



วิทยานิพนธ์

การศึกษาเปรียบเทียบฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบิน
ในปลาดุก (*Clarias batrachus*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*)

THE COMPARISON STUDIES OF PHENOTYPES AND
BIOCHEMICAL PROPERTIES OF HEMOGLOBIN IN
WALKING CATFISH (*CLARIAS BATRACHUS*) AND
COMMON SILVER BARB (*PUNTIUS GONIONOTUS*)

นายคมสัน นามตะกู

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๑



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบิน
ในปลาดุก (*Clarias batrachus*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*)

The Comparison Studies of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin in
Walking Catfish (*Clarias batrachus*) and Common Silver Barb (*Puntius gonionotus*)

นามผู้วิจัย นายคมสัน นามตะกู

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รศ.ดร.ราชนา ชูเทศ, Dr.rer.nat.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุศรี ศรีเพ็ญ, Dr.sci.agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รศ.ดร.จารย์วันชัย วรวัฒนเมธิกุล, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รศ.ดร.จารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รศ.ดร.จารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในปลาดุก (*Clarias batrachus*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*)

The Comparison Studies of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin in Walking Catfish (*Clarias batrachus*) and Common Silver Barb (*Puntius gonionotus*)

โดย

นายคมสัน นามตะกู

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2551

คมสัน นามตะกู 2551: การศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของ
ฮิโมโกลบินในปลาดุก (*Clarias batrachus*) และปลาดะเพียน (*Puntius gonionotus*)
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
รองศาสตราจารย์อภัสสรฯ ชูเทศะ, Dr.rer.nat. 84 หน้า

การศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮิโมโกลบินในปลาดุก
(*Clarias batrachus*) และปลาดะเพียน (*Puntius gonionotus*) ชนิดละ 30 ตัวโดยอาศัยเทคนิคอิเล็ก
โตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต แบบหนึ่งที่ฟอลโอะครีลาไมด์เจลและเทคนิคไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง พบว่าฮิโมโกลบินของปลาดุกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า
ฮิโมโกลบินของปลาดะเพียน และเมื่อนำฮิโมโกลบินของปลาที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์
เซฟาเดกซ์ G-100 มาศึกษาโดยวิธีหนึ่งที่ฟอลโอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าทั้งปลาดุก
และปลาดะเพียนต่างมีฮิโมโกลบินฟิโนไทป์เพียงชนิดเดียว ฮิโมโกลบินของปลาดุกแสดง 2 แถบ
ที่ประกอบด้วยฮิโมโกลบินหลักร้อยละ 98 และฮิโมโกลบินรองร้อยละ 2 ขณะที่ฮิโมโกลบินของ
ปลาดะเพียนประกอบด้วยฮิโมโกลบินเพียงแถบเดียวเท่านั้น เมื่อใช้วิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพ
อลิโอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าหน่วยย่อยของฮิโมโกลบินของปลาดุกมีน้ำหนักโมเลกุล
15,260 คาลตันและ 14,740 คาลตัน และของปลาดะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 14,630 คาลตัน วิธี
แมสสเปกโตรเมทรีพบว่าฮิโมโกลบินของปลาดุกมีน้ำหนักโมเลกุล 63,460.678 คาลตัน ส่วนของ
ปลาดะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 63,634.812 คาลตัน วิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่า
ฮิโมโกลบินของปลาดุกและปลาดะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุล 63,096 คาลตัน และ 64,565 คาลตัน
ตามลำดับ ฮิโมโกลบินของปลาดุกและปลาดะเพียนมีค่า pI อยู่ในช่วง 5.5 – 8.0 และ 5.8 – 7.0
ตามลำดับ ปลาดุกมีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮิโมโกลบินเท่ากับ 8.17 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งมี
ค่าสูงกว่าปลาดะเพียนที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.83 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร แต่ในทางตรงกันข้าม พบว่า
ค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยของปลาดุกมีค่าเท่ากับ 30.17 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ซึ่งต่ำกว่า
ของปลาดะเพียนที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.45 ± 1.70 เปอร์เซ็นต์

