที่สองของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,978.01 และ 15,219.55 คาลตัน ตามลำดับ

อีโมโกลบิน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ชนิด คือ สายอัลฟาและสายเบต้า แต่ละโมเลกุลของฮีโมโกลบินเป็นหมู่พอสเซตกับแต่ละสายพอลิเปปไทด์ โดยสายอัลฟาและสายเบต้าจับกันด้วยแรงหลัก คือ แรงไฮโดรโฟบิก พันธะไฮโดรเจน แรง ระหว่างประจุ และแรงแวนเดอร์วาลส์ (ปริยานันท์ และคณะ, 2553) การวิเคราะห์โครมาโทแกรมของอีโมโกลบินในสัตว์โดยเอชพีแอลซีส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 พิก หรือมากกว่า ส่วนของพิก ประกอบด้วย สายอัลฟา และสายเบต้า หรืออาจมีส่วนของฮีโมรวมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษา อีโมโกลบินของคนและในสัตว์อีกหลายชนิด (Espinoza *et al.*, 1996, Wajcman and Riou, 2009)

Espinoza *et al.* (1996) รายงานการแยกอีโมโกลบินจากตัวอย่างเลือดโดยวิธีรีเวอร์ส-เฟสเอชพีแอลซี ใช้คอลัมน์ C_4 ในการแยก ใช้สารละลายเอ ประกอบด้วยน้ำเกรด HPLC ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไตรเอทิลเอมีน (triethylamine) และสารละลาย บี ประกอบด้วย อะซิโทไนโตรล ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไตรเอทิลเอมีน อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ 36 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างสัตว์ทั้งหมด 275 ตัวอย่าง พบอีโมโกลบินของสุนัข (*Canis familiaris*) สายอัลฟาและสายเบต้ามีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 10.3 และ 9.8 นาที ตามลำดับ อีโมโกลบินของสุนัขป่าสีเทา (gray wolf) (*Canis lupus*) สายอัลฟาและสายเบต้ามีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 10.5 และ 10.0 นาที ตามลำดับ อีโมโกลบินของสุนัขป่าอเมริกันสีเทา (American gray wolf) (*Canis occidentalis*) สายอัลฟาและสายเบต้า มีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 10.3 และ 9.9 นาที ตามลำดับ อีโมโกลบินของสุนัขจิ้งจอก (bat eared fox) (*Otocyon megalotis*) สายอัลฟาและสายเบต้ามีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 11.1 และ 10.3 นาที ตามลำดับ อีโมโกลบินของสุนัขจิ้งจอกสีแดง (red fox) (*Vulpes vulpes*) สายอัลฟาและสายเบต้ามีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 10.8 และ 10.1 นาที ตามลำดับ อีโมโกลบินของแมวบ้าน (domestic cat) (*Felis catus*) สายอัลฟาและสายเบต้า มีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 12.8 และ 9.4 นาที ตามลำดับ อีโมโกลบินของเสือชีตาห์ (*Acinonyx jubatus*) สายอัลฟาและสายเบต้า มีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 13.3 และ 10.3 นาที ตามลำดับ อีโมโกลบินของเสือโคร่ง (*Panthera tigris*) สายอัลฟาและสายเบต้า มีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 13.5 และ 8.6 นาที ตามลำดับ อีโมโกลบินของวัว (*Bos taurus*) สายอัลฟาและสายเบต้า มีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 17.1 และ 12.1 นาที ตามลำดับ และอีโมโกลบินของคน สายอัลฟาและสายเบต้ามีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 13.4 และ 11.1 นาที ตามลำดับ

Petruzzelli *et al.* (1996) รายงานการศึกษาหน้าที่ของฮีโมโกลบินของเต่าหัวค้อน (loggerhead sea turtle) (*Caretta caretta*) สายอัลฟาและสายเบต้าแยกให้บริสุทธิ์โดย วิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ C_8 (Applied Biosystems) ใช้สารละลายเกรเดียน 40-70 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์ ใน 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก อัตราการไหล 2.8 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 42 นาที วัดความยาวคลื่นที่ 220 นาโนเมตร พบสารละลายฮีโมโกลบิน มีลักษณะโครมาโทแกรม ประกอบด้วยสองพีคของสายอัลฟาและสายเบต้ามี่รีเทนชันไทม์ประมาณ 25 และ 27 นาที ตามลำดับ และศึกษาลำดับกรดอะมิโนโดย วิธี Edman degradation (N-terminal sequencing) พบว่าสายอัลฟาและสายเบต้ามี่กรดอะมิโน 141 และ 146 หน่วย ตามลำดับ

Scaloni *et al.* (1998) รายงานพบ โพลิมอร์ฟิซึมของฮีโมโกลบินในวัวโปโดเลียน (podolian) โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี ใช้คอลัมน์ C_4 แยกสายกลอบินด้วยสารละลายเกรเดียน 48-67 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลาย บี (60 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์ ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก) ในสารละลาย เอ (20 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์ ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 95 นาที วัดความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร พบสารละลายฮีโมโกลบิน มีลักษณะ โครมาโทแกรม ประกอบด้วยสามพีค เมื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งในพีคที่ 1 และ 2 เป็นสายอัลฟาที่มีลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป 2 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 131 เกิดจากการแทนที่กรดอะมิโน แอสพาราจีนด้วยเซอริน มีน้ำหนักโมเลกุลของสาย อัลฟา ($\alpha^{131\text{Ser}}$) เท่ากับ $15,026.47 \pm 0.44$ ดาลตัน และ ที่ตำแหน่ง 89 เกิดจากการแทนที่กรดอะมิโน ฮิสทีดีนด้วยไทโรซีน (tyrosine) มีน้ำหนักโมเลกุลของสาย อัลฟา ($\alpha^{89\text{Tyr}}$) เท่ากับ $15,079.86 \pm 0.66$ ดาลตัน ตามลำดับ และในพีคที่ 3 เป็นสายเบต้าที่ปกติมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับสายเบต้าของวัวโปโดเลียน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $15,953.83 \pm 0.89$ ดาลตัน

Weber (2000a) แยกสายกลอบินของฮีโมโกลบินของปลาไหลมอร์เรย์และปลาหมอสีน้ำจืด โดยนำสารละลายฮีโมโกลบินที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเดกซ์ G-25 นำสารละลายฮีโมโกลบินที่ได้มาบ่มด้วยสารละลายผสม ของ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และ 50 เปอร์เซ็นต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกหาชนิดของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิเคราะห์ผ่านรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ C_{18} (Sigma-Aldrich, U.S.A.) ขนาด 0.46-25 เซนติเมตร และ ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย สารละลาย เอ (45 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์ และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก) และ 0-100 เปอร์เซ็นต์ เกรเดียนของสารละลาย บี (60 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์) นาน 45 นาที วัดความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร พบว่าสายอัลฟาและเบต้าของ ปลาไหลมอร์เรย์มีรีเทนชัน

ชั้นโทม์ประมาณ 25 และ 33 นาที ตามลำดับ สามารถแยกได้ไวกว่าสายอัลฟาและเบต้าของปลามอร์เรย์สีน้ำตาลที่มีริเทนชั้นโทม์ประมาณ 27 และ 36 นาที ตามลำดับ

Wajcman and Riou (2009) กล่าวว่าการศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินมีส่วนในการวินิจฉัยความผิดปกติของฮีโมโกลบินซึ่งส่วนใหญ่จะมีความแตกต่างของประจุทำให้สามารถศึกษาคุณสมบัติของสายกลอบินได้ วิธีรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซีเป็นวิธีการแยกสายพอลิเปปไทด์โดยอาศัยคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกของสายกลอบิน มีการศึกษาการแยกสายกลอบินในคนโดยวิธีรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซีซึ่งใช้คอลัมน์และระบบการชะสารหลายชนิด จากการพัฒนาการศึกษาวิธีนี้โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย Lichrospher 100 RB8 phase (Merck, Germany) ขนาด 20x0.46 เซนติเมตร ใช้สารละลายเกรเดียนของสารละลาย เอ ประกอบด้วย ๒ อะซีโทไนไตรล์ เมทานอล และ 0.143 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ที่พีเอช 2.7 ในสัดส่วนสารปริมาตร 24 ส่วน ต่อ 38 ส่วน ต่อ 36 ส่วน ตามลำดับ สารละลาย บี ประกอบด้วยสารชนิดเดียวกัน ในสัดส่วนสารปริมาตร 55 ส่วน ต่อ 6 ส่วน ต่อ 39 ส่วน ตามลำดับ ใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลาย บี เริ่มต้นเกรเดียน และสิ้นสุดเกรเดียนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลาย บี และเพิ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลาย บี ในกรณีสายกลอบินมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 90 นาที วัดความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร พบฮีโมโกลบินของคน สายอัลฟาและสายเบต้ามีริเทนชั้นโทม์ประมาณ 25 และ 27 นาที ตามลำดับ

ฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานมี น้ำหนักโมเลกุลของสายอัลฟาเท่ากับ 15,269.63 ดาลตัน ซึ่งตรงกับพีค ที่สอง และ สายเบต้าเท่ากับ 16,018.56 ดาลตัน ซึ่งตรงกับพีค แรก และ ฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทย บางแก้วมีน้ำหนักโมเลกุลของสายอัลฟาเท่ากับ 15,219.55 ดาลตัน ซึ่งตรงกับพีค ที่สอง และ สายเบต้าเท่ากับ 15,978.01 ดาลตันซึ่งตรงกับพีค แรก สอดคล้องกับการศึกษาของ Espinoza *et al.*, 1996 และ Wajcman and Riou, 2009 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสายอัลฟาของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทย บางแก้วเป็นสายที่มีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกมากกว่าสายเบต้า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน คนที่มีการพัฒนาวิธีรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซีให้มีการวิเคราะห์ผลได้ละเอียด แม่นยำ และรวดเร็วขึ้น พบว่าสาย อัลฟา ของคนมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง เช่น สาย อัลฟาของ Hb Groene Hart และสายช่วงตัวอ่อน (embryonic chain) ใช้คอลัม C₄ ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร (Zanella-Cleon *et al.*, 2008) สายกลอบินแยกด้วยสารละลายเกรเดียน 50 ต่อ 50 ของสารละลาย เอ ประกอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์ ใน 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และสารละลาย บี ประกอบด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ อะซีโทไนไตรล์ ใน 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 80 นาที

วัดความยาวคลื่นที่ 220 นาโนเมตร และสัณฐานิตต่างๆ เมื่อใช้คอลัมน์ C_4 ในการแยก ใช้สารละลาย เอ ประกอบด้วย น้ำกรด HPLC ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไตรเอทิลลามีน (triethylamine) และสารละลาย บี ประกอบด้วย อะซิโทไนไตรล์ ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไตรเอทิลลามีน อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อนาที ที่ 36 องศาเซลเซียส พบฮีโมโกลบินของสุนัข สายอัลฟาและสายเบต้ามีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 10.3 นาที และ 9.8 นาที ตามลำดับ แสดงว่าสายอัลฟาของสุนัขมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง กว่าสายเบต้าจึงถูกชะออกมาจากคอลัมน์ช้ากว่า อย่างไรก็ตามมี รายงานพบพิกัดเล็กๆบ้างเล็กน้อยอาจเกี่ยวข้องกับ สารประกอบเชิงซ้อนของกลอบิน -กลูตาไธโอน (globin-glutathione complex) การทำลายสภาพธรรมชาติของสายกลอบิน และ สายกลอบินต่างชนิดกัน (heterogenous globin) ที่พบได้ในความเข้มข้นต่ำๆ (Espinoza *et al.*, 1996; Wajcman and Riou, 2009)

จากการพัฒนาเทคนิครีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี ในการศึกษาครั้งนี้ใช้คอลัมน์ C_4 เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีองค์ประกอบคงที่ตลอดการทดลอง (isocratic elution) เป็นสารละลายผสมของ 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติกและอะซิโทไนไตรล์ในน้ำ (70:30) โดยใช้อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารละลายฮีโมโกลบินที่ใช้เพียง 20 ไมโครลิตรเท่านั้น ประสบความสำเร็จในการแยกสาย อัลฟาและสายเบต้าออกจากกันโดยสมบูรณ์ใช้เวลาในการแยกน้อยกว่า 10 นาที นับเป็นเทคนิคการแยกหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน ที่ดีและใช้กันมาก เทคนิคหนึ่งในการแยกฮีโมโกลบิน ที่มีความเร็ว (rapid) ความไว (sensitive) และสามารถทำซ้ำให้เหมือนเดิมได้ (reproducible) แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานการเคลื่อน (shift) ของรีเทนชันไทม์เกิดขึ้นได้จากการ เจือจางตัวอย่างมากเกินไป มีผลทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนน้อยลง จึงเกิดการเคลื่อนของรีเทนชันไทม์ขึ้น ดังนั้นจึงควรระมัดระวังในการ เจือจางตัวอย่างไม่ให้มากเกินไป (Espinoza *et al.*, 1996) วิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้สะดวกในการเตรียม สารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่เนื่องจากมีองค์ประกอบคงที่ตลอดการทดลอง ที่ยังไม่พบการศึกษาฮีโมโกลบินในสุนัขมาก่อน ที่ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นแบบเกรเดียนและมีอัตราส่วนของสารแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีองค์ประกอบคงที่ตลอดการทดลอง ในครั้งนี้สามารถแยกหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินได้เร็วกว่าที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นแบบเกรเดียน (Espinoza *et al.*, 1996; Zanella-Cleon *et al.*, 2008; Wajcman and Riou, 2009)

วิธีรีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี สามารถแยกสารได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ใช้เฟสอยู่กับที่ไม่มีขั้ว การศึกษาในครั้งนี้ใช้ C_4 (butyl) เป็นหมู่ฟังก์ชันนัล (-Si-O-Si-CH₂CH₂CH₂CH₃) ที่เกาะกับอนุภาคค้ำจุนใน รีเวอร์ส-เฟส ในทางปฏิบัติแม้จะใช้ C_4 ที่เหมือนกัน แต่ถ้า ได้มาจาก

บริษัทผู้ผลิตที่ต่างกัน จะมีผลต่อคุณสมบัติการเลือกเฉพาะที่ต่างกัน เช่น ความต่างกันของ โครงสร้างอนุภาคคอลลอยด์ พื้นผิวที่เกิดพันธะ และปริมาณของหมู่ฟังก์ชันนัล มีผลต่อการแยกสาร ดังนั้นมีปัจจัยหลาย ชนิดในการแยกหน่วยย่อยของ ฮีโมโกลบิน ให้มีประสิทธิภาพ เริ่มตั้งแต่การ เตรียมและเก็บรักษาตัวอย่างให้เหมาะสม ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดีควรมี จำนวนและความสูง ของเฟลทเหมาะสมเพื่อที่จะแยก ได้แถบโครมาโทแกรม ที่มีสมมูลในอัตราส่วนความกว้างของฐาน พีก ไม่ควรเกิดแฟกเตอร์ของหางพีก การเลือกเฉพาะ ที่ใช้ในการแยกมีความสำคัญมาก ขึ้นกับการ เลือกชนิดของเฟสอยู่กับที่และองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ในการศึกษารังนี้ใช้ตัวชะแบบสอง ตัวผสมกัน คือ อะซีโทไนไตรล์และน้ำ ซึ่งมีความแรงของตัวชะ (eluent strength) ที่สามารถแยก หน่วยย่อยของ ฮีโมโกลบิน ออกจากกันได้ดี มีการ เติมสารปรับสภาพตัวชะ (eluent modifier) คือ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ใช้เติมลงไปในตัวชะ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้การแยกหน่วยย่อยของ ฮีโมโกลบินมีรูปร่างของพีคดีขึ้นและลดการเกิดหางพีก (ธวัชชัย, 2551; สุนันท์, 2541)

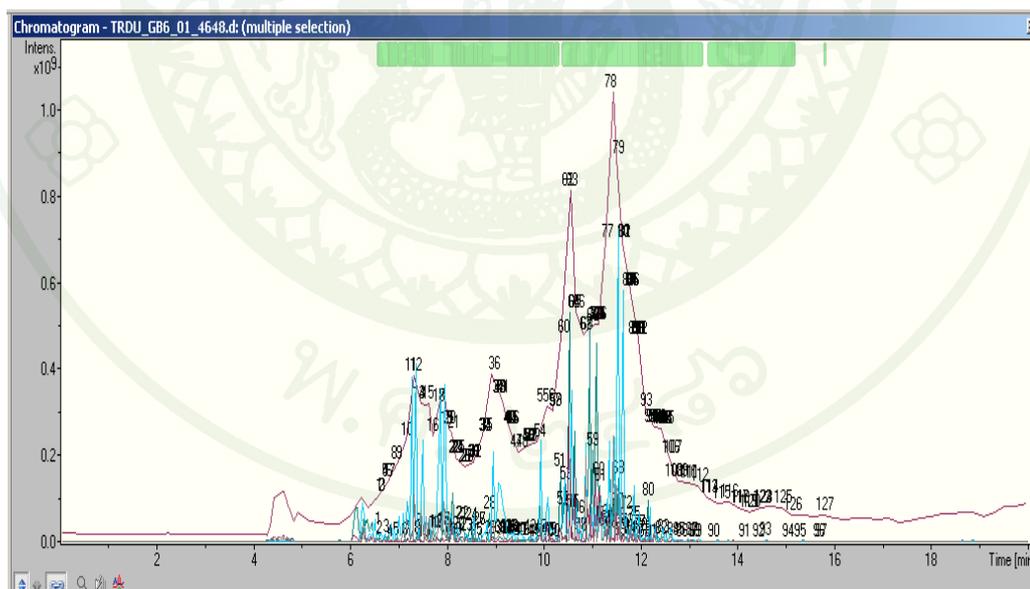
นิติวิทยาศาสตร์ทางสัตวแพทย์ มีการ ใช้ตัวอย่างจากเลือดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอและ โปรตีน (DNA and protein marker) เพื่อจำแนกวงศ์ (family) จีนัส (genus) และสปีชีส์ของสัตว์ ความแตกต่างจากการใช้เลือดคนและสัตว์ตรงที่เลือดคนที่ได้มาจากสปีชีส์เดียวกัน แต่เลือดของ สัตว์มาจากหลายสปีชีส์ ดังนั้นฮีโมโกล บินในเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในเลือด สามารถใช้เป็นเครื่องหมายเฉพาะต่อสปีชีส์ของสัตว์ชนิดนั้นๆ ซึ่งเทคนิค เอชพีแอลซี นำมาใช้ ประโยชน์ในการจำแนกของกลางที่ได้จากการจับกุมสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเทียบกับรีเฟรนซ์ไทป์ของ ฮีโมโกลบิน สัตว์อ้างอิงที่สงสัย ซึ่งมีการ ใช้ในห้องปฏิบัติการ นิติวิทยาศาสตร์ ของปลาและสัตว์ป่า แห่งชาติ (National Fish and Wildlife Forensic Laboratory) เมืองแอสแลนด์ (Ashland) ประเทศ สหรัฐอเมริกา นอกจากนี้ผู้ประกอบการทางด้านวิทยาศาสตร์การอาหารมีการประยุกต์ใช้เทคนิคเอชพี แอลซีในการแยกฮีโมโกลบิน ไม โอลบิน และส่วน ที่มีสี (pigment) ออกจากเนื้อเยื่อ (Espinoza *et al.*, 1996)

การเปลี่ยนแปลงของฮีโมโกลบิน (Hb variant) ที่ผิดปกติสามารถแยกออกจากฮีโมโกลบิน ปกติโดยใช้เทคนิค อิเล็กโตรโฟเรซิส และ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ แต่ประสิทธิภาพ ขึ้นอยู่กับการมีประจุที่แตกต่างกันจากการเกิดมิวเทชัน ดังนั้นถ้าเกิดมิวเทชันที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ประจุจะทำให้แยกออกจากฮีโมโกลบินปกติได้ยาก ด้วยเทคนิคดังกล่าว ดังนั้นการพัฒนาเทคนิค รีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี มีประโยชน์ในการช่วยแยกฮีโมโกลบินปกติออกจากฮีโมโกลบินที่เกิด มิวเทชัน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงประจุได้ดีขึ้น แต่การแยกอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติ ไฮโดรโฟบิก การแยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสและ โครมาโทกราฟีไม่สามารถแยกฮีโมโกลบินที่มีการ

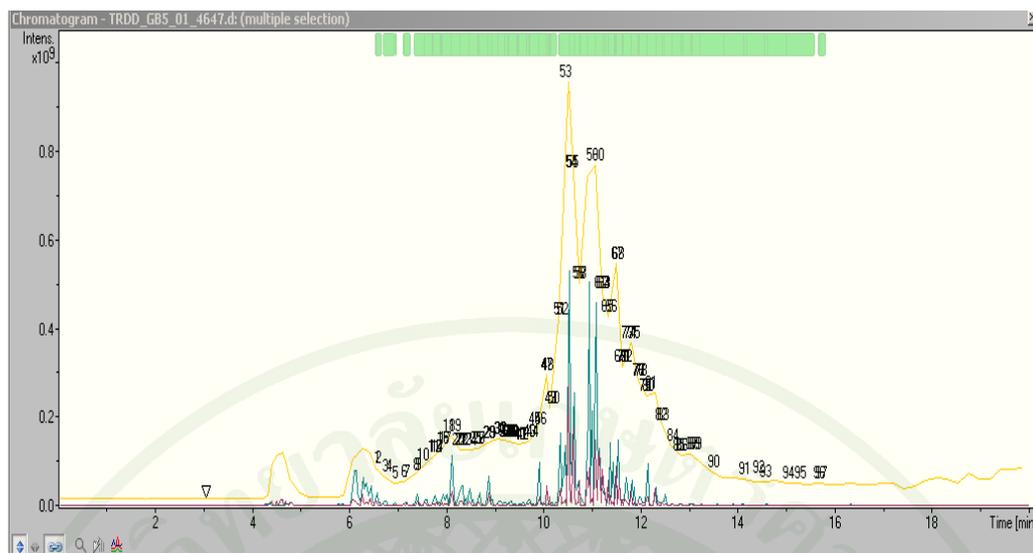
เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียงตำแหน่งเดียวได้ แม้แต่การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไม่ได้ให้ข้อมูลที่ระดับโปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงการปรับแต่งหลังจากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (posttranslational modification) แต่อย่างไรก็ตามในบางกรณีการใช้วิธีรีเวอร์ส-เฟสเอชพีแอลซีไม่สามารถแยกฮีโมโกลบินที่เกิดมิวเทนชันได้ ถ้าเกิดการแทนที่แล้วมีประจุรวมเท่ากันซึ่งการแยกนั้นขึ้นอยู่กับความแตกต่างของประจุ จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี (Zanella-Cleon *et al.*, 2008, 2009)

6. ลำดับกรดอะมิโนของสายกลอบินของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์จากวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจลโดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโทรเมตรี (nano-electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS/MS)

จากการศึกษา ลำดับ กรดอะมิโนของสายกลอบินของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ จากวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจลแสดงโครมาโทแกรมแถบบน (ดังภาพที่ 39) และแถบล่าง (ดังภาพที่ 40) ของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน



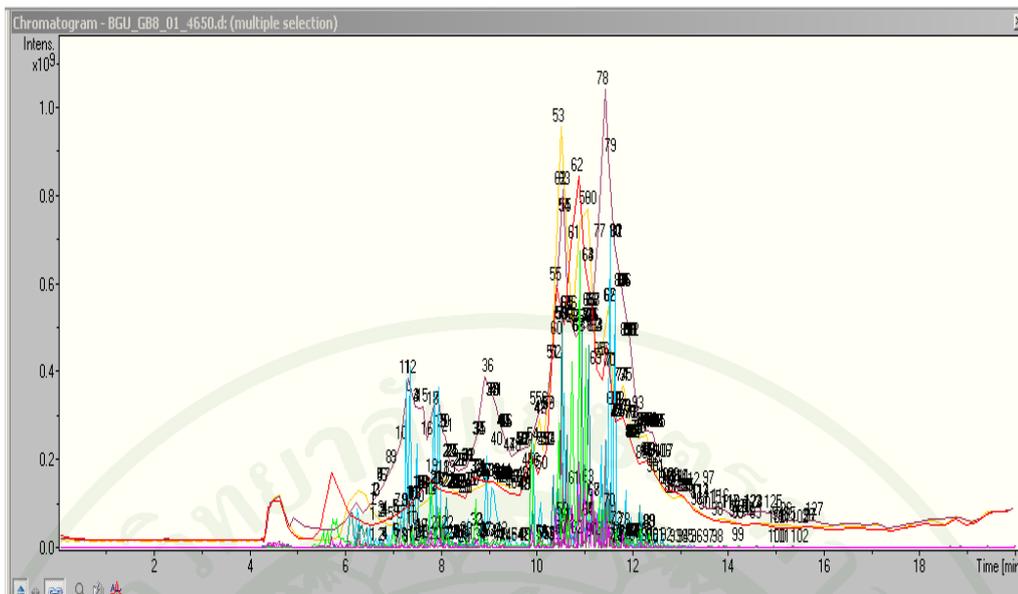
ภาพที่ 39 แสดงโครมาโทแกรมแถบบนของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโทรเมตรี



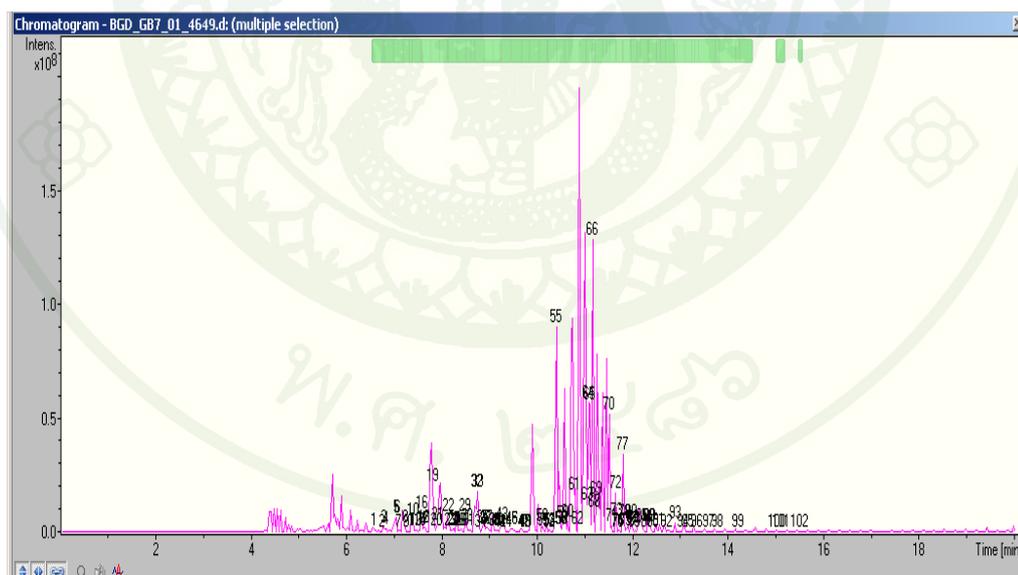
ภาพที่ 40 แสดงโครมาโทแกรมแถบค่าของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมไดอิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี

แสดงโครมาโทแกรมแถบบน (ดังภาพที่ 41) และแถบล่าง (ดังภาพที่ 42) ของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว จากภาพโครมาโทแกรม ของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ซึ่งวิเคราะห์ผล ด้วยวิธี นาโน อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี ที่อัตราเร็ว 20 ไมโครลิตรต่อนาที โดยสารละลายฮีโมโกลบิน ถูกแยกด้วยนาโนคอลัมน์ (Acclaim PepMap 100 C 18, 3 μm , 100 A, 75 μm i.d. x 150 mm) ด้วยอัตราเร็ว 300 นาโนลิตรต่อนาที โดยใช้สารละลายเกรเดียน (solvent gradient) (Solvent A: 0.1% formic acid in water; Solvent B: 0.1% formic acid in 80% ACN) เป็นเวลา 20 นาที

จากการศึกษาในครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการแยกฮีโมโกลบินโดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี ซึ่งมีการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีควบคู่กับ แมสสเปกโตรเมทรี ใช้เวลาในการแยกเพียง 20 นาทีและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เหมาะสมสำหรับฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

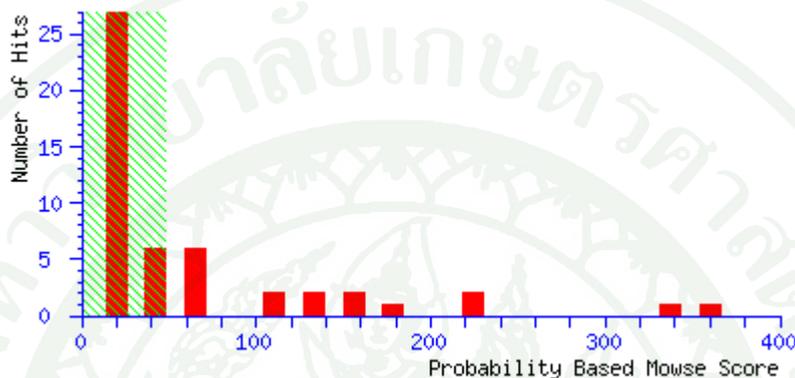


ภาพที่ 41 แสดงโครมาโทแกรมแถบบนของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดคิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์จลอิเล็กโตรโฟซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมตรี

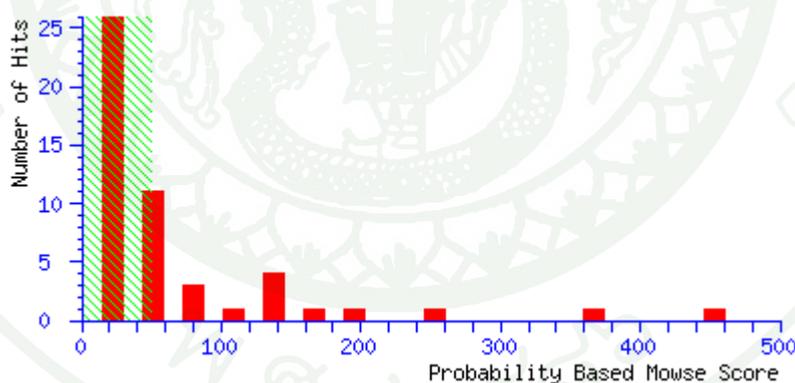


ภาพที่ 42 แสดงโครมาโทแกรมแถบล่างของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดคิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์จลอิเล็กโตรโฟซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมตรี

ข้อมูลแมสสเปกตรัมที่ได้จากวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี นำมาระบุชนิดของโปรตีน ที่มีในฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ โดยโปรแกรม MASCOT ซึ่งแสดงค่า Probability Based Mowse Score ของแถบต่างของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (ดังภาพที่ 43) และแสดงค่า Probability Based Mowse Score ของแถบต่างของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (Perkins *et al.*, 1999) (ดังภาพที่ 44)



ภาพที่ 43 แสดงไดอะแกรมของแถบต่างของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน โดยโปรแกรม MASCOT



ภาพที่ 44 แสดงไดอะแกรมของแถบต่างของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยโปรแกรม MASCOT

จากไดอะแกรมของแถบต่างของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โดยโปรแกรม MASCOT บริเวณส่วนที่แรเงาสีเขียว (green shaded area) เป็นบริเวณที่แสดงว่าส่วนนี้มีระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแท่งบาร์สีแดง (red bar) แสดงจำนวนของฮิต (ความสูงของแท่งบาร์) ในฐานที่เป็นส่วนของค่า Mowse Score ซึ่งค่า Probability Based Mowse

Score ของแถบบนของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว สูงสุดเท่ากับ 596 และ 637 ตามลำดับ และ ค่า Probability Based Mowse Score ของแถบล่างของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วสูงสุดเท่ากับ 360 และ 453 ตามลำดับ (Perkins *et al.*, 1999)

การระบุชนิดโปรตีนที่มีในฐานข้อมูล คอมพิวเตอร์ โดยการใช้ข้อมูลแมสสเปกตรัม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ มีหลายวิธีเช่น ค่า Probability Based Mowse Score โดยโปรแกรม MASCOT ค่า Bayesian Probability โดยโปรแกรม ProFound Sonar และ ค่า Cross-correlation (MS-Fit Sequest) ซึ่งแต่ละวิธีให้รายละเอียดเกี่ยวกับชื่อโปรตีน (protein name) และลำดับเบสดีเอ็นเอหรือโปรตีนใน ฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ (accession number) เหมือนกัน ซึ่งค่า Mowse Score ที่อยู่ต่ำกว่าระดับความเชื่อมั่นมีโอกาสเกิดผิดพลาด (false-positive hit) ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ค่าคะแนนสมบูรณ์ (absolute score value) ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ขนาดของ ฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ และจำนวนของพีคที่ใช้ป้อนข้อมูล แต่อย่างไรก็ตามถ้าค่า Mowse Score อยู่ในช่วงระหว่าง 50 ถึง 100 ควรจะทำการทดลองซ้ำใหม่โดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างให้ มากขึ้นหรือใช้ตัวอย่างใหม่แทน ถ้าค่า Mowse Score มากกว่า 100 เป็นค่าที่ยอมรับได้ โดยที่ค่า Mowse Score ที่เพิ่มขึ้น 10 ยูนิต บ่งชี้ถึงการเพิ่มระดับความเชื่อมั่นโดยอนุมานประมาณ 10 เท่า เช่น ถ้าที่ฮิตมีค่า Mowse Score 120 แสดงว่ามีความเชื่อถือ 1,000 เท่า มากกว่าที่ค่า Mowse Score 90 (Drabik *et al.*, 2008)

จากการวิเคราะห์แมสสเปกตรัมที่ได้จากแถบบนและแถบล่างของน้ำหนักริมโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปกโตรเมตรี ไอออนไนเซชัน และระบุชนิดของโปรตีน จากน้ำหนักริมโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัว (fragmentation pattern) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของฮีโมโกลบินประกอบด้วยปริมาณของไอออน ชนิดต่างๆที่เกิดจากการแตกตัว ด้วยโปรแกรม MASCOT เพื่อใช้ในการ เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมในฐานข้อมูล คอมพิวเตอร์ สามารถ แสดงชนิด ของโปรตีน แถบบนของน้ำหนักริมโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (ดังตารางที่ 10) และของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (ดังตารางที่ 11) นอกจากนี้สามารถ แสดงชนิด ของโปรตีน แถบล่างของน้ำหนักริมโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (ดังตารางที่ 12) และของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (ดังตารางที่ 13)

ตารางที่ 10 แสดงชนิดของโปรตีนแถบบนของน้ำหนักรวมของโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน ระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 44887976	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName:	16100	596	12	K.SLVSGLWGK.V
	Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin				K.VLNSFSDGLK.N
					K.LHVDPENFK.L
gi 57113367	PREDICTED: similar to beta globin [<i>Canis familiaris</i>]	16231	596	12	K.LHVDPENFK.L
					R.LLIVYPWTQR.F
gi 73988174	PREDICTED: similar to beta globin isoform 2 [<i>Canis familiaris</i>]	17835	596	12	K.VNVDEVGGEALGR.L
					K.EFTPQVQAAYQK.V
					K.VVAGVANALAHKYH.-
					K.LLGNVLCVLAHHFGK.E
					R.FDSEFGDLSTPDAVMSNAK.V
R.FDSEFGDLSTPDAVMSNAK.V					
					K.LSELHCCKLHVDPENFK.L

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 116666787	Chain B, Hemoglobin From Cerdocyon Thous, A Canidae From Brazil, At 2.2 Angstroms Resolution	16130	480	10	K.VLNSFSDGLK.N K.LHVDPENFK.L K.LHVDPENFK.L R.LLIVYPWTQR.F K. VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E R.FFDSFGDLSTPDSVMSNAK.V K.LSELHCDKLHVDPENFK.L
gi 73988388	PREDICTED: similar to beta globin [<i>Canis familiaris</i>]	16297	428	10	K.VLNSFSDGLK.N K.LHVDPENFK.L K.LHVDPENFK.L R.LLIVYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L R.EFTPLAQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.-

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 54037254	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16113	379	10	R.FFDSFGDLSTPDAVMSNAK.V R.FFDSFGDLSTPDAVMSNAK.V + Oxidation (M) K.LSELHCDKLHVDPENFK.L K.VLNSFSDDLK.N K.LHVDPENFK.L K.LHVDPENFK.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E K.LSELHCDKLHVDPENFK.L R.FFDSFGDLSSADAIMNPNK.V + Oxidation (M) R.FFDSFGDLSSADAIMNPNK.V + Oxidation (M)

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi 122634</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16101	331	7	K.LHVDPENFK.L
					K.LHVDPENFK.L
					R.LLVYPWTQR.F
					K.VNVDEVGGEALGR.L
					K.EFTPQVQAAYQK.V
					K.VVAGVANALAHKYH.-
					K.LLGNVLCVLAHFGK.E
<u>gi 122634</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16101	331	7	K.LHVDPENFK.L
					K.LHVDPENFK.L
					R.LLVYPWTQR.F
					K.VNVDEVGGEALGR.L
					K.EFTPQVQAAYQK.V
					K.VVAGVANALAHKYH.-
					K.LLGNVLCVLAHFGK.E

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi 122625</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16097	314	6	K.VLNSFSDGLK.N K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E K.LSELHCDQLHVDPENFK.L
<u>gi 62901562</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16120	240	5	K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLAHHFGK.E R.FFDSFGDLSTPDVMSNPV.V + Oxidation (M)
<u>gi 62901559</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16160	236	6	K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLAHHFGK.E R.FFESFGDLSSPDVMSNAK.V