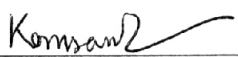
ลายมือชื่อนิสิต

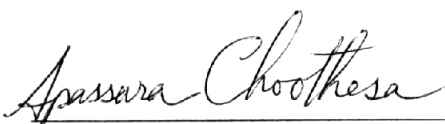
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

๑๑ / พ.ค. / ๕๑

Komsan Namtaku 2008: The Comparison Studies of Phenotypes and Biochemical Properties of Hemoglobin in Walking Catfish (*Clarias batrachus*) and Common Silver Barb (*Puntius gonionotus*). Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Apassara Choothesa, Dr.rer.nat. 84 pages.

The comparison studies of phenotypes and biochemical properties of hemoglobin in walking catfish (n=30) and common silver barb (n=30) were determined by cellulose acetate electrophoresis, native polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. The results showed that the hemoglobin of walking catfish moved toward the anode faster than those of the common silver barb. In addition, native polyacrylamide gel electrophoresis of purified solution (hemolysates purified by Sephadex G-100 column chromatography) showed one phenotype for each species. However, the purified hemoglobin from walking catfish revealed two migrating bands, major hemoglobin (98%) and minor hemoglobin (2%), whereas, that of the common silver barb contained only one band of hemoglobin. Molecular weights of globin chains of walking catfish hemoglobin were 15,260 daltons and 14,740 daltons while common silver barb hemoglobin showed 14,630 daltons. These data were determined by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Mass spectrometry showed results of the molecular weight of walking catfish hemoglobin, which had 63,460.678 daltons, whereas, common silver barb hemoglobin had 63,634.812 daltons. By using gel filtration column chromatography, the results revealed that molecular weights of walking catfish hemoglobin and common silver barb hemoglobin were 63,096 daltons and 64,565 daltons, respectively. The pI values of walking catfish hemoglobin and common silver barb hemoglobin showed the ranges between 5.5 – 8.0 and 5.8 – 7.0, respectively. Walking catfish showed the mean hemoglobin concentration value (8.17 ± 0.01 g/dl) higher than those of common silver barb (7.83 ± 0.01 g/dl). In contrast, we found that the percents of mean hematocrit value of walking catfish ($30.17 \pm 1.25\%$) lower than common silver barb ($39.45 \pm 1.70\%$).


Student's signature


Thesis Advisor's signature

21 ' May ' 08

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อาทิตย์สุนทร ชูเทศะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆและให้กำลังใจในการทำงานวิจัย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูศรี ศรีเพ็ญ และ รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย วรวัฒนเมธิกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิทยานิพนธ์ โดยงบประมาณของโครงการสหวิทยาการ โครงการย่อยบัณฑิตวิทยาลัยและการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุนบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ จากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และจากภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า และ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ค่าบางค่า ขอขอบพระคุณพี่ๆนักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ธุรการ ขอขอบพระคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นิสิตทุกท่านที่กรุณาช่วยเหลือในการทำวิจัยและให้กำลังใจเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อมนัส นามตะคุณ คุณแม่ธงปิก นามตะคุณ และขอขอบพระคุณ คุณพี่หฤดี นามตะคุณ คุณพี่จิรนนท์ นามตะคุณ ตลอดจนน้องๆ พี่ๆและญาติๆทุกคนที่คอยให้ความห่วงใยและเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คมสัน นามตะคุณ

มีนาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	30
ผลและวิจารณ์	50
สรุปและข้อเสนอแนะ	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเตรียมสารละลายอีโมโกลบินปลาตุกและปลาตะเพียน	32
2	การเตรียมสารละลายมาตรฐานอีโมโกลบิน	33
3	สูตรการเตรียมเจล	38
4	สูตรการเตรียมเจล	44
5	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยหรือค่า %PCV และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของอีโมโกลบินของปลาตุกและปลาตะเพียน	50
6	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินปลาตุกและปลาตะเพียนแบ่งตามวิธีการศึกษา	66
ตารางผนวกที่		
1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและความเข้มข้นของอีโมโกลบินมาตรฐาน	82
2	หลอดที่สารถูกชะออกมามากที่สุด ค่า Kd ค่า Log M.W. และค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและของอีโมโกลบินปลาตุกและปลาตะเพียน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที	83

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของฮีโมโกลบิน	6
2	Oxygen binding curve ของฮีโมโกลบินและไมโอโกลบิน	11
3	แสดงผลของ pH CO ₂ , 2,3-BPG และอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของกราฟเส้นโค้งของการจับกันของออกซิเจนและฮีโมโกลบิน	12
4	แสดงค่า pI ของฮีโมไลสเดปลา <i>G.unicolor</i> (เลนที่ 1) ฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติก(เลนที่ 2) ฮีโมโกลบินกลุ่มแอโนติก (เลนที่ 3) ด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง แอมโฟไลท์ pH 3.5 - 10.0 ฮีโมโกลบินได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิด DEAE – เซลลูโลส (DEAE- cellulose)	22
5	แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสเดของคน (เลนที่ 1) ปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 4) และปลาชุก (เลนที่ 3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่ pH 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)	52
6	แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสเดของคน (เลนที่ 1) และปลาชุก (เลนที่ 2 และ 3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่ pH 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)	53
7	แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสเดของคน (เลนที่ 1) ปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่ pH 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)	53
8	แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสเดของปลาชุก (เลนที่ 1 และ 3) และปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะครีลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่ pH 8.3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซึบลูอาร์ - 250	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	แสดงการเคลื่อนที่ของอีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของปลาตะเพียน (เลนที่ 1 และ 3) และปลาฉลาม (เลนที่ 2 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่ pH 8.3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซิบลูอาร์ - 250	55
10	แสดงการเคลื่อนที่ของอีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของปลาฉลาม (เลนที่ 1 และ 3) และ ปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (15% T 2.67% C ที่ pH 8.3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยซิลเวอร์ (silver staining)	56
11	แสดงผลการชะสารชนิดต่างๆ ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที	58
12	แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลอีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียน จากค่า Kd และ Log M.W. ของโปรตีนมาตรฐาน	59
13	แสดงผลน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของอีโมโกลบินของปลาฉลาม (เลนที่ 2 และ 4) และปลาตะเพียน (เลนที่ 3 และ 5) และเลนที่ 1 คือ broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ pH 8.3 ด้วย separating gel 18%T, 2.67%C stacking gel 4%T, 2.67%C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์ ต่อเจล 1 แผ่น เวลา 45 นาที)	61
14	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของอีโมโกลบินปลาฉลามโดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบMALDI – TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมินิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินปลาตะเพียนโดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมินิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	64
16	แสดงค่า pI ของฮีโมโกลบินปลาตุ๊กและปลาตะเพียน โดยวิธีไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง ด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) แอมโฟไลต์ pH 3-10 เลนที่ 1 และ 3 คือ ฮีโมไลสของปลาตะเพียนและปลาตุ๊ก เลนที่ 2 และ 4 คือฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนและปลาตุ๊กที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี และเลนที่ 5 คือ broad range standard pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)	68
ภาพผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน	82
2	กราฟแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและของฮีโมโกลบินปลาตุ๊กและปลาตะเพียน ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเฮกซ์ไนด์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที	83

การศึกษาเปรียบเทียบฟีโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในปลาดุก
(*Clarias batrachus*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*)

The Comparison Studies of Phenotypes and Biochemical Properties of
Hemoglobin in Walking Catfish (*Clarias batrachus*) and Common Silver Barb
(*Puntius gonionotus*)