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
					R.FFESFGDLSSPDAVMSNAK.V + Oxidation (M)
gi 62901575	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16147	198	4	K.VNVEDVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLAHHFGK.E
gi 13549112	beta globin chain variant [<i>Homo sapiens</i>]	16117	170	3	K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.-
gi 4038415	beta globin [<i>Homo sapiens</i>]	6262	151	2	R.LLVIYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L
gi 46014946	Chain B, Crystal Structure Of Human Hemoglobin E At 1.73 A Resolution	15970	138	3	K.VNVDEVGKALGR.L K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLAHHFGK.E
gi 136429	RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor	25078	129	4	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
					K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L + Oxidation (M)
gi 122725	RecName: Full=Hemoglobin subunit epsilon; AltName: Full=Hemoglobin epsilon chain; AltName: Full=Epsilon-globin	16227	121	4	K.LHVDPENFK.L K.LHVDPENFK.L K.VNIEEAGGEALGR.L
gi 195977060	A-gamma globin (predicted) [<i>Otolemur garnettii</i>]	16213	121	4	K.LSELHCDKLHVDPENFK.L
gi 1419181	beta-globin chain [<i>Rattus norvegicus</i>]	15304	86	3	K.LHVDPQNFK.L K.LHVDPQNFK.L R.LLIVYPWTQR.F
gi 202476	beta-1-globin	8147	75	2	-.LLIVYPWTQR.F R.FFDSFGDLSSASAVMSNAK.V + Oxidation (M)
gi 179409	beta-globin	15984	72	3	K.EFTPPVWAAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVIVCVLAHHFGK.E
gi 260076159	omega globin [<i>Dactylopsila trivirgata</i>]	-	71	3	K.LHVDPQNF.- K.LHVDPQNFK.-

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 122549	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta-C(NA); AltName: Full=Hemoglobin beta C(NA) globin chain	-	63	2	K.LHVDPQNFW.- K.VLNSFSDGLK.H K.KVLNSFSNGLK.H
gi 122687	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	15831	61	3	K.LHVDPENFK.L K.LHVDPENFK.L R.FFDSFGDLSSPSAVMSNPK.V + Oxidation (M)
gi 73762521	delta-globin Troodos variant [Homo sapiens]	16163	57	2	K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLCNFGK.E
gi 221381007	beta-globin [Orycteropus afer]	15521	50	1	K.VLNSFSDGIK.H
gi 6981420	protease, serine, 2 precursor [<i>Rattus norvegicus</i>]	-	48	1	R.LGEHNINVLEGDEQFINAAK.I
gi 91206847	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	-	45	1	K.VNVDDVGAEALGR.L
gi 91206847	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	-	45	1	K.VNVDDVGAEALGR.L
gi 122704	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	15959	42	2	K.VVAGVANALAHKYH.- R.FFDSFGDLSSPSAVMSNPK.V +

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 122614	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName:	16055	36	2	Oxidation (M) K.VVAGVANALAHKYH.-
gi 255683515	Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin hemoglobin, beta [<i>Equus caballus</i>]	16186	36	2	R.FFDSFGDLSNPGAVMGNPK.V
gi 16716569	protease, serine, 1 [<i>Mus musculus</i>]	-	32	1	R.LGEHNINVLEGNEQFIDAAK.I
gi 91206846	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16298	31	1	R.FFDSFGDLSSPAAIMGNPK.V

ตารางที่ 11 แสดงชนิดของโปรตีนแถบล่างของน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดสิล ซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปร์ย์ไอออนไนเซชัน ระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 44887976	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16100	360	6	K.VLNSFSDGLK.N R.LLIVYPWTQR.F
gi 57113367	PREDICTED: similar to beta globin [<i>Canis familiaris</i>]	16231	360	6	K.VNVDEVGGEALGR.L
gi 73988174	PREDICTED: similar to beta globin isoform 2 [<i>Canis familiaris</i>]	17835	360	6	K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- R.FFDSFGDLSTPDAVMSNAK.V + Oxidation (M)
gi 116666787	Chain B, Hemoglobin From Cerdocyon Thous, A Canidae From Brazil, At 2.2 Angstroms Resolution	16130	336	6	K.VLNSFSDGLK.N R.LLIVYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- R.FFDSFGDLSTPDSVMSNAK.V

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gij122508	RecName: Full=Hemoglobin subunit alpha; AltName:	15365	216	4	R.TFQSFPTTK.T
gij44887975	Full=Hemoglobin alpha chain; AltName: Full=Alpha-globin	15352	216	4	K.FFTAVSTVLTSK.Y K.TYFPHFDLSPGSAQVK.A R.TFQSFPTTKTYFPHFDLSPGSA
gij115502084	RecName: Full=Hemoglobin subunit alpha; AltName: Full=Hemoglobin alpha chain; AltName: Full=Alpha-globin	15483	216	4	QVK.A
gij62901559	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16160	179	4	K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- R.FFESFGDLSSPDVMSNAK.V + Oxidation (M)
gij62901575	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16147	159	3	K.VNVEDVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.-

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gij136429	RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor	25078	136	6	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L+ Oxidation (M) K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L + Oxidation (M)
gij46014946	Chain B, Crystal Structure Of Human Hemoglobin E At 1.73 A Resolution	15970	104	2	K.VNVDEVGGKALGR.L K.VVAGVANALAHKYH.-
gij229149	hemoglobin beta	-	72	1	K.VDVDEVGGEALGR.L
gij4159806	type II keratin subunit protein [Mus musculus]	65696	65	2	R.TNAENEFVTIKK.D R.FLEQQNKVLQTK.W
gij12859782	unnamed protein product [Mus musculus]	-	65	2	R.TNAENEFVTIKK.D R.FLEQQNQLQTK.W
gij148747492	keratin 2 [Sus scrofa]	-	50	1	R.FLEQQNQLKTK.W
gij91206847	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta	-	49	1	K.VNVDDVGAEALGR.L

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi122402</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit alpha; AltName: Full=Hemoglobin alpha chain; AltName: Full=Alpha-globin	15170	26	1	K.TYFPHFDLNPQSAQVK.G

ตารางที่ 12 แสดงชนิดของโปรตีนแถบบนของน้ำหนักรวมของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดสิล ซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน ระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi 44887976</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16100	637	17	K.SLVSGLWGK.V K.SLVSGLWGK.V K.LHVDPENFK.L K.KVLNSFSDGLK.N R.LLIVYPWTQR.F R.LLIVYPWTQR.F
<u>gi 57113367</u>	PREDICTED: similar to beta globin [Canis familiaris]	16231			K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V
<u>gi 73988174</u>	PREDICTED: similar to beta globin isoform 2 [Canis familiaris]	17835			K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E R.FFDSFGDLSTPDV <u>M</u> SNAK.V +Oxidation (M) R.FFDSFGDLSTPDV <u>M</u> SNAK.V +

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
					Oxidation (M)
					K.LSELHCDKLHVDPENFK.L
					K.LSELHCDKLHVDPENFK.L
gi 116666787	Chain B, Hemoglobin From Cerdocyon Thous, A Canidae From Brazil, At 2.2 Angstroms Resolution	16130	530	15	K.LHVDPENFK.L
					K.KVLNSFSDGLK.N
					R.LLIVYPWTQR.F
					R.LLIVYPWTQR.F
					K.VNVDEVGGEALGR.L
					K.VNVDEVGGEALGR.L
					K.EFTPQVQAAYQK.V
					K.EFTPQVQAAYQK.V
					K.VVAGVANALAHKYH.-
					K.VVAGVANALAHKYH.-
					K.LLGNVLCVLAHHFGK.E
					R.FFDSFGDLSTPDSVMSNAK.V
					R.FFDSFGDLSTPDSVMSNAK.V
					K.LSELHCDKLHVDPENFK.L

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi 54037254</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16113	416	12	K.LSELHCDKLHVDPENFK.L K.LHVDPENFK.L K.KVLNSFSDGLK.N K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E K.LSELHCDKLHVDPENFK.L K.LSELHCDKLHVDPENFK.L R.FFDSFGDLSSADAIMNNPK.V + Oxidation (M)

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi 62901532</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16024	400	12	K.LHVDPENFK.L K.KVLNSFSDGLK.N K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E R.FFDSFGDLSSPDVAVMGNPK.V + Oxidation (M) K.LSELHCDKLHVDPENFK.L K.LSELHCDKLHVDPENFK.L

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi122625</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16097	378	10	K.KVLNSFSDGLK.N K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E K.LSELHCDQLHVDPENFK.L K.LSELHCDQLHVDPENFK.L

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gjl62286657</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit delta; AltName: Full=Hemoglobin delta chain; AltName: Full=Delta-globin	16284	342	11	K.LHVDPENFK.L K.NLDNLKGTFFVK.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E K.LSELHCDKLHVDPENFK.L K.LSELHCDKLHVDPENFK.L
<u>gjl122634</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16101	332	10	K.LHVDPENFK.L R.LLLVYPWTQR.F R.LLLVYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 62901559	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16160	322	10	K.EFTPQVQAAYQ K.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- K.LLGNVLCVLAHHFGK.E K.VNVPEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLAHHFGK.E R.FFESFGDLSSPDVMSNAK.V + Oxidation (M) R.FFESFGDLSSPDVMSNAK.V + Oxidation (M)

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi 62901562</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16120	291	8	K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLAHHFGK.E R.FFDSFGDLSTPDAVMSNP _K .V + Oxidation (M)
<u>gi 62901575</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16147	229	7	K.VNVEDVGGEALGR.L K.VNVEDVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLAHHFGK.E

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gij13549112</u>	beta globin chain variant [Homo sapiens]	16117	203	6	K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTQPVQAAYQK.V K.EFTQPVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.-
<u>gij46014946</u>	Chain B, Crystal Structure Of Human Hemoglobin E At 1.73 A Resolution	15970	175	5	K.VNVDEVGKALGR.L K.VNVDEVGKALGR.L K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLAHHFGK.E
<u>gij4038415</u>	beta globin [Homo sapiens]	6262	155	4	R.LLVIYPWTQR.F R.LLVIYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L
<u>gij122699</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16127	152	5	K.VDVEDVGGEALGR.L K.VDVEDVGGEALGR.L

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาล ตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gij122698</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	15966	152	5	K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V R.LLGNVLCVLAHHFGK.E
<u>gij136429</u>	RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor	25078	144	4	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L K.IITHPNFNGNTLDNDIMLIK.L + Oxidation (M)
<u>gij122681</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16059	140	3	K.VKVEEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V
<u>gij122712</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit delta; AltName: Full=Hemoglobin delta chain; AltName: Full=Delta-globin	16038	125	5	K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.-

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi 122630</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16053	119	3	R.FFESFGDLSSPAAVMGNPK.V K.VNVEEIGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V
<u>gi 122725</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit epsilon; AltName: Full=Hemoglobin epsilon chain; AltName: Full=Epsilon-globin	16227	118	5	K.LHVDPENFK.L K.VNIEEAGGEALGR.L K.VNIEEAGGEALGR.L K.LSELHCDKLHVDPENFK.L K.LSELHCDKLHVDPENFK.L
<u>gi 122665</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta-1/2; AltName: Full=Hemoglobin beta-1/2 chain; AltName: Full=Beta-1/2-globin; AltName: Full=Hemoglobin beta-I/II chain	16231	105	3	K.VNVEEIGGEALGR.L K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.-
<u>gi 169402678</u>	hemoglobin subunit delta (predicted) [Callicebus moloch]	16055	103	3	K.VNVDEVGGEALGR.L K.VNVDEVGGEALGR.L R.FFESFGDLSSPAAVMGNPK.V

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi122731</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit epsilon; AltName: Full=Hemoglobin epsilon chain; AltName: Full=Epsilon-globin; AltName: Full=Beta-4 globin	16394	93	4	K.LHVDPENFK.L K.LVSGVAIALAHK.Y K.LSELHCDKLHVDPENFK.L K.LSELHCDKLHVDPENFK.L
<u>gi122637</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	15783	92	4	K.LHVDPENFK.L K.KVIDSFSNGLK.H K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.-
<u>gi122688</u>	Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	15806			
<u>gi149719363</u>	PREDICTED: similar to Hemoglobin subunit beta (Hemoglobin beta chain) (Beta-globin) [Equus caballus]	16760	91	3	R.LLIVYPWTQR.F R.LLIVYPWTQR.F K.VNEEEIGGEALGR.V
<u>gi73762521</u>	delta-globin Troodos variant [Homo sapiens]	16163	85	3	K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- R.LLGNVLCVLCNFGK.E
<u>gi179409</u>	beta-globin	15984	83	3	K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.-

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gij122686	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16120	79	3	R.LLGNVIVCVLAHHFGK.E K.VKVDEVGAEALGR.L K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.-
gij229149	hemoglobin beta	-	68	2	K.VDVDEVGGEALGR.L K.VDVDEVGGEALGR.L
gij229229	hemoglobin beta	16050	68	3	K.EFTPQVEAAYQK.V K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.-
gij109287733	hemoglobin beta 1 [Mus caroli]	16104	66	2	K.LHVDPENFK.L
gij187369324	hemoglobin beta 2 [Mus caroli]	15980			K.VNPDEVGGEALGR.L
gij221381007	beta-globin [Orycteropus afer]	15521	64	1	K.KVLNSFSDGIK.H
gij122614	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16055	60	3	K.VVAGVANALAHKYH.- K.VVAGVANALAHKYH.- R.FFDSFGDLSNPGAVMGPNK.V

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาล ตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 91206847	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	-	57	2	K.VNVDDVGAEALGR.L K.VNVDDVGAEALGR.L
gi 6981420	protease, serine, 2 precursor [Rattus norvegicus]	-	45	1	R.LGEHNINVLEGDEQFINAAK.I
gi 78099200	RecName: Full=Hemoglobin subunit epsilon; AltName: Full=Hemoglobin epsilon chain; AltName: Full=Epsilon-globin	-	44	2	K.LVGGVANALAHKYH.- K.LVGGVANALAHKYH.-
gi 122540	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta-A; AltName: Full=Hemoglobin beta-A chain; AltName: Full=Beta-A-globin; AltName: Full=Alanine beta-globin	16068	38	2	K.LHVPENFK.L K.VKVDEVGAEALGR.L
gi 122653	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	-	31	1	K.VNINELGGEALGR.L
gi 91206846	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16298	24	1	R.FFDSFGDLSSPAAIMGNPK.V

ตารางที่ 13 แสดงชนิดของโปรตีนแถบล่างของน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วที่ทำให้บริสุทธิ์จากเทคนิคโซเดียมโดคิล ซัลเฟตพอ ลีอะครีลาไมด์เจลอเล็กโตรโฟริซิสโดยวิธีนาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน ระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 44887976	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16100	453	8	K.SLVSGLWGK.V K.VLNSFSDGL
gi 57113367	PREDICTED: similar to beta globin [Canis familiaris]	16231			K.N K.KVLNSFSDGL K.N R.LLIVYPWTQR.F
gi 73988174	PREDICTED: similar to beta globin isoform 2 [Canis familiaris]	17835			K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V R.FFDSFGDLSTPDVMSNAK.V + Oxidation (M)
gi 116666787	Chain B, Hemoglobin From Cerdocyon Thous, A Canidae From Brazil, At 2.2 Angstroms Resolution	16130	373	7	K.VLNSFSDGLK.N K.KVLNSFSDGLK.N R.LLIVYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V R.FFDSFGDLSTPDSVMSNAK.V

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 122634	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16101	197	4	R.LLLVYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V
gi 122508	RecName: Full=Hemoglobin subunit alpha; AltName: Full=Hemoglobin alpha chain; AltName: Full=Alpha-globin	15365	239	4	R.TFQSFPTTK.T - .VLSPADKTNIK.S K.TYFPHFDLSPGSAQVK.A K.STWDKIGGHAGDYGGALDR.T
gi 44887975	RecName: Full=Hemoglobin subunit alpha; AltName: Full=Hemoglobin alpha chain;	15352			
gi 4488810	AltName: Full=Alpha-globin	15322			
gi 115502084	RecName: Full=Hemoglobin subunit alpha; AltName: Full=Hemoglobin alpha chain; AltName: Full=Alpha-globin				

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
gi 122634	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16101	197	4	R.LLLVYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.
gi 62901559	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16160	180	4	K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V R.FFESFGDLSSPDVMSNAK.V + Oxidation (M)
gi 13549112	beta globin chain variant [Homo sapiens]	16117	151	3	K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTQPVQAAYQK.V K.EFTQPVQAAYQK.V
gi 62901575	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16147	143	3	K.VNVDEVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V
gi 4038415	beta globin [Homo sapiens]	6262	125	2	R.LLVIYPWTQR.F K.VNVDEVGGEALGR.L

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับโปรตีน (Accession no.)	ชื่อโปรตีน (Protein name)	น้ำหนัก โมเลกุล (ดาลตัน)	Mouse Score	No. of match peptide	ลำดับกรดอะมิโน
<u>gi 122698</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	15966	119	3	K.VDVEDVGGEALGR.L K.EFTPQVQAAYQK.V K.EFTPQVQAAYQK.V
<u>gi 122699</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16127			
<u>gi 11066958</u>	mutant beta-globin [Homo sapiens]	-	91	1	K.VNVDEVGGKALGR.-
<u>gi 221381007</u>	beta-globin [Orycteropus afer]	15521	89	2	K.VLNSFSDGIK.H K.KVLNSFSDGIK.H
<u>gi 229149</u>	hemoglobin beta	-	68	1	K.VDVDEVGGEALGR.L
<u>gi 91206847</u>	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Hemoglobin beta chain; AltName: Full=Beta-globin	16760	59	2	R.LLIVYPWTQR.F K.VNEEEIGGEALGR.V
<u>gi 126022906</u>	hemoglobin alpha subunit 1 [Peromyscus maniculatus]	15172	27	1	K.TYFPHFDVSHSSAQVK.T

จากตาราง แสดงชนิดของโปรตีน แถบบนของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (ตารางที่ 10) แสดงหน่วยย่อยของแถบบนเป็นสายเบต้าที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,000 ดาลตัน มีค่า Mowse Score สูงสุดและต่ำสุดเท่ากับ 596 และ 31 ตามลำดับ สายเบต้ามีลำดับกรดอะมิโนครอบคลุม (sequence coverages) 82 เปอร์เซ็นต์ในสุนัข และสามารถพบแมสสเปกตรัมมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนบางช่วงกับสายเบต้า เกลต้า และเอฟซิลอนในคน สายเบต้า ในหนูนอร์เวย์ (Norway) (*Rattus norvegicus*) และในตัวอาร์ควาร์ค (Aardvark) (*Orycteropus afer*) สายโอเมก้า ในตัวพอสซัม (*Dactylopsila trivirgata*) และ โปรตีเอส ในหนูนอร์เวย์และหนูบ้าน (*Mus musculus*) นอกจากนี้พบมีส่วนของทริปซินที่เหลือจากการย่อยโปรตีนปนอยู่ด้วย

จากตาราง แสดงชนิดของโปรตีน แถบล่างของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (ตารางที่ 11) แสดงหน่วยย่อยของแถบล่างเป็นสายอัลฟาที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15,000 ดาลตัน มีค่า Mowse Score สูงสุดและต่ำสุดเท่ากับ 360 และ 26 สายอัลฟามีลำดับกรดอะมิโนครอบคลุม 26 เปอร์เซ็นต์ในสุนัข และสามารถพบแมสสเปกตรัมมีความเหมือนลำดับกรดอะมิโนบางช่วงของสายเบต้าในสุนัข ซึ่งอาจเกิดจากการแพร่ (diffuse) ของสายเบต้าขณะเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าโดยวิธี โซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากแถบบนลงสู่แถบล่างทำให้เกิดการปนเปื้อนในแถบล่างดังกล่าว นอกจากนี้พบมีส่วนโปรตีเอสในหนูนอร์เวย์ เคราตินในหนูบ้าน และ มีส่วนของทริปซินที่เหลือจากการย่อยโปรตีนปนอยู่ด้วย

จากตาราง แสดงชนิดของโปรตีน แถบบนของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (ตารางที่ 12) แสดงหน่วยย่อยของแถบบนเป็นสายเบต้าที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,000 ดาลตัน มีค่า Mowse Score สูงสุดและต่ำสุดเท่ากับ 637 และ 24 สายเบต้ามีลำดับกรดอะมิโนครอบคลุม 82 เปอร์เซ็นต์ในสุนัข และสามารถพบแมสสเปกตรัมมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนบางช่วงกับสายเบต้า เกลต้า และเอฟซิลอนในคน สายเบต้าในหนูริงงาหางยาว (Ryukyu mouse) (*Mus caroli*) สายเบต้าในม้า (*Equus caballus*) และในตัวอาร์ควาร์ค (Aardvark) (*Orycteropus afer*) และสายเกลต้าในลิง (Dusky titi Monkey) (*Callicebus moloch*) นอกจากนี้พบมีส่วนของทริปซินที่เหลือจากการย่อยโปรตีนปนอยู่ด้วย

จากตาราง แสดงชนิดของโปรตีน แถบล่างของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (ตารางที่ 13) แสดงหน่วยย่อยของแถบล่างเป็นสายอัลฟาที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 ดาลตัน มีค่า Mowse Score สูงสุดและต่ำสุดเท่ากับ 453 และ 27 สายอัลฟามีลำดับกรดอะมิโนครอบคลุม 26 เปอร์เซ็นต์ในสุนัข นอกจากนี้พบสายอัลฟาในหนูสีจกวาง (Deer Mouse) (*Peromyscus maniculatus*)

และสามารถพบแมสสเปกตรัมมีความเหมือนลำดับกรดอะมิโนบางช่วงกับสายเบต้าในสุนัข ซึ่งอาจเกิดจากการแพร่ของสายเบต้าขณะมีการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าโดยวิธี โซเดียมไดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากแถบบนลงสู่แถบล่างทำให้เกิดการปนเปื้อนในแถบล่างดังกล่าว นอกจากนี้พบมีส่วนของทริปซินที่เหลือจากการย่อยโปรตีนปนอยู่ด้วย

จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินสุนัขโดยใช้เทคนิค ESI-MS พบว่าสายอัลฟาหนึ่งและอัลฟาสองมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,217.3 และ 15,247.3 ดาลตัน และสายเบต้ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,996.3 ดาลตันตามลำดับ (Adamczyk and Gebler, 1997) นอกจากนี้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินในคน มี น้ำหนักโมเลกุลของสายอัลฟาเท่ากับ 15,126 ดาลตัน และ น้ำหนักโมเลกุลของสายเบต้าเท่ากับ 15,867 ดาลตัน (Troxler *et al.*, 2002)

จากการศึกษาครั้งนี้ใช้ทริปซิน ซึ่งเป็น เอนไซม์ที่ใช้ ในการย่อยโปรตีนและ ตัดโปรตีนฮีโมโกลบิน ที่ต้องการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน ให้มีขนาดเล็กลง ในสถานะเดียวกันกับโปรตีนมาตรฐาน ของซีรัมอัลบูมินของโค ที่ใช้เปรียบเทียบ โดยทริปซินจะตัด โปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นตรงตำแหน่งหลังหมู่คาร์บอกซิลของไลซีนและอาร์จินีน เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะ ใช้งานง่ายสามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม และประสบผลสำเร็จในการย่อยฮีโมโกลบินในขั้นตอนก่อนการใช้ทริปซินย่อยโปรตีนฮีโมโกลบินนั้นจะต้องมีการรีดิวซ์โปรตีนและแยกโปรตีนออกเป็นชนิดเดี่ยวๆก่อน จากการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการบอสมิทธิลเลชัน (carboxymethylation) ซึ่งวิธีนี้โปรตีนฮีโมโกลบินจะถูกรีดิวซ์ด้วยสารรีดิวซิงก์ คือ ไคโซโอไรดอล เพื่อตัดพันธะไดซัลไฟด์ที่เป็น พันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรงระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีนที่อยู่ในโครงสร้าง ทำให้โปรตีนไม่กลับมาจับอีกและ ทำให้หมู่ข้างของกรดอะมิโนซิสเทอีน มีหมู่ซัลไฮดริลอิสระ ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ ไอโอโดอะเซตาไมด์เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ของไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ฟังก์ชันซัลไฮดริลด้วยหมู่คาร์บอกซีเมทิล ได้ ซึ่งการใช้ทริปซิน มีประโยชน์ในการวิเคราะห์ โดยใช้หลักการตรวจหาประจุบวก ของสารละลายจากการย่อย ด้วยทริปซินที่จะนำมาวิเคราะห์หามวลของแต่ละเปปไทด์ที่ตัดได้และได้แผนที่ของเปปไทด์ (peptide map) ที่เป็นสเปกตรัมของมวล โดยการย่อยด้วยทริปซินนั้นนิยมใช้งานทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อระบุชนิดของโปรตีน วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน และศึกษาโครงสร้างเมื่อเกิดการปรับแต่งหลังจากการแปลรหัส เป็นกรดอะมิโน (สมปอง, 2550; สุภคร และ ณรงค์, 2553; Wilkins *et al.*, 2007; Vekey *et al.*, 2008; Henning *et al.*, 2010)

เทคนิคการต่ออนุกรมของส่วนวิเคราะห์มวล (Tandem mass spectrometry, MS-MS) เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาโครงสร้างของโปรตีน และสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีการนำส่วนวิเคราะห์มวลโมเลกุล (mass analyzer) มากกว่า 1 เครื่อง ทำให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและมีลักษณะที่จำเพาะเจาะจงของการแตกหัก (fragmentation) โดยอาศัยการทำให้มีขนาดของโปรตีนเล็กลง แล้วทำการคัดเลือกและเหนี่ยวนำให้ไอออนย่อยแต่ละส่วนเกิดการแตกตัวต่อไป และ คัดเลือกไอออนลูกที่จำเพาะของโปรตีน มาวิเคราะห์แมสสเปกตรัมทำให้ได้ข้อมูลโครงสร้างแต่ละส่วนของไอออนย่อยครบถ้วน ทำการวิเคราะห์มวล ส่วนโปรตีนเล็กๆหรือเปปไทด์สั้น ๆ หรือกรดอะมิโนแต่ละตัวที่เกิดจากการแตกหักนั้น โดยการนำกรดอะมิโนแต่ละตัวที่แตกหักมาวางเรียงต่อกัน ทำให้ได้โครงสร้างระดับปฐมภูมิหรือลำดับกรดอะมิโน (สมปอง, 2550; ศุภสร และณรงค์, 2553; Wilkins *et al.*, 2007; Vekey *et al.*, 2008)

การหาลำดับกรดอะมิโน เพื่อระบุชนิดโปรตีน ในปัจจุบันมีเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี โดยอาศัยการวัดน้ำหนักโมเลกุลของสารแล้วนำมาแมสสเปกตรัมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ จะทำให้สามารถทราบลำดับกรดอะมิโน de novo sequencing ได้ ซึ่งในการหาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค MS-MS พบว่าในโครงสร้างหลักของพันธะเปปไทด์มีพันธะสามชนิดที่เกิดการแตกหัก คือ NH-CH CH-CO และ CO-NH ทำให้ได้ไอออนสองชนิดเกิดขึ้นจากการแตกหักเป็น ไอออนที่ไม่มีประจุ (neutral) และไอออนที่มีประจุ (charge) โดยจะมีเฉพาะไอออนบวกเท่านั้นที่ถูกตรวจวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี เมื่อมีการตัดเปปไทด์จะทำให้มีประจุเกิดขึ้นที่สองข้างของเส้นเปปไทด์ ดังนั้นจะมี ไอออนของกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ 6 ชนิด ซึ่งไอออนที่อยู่ทางฝั่งปลายอะมิโนของเปปไทด์ ใช้สัญลักษณ์ a b และ c ไอออน และไอออนที่อยู่ทางฝั่งปลายคาร์บอกซี ใช้สัญลักษณ์ x y และ z ไอออน มีตำแหน่งที่เกิดการแตกหักได้ดีที่ CO-NH₂ ซึ่งจะให้ b หรือ y ไอออน มวลของกรดอะมิโน เกิดจากมวลที่แตกต่าง กันระหว่าง b ไอออนที่อยู่ใกล้กัน เทคนิค MS-MS สามารถใช้ในการเพิ่มคุณภาพและความไวในการวิเคราะห์ผล นับเป็นวิธีที่มีความไวในการเลือกใช้หาลำดับ กรดอะมิโน (สมปอง, 2550; Kamp *et al.*, 2000; Wilkins *et al.*, 2007; Kraj and Macht, 2008; Vekey *et al.*, 2008)

นาโนอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว มีความไวในการวิเคราะห์สูง และใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับอิเล็กโตรสเปรย์แบบธรรมดา ทำให้อัตราเร็วของการไหลลดลงจาก 1,000 นาโนลิตรต่อนาที เหลือเพียง 10-100 นาโนลิตรต่อนาที และหยดของสารละลายมีขนาดเล็กมากกว่า 1,000,000 เท่า เมื่อเทียบกับ อิเล็กโตรสเปรย์แบบธรรมดา ใช้ปลายเข็มขนาดเล็กและอยู่ใกล้กับโคนสารตัวอย่าง

จากการศึกษาของสายอัลฟาของฮิโมโกลบินในสุนัข (*Canis familiaris*) มีความแตกต่างกันที่ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 130 จากกรดอะมิโนทั้งหมด 141 หน่วย น้ำหนักโมเลกุล 15,217 ดาลตัน พบว่ามี 2 รูปแบบ คือ รูปแบบของธรีโอนีน และอะลานีน จากการศึกษาในสุนัขพันธุ์ลาบราดอร์ (Labrador) 2 ครอบครัว พบว่ามียีนโครงสร้างของสายอัลฟา ที่ซับซ้อน (multiple alpha-chain structural genes) ซึ่งทำให้เกิดความแตกต่างไม่เหมือนกัน (heterogeneity) ของสายอัลฟา ประกอบด้วยอย่างน้อยที่สุดเป็นยีนตำแหน่งของธรีโอนีนและอะลานีน ส่วนในสุนัขพันธุ์บาเซ็นจิ (Basenji) และพันธุ์บีเกิ้ล มียีนตำแหน่งของธรีโอนีนและอะลานีนทั้งคู่ (Dresler *et al.*, 1976a, 1976b)

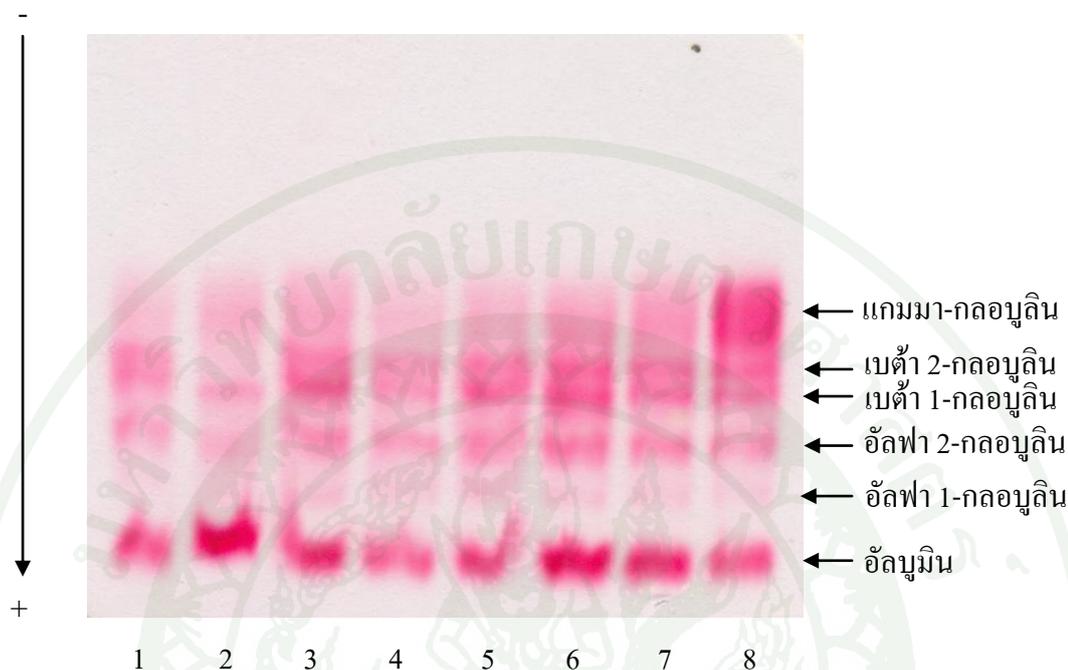
จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของฮิโมโกลบินในสุนัข (*Canis familiaris*) โดยหาลำดับกรดอะมิโน ซึ่งย่อยเปปไทด์ด้วยทริปซิน พบว่าสายอัลฟามีกรดอะมิโน จำนวน 141 หน่วย และสายเบต้ามีกรดอะมิโน จำนวน 146 หน่วย โดยสายอัลฟาที่ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 130 มี 2 ชนิด สายหนึ่งประกอบด้วยธรีโอนีนและอีกสายประกอบด้วยอะลานีน (Brimhall *et al.*, 1997)

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของฮิโมโกลบินในสุนัขป่าโคโยตี (coyote) (*Canis latrans*) และสุนัขป่าสีเทา (wolf) (*Canis lupus*) ซึ่งย่อยเปปไทด์ด้วยทริปซินจากสายอัลฟาและสายเบต้า พบว่าสายอัลฟามีกรดอะมิโนจำนวน 141 หน่วย และสายเบต้ามีกรดอะมิโนจำนวน 146 หน่วย โดยสายอัลฟาที่ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 130 เป็นธรีโอนีนเพียงชนิดเดียว ซึ่งแตกต่างจากในสุนัข (*Canis familiaris*) โดยสายอัลฟาที่ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 130 มี 2 ชนิด สายหนึ่งประกอบด้วยธรีโอนีนและอีกสายประกอบด้วยอะลานีน (Runkel *et al.*, 1974)

7. รูปแบบซีรัมโปรตีนโดยวิธีเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส จากตัวอย่างซีรัมของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

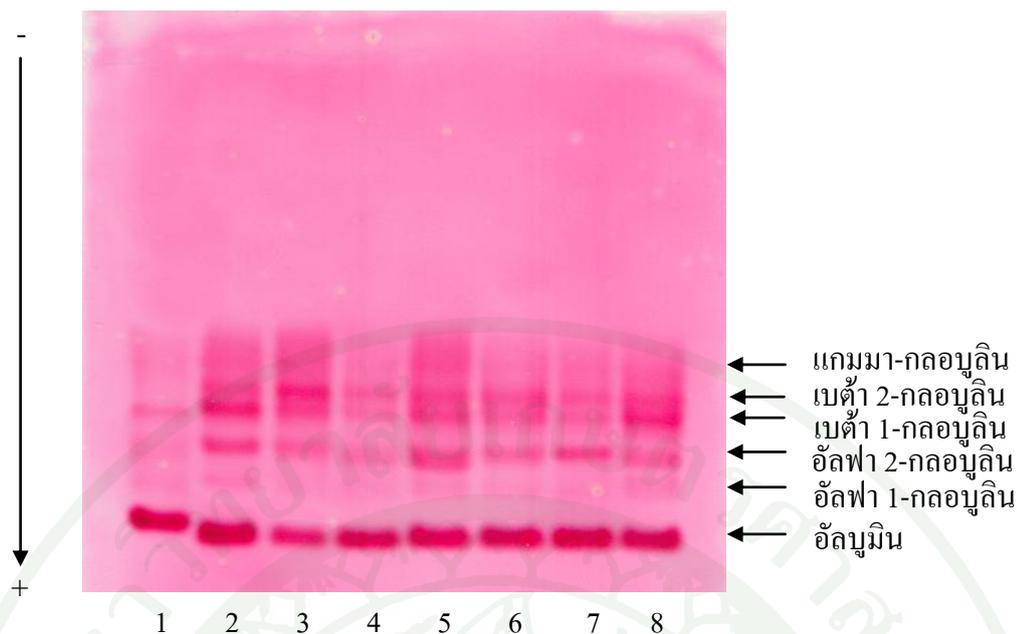
จากการศึกษา รูปแบบซีรัมโปรตีนของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว โตเต็มวัย โดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีของ Helena Laboratories (U.S.A.) ซึ่งใช้บัฟเฟอร์ทริส-บาร์บิทอล-โซเดียม บาร์บิทอล พีเอช 8.8 โดยใช้ซีรัมของสุนัขทั้งสองสายพันธุ์ พบการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ของซีรัมโปรตีน ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว บนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ประกอบด้วย 6 แถบ โดยที่อัลบูมิน สามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ได้ระยะทางไกลที่สุด จนเกือบสุดแผ่น เซลลูโลสอะซีเตต และเห็นเป็นแถบเด่นชัดรองลงมาคือ อัลฟา 1-กลอบูลิน อัลฟา 2-กลอบูลิน เบต้า 1-กลอบูลิน เบต้า 2-กลอบูลิน และแกมมา-กลอบูลิน ตามลำดับ (ดังภาพที่ 47 และภาพที่ 48) ซึ่งรูปแบบซีรัมโปรตีน

ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีการ เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ได้รูปแบบ เหมือนกัน



ภาพที่ 47 แสดงการเคลื่อนที่ของซีรัมโปรตีนจากสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (เลขที่ 1, 3-8) และ คน (เลขที่ 2) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (180 โวลต์ 15 นาที)