คำนำ

ปลาเป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญแหล่งหนึ่งนอกเหนือจากเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ เนื้อปลามีไขมันต่ำและให้คุณค่าทางอาหารสูง ประกอบกับในปัจจุบันค่านิยมของผู้บริโภคในการรับประทานอาหารมีความใส่ใจในสุขภาพกันมากขึ้น จึงทำให้การบริโภคเนื้อปลาแทนเนื้อสัตว์เพิ่มมากขึ้น ทั้งปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม ปลาน้ำจืดที่เป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญในประเทศไทยมีหลายชนิด เช่น ปลานิล ปลาทับทิม ปลาตะเพียน และปลาดุก ฯลฯ ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาพแวดล้อมและการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลสารภายในร่างกาย ระบบที่น่าสนใจที่สุดระบบหนึ่งคือ ระบบการลำเลียงก๊าซออกซิเจน (O_2) ภายในเลือด โดยมีฮีโมโกลบินเป็นตัวขนส่ง O_2 ไปยังเซลล์ต่างๆทั่วร่างกาย ฮีโมโกลบิน (hemoglobin; Hb) มีกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) โดยมีการร่วมมือ (co-operativity) ระหว่างหน่วยย่อยในการจับกับ O_2 ทำให้สามารถจับกับ O_2 ได้สูงสุด ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่สำคัญในเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบินของปลาเหมือนสัตว์เลื้อยคลานคือนมคือ 1 โมเลกุล ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide chain) 4 สาย ที่เรียกว่าสายกลอบิน (globin chain) แต่ละสายจับกับฮีม (heme) 1 หน่วย ฮีโมโกลบินทำหน้าที่ขนส่ง O_2 จากเหงือกหรือปอดไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ และนำผลผลิตจากเมแทบอลิซึม (metabolic end-products) เช่น CO_2 และโปรตอน (proton) จากเนื้อเยื่อกลับสู่เหงือกหรือปอด การทำงานของฮีโมโกลบินถูกควบคุมด้วยไอออน (ionic effectors) หลายชนิด เช่น โปรตอนหรือ H^+ และแอนไอออนอนินทรีย์ (inorganic anions) นอกจากนี้ยังมีสารฟอสเฟตอินทรีย์ (organic phosphate) ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมความชอบต่อออกซิเจน (O_2 affinity) ในสัตว์เลื้อยคลานคือนม ได้แก่ 2,3 - บิสฟอสโฟกลีเซอเรต (2,3-bisphosphoglycerate; BPG) ในนก ได้แก่ อินซิทอลเพนตาฟอสเฟต (inositol pentaphosphate) และในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ต่ำกว่าได้แก่ อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate ; ATP) ในปลาบางชนิดนอกจาก ATP แล้วกวานิซีนไตรฟอสเฟต (guanosine triphosphate ; GTP) ยังมีผลควบคุมความชอบต่อ O_2 ด้วย (Prisco *et al.*, 2000)

คุณสมบัติของฮีโมโกลบินในแง่ความชอบต่อ O_2 คือ ฮีโมโกลบินที่มีความชอบต่อ O_2 สูงกว่าจะได้รับ O_2 จากสภาพแวดล้อมได้ง่ายกว่า แต่จะปล่อย O_2 ให้กับเซลล์ได้น้อยกว่า การที่ฮีโมโกลบินมีความชอบต่อ O_2 ที่สูงนี้ อาจเป็นกลไกที่ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มี O_2 ต่ำได้ (hypoxia) (Weber, 1982; Stryer, 1988; Sauer and Harrington, 1988)