จากซีรัมโปรตีนมาตรฐานของคนเมื่อเปรียบเทียบกับสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว พบว่าให้ผลการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก เหมือนกันและแยกออกจากกันชัดเจน แต่ซีรัมโปรตีน มาตรฐาน ของคนประกอบด้วย 5 แถบ โดยที่อัลบูมินสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ได้ระยะทางไกลที่สุด รองลงมาคือ อัลฟา 1-กลอบูลิน อัลฟา 2-กลอบูลิน เบต้า-กลอบูลิน และแกมมา-กลอบูลิน ตามลำดับ อัลบูมินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเคลื่อนที่ ในสนามไฟฟ้า ได้ไกลกว่า อัลบูมินของคนเล็กน้อย ซึ่งอัลบูมิน ในเกือบทุกสปีชีส์มีส่วนของกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรดสูงและมีขนาดเล็กน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66,400 ดาลตัน ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของอัลบูมินกับสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรดหรือเบส เช่น อัลบูมินในหมูมีกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด 7 หน่วย และเบส 83 หน่วย ขณะที่อัลบูมินในแมวมมีกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด 100 หน่วย และเบส 75 หน่วย ทำให้การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของอัลบูมินในแมวเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าอัลบูมินในคน (Kojima *et al.*, 1997, 2008)



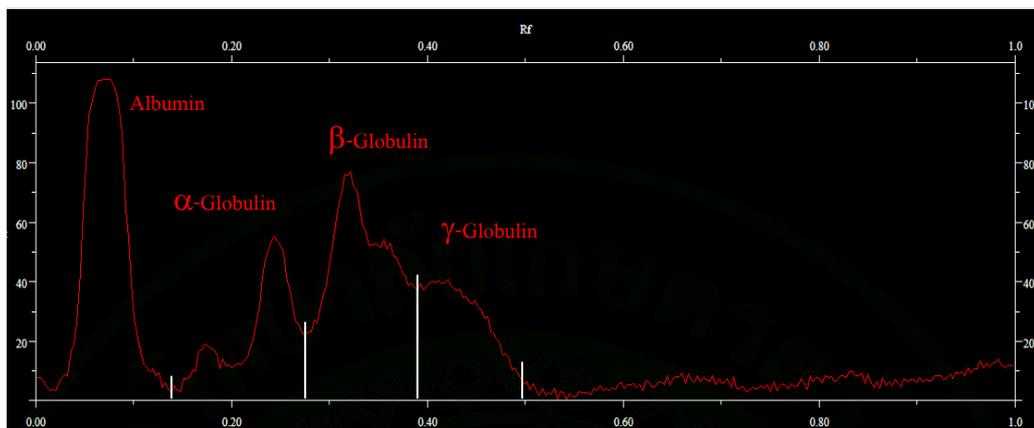
ภาพที่ 48 แสดงการเคลื่อนที่ของซีรัมโปรตีนจากสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (เลนที่ 2-8) และคน (เลนที่ 1) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (180 โวลต์ 15 นาที)

รูปแบบซีรัมโปรตีน ของสุนัขพันธุ์ไทย หลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้ วัน อิเล็กโตรโฟรีโทแกรม ของรูปแบบซีรัมโปรตีนสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน ประกอบด้วย 6 พิก ของอัลบูมิน อัลฟา 1-กลอบูลิน อัลฟา 2-กลอบูลิน เบต้า 1-กลอบูลิน เบต้า 2-กลอบูลิน และแกมมา-กลอบูลิน ตามลำดับ (ดังภาพที่ 49)

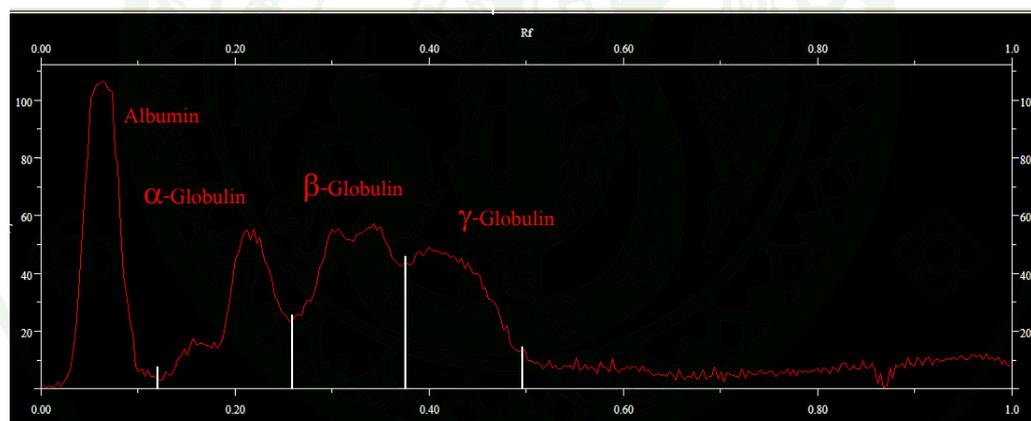
อิเล็กโตรโฟรีโทแกรมของรูปแบบซีรัมโปรตีนสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วย 6 พิก ของอัลบูมิน อัลฟา 1-กลอบูลิน อัลฟา 2-กลอบูลิน เบต้า 1-กลอบูลิน เบต้า 2-กลอบูลิน และแกมมา-กลอบูลิน ตามลำดับ (ดังภาพที่ 50) ซึ่งรูปแบบซีรัมโปรตีน ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วเหมือนกัน

การแยกซีรัมโปรตีนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสขึ้นอยู่กับเคลื่อนที่ของประจุในส่วนองโปรตีนในกระแสไฟฟ้า โดยทิศทางและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นกับประจุ ขนาด และชนิดของตัวค้ำจุน ซึ่งวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต พบว่าซีรัมโปรตีนส่วนใหญ่มีประจุเป็นลบสามารถเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาบวก เมื่อใช้บาร์บิทอลบัพเฟอร์ พีเอช 8.8 โดยที่อัลบูมินมีความเป็นประจุลบมากที่สุดจึงเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาบวกได้ไกลที่สุด ส่วนกลอบูลินมีความเป็นประจุลบน้อยที่สุดจึงเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าอย่างช้าๆจากขั้วลบไปหาบวก ซีรัมโปรตีนส่วนกลอบูลินสามารถเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าแยกออกเป็น อัลฟา เบต้า และแกมมา-กลอบูลิน ตามลำดับ สำหรับในสุนัขและแมว อัลฟาและเบต้าสามารถแบ่งย่อยออกเป็น

อัลฟา 1-กลอบูลิน อัลฟา 2-กลอบูลิน เบต้า 1-กลอบูลิน และเบต้า 2-กลอบูลิน ตามลำดับ (Kaneko *et al.*, 1997, 2008)



ภาพที่ 49 แสดงอิเล็กโตรโฟรีโทแกรมของรูปแบบซีรัมโปรตีนสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน เมื่อใช้โปรแกร่ววิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน



ภาพที่ 50 แสดงอิเล็กโตรโฟรีโทแกรมของรูปแบบซีรัมโปรตีนสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เมื่อใช้โปรแกร่ววิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน

การคำนวณปริมาณโปรตีนแต่ละแถบเมื่อใช้โปรแกร่ววิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้วัน จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับเปอร์เซ็นต์การเทียบเคียงของแต่ละแถบ (relative percent of the band) เมื่อนำไปคูณกับซีรัมโปรตีนทั้งหมดจะได้ผลลัพธ์เป็นค่าโปรตีนสัมบูรณ์ของแต่ละแถบ (absolute value of protein per band) ถ้าใช้ซีรัมโปรตีนของคนปกติเป็นมาตรฐานอ้างอิงซึ่งจะมีค่าเปอร์เซ็นต์การเทียบเคียงเฉลี่ยของแต่ละแถวดังนี้ อัลบูมิน 55.7 เปอร์เซ็นต์ อัลฟา 1-กลอบูลิน 3.1 เปอร์เซ็นต์ อัลฟา 2-กลอบูลิน 11.3 เปอร์เซ็นต์ เบต้า-กลอบูลิน 11.8 เปอร์เซ็นต์ และแกมมา-กลอบูลิน 18.1

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Kaneko *et al.*, 1997, Helena Laboratories, 1994) ค่าโปรตีนสัมบูรณ์เฉลี่ยของแต่ละแถบของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ตารางแสดงการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของซีรัมโปรตีนของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

ซีรัมโปรตีน	สุนัขพันธุ์ไทย	สุนัขพันธุ์ไทย	พิสัยค่าอ้างอิงปกติ (Warner <i>et al.</i> , 1994)
	หลังอาน	บางแก้ว	
โปรตีนทั้งหมด (g/dl)	6.51±0.05	6.56±0.05	6.0-7.6
อัลบูมิน (g/dl)	2.87±0.03	2.92±0.05	2.72-3.67
อัลฟา 1-กลอบูลิน (g/dl)	0.28±0.01	0.29±0.03	0.25-0.60
อัลฟา 2-กลอบูลิน (g/dl)	0.91±0.01	0.91±0.01	0.72-1.40
เบต้า 1-กลอบูลิน (g/dl)	0.98±0.01 ^a	0.84±0.01 ^b	0.63-0.89
เบต้า 2-กลอบูลิน (g/dl)	0.84±0.01 ^b	0.91±0.01 ^a	0.59-0.96
แกมมา-กลอบูลิน (g/dl)	0.61±0.01 ^b	0.68±0.01 ^a	0.49-0.83
อัตราส่วนระหว่าง A:G	0.79±0.01	0.81±0.02	0.79-1.02

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่มีอักษรตัวกำกับต่างกัน (a,b) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างพันธุ์สุนัขทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1998)

ค่าซีรัมโปรตีนรวมเฉลี่ยของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (6.51±0.05) และของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (6.56±0.05 กรัมต่อเดซิลิตร) โตเต็มวัย อยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ (6.0-7.6 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าซีรัมโปรตีนรวมเฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จตุพร และคณะ (2550) รายงานการศึกษาค่าซีรัมโปรตีนของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน พบว่าสุนัขในกลุ่มอายุไม่เกิน 1 ปี จำนวน 6 ตัว มีค่าซีรัมโปรตีนรวมต่ำกว่าสุนัขในกลุ่มอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไปแต่ไม่เกิน 6 ปี จำนวน 43 ตัว ค่าซีรัมโปรตีนรวมเฉลี่ย ทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากในสัตว์แรกเกิด ความเข้มข้นของพลาสมาโปรตีนและซีรัมโปรตีนจะต่ำ เมื่อลูกสัตว์ได้กินนมแม่เหลืองจึงมีค่าเพิ่มขึ้น และลดลงอีกครั้งเมื่ออายุ 1-5 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับปกติเมื่อสัตว์โตเต็มวัยอายุ 6-12 เดือน (เฉลี่ยว, 2548; จตุพร และคณะ, 2550; Duncan, 1994) แต่จากการศึกษาค่าซีรัมโปรตีน ของสุนัขพันธุ์ เกรย์ฮาวด์ที่ไม่ได้ใช้ในการแข่งขัน (retired racing) จำนวน 28 ตัว อายุ 2-9 ปี พบว่าค่าซีรัมโปรตีนรวม (5.56±0.39 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าอัลฟา 1-

กลอบูลิน (0.33 ± 0.05 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าอัลฟา 2-กลอบูลิน (0.27 ± 0.10 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าเบต้า 1-กลอบูลิน (0.20 ± 0.06 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าเบต้า 2-กลอบูลิน (0.21 ± 0.07 กรัมต่อเดซิลิตร) ต่ำกว่า ค่าซีรัมโปรตีนรวม (6.07 ± 0.45 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าอัลฟา 1-กลอบูลิน (0.46 ± 0.14 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าอัลฟา 2-กลอบูลิน (0.47 ± 0.14 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าเบต้า 1-กลอบูลิน (0.32 ± 0.12 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าเบต้า 2-กลอบูลิน (0.34 ± 0.09 กรัมต่อเดซิลิตร) ของสุนัขพันธุ์ผสม จำนวน 28 ตัว อายุ 1-9 ปี ส่วน ค่าอัลบูมิน (3.34 ± 0.25 กรัมต่อเดซิลิตร) และแกมมา-กลอบูลิน (1.23 ± 0.25 กรัมต่อเดซิลิตร) ของ สุนัขพันธุ์เกรย์ฮาวด์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติกับค่าอัลบูมิน (3.23 ± 0.33 กรัมต่อเดซิลิตร) และแกมมา-กลอบูลิน (1.23 ± 0.23 กรัมต่อเดซิลิตร) ของสุนัขพันธุ์ผสม (Fayos *et al.*, 2005) นอกจากนี้มีการศึกษาค่าซีรัมโปรตีนของสุนัขปกติไม่จำกัดอายุ เพศ และพันธุ์ จำนวน 26 ตัว โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ประกอบด้วย 6 แถบของ อัลบูมิน อัลฟา 1-กลอบูลิน อัลฟา 2-กลอบูลิน เบต้า 1-กลอบูลิน เบต้า 2-กลอบูลิน แกมมา-กลอบูลิน มีค่าซีรัมโปรตีนรวม (6.86 ± 0.55 กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าอัลบูมิน (3.23 ± 0.29 กรัมต่อเดซิลิตร) อัลฟา 1-กลอบูลิน (0.77 ± 0.15 กรัมต่อเดซิลิตร) อัลฟา 2-กลอบูลิน (0.55 ± 0.17 กรัมต่อเดซิลิตร) เบต้า 1-กลอบูลิน (0.88 ± 0.29 กรัมต่อเดซิลิตร) เบต้า 2-กลอบูลิน (0.76 ± 0.21 กรัมต่อเดซิลิตร) และแกมมา-กลอบูลิน (0.62 ± 0.19 กรัมต่อเดซิลิตร) ตามลำดับ (Abate *et al.*, 2000)

ค่าอัลบูมินเฉลี่ยของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (2.87 ± 0.03 กรัมต่อเดซิลิตร) และของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (2.92 ± 0.05 กรัมต่อเดซิลิตร) โตเต็มวัย อยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ ($2.72-3.67$ กรัมต่อเดซิลิตร) ซึ่งสอดคล้องจากภาพที่ 49 และ 50 ที่แสดงอิเล็กโตรโฟรีโทแกรมของอัลบูมินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจลควอนติตี้ วัน ได้พีคสูงสุด และค่าอัลบูมินเฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งค่าอัลบูมินที่ลดลงอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น ภาวะตับแข็ง (cirrhosis) การสูญเสียโปรตีนจากโรคของลำไส้ (protein-losing enteropathy) สภาวะทุพโภชนาจากการขาดอาหาร อย่างรุนแรง (severe starvation) เนื้องอก (neoplasia) และการสูญเสียไปทางไต (renal loss) (Warner *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

ค่าอัลฟา 1-กลอบูลินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (0.28 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) และของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (0.29 ± 0.03 กรัมต่อเดซิลิตร) โตเต็มวัย อยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ ($0.25-0.60$ กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าอัลฟา 1-กลอบูลินเฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งค่าอัลฟา 1-กลอบูลินที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น การเกิดการอักเสบ (inflammation) ทำให้ส่วนของ แอนตีทริปซิน (antitrypsin) สูงขึ้น การเกิดการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) มะเร็ง (malignant) และโรคข้ออักเสบซึ่งมีการกร่อนของเอ็นข้อต่อและกระดูกข้างเคียง (rheumatoid arthritis) ทำให้ส่วนของ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) สูงขึ้น มะเร็ง เซลล์ตับ (hepatoma) และพบได้ปกติในลูกสัตว์ แรกเกิด (newborns) ทำให้ส่วนของพีโต

โปรตีน (fetoprotein) สูงขึ้น ค่าอัลฟา 1-กลอบูลินที่ลดลงอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น กลุ่มอาการของโรคตับ (hepatic syndrome) ทำให้ส่วนของไลโปโปรตีน เอ (lipoprotein A) และกลอบูลินลดลง (Warner *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

ค่าอัลฟา 2-กลอบูลินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (0.91 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) และของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (0.91 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) โตเต็มวัย อยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ ($0.72-1.40$ กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าอัลฟา 2-กลอบูลินเฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งค่าอัลฟา 2-กลอบูลินที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น การเกิดการอักเสบทำให้ส่วนของไกลโคโปรตีน สูงขึ้น การเกิดการอักเสบและการอักเสบเรื้อรัง ทำให้ส่วนของแฮปโทกลอบิน (haptoglobin) สูงขึ้น มะเร็งทำให้ส่วนของเซอรูโลพลาสมีน (ceruloplasmin) สูงขึ้น กลุ่มอาการของโรคตับและโรคไต ทำให้ส่วนของแมกโครกลอบิน (macroglobin) สูงขึ้น โรคติดเชื้อราทางระบบ (systemic mycotic diseases) ทำให้ส่วนของโปรตีนไม่จำเพาะ (unspecified protein) สูงขึ้น ค่าอัลฟา 2-กลอบูลินที่ลดลงอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น การเกิดการอักเสบ มะเร็ง และกลุ่มอาการของโรคไต ทำให้ส่วนของทรานส์เฟอร์ริน (transferrin) ลดลง มะเร็งคาร์ซิโนมา (carcinoma) ทำให้ส่วนของไกลโคโปรตีนลดลง กลุ่มอาการของโรคตับ ทำให้ส่วนของ Gc กลอบูลินลดลง กลุ่มอาการของโรค ตับที่เป็นมาแต่กำเนิด โลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic anemia) และ hypohaptoglobulinemia ทำให้ส่วนของแฮปโทกลอบินลดลง (Warner *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

ค่าเบต้า 1-กลอบูลินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (0.98 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) และของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (0.84 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) โตเต็มวัย อยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ ($0.63-0.89$ กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าเบต้า 1-กลอบูลินเฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเบต้า 1-กลอบูลินที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากสาเหตุของ กลุ่มอาการของโรคไต ทำให้ส่วนของไลโปโปรตีน บี (lipoprotein B) สูงขึ้น ค่าเบต้า 1-กลอบูลินที่ลดลงอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น โรคแพ้ภูมิตัวเอง (autoimmune disease) และลูปัส อิริทิมาโตซัส ที่วรั้ง (systemic lupus erythematosus) ทำให้ส่วนของ C1 C3 และ C4 ลดลง โลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงแตก ทำให้ส่วนของฮีโมเพกซิน (hemopexin) ลดลง โรคเลือดไร้บีตาไลโปโปรตีน (abetalipoproteinemia) ที่เป็นแต่กำเนิดทำให้ส่วนของไลโปโปรตีน บี ลดลง (Warner *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

ค่าเบต้า 2-กลอบูลินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (0.84 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) และของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (0.91 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) โตเต็มวัย อยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ ค่าเบต้า 2-กลอบูลินเฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเบต้า 2-กลอบูลินที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น การเกิดการอักเสบแบบ เฉียบพลัน ทำให้ส่วนของ ซี-รีแอคทีฟ โปรตีน (C-reactive protein) สูงขึ้น กลุ่มอาการของโรคตับ และ มะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีโลมา

(myeloma) ทำให้ส่วนของ IgM IgA สูงขึ้น โรคติดเชื้อทางระบบ และการสูญเสียโปรตีนจากโรคของลำไส้ ทำให้ส่วนของโปรตีนไม่จำเพาะ สูงขึ้น (Warner *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

ค่าแกมมา-กลอบูลินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (0.61 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) และของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (0.68 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร) โตเต็มวัย อยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ ($0.49-0.83$ กรัมต่อเดซิลิตร) ค่าแกมมา-กลอบูลินเฉลี่ย ทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าแกมมา-กลอบูลินที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น การเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน ทำให้ส่วนของซี-รีแอคทีฟโปรตีนสูงขึ้น กลุ่มอาการของโรคตับ การติดเชื้อเรื้อรังหรือรุนแรง และ มะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีโลมา ทำให้ส่วนของอิมมูโนกลอบูลินสูงขึ้น ค่าแกมมา-กลอบูลินที่ลดลงอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น ภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunodeficiency) การกดระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) แกมมา-กลอบูลิน ในกระแสเลือดต่ำ (hypogammaglobulinemia) และถูกสัตว์แรกคลอดที่ยังไม่ได้รับนมแม่เหลือง ทำให้ส่วนของอิมมูโนกลอบูลินลดลง (Warner *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

อัตราส่วนระหว่างอัลบูมินและกลอบูลิน (A:G ratio) ในซีรัมของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน (0.79 ± 0.01) และของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว (0.81 ± 0.02) โตเต็มวัย อยู่ในช่วงพิสัยค่าอ้างอิงปกติ ($0.79-1.02$) อัตราส่วนระหว่างอัลบูมินและกลอบูลิน เฉลี่ย ทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รูปแบบอัตราส่วนระหว่างอัลบูมินและกลอบูลิน ปกติ (normal A:G) สามารถพบได้ 2 กรณี คือ 1. ค่าโปรตีนในเลือดสูง (hyperproteinemia) พบได้ในกรณี การสูญเสีย น้ำของร่างกายที่ไม่ทำให้อัตราส่วนระหว่างอัลบูมินและกลอบูลิน เปลี่ยนแปลง จากกรณีนี้ทำให้ส่วนของโปรตีนทั้งหมดรวมทั้งอัลบูมินเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีเฉพาะน้ำเท่านั้นที่ออกจากร่างกาย 2. ค่าโปรตีนในเลือดต่ำ (hypoproteinemia) พบได้ในกรณีภาวะร่างกายมีน้ำเกินจากการได้รับสารน้ำหรือการดื่มน้ำมากเกินไปทำให้เจือจางลง นอกจากนี้การเสียเลือดเฉียบพลัน (acute blood loss) ทำให้เกิดการสูญเสียของเหลวภายในเซลล์อย่างรวดเร็วเข้าไปในพลาสมาหรือมีการกระหายน้ำทำให้ดื่มน้ำมากขึ้นทำให้เจือจางลง ในทำนองเดียวกันการเสียพลาสมาเฉียบพลัน (acute plasma loss) ทั้งภายในและภายนอกทำให้เกิด มีของเหลว(exudate) หรือ การไหลออกสู่เนื้อเยื่อโดยรอบ(extravasation) ทำให้ค่าโปรตีนในเลือดต่ำ เนื่องจากการเคลื่อนที่ของน้ำภายใน เข้าสู่พลาสมาอย่างรวดเร็วเพื่อแทนที่น้ำที่สูญเสียไป (Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

รูปแบบซีรัมโปรตีนใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงในชีวเคมีคลินิก เป็นวิธีที่นิยมใช้ในทางคลินิก การแพทย์ ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบซีรัม โปรตีนที่บ่งชี้ความสัมพันธ์กับโรคต่างๆได้ ถึงแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเพียงเล็กน้อยในการพิจารณาวินิจฉัยโรคที่จำเพาะ แต่มีประโยชน์ใน การเฝ้าระวังและ พยากรณ์ความผิดปกติของโรค การวินิจฉัยแยกโรค

ความผิดปกติต่างๆของร่างกาย ร่วมกับการตรวจอาการทางคลินิก และผลจากห้องปฏิบัติการอื่นๆ เพื่อประกอบการวินิจฉัยโรค (Warner *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

การวิเคราะห์ ความผิดปกติของ ซีรัม อิเล็กโตรโฟรีซิส ควรพิจารณา ด้วยความรอบคอบ เนื่องจากมีอิทธิพล ที่ไม่เกี่ยวกับโรคเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้น ควรคำนึงถึง การเปลี่ยนแปลงทาง สรีรวิทยาที่ปกติของแต่ละตัวมาพิจารณาร่วมด้วย เพราะอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ ซีรัมอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ เช่น 1. อิทธิพลของอายุ (age) ช่วงการพัฒนา (developmental stage) และ พันธุ์ (breed) พบว่าในระยะตัวอ่อนความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนรวม และอัลบูมินเพิ่มสูงขึ้น แต่มีการเปลี่ยนแปลงของกลอบูลินเล็กน้อยและอาจไม่พบแกมมา -กลอบูลิน แต่ ในลูกวัว สามารถพบ แกมมา-กลอบูลินประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ในซีรัมที่ผ่านมาทางรกได้ โดยในช่วงแรกที่ลูกวัวยังไม่ได้รับนม น้ำเหลืองจะยังไม่มีแกมมา-กลอบูลิน แต่หลังจากลูกวัวได้รับนม น้ำเหลืองภายในไม่กี่ชั่วโมง สามารถพบแกมมา-กลอบูลินในซีรัมได้และการดูดซึมมน้ำเหลืองจะต่อเนื่องจนกระทั่ง 48 ชั่วโมง หลังคลอดลูกวัวจะมีระดับอิมมูโนกลอบูลินสูงขึ้น ส่วนในลูกหมูหลังจากคลอดจนกระทั่งในช่วง 24 ชั่วโมง สามารถพบแกมมา -กลอบูลินจำนวนมากและจะลดลง 5 เปอร์เซ็นต์ในช่วง 4 สัปดาห์ ในลูกม้าตั้งแต่เกิดจนกระทั่งอายุ 12 เดือน พบมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของอัลบูมิน กลอบูลินและ ซีรัมโปรตีน รวม ในสัตว์ทุกชนิด เมื่ออายุมากขึ้น จะมีการเพิ่มขึ้นของ ซีรัมโปรตีน รวม การลดลง ของอัลบูมิน และเพิ่มขึ้นของกลอบูลิน จากนั้นเมื่ออายุมากขึ้น ซีรัมโปรตีนรวมจะลดลง ดังนั้นอายุ มีความสำคัญในการแปลผลของซีรัมอิเล็กโตรโฟรีซิส ในสุนัขพันธุ์เกรย์ฮาวด์พบว่ามีการอ้างอิง สำหรับพันธุ์นี้โดยเฉพาะ เนื่องจากสุนัขพันธุ์ เกรย์ฮาวด์ที่ร่างกายปกติจะมี ค่าโปรตีนในเลือดต่ำ เพราะมีค่า PCV และความหนืดของเลือด (blood viscosity) สูงกว่าสุนัขพันธุ์อื่น การที่ค่าโปรตีนใน เลือดต่ำเป็นกลไกการปรับตัวในการลด ความหนืดของซีรัมลงซึ่ง เป็นลักษณะ เฉพาะ ของสุนัข พันธุ์นี้ (Fayos *et al.*, 2005) จากการศึกษาโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมี คลินิก และค่าซีรัมโปรตีนในสุนัข เยอรมันเชพเพิร์ด จำนวน 10 ตัว เปรียบเทียบกับสุนัขในท้องถิ่น จำนวน 10 ตัว อายุระหว่าง 2½-4 ปี พบว่าพันธุ์ของสุนัขไม่มีผลต่อค่าโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีคลินิก และค่าซีรัมโปรตีนในสุนัขปกติ (Ariyibi *et al.*, 2002) 2. อิทธิพลของฮอร์โมน (hormone) และเพศ (sex) พบว่าเทสโตสเตอโรน (testosterone) และเอสโตรเจน (estrogen) เป็นอนาบอลิก (anabolic) ฮอร์โมนที่พบได้ในทุกสปีชีส์ การให้ไดเอทิลstilbestrol (diethylstilbestrol) เป็นสารเอสโตรเจนสังเคราะห์ ในวัวตัวผู้และไก่ มีผลในการเพิ่มขึ้นของซีรัมโปรตีนรวม การลดลงของอัลบูมิน และเพิ่มขึ้นของกลอบูลิน นอกจากนี้ โกรทฮอร์โมน (growth hormone) เป็นอนาบอลิกฮอร์โมนอีกชนิดหนึ่งที่ทำให้ผลในการเพิ่มขึ้นของ ซีรัมโปรตีนรวม การลดลงของอัลบูมิน และเพิ่มขึ้นของกลอบูลิน แต่ถ้าให้ไทร็อกซิน (thyroxine) ซึ่งเป็นแคตาบอลิก (catabolic) ฮอร์โมน มีผลในการลดลงของ ซีรัมโปรตีนรวม การให้กลูโคคอร์ติ คอยด์ (glucocorticoid) มีผลต่อซีรัมโปรตีน ไม่เด่นชัด เพียงแต่พบการลดลงเล็กน้อยในส่วน ของ แกมมา-กลอบูลิน ดังนั้นอิทธิพลของ ฮอร์โมน มีผลต่อซีรัมโปรตีนเล็กน้อย แต่มีอิทธิพลต่อการเพิ่ม น้ำหนักตัวหรือองค์ประกอบของร่างกายเด่นชัดมากกว่า 3. อิทธิพลของช่วงการตั้งท้อง (pregnancy)

และการให้น้ำนม (lactation) พบว่าในช่วงตั้งท้องอัลบูมินจะลดลงและกลอบูลินจะเพิ่มขึ้น ในแกะอัลบูมินจะลดลงถึงระดับต่ำสุดในช่วงกลางของการตั้งท้องและจะกลับมาใกล้ระดับปกติ ในช่วงใกล้ครบเวลาการตั้งท้อง ส่วนกลอบูลินและซีรัมโปรตีนรวมจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการตั้งท้อง ในวัวซีรัมโปรตีนรวม แกมมา 1-กลอบูลิน เบต้า 1-กลอบูลินจะเริ่มเพิ่มขึ้นในช่วง 2 เดือนก่อนครบเวลาการตั้งท้อง จนถึงระดับสูงสุดในช่วง 1 เดือนก่อนครบเวลาการตั้งท้อง และค่อยๆ ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อครบเวลาการตั้งท้อง ซึ่งอิมมูโนกลอบูลินจะออกจากพลาสมาในช่วงเดือนสุดท้ายของการตั้งท้อง เนื่องจากมีการผลิตน้ำเหลืองในต่อมสร้างน้ำนมแล้ว ในช่วง การให้น้ำนมและการสร้างไขสัตว์อาจได้รับความเครียดจึงมีผลต่อการเก็บสำรองโปรตีน ทำให้เกิด เมแทบอลิซึมและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนคล้ายกับช่วงการตั้งท้อง 4. อิทธิพลของอาหาร (nutrition) มีผลต่อพลาสมาโปรตีนแต่การเปลี่ยนแปลงยากที่จะตรวจสอบและแปลผล จากการศึกษาความสัมพันธ์ ทางตรงระหว่างวิตามิน เอ และระดับอัลบูมินที่ต่ำ ในวัว พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการให้ แคลโรทีน (carotene) การขาดโปรตีนรุนแรงในอาหารเหนียวทำให้ ค่าโปรตีนในเลือดต่ำ และอัลบูมินต่ำในกระแสเลือด (hypoalbuminemia) พบในหนูแรท ไก่ และสุนัข ซึ่ง ในคน โรค ควาซิออร์ กอร์ (kwashiorkor) และ มาราสมีตัส (marasmus) เป็นโรคเกี่ยวกับการขาดโปรตีนและ แคลอรี (calorie) ในอาหารรุนแรง ทำให้พบลักษณะของโปรตีนต่ำในกระแสเลือด และอัลบูมินต่ำในกระแสเลือด การขาดโปรตีนในอาหารทำให้ลด การหมุนเวียนของอัลบูมินในหนู ส่วนอิมมูโนกลอบูลินมีผลเฉพาะในกรณีที่มีการจำกัดโปรตีนอย่างรุนแรงเท่านั้น และสามารถกลับมาเป็นปกติเมื่อมีการเสริมโปรตีนทดแทน. ความเครียดและการสูญเสียของเหลวในร่างกาย ความซึมเตจจากอุณหภูมิทั้งอุณหภูมิสูงจากการมีไข้ (febrile) และอุณหภูมิต่ำ (hypothermia) เกี่ยวข้องกับการสูญเสียในโตรเจนทำให้มีการเพิ่มขึ้นของการทำงานของต่อมหมวกไต (adrenal activity) และเพิ่มการหมุนเวียนของโปรตีน ดังนั้นความเครียดเป็นสาเหตุให้เกิดการลดลงของซีรัมโปรตีนรวม การลดลงของอัลบูมินและการเพิ่มขึ้นของอัลฟา 2-กลอบูลิน ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดบาดแผล กระดูกหัก และการผ่าตัด ทำให้เนื้อเยื่อเร่งซ่อมแซม มีการนำโปรตีนที่เก็บสะสมไว้มาใช้และเพิ่ม การหมุนเวียนของโปรตีนทำให้อัลบูมินลดลงและอัลฟา 2-กลอบูลินเพิ่มขึ้น เมื่อเกิดขบวนการอักเสบขึ้นจะมีของเหลวและโปรตีนเคลื่อนที่เข้าไปในเนื้อเยื่อทำให้เกิดการบวม (edema) และเกิดการลดลงของอัลบูมิน เมื่อเกิดเลือดออก (hemorrhage) และมีของเหลวมากร่วมกับการสูญเสียพลาสมาจำนวนมากทำให้เกิดการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วของเหลวภายในเข้าสู่ส่วนของพลาสมาจึงทำให้ค่าโปรตีนในเลือด ต่ำอย่างเฉียบพลัน แต่ถ้าเกิดภาวะเลือดขึ้นจากภาวะร่างกายขาดน้ำมีผลทำให้ค่าโปรตีนในเลือดสูง (Kaneko *et al.*, 1997, 2008)

จากการศึกษารูปแบบ ซีรัมโปรตีนในครั้งนี้เป็นประโยชน์ ในชีวิตคลินิกการแพทย์มีส่วนสำคัญในการวินิจฉัยโรคและ พยากรณ์ความผิดปกติของโรค เมื่อเกิดความผิดปกติของซีรัมโปรตีน จะบ่งชี้ถึงการ เกิดภาวะผิดปกติขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของซีรัมโปรตีนในส่วนต่างๆที่มีความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ รวมถึงการพัฒนาเทคนิคทางชีวเคมีเพื่อใช้เป็นเครื่องหมาย

โปรตีนในการจำแนกชนิดและปริมาณ โปรตีนที่มีผลต่อโรคต่าง ๆ เพื่อเฝ้าระวังและทำนายการเกิดโรคในอนาคตต่อไป



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินและรูปแบบ ของฮีรั่มโปรตีนในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว จำนวนพันธุ์ละ 30 ตัว สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

1. สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย 39.39 ± 1.23 เปอร์เซ็นต์ และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย 36.38 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์

2. สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน มีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ย 13.75 ± 0.47 กรัมต่อเดซิลิตร และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ย 13.10 ± 0.32 กรัมต่อเดซิลิตร

3. การศึกษา ด้วยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว แสดงฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์ประกอบด้วยโปรตีน 1 แถบเช่นเดียวกัน ให้ผลการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกเหมือนกัน โดยเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง Hb F และ Hb S ของคน แสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินของสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์มีประจุลบเหมือนกัน ทำให้มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกเหมือนกัน

4. การศึกษาด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะครีลาไมด์ เจล พบว่าฮีโมโกลบิน ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน แสดงฮีโมโกลบิน ฟิโนไทป์ 1 ชนิด ประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดหลัก (84.37 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์) และชนิดรอง (15.63 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์) และฮีโมโกลบิน ของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว แสดงฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ 1 ชนิด เช่น เดียว กันประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดหลัก (93.93 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์) และชนิดรอง (6.07 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์) ฮีโมโกลบินของสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลักษณะฟิโนไทป์แบบเดี่ยวและอยู่ใกล้กับขั้วลบมากกว่าขั้วบวก โดยเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกเหมือนกับวิธีเซลลูโลสอะซีเตต

5. การศึกษาด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรฟีเรซิสคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 เกรดละเอียด พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน และสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เท่ากับ 64,000 ดาลตัน และ 65,956 ดาลตัน ตามลำดับ

6. การศึกษาด้วยเทคนิคโพรตีโอมิกซ์ซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานมีจำนวน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ $13,637.5 \pm 229.65$ และ $15,087.5 \pm 52.81$ ดาลตัน ตามลำดับ และหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน สุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีจำนวน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ $13,030 \pm 75.93$ และ $15,115 \pm 314.89$ ดาลตัน ตามลำดับ

7. การศึกษาด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน ประกอบด้วย 5 พีค ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ที่ถูกต้อง เท่ากับ $15,216.84 \pm 8.25$ $15,969.62 \pm 8.46$ $31,785.13 \pm 206.44$ $47,955.10 \pm 240.39$ และ $63,486.75 \pm 389.42$ ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งรูปแบบมอโนเมอร์ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานมี น้ำหนักโมเลกุล ของสายอัลฟาเท่ากับ $15,216.84 \pm 8.25$ ดาลตัน และ สายเบต้าเท่ากับ $15,969.62 \pm 8.46$ ดาลตัน ส่วนรูปแบบไดเมอร์ ไตรเมอร์ และเตตระเมอร์ มี น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $31,785.13 \pm 206.44$ $47,955.10 \pm 240.39$ และ $63,486.75 \pm 389.42$ ดาลตัน ตามลำดับ ส่วนฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วประกอบด้วย 5 พีค ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ที่ถูกต้องเท่ากับ $15,230.11 \pm 15.96$ $15,980.23 \pm 16.67$ $31,752.16 \pm 194.91$ $48,018.41 \pm 303.74$ และ $63,728.82 \pm 488.21$ ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งรูปแบบ มอโนเมอร์ของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมี น้ำหนักโมเลกุล ของสายอัลฟาเท่ากับ $15,230.11 \pm 15.96$ ดาลตัน และสายเบต้าเท่ากับ $15,980.23 \pm 16.67$ ดาลตัน ส่วนรูปแบบไดเมอร์ ไตรเมอร์ และเตตระเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ $31,752.16 \pm 194.91$ $48,018.41 \pm 303.74$ และ $63,728.82 \pm 488.21$ ดาลตัน ตามลำดับ

8. การศึกษาด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าฮีโมโกลบินของ สุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว มีค่า pI ใกล้เคียงกัน โดยสุนัขทั้งสองสายพันธุ์มีค่า pI อยู่ระหว่าง 7.0-7.9

9. ชนิดของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิครีเวอร์ส-เฟส เอชพีแอลซี และหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี พบฮีโมโกลบิน ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน มีลักษณะ โครมาโทแกรมสองพีค ประกอบด้วยสายเบต้าและสายอัลฟา มีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 6.23