ฮีโมโกลบินของปลาแตกต่างจากฮีโมโกลบินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ ฮีโมโกลบินปลามีหลายชนิด ปลาที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะมีฮีโมโกลบินที่ต่างกันและมีการทำงานที่ต่างกันด้วย ฮีโมโกลบินของปลาสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า คือ กลุ่มแอโนดิก (anodic) พบในปลาทุกสายพันธุ์และสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และกลุ่มแคโทดิก (cathodic) ซึ่งพบในปลาบางสายพันธุ์เท่านั้น ฮีโมโกลบินทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างทั้งโครงสร้างและการทำงานคือมีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างกัน กลุ่มแคโทดิก มีความชอบต่อออกซิเจนสูงกว่ากลุ่มแอโนดิก เพราะฉะนั้น กลุ่มแคโทดิก จึงทำหน้าที่เป็นตัวเก็บสำรอง O_2 และขนส่ง O_2 ภายใต้สภาวะที่มี O_2 ต่ำ (Prisco *et al.*, 2000) นอกจากนี้การเจริญเติบโตของปลา เช่น ปลา turbot และปลา cod ที่อุณหภูมิต่างๆ ขึ้นกับชนิดของฮีโมโกลบิน (Imsland *et al.*, 1997; Karpov and Novikov, 1980 and Mork *et al.*, 1984) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของฮีโมโกลบินภายในเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่มีคุณสมบัติทั้งโครงสร้างและหน้าที่ที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม และมีกลไกในการเปลี่ยนแปลงให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณของ O_2 ที่ต่างกัน เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการขนส่ง O_2 ในกระแสเลือด นอกจากนี้ความหลากหลายของฮีโมโกลบินยังไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาที่สภาพแวดล้อมที่ต่างกันด้วย

จากการตรวจเอกสารการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบิน โครงสร้าง คุณสมบัติในแง่ความชอบต่อ O_2 การทำงาน ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงาน รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฮีโมโกลบิน ความชอบต่อ O_2 และการเจริญเติบโตของปลาที่สภาพแวดล้อมต่างๆ พบว่ามีการศึกษาวิจัยในต่างประเทศอย่างกว้างขวางและดำเนินเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาดังกล่าวมากนักทั้งในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม ทำให้ขาดข้อมูลพื้นฐานต่างๆ ที่สำคัญของฮีโมโกลบินปลา เช่น ฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินของปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เช่น ปลาดุกและปลาดูแป้น สภาพแวดล้อมในการดำรงชีวิตของปลาน้ำจืดทั้ง 2 ชนิดที่ต่างกันจะส่งผลให้ฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินแตกต่างกันหรือไม่ เหตุใดปลาดุกจึงสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีปริมาณ O_2 ต่ำได้โดยไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิต ซึ่งข้อมูลการศึกษาดังกล่าวนี้อาจเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ในการอธิบายกลไกทางชีวเคมีและทางสรีรวิทยาในการทำงานของฮีโมโกลบินรวมทั้งกลไกในการเปลี่ยนแปลงให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณของ O_2 ที่

แตกต่างกันได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นคุณสมบัติหนึ่งในการเลือกสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยเฉพาะปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศ ซึ่งจะส่งผลต่ออุตสาหกรรมเพาะพันธุ์ปลาในอนาคตได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฟีนไทป์และชนิดของฮีโมโกลบินของปลาดุก (*Clarias batrachus*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate electrophoresis) แบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (native polyacrylamide gel electrophoresis; N-PAGE) และเทคนิคไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing; IEF)
2. เพื่อศึกษาจุดไฟฟ้าเสมอ (isoelectric point; pI) ของฮีโมโกลบินปลาดุกและปลาตะเพียน โดยใช้เทคนิคไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง
3. เพื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินปลาดุกและปลาตะเพียนโดยใช้เทคนิคเจลฟิльтраชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี (gel filtration column chromatography) และเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry ; MS)
4. เพื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของฮีโมโกลบินปลาดุกและปลาตะเพียนโดยใช้เทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) และเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี

การตรวจเอกสาร

โครงสร้างของฮีโมโกลบิน

ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงเป็นโปรตีนชนิดกลอบูลาร์ (globular protein) (Ritter, 1996) ทำหน้าที่ในการลำเลียงออกซิเจนจากปอดไปยังเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ ในหนึ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีฮีโมโกลบินอยู่ประมาณ 400 ล้านโมเลกุล คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของเม็ดเลือดแดง (Jain, 1986) ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุลประกอบด้วยฮีโม 4 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลของฮีโมจะแทรกอยู่เป็นหมู่โปรสเทติก (prosthetic group) กับสายพอลิเปปไทด์แต่ละสาย ซึ่งฮีโมประกอบด้วยเหล็ก (ferrous, Fe^{2+}) อยู่กลางโมเลกุล (ภาพที่ 1) (Rule, 2000)

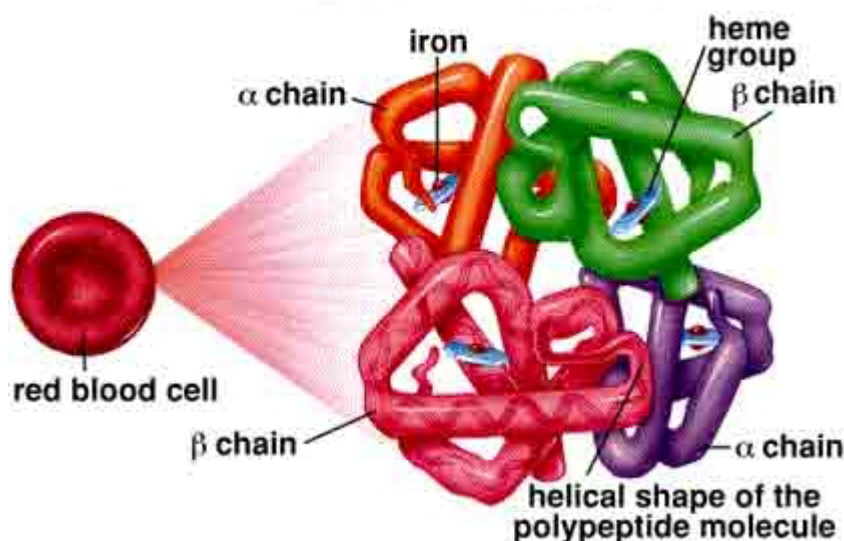
Kanko and Autio (1985) กล่าวว่าฮีโมโกลบินเป็นฮีโมโปรตีน (hemoprotein) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 สาย เป็นสายอัลฟา (α) 2 สาย และสายเบต้า (β) 2 สาย จัดตัวอยู่ในโครงสร้างทรงกลม (spherical structure) แต่ละสายของพอลิเปปไทด์จับอยู่กับหมู่ฮีโม 1 หน่วย ซึ่งเกาะอยู่ภายในของโมเลกุลตรงบริเวณหน่วยที่ไม่มีขั้ว (non-polar residues) สูง เหล็กของฮีโมจับกับอะตอมไนโตรเจนของหน่วยอิมิดาโซลของกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine imidazole nitrogen atom) ของสายพอลิเปปไทด์ เมื่อเอาฮีโมออกจากฮีโมโกลบินความเสถียรของโมเลกุลฮีโมโกลบินจะลดลง

หมู่โปรสเทติกในฮีโมโกลบิน คือ หมู่ฮีโมที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์และอะตอมของ Fe^{2+} สารอินทรีย์ คือ โปรโตพอร์ไฟริน (protophyrin) ซึ่งเป็นวงแหวนไพร์รอล (pyrrole ring) 4 วง เชื่อมต่อกันด้วยสะพานมีธีน (methene bridge) เกิดเป็นเตตระไพร์รอล (tetrapyrrole) และในโมเลกุลประกอบด้วยโซ่ข้างเป็นหมู่เมทิล (methyl group) 4 หมู่ หมู่ไวนิล (vinyl group) 2 หมู่ และหมู่โปรปิโอเนต (propionate group) 2 หมู่ (อาภัสสรา, 2547 และ Horton *et. al.*, 2002)