และ 9.72 นาที ตามลำดับ และฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้วมีลักษณะโครมาโทแกรมสองพีคประกอบด้วยสายเบต้าและสายอัลฟามีรีเทนชันไทม์เท่ากับ 6.23 และ 9.72 นาที ตามลำดับ

10. การศึกษา ลำดับ กรดอะมิโนของสายกลอบินของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ จากวิธี โซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบคิสคอนทินูอัสเจล โดยเทคนิค นาโนอิเล็กโตรสเปรย์ ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมตรี พบลำดับกรดอะมิโนของฮีโมโกลบินของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วยสายอัลฟา 141 หน่วย และสายเบต้า 146 หน่วย

11. การศึกษารูปแบบซีรัม โปรตีนด้วยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ของสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ประกอบด้วย 6 แถบของ อัลบูมิน อัลฟา1-กลอบูลิน อัลฟา2-กลอบูลินเบต้า1-กลอบูลินเบต้า2-กลอบูลินและแกมมา-กลอบูลิน

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาคุนสมบัติความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินต่อไป
2. ความรู้ที่ได้ไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาใช้ฮีโมโกลบินเป็นสารทดแทนเลือด (blood substitute) เพื่อใช้ในทางสัตวแพทย์
3. ความรู้ที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาเพิ่มเติมในการพัฒนาใช้ฮีโมโกลบินเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial peptide) ในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องจากฮีโมโกลบินมีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (endogenous bioactive peptides) อีกด้วย
4. สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาซีรัมโปรตีนเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาเพิ่มเติมในการวินิจฉัยโรคต่างๆร่วมกับศึกษารายละเอียดชนิดและปริมาณของโปรตีนในแต่ละส่วนที่มีผลต่อโรคนั้นต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกรียงไกร ทองสาร. 2548. คุณสมบัติทางชีวเคมีของอีโมโกลบินของปลาไนล (*Oreochromis niloticus*) ที่เกี่ยวข้องกับความสดของปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คมสัน นามตะคุ. 2551. การศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของอีโมโกลบินในปลาดุก (*Clarias batrachus*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จตุพร หนูสุด, จันทร์จิรา ภวภูตานนท์, เกษกนก ศิริินฤมิตร, พรรณจิตต์ นิลกำแหง, ชีระพล ศิริินฤมิตร, อาภัสสร ชูเทศะ, อุดเดช บุญประกอบ, ธราธร หรัยเจริญ, รวิศรา แสงทรัพย์, วรนาถ โรจน์เอกจิตต์ และ เสลภูมิ ไพบเราะ. 2550. ค่าโลหิตวิทยาและซีรัมโปรตีนในสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน, น. 557-562. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาสัตวแพทย์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จันทร์จิรา ภวภูตานนท์, เกษกนก ศิริินฤมิตร, มังกร คำยัง, กวิน วงษ์หงส์, คงศักดิ์ เทียงธรรม, กาวิน นันท์กลาง, จุฑามาส รัตนคุณุประการ และ พิมล วรสิทธิ์. 2544. ค่าโลหิตวิทยาในลูกสุนัข, น. 598-601. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 (สาขาสัตวแพทย์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เฉลียว ศาลากิจ. 2548. โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ชวดี นพรัตน์, ละออง ทองคง, พเยาว์ อินทนาคม และ นवलดา นักรำบัณฑิตย์. 2551. การเตรียมน้ำเลือดอย่างง่ายเพื่อใช้ทดสอบหาชนิดและปริมาณอีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้า. *สงขลา นครินทร์เวชสาร* 26 (3): 275-282.

ชุติมา ลิ้มมัทวาริทธิ์. 2548. การประยุกต์ใช้ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี. *ไทย ไบโชนิพนธ์* 2 (8): 1-14.

ทัศนาวรรณ แก้วสาคร, มงคล โชคยาภรณ์, นิชดา สุวรรณคง, กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, สุปราณี จิตรเพ็ชร และ ประมวล คีวสุวรรณ. 2546. ค่าปกติทางโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกในสุนัขโตเต็มวัยขนาดเล็ก กลาง ใหญ่. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร* 1: 39-45.

รัชชชัย ศรีวิบูลย์. 2551. *เทคนิคการแยก*. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

นันทวรรณ เนาวโรจน์. 2549. การศึกษาชนิดและคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟี อิเล็กโตรโฟรีซิสและสเปกโตรเมทรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บัณฑิตย์ สุริยพันธุ์. 2545. *หมาบางแก้ว*. สำนักพิมพ์บีบีบุ๊คส์ พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

บัวรอง ลีวนเฉลิมวงศ์. 2536. ระบบหายใจ, น. 197-201. ใน *เลี้ยงชัย ลีมน้อมวงศ์, บรรณาธิการ. สรีรวิทยา. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัลส์ พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.*

ปริญญานันท์ อำนวยวิเศษ, จินดา จันดาเรือง, ทัย กาบบัว และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2553. ฮีโมโกลบินจระเข้: การนำไปใช้ประโยชน์. *ว. วิทย. มข.* 38 (3): 303-312.

พิพัฒน์ เจริญชัย. 2536. ระบบไหลเวียนเลือด, น. 118-122. ใน *เลี้ยงชัย ลีมน้อมวงศ์, บรรณาธิการ. สรีรวิทยา. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัลส์ พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.*

แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภควดี สุทธิไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลี้ยวเรืองรัตน์, อูมาพร สุขม่วง และ วันเพ็ญ ช้อนแก้ว. 2553. *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. บริษัท ชวนพิมพ์ 50 จำกัด, กรุงเทพฯ.

เลี้ยงชัย ลีมน้อมวงศ์. 2536. *ปอดและการหายใจ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.

วิจิต สิงห์ทอง. 2540ก. *สุนัขบางแก้ว*. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท เลิฟแอนด์ลิฟเพรส จำกัด, กรุงเทพฯ.

_____. 2540ข. **สุนัขหลังอาน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท เลิฟแอนด์ลิฟเพรส จำกัด, กรุงเทพฯ.

ศุภสร วณิชเวชารุ่งเรือง และ ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์. 2553. **แมสสเปกโทรเมตรี**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. **โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน**. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุกัญญา สุนทรส. 2549. **อิเล็กโทรโฟรีซิส**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุนันท์ รังษิกายุจน์ส่อง. 2541. **คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC**. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุวิษ บุญโปร่ง, อภัสสรา ชูเทศะ, ชุศรี ศรีเพ็ญ และ ชาญวิทย์ วัชรพุกก์. 2548. ความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินฟิโนไทป์และซีรั่มโปรตีนกับการให้ผลผลิตของโคเนื้อในประเทศไทย, น. 279-287. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 (สาขาสัตว). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สันต์ นาคะสุวรรณ. 2545. **หมาไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, นนทบุรี.

อมรรัตน์ ศาสตร์วาทา, จตุพร หนูสุด, อนุสรณ์ กลิ่นขจร, เฉลิมพล เล็กเจริญสุข และ อภัสสรา ชูเทศะ. 2548. ความแตกต่างของซีรั่มโปรตีนและฮีโมโกลบินฟิโนไทป์ระหว่างสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์และสุนัขที่ป่วยเป็นโรค bebesiosis. วารสารสัตวแพทย์. 15 (2): 82-89.

อรพรรณ สังข์สัมฤทธิ์. 2546. การศึกษาฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางเคมีของฮีโมโกลบินโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภัสสรา ชูเทศะ. 2551. **ชีวเคมี**. ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภัสสรา ชูเทศะ. 2537. **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส**. สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพฯ.

- Abate, O., R. Zanattia, T. Malisono and U. Dotta. 2000. Canine serum protein patterns using high-resolution electrophoresis (HRE). **Vet. J.** 159: 154-160.
- Ariyibi, A.A., M.O. Oyeyemi and R.A. Ajadi. 2002. A comparative study of some hematology and biochemical parameters of clinically healthy Alsatian and local dogs. **Afr. J. Biomed. Res.** 5: 145-147.
- Adamczyk, M. and J.C. Gebler. 1997. Electrospray mass spectrometry of α and β chains of selected hemoglobins and their TNBA and TNB conjugates. **Bioconjug. Chem.** 8: 400-406.
- Akinyemi, M.O. and A.E. Salako. 2010. Hemoglobin polymorphism and morphometrical correlates in the west African dwarf sheep of nigeria. **Int. J. Morphol.** 28 (1): 205-208.
- 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 *Bubalus bubalis* in Northern Australia. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** 56 (5): 623-629.
- 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.
- Berg, J.M., J.L. Tymoczko and L. Stryer. 2002. **Biochemistry.** 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A..
- Bio-Medical Laboratories. 2000. **Cyanmethemoglobin.** B.M. Lab. Limited Partnership. Thailand.
- Boonprong, S., A. Choothesa, C. Sribhen, N. Parvizi and C. Vajrabukka. 2007. Relationship between haemoglobin types and productivity of Thai indigenous and Simmental \times Brahman crossbred cattle. **Livest. Sci.** 111: 213-217.

- Boonyarat, D. 1977. **Hemoglobin Thailand: Structure Characterization and Oxyhemoglobin Dissociation Studies**. M.Sc. Thesis, Mahidol University.
- Boron, W.F. and E.L. Boulpaep. 2003. **Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach**. Philadelphia, Pennsylvania.
- Braend, M. 1988. Hemoglobin polymorphism in the domestic dog. **J. Hered.** 79: 211-212.
- Brimhall, B., M. Duerst and R.T. Jones. 1977. The amino acid sequence of dog (*Canis familiaris*) hemoglobin. **J. Mol. Evo.** 9: 231-235.
- Brown, B.A. 1993. **Hematology: Principles and Procedures**. 6th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Brunk, R.R. 1969. Standard values in the Beagle dog: Haematology and clinical chemistry. **Fd. Cosmet. Toxicol.** 7: 141-148.
- Bunn, H.F. 1993. Human hemoglobins, pp. 698-731. *In* D.G. Nathan and F.A. Oski., eds. **Hematology of Infancy and Childhood**. 4th ed. WB Saunders, Philadelphia, U.S.A..
- Cigremis, Y., A. Omer, E. Kenan, M. Gaffaroglu, Y. Turkoz and S. Yilmaz. 2008. Comparative analysis of human and porcupine (*Hystrix cristata* L., 1758) haemoglobins. **G.U. J. Sci.** 21 (4): 113-115.
- Cunningham, J.G. and B.G. Klein. 2007. **Textbook of Veterinary Physiology**. 4th ed. Saunders, Elsevier, China.
- 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): 887-892.

- Dimitrijevic, V., S. Jovanovic, M. Savic and T. Ruzica. 2005. Genetic polymorphism of blood proteins in Yugoslav shepherd dog. **Acta Veterinaria (Beograd)** 55 (5-6): 357-365.
- _____, S. Jovanovic, M. Savic and T. Ruzica. 2007. Efficiency of blood protein systems as genetic markers for parentage verification in Yugoslav shepherd dog. **Acta Veterinaria (Beograd)** 57 (1): 81-86.
- Drabik, A., M. Noga, M. Macht and J. Silberring. 2008. Protein identification by mass spectrometry, pp. 123-141. *In* A. Kraj and J. Silberring, eds. **Proteomics: Introduction to Methods and Applications**. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Dresler, S.L., B. Brimhall and R.T. Jones. 1976a. Multiple structural genes for the alpha chain of canine (*Canis familiaris*) hemoglobin. **Biochem. Genet.** 14: 1065-1070.
- _____, D. Runkel, P. Stenzel, B. Brimhall and R.T. Jones. 1976b. Multiplicity of the hemoglobin α chains in dogs and variations among related species, pp. 411-415. *In* Conference on "Hemoglobins: Comparative molecular biology models for the study of disease" **Proceeding by the Annals New York Academy of Sciences**. Silver Spring, Maryland.
- Duffy, L.K., C.T. Genaux and G.L. Florant. 1986. A reinvestigation of haemoglobin alterations in ground squirrels while in various hibernation activity states. **Comp. Biochem. Physiol.** 83: 797-800.
- Duncan, J.R., K.W. Prasse and E.A. Mahaffey. 1994. **Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology**. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames.
- Erdogan, M. and C. Ozbeyaz. 2004. Investigation of blood protein polymorphism and estimation of genetic distances in some dog breeds in Turkey. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 28: 583-590.

- Esharatkah, B., S. Safi, Z. Khaki, P.K. Nia and M. Sadaghian. 2007. Study on haemoglobin polymorphism in two breeds of Iranian sheep. **J. Anim. Vet.** 6 (12): 1426-1428.
- Espinoza, E.O., M.A. Kirms and M.S. Filipek. 1996. Identification and quantitation of source from hemoglobin of blood and blood mixtures by high performance liquid chromatography. **J. Forensic Sci.** 41 (5): 804-811.
- Fago, A., V. Carratore, G.D. Prisco, R.J. Feuerlein, L. Sottrup-Jensen and R.E. Weber. 1995. The cathodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*: Amino acid sequence and oxygen equilibria of a reverse bohr effect hemoglobin with high oxygen affinity and high phosphate sensitivity. **J. Biol. Chem.** 270(32): 18879-18902.
- Falk, T.M., E.K. Abban, W. Villwork and L. Renwranz. 1998. Hemoglobin variations in some tilapiine species (Teleostei, Cichlidae) of the genera *Oreochromis* and *Sarotherodon*, pp. 147-152. **Genetics and Aquaculture in Africa, Actes de Colloque Genetique et Aquaculture en Afrique, 1-4 April 1998**. Abidjan, Cote d' Ivoire.
- Fayos, M., C.G. Couto, M.C. Iazbik and M.L. Wellman. 2005. Serum protein electrophoresis in retired racing Greyhounds. **Vet. Clin. Pathol.** 34 (4): 397-400.
- Feldman, B.F., J.G. Zinkl and N.C. Jain. 2000. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Canada.
- 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 reexamination of $\alpha 1$ and $\alpha 3$ globin chain sequences. **Comp. Biochem. Physiol.** 105 (3-4): 573-578.
- _____, 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.

Francis, J. and D.A. Little. 1964. Resistance of droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. **Aust. Vet. J.** 40: 247.

Gornall, A.G., C.J. Bardawill and M.M. David. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.** 177: 751-766.

Guyton, A.C. and J.E. Hall. 1996. **Textbook of Medical Physiology**. 8th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, U.S.A..

_____. 2011. **Textbook of Medical Physiology**. 12th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, U.S.A..

Helena Laboratories, U.S.A. 1994. **Serum Protein Electrophoresis Procedure**. Instruction manual.

_____. 2001. **Hemoglobin Electrophoresis Procedure**. Instruction manual.

Henning, S., M. Mormann, J. Peter-Katalinic and G. Pohlentz. 2010. Direct analysis of α - and β -chains of hemoglobins from mammalian blood samples by nanoESI mass spectrometry during in-capillary proteolytic digestion. **Amino Acids**. 10: 671-677.

Horton, H.R., L.A. Moran, R.S. Ochs, J.D. Rawn and K.G. Scrimgeour. 2002. **Textbook of Principle of Biochemistry**. 3rd ed. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, U.S.A..

Jain, N.C. 1986. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A..

_____. 1993. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A..

Kamp, R.M., D. Kyriakidis and T. Choli-paradopoulos. 2000. **Proteome and Protein Analysis**. Springer, Verlag Berlin, Heidelberg.

Kaneko, J.J., J.W. Harvey and M.L. Bruss. 1997. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. San Diego, Calif: Academic Press.

_____. 2008. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Amsterdam, Elsevier.

Kiral, F.K., K. Seyrek, S. Pasa, H. Ertabaklar and C. Unsal. 2004. Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral Leishmaniasis. **Revue. Med. Vet.** 155 (4): 226-229.

Khazraiiina, P., A. Rostami, H.R. Haddadzadeh and S.M. Nassiri. 2008. Hematological characteristics and hemoglobin typing of the Persian squirrel (*Sciurus anomalus*). **J. Exot. Pet Med.** 17 (1): 44-48.

Kraj, A. and M. Macht. 2008. Introduction to protein and peptide mass spectrometry: matrix-assisted laser desorption/ionization, pp. 89-99. In A. Kraj and J. Silberring, eds. **Proteomics: Introduction to Methods and Applications**. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

Lecrone, C.N. 1970. Absence of special fetal hemoglobin in Beagle dogs. **Blood** 35 (4): 451-452.

Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993. **Principles of Biochemistry**. Worth Pub, New York, U.S.A..

Lincoln, D.R., D.T. Edmunds, T.J. Gribble and H.C. Schwartz. 1973. Studies on the hemoglobins of pinnipeds. **Blood** 41 (1): 163-170.

- Maisar, P. 1970. On hemoglobin-XXVI. Hemoglobin of hedgehog (*Erinaceus romanicus*), I. **Comp. Biochem. Physiol.** 33: 697-703.
- Martin, J.P., H.J. Fyhn, U.E.H. Fyhn, R.L. Garlick, R.W. Noble and D.A. Powers. 1979a. The hemoglobins of pseudodoras, a South American catfish: Isolation, characterization and ligand binding studies. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 207-212.
- _____, J. Bonaventura, M. Brunori, H.J. Fyhn, U.E.H. Fyhn, R.L. Garlick, D.A. Powers and M.T. Wilson. 1979b. The isolation and characterization of the hemoglobin components of *Mylossoma spp.*, an mazonian teleost. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 155-162.
- Mohri, M. 2000. Electrophoretic study of haemoglobin polymorphism in one-humped camel (*Camelus dromedarius*). **Comp. Haematol. Int.** 10: 187-189.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes and V.W. Rodwell. 1996. **Harper's Biochemistry.** 24th ed. Simon & Schuster, U.S.A..
- Naik, S.N., D.E. Anderson, J.H. Jardine and D.H. Clifford. 1971. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency, haptoglobin and hemoglobin variants in dogs. **Anim. Blood Groups Bi.** 2 (2): 89-94.
- Nakamoto, W. and P.E. Mochado. 1986. Characterization of the hemoglobins and globins of *Synbranchus marmoratus* bloch, 1795 (Pisces, Synbranchidae). **Comp. Biochem. Physiol. B.** 84 (3): 383-386.
- Nazifi, S. and A. Rategh. 2005. Haemoglobin types and blood concentrations of haemoglobin, copper, ceruloplasmin and iron in adult Caspian miniature horses **Revue. Med. Vet.** 1: 50-52.

_____, M. Saeb and A. Alizadeh. 2000. Studies on the relationship between haemoglobin types of adult dromedary camels and the concentrations of haemoglobin, copper, ceruloplasmin and iron. **Comp. Haematol. Int.** 10: 122-125.

_____, _____ and A. Khoshvaghti. 2003. Studies on the relationship between haemoglobin types of adult Turkoman horses and the concentrations of haemoglobin, copper, ceruloplasmin and iron. **Comp. Clin. Path.** 12: 53-56.

Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2008. **Principle of Biochemistry.** 5rd ed. W.H. Freeman, New York.

Pekins, D.N., D.J.C. Pappin, D.M. Creasy and J.S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence database using mass spectrometry data. **Electrophoresis.** 20: 3551-3567.

Perry, S.F. and B. Tuffs. 1998. **Fish Respiration.** Academic Press, Sandiaco, California.

Perutz, M.F. 1986. Hemoglobin structure, pp. 13-35. *In* H.F. Bunn and B.G. Forget., eds. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects.** WB Saunders. Philadelphia.

_____ and K. Imai. 1980. Regulation of oxygen affinity of mammalian haemoglobins. **J. Mol. Biol.** 136: 183-191.

_____, M.G. Rossmann, A.F. Cullis, H. Muirhead, G. Will and A.C.T. North. 1960. Structure of haemoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 ⁰Å resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature** 185: 416-422.

Petruzzelli, R., G. Aurelli, A. Lania, A. Galtieri, A. Desideri and B. Giardinias. 1996. Diving behavior and haemoglobin function: The primary structure of the α - and β - chains of the sea turtle (*Caretta caretta*) and its functional implications. **Biochem. J.** 316: 959-965.

Piras, A.M., A. Dessy, F. Chiellini, E. Chiellini, C. Farina, M. Ramelli and E.D. Valle. 2008.

Polymeric nanoparticles for hemoglobin-based oxygen carriers. **Biochimica. et.**

Biophysica. Acta. 1784: 1454-1461.

Prisco, G.D., B. Giardina and R.E. Weber. 2000. **Hemoglobin Function in Vertebrates:**

Molecular Adaptation in Extreme and Temperate Environments. Springer, Verlag

Italia, Milano.

Reed, S. 2009. **Essential Physiological Biochemistry: An Organ-Based Approach.** John

Wiley & Sons, UK.

Ritter, P. 1996. **Biochemistry: A Foundation.** Brooks/COLE Publishing Company, Pacific

Grove, U.S.A..

Rocco, R.M. 2005. Joachim Kohn (1912-1987) and the origin of cellulose acetate

electrophoresis. **Clin. Chem.** 51 (10): 1896-1901.

Rodak, B.F., G.A. Fritsma and K. Doig. 2007. **Hematology: Clinical Principles and**

Applications. 3rd ed. Saunders, Elsevier.

Runkel, D., S.L. Dresler, B. Brimhall and R.T. Jones. 1974. The tryptic peptides of coyote

(*Canis latrans*) hemoglobin. **Biochem Gen.** 12 (6): 467-473.

Salako, A.E., T.O. Ijadunola and Y.O. Agbesola. 2007. Hemoglobin polymorphism in Nigerian

indigenous small ruminant populations-preliminary investigation. **Afr. J. Biotechnol.** 6

(22): 2636-2638.

Scaloni, A., E. Pieragostini, A. Malorni, L. Ferrara and A.D. Luccia. 1998. Bovine hemoglobin

α -globin chain polymorphism: Primary structure determination of two new genetic

variants by mass spectrometry and amino acid sequencing. **Biochimie.** 80: 333-338.

- Sauer, J. and J.P. Harrington. 1988. Hemoglobins of the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Comp. Biochem. Physiol.** 91 A: 1090-1114.
- Schechter, A.N. 2008. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood** 112 (10): 3927-3938.
- 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.
- Shikawa, 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.
- Simonsen, V. 1976. Electrophoretic studies on the blood proteins of domestic dogs and other Canidae. **Hereditas** 82: 7-8.
- Sittivilai, R., C. Sribhen, S. Isariyodom, T. Songserm and A. Choothesa. 2004. A chromatographic and electrophoretic study of hemoglobin of domestic fowl. **Kasetsart Journal (Natural Science)** 38: 132-136.
- Southard, J.N., C.R. Jr. Berry and T.M. Farley. 1986. Multiple hemoglobins of the cutthroat trout (*Salmo ciarki*). **J. Exp. Zool.** 239 (1): 7-16.
- Sripanitan, R. 1983. **Structure Characterization of the Fourth Component of Hemoglobin Constant Spring.** M.Sc. Thesis, Mahidol University.
- Statistical Analysis Systems (SAS). 1998. **SAS Users Guide: Statistics.** Version 8. SAS Institute, Cary, North Caroline.
- Stryer, L. 1988. **Biochemistry.** 3rd ed. W.H. Freeman, New York.

- Tanabe, Y. 1990. Genetic relationships among dog breeds with special reference to Asian dog breeds studied by biochemical polymorphism of blood proteins. **Prog. Clin. Biol. Res.** 344: 619-637.
- _____, T. Omi and K. Ota. 1978. Genetic variants of hemoglobin in canine erythrocytes. **Anim. Blood Groups Biochem. Genet.** 9 (2): 79-83.
- Tamburrini, M., C. Verde, A. Olianas, B. Giardina, G.D. Prisco and M. Pellegrini. 2001. The hemoglobin system of the brown moray *Gymnothorax unicolor*: Structure function relationships. **Eur. J. Biochem.** 268: 4104-4111.
- Thrall, M.A., D.C. Baker, T.W. Campbell, D. Denicola, M.J. Fettman, E.D. Lassen, A. Rebar and G. Weiser. 2004. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.** Lippincott Williams & Wilkins, U.S.A..
- Troxler, H., F. Neuheiser, P. Kleinert, T. Kuster, C.W. Heizmann, R. Sack, P. Hunziker, T.J. Neuhaus, M. Schmid and H. Frischknecht. 2002. Detection of a novel variant human hemoglobin by electrospray ionization mass spectrometry. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 292: 1044-1047.
- Tvedten, H. 1989. The complete blood count and bone marrow examination: general comments and selected techniques, pp. 14-31. *In* M.D. Willard, H. Tvedten and G.H. Turnwald, eds. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods.** W.B. Saunders, Philadelphia, U.S.A..
- Vanderdon, T.L. and J.M. Colacino. 1989. Characterization of hemoglobin from *Phoronis architecta* (Phoronida). **Comp. Biochem. Physiol.** 94 (1): 31-39.
- Veenstra, T.D. 2006. Mass spectrometry, pp. 3-17. *In* T.D. Veenstra and J.R. Yates III, eds. **Proteomics for Biological Discovery.** John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.

- Vekey, K., A. Telekes and A. Vertes. 2008. **Medical Applications of Mass Spectrometry**. Elsevier. Amsterdam.
- Voet, D. and J.G. Voet. 2004. **Biochemistry**. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Wajcman, H. and J. Riou. 2009. Globin chain analysis: An important tool in phenotype study of hemoglobin disorders. **Clin. Biochem.** 42 (18): 1082-1086.
- Warner, L.L., G.H. Turnwald and O. Barta. 1994. Immunologic and plasma protein disorders, pp. 253-257. *In* M.D. Willard, H. Tvedten and G.H. Turnwald, eds. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Weber, R.E. 1982. Intraspecific adaptation of hemoglobin function in fish to oxygen availability, pp. 87-102. *In* A.D.F. Addink and N. Spronk, eds. **Exogenous and Endogenous Influences on Metabolic and Neural Control**. Pergamon Press, Oxford.
- _____. 2000a. Adaptations for oxygen transport: lessons from fish hemoglobin, pp. 61-69. *In* A. Olianas, M.T. Sanna, A. Fais, A. Pisano, S. Salvadori, A.M. Deiana, M. Corda and M. Pellegrini, eds. **Functional Properties of the Cathodic Hemoglobin Component from Two Species of Anguilliformes**. Springer, Verlag Italia, Milano.
- _____. 2000b. Adaptations for oxygen transport: lessons from fish hemoglobin, pp. 22-37. *In* G.D. Prisco, B. Giardina and R.E. Weber, eds. **Hemoglobin Function in Vertebrate: Molecular Adaptation in Extreme and Temperate Environments**. Springer, Verlag Italia, Milano.
- Weber, R.E., S. Hourdez, F. Knowles and F. Lallier. 2003. Hemoglobin function in deep-sea and hydrothermal-vent endemic fish: *Symenchelis parasitica* (Anguillidae) and *Thermarces cerberus* (Zoarcidae). **J. Exp. Biol.** 206: 2693-2702.

Wilkins, M.R., R.D. Appel, K.L. Williams and D.F. Hochstrasser. 2007. **Proteome Research Concepts, Technology and Application**. 3rd ed. Springer, Verlag Berlin, Heidelberg.

Whitford, D. 2005. **Proteins: Structure and Function**. Chichester, West Sussex: J. Wiley & Sons.

Whitaker, J.R. 1963. Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on sephadex. **Anal. Chem.** 35: 1950-1953.

Zanella-Cleon, I., M. Becchi, P. Lacan, P.C. Giordano, H. Wajcman and A. Francina. 2008. Detection of a thalassemia alpha-chain variant (hemoglobin Groene Hart) by reverse-phase liquid chromatography. **Clin. Chem.** 54: 1053-1059.

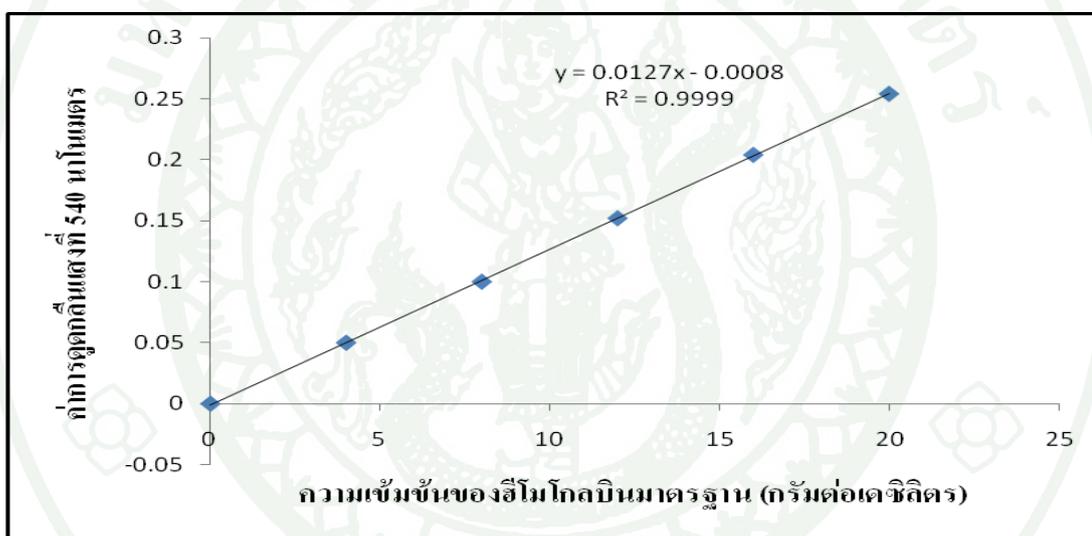
_____, P. Joly, M. Becchi and A. Francina. 2009. Phenotype determination of hemoglobinopathies by mass spectrometry. **Clin. Biochem.** 42 (18): 1807-1817.



ตารางผนวกที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน

(หน่วย: กรัมต่อเดซิลิตร)

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน
0.000	0.00
0.050	4.00
0.100	8.00
0.152	12.00
0.204	16.00
0.254	20.00



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน

จากสมการเส้นตรง $y = ax + b$ โดยที่

y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

a คือ ค่าความชัน

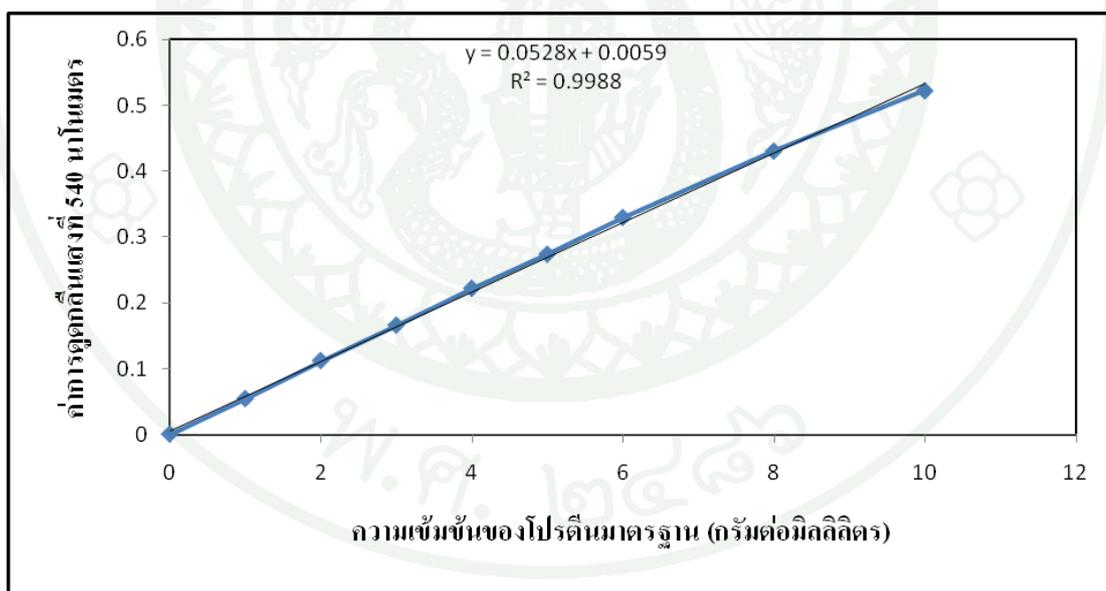
x คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายฮีโมโกลบิน

b คือ ค่าคงที่

ตารางผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

(หน่วย: กรัมต่อมิลลิเมตร)

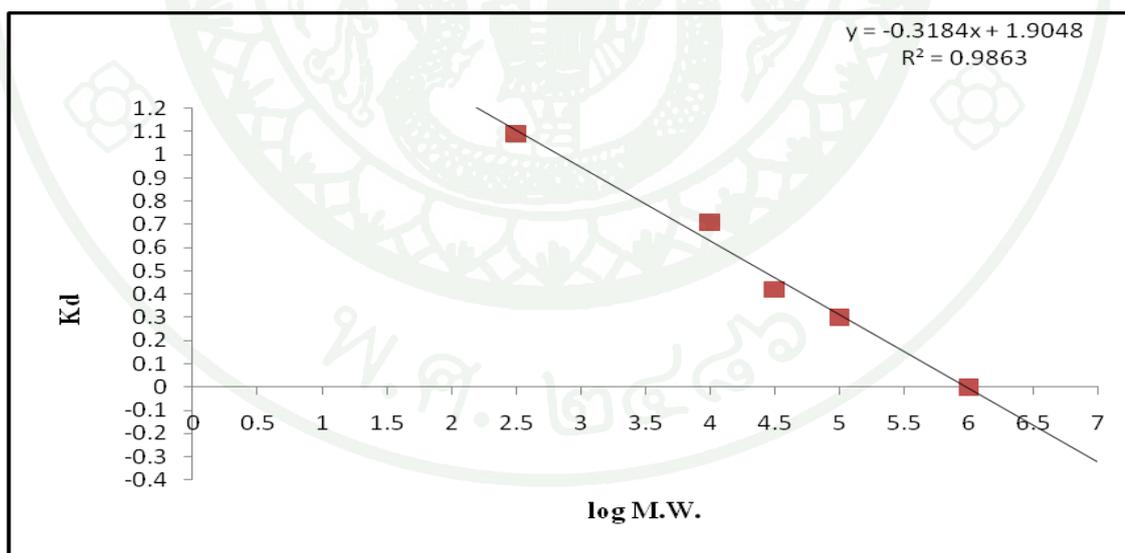
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน
0.000	0.00
0.054	1.00
0.112	2.00
0.166	3.00
0.222	4.00
0.274	5.00
0.330	6.00
0.431	8.00
0.523	10.00



ภาพผนวกที่ 2 กราฟโปรตีนมาตรฐานในการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายอีโมโกลบินและซีรัม

ตารางผนวกที่ 3 หลอดที่สารถูกชะออกมามากที่สุด ค่า Kd ค่า Log M.W. และค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและของฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอานและสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทรिसบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

สารละลาย	หลอดที่สารถูกชะออกมามากที่สุด	Kd	Log M.W.	M.W. (ดาลตัน)
บลูเดกซ์เทรน	22	0.00	6.30	2,000,000
ซีรัมอัลบูมินของโค	39	0.30	4.83	68,000
โอวัลบูมิน	46	0.42	4.65	45,000
ไซโตโครม ซี	62	0.71	4.09	12,384
ดีเอ็นพี-แอสปาร์เตด	84	1.00	2.48	299.20
ฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน	43	0.37	4.80	64,000
ฮีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว	42	0.35	4.81	64,565



ภาพผนวกที่ 3 กราฟแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทรिसบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

ภาคผนวกที่ 4 การเตรียมสารเคมีสำหรับการย่อยเจลด้วยทริปซิน

4.1 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต (FW 79.06) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ชั่งสาร แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต 79.6 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile milli Q water) ปรับ ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

4.2 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

4.3 10 มิลลิโมลาร์ ไดโซโอโทรดอล ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ชั่งสารไดโซโอโทรดอล (FW 154.25) 3.085 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร

4.4 100 มิลลิโมลาร์ ไอโอโคอะเซตาไมด์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ชั่งสารไอโอโคอะเซตาไมด์ (FW 184) 36.8 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร

4.5 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต เติม 100 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ลงใน 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต อัตราส่วน 1:1

4.6 20 นาโนกรัม ทริปซิน ใน 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต เติม 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 20 นาโนกรัม ทริปซิน จะได้ 20 นาโนกรัม ทริปซิน ใน 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต

4.7 30 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร

4.8 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กรดไตรฟลูออโรอะซิติก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม กรดไตรฟลูออโรอะซิติกเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 49.95 มิลลิลิตร

4.9 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อะซิโตนไนไตรล์ ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม 100 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตนไนไตรล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กรดฟอร์มิก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ 4 รูปลักษณะสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน



ภาพผนวกที่ 5 รูปลักษณะสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายจตุพร หนูสุด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	เกิดวันที่ 26 มกราคม พ.ศ. 2517
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลเด็ก ถ. ราชวิถี พญาไท กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	ศพ.บ. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บธ.บ. คณะบริหารธุรกิจ มหาวิทยาลัยรามคำแหง สบ. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช Certificate in clinical rhinoscopy and bronchoscopy course, Utrecht University, The Netherlands Certificate in companion animal practice and pathology course, Nippon Veterinary and Animal Science University, Japan
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ผลงานวิจัย - Hemoglobin phenotypes and serum protein patterns in Thai Ridgeback dogs using cellulose acetate electrophoresis, 1 st AVIMM, China, 2007 - รางวัล Merit Achievement จากเรื่อง Characterization of Hemoglobin in Thai Ridgeback Dogs, The 4 th AG- BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and University of Tsukuba-Kasetsart University Joint Seminar, 2010
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนโครงการพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ประจำปี 548 ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์