อะตอมของ Fe^{2+} ซึ่งอยู่ที่ศูนย์กลางของวงแหวนโปรโตพอร์ไฟรินสามารถสร้างพันธะกับอะตอมอื่นๆ ได้ 6 พันธะ โดย 4 พันธะจะจับกับ N อะตอมของวงแหวนไพร์รอลที่อยู่ในระนาบเดียวกับหมู่ฮีโม พันธะที่ 5 หรือตำแหน่งโคออร์ดิเนชัน (coordination position) ที่ 5 จะจับกับ N อะตอมของกรดอะมิโนฮิสทีดีน F8 ส่วนพันธะที่ 6 หรือ ตำแหน่งโคออร์ดิเนชันที่ 6 จะจับกับโมเลกุลของออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่า สารโมเลกุลเล็ก เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) สามารถสร้างพันธะที่ 6 ของ Fe^{2+} ได้ และมีความชอบสูงกว่าออกซิเจน (อาภัสสรา, 2547)

Sripanitan (1983) ได้รายงานเพิ่มเติมว่า โปรตีนในฮีโมโกลบิน เรียกว่า กลอบิน กลอบินในมนุษย์มีความแตกต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ อัลฟา เบต้า แกมมา (γ) เดลต้า (δ) เอพซิลอน (ϵ) หรือสายเหมือนเบต้า (β - like chain) และซีต้า (ζ) หรือสายเหมือนอัลฟา (α -like chain) โดยฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุล ประกอบด้วย 2 สายอัลฟา และ 2 สายที่ไม่ใช่อัลฟา ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโต

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



ภาพที่ 1 โครงสร้างของฮีโมโกลบิน

ที่มา: Bloodless Medicine Research University of Pisa, 2007

Zinoffsky (1985) ได้ทำการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินพบว่าประกอบด้วยเหล็ก 1 อะตอม และคาร์บอน 600 อะตอม แสดงว่าใน 1 โมเลกุลของฮีโมโกลบินประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมอย่างน้อยที่สุด 600 คาร์บอนอะตอมและขนาดที่เล็กที่สุดของโมเลกุลฮีโมโกลบินบรรจุเหล็กเพียง 1 อะตอมเท่านั้น

Sripanitan (1983) กล่าวว่าระยะตัวอ่อน (embryonic state) จะพบฮีโมโกลบินเพียง 3 รูปแบบ คือ $\zeta_2\epsilon_2$ (Hb Gower 1) $\alpha_2\epsilon_2$ (Hb Gower 2) และ $\zeta_2\gamma_2$ (Hb Portland) โดยเชื่อว่า Hb Gower 1 จะถูกสังเคราะห์ขึ้นก่อน ต่อมามีการสังเคราะห์สายอัลฟา ทำให้พบฮีโมโกลบินแบบ Hb Gower 2 และเมื่อใกล้เข้าสู่ระยะลูกอ่อน (fetal state) จะมีการสังเคราะห์สายแกมมา ทำให้พบฮีโมโกลบินแบบ Hb Portland โดยสามารถตรวจฮีโมโกลบินทั้ง 3 รูปแบบ ในระยะ 3 เดือนแรกของการเจริญเติบโต

ในระหว่างที่ตัวอ่อนของสัตว์อยู่ในช่วงอู้มท้องจนกระทั่งโตเต็มวัย การสังเคราะห์ฮีโมโกลบินมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ ระยะตัวอ่อน 2 สายซิก้า (ζ -chain) ถูกสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งจะไปรวมกับ 2 สายเอฟซิลอน (ϵ -chain) ทำให้ฮีโมโกลบินอยู่ในรูป $\zeta_2\epsilon_2$ ขณะเดียวกัน 2 สายเอฟซิลอนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะไปรวมกับ 2 สายอัลฟา ฮีโมโกลบินจึงอยู่ในรูป $\alpha_2\epsilon_2$ จากนั้นเมื่อตัวอ่อนเจริญไปเป็นลูกอ่อน มีการสังเคราะห์ 2 สายแกมมา (γ -chain) มาแทน 2 สายเอฟซิลอน ซึ่งจะไปรวมกับ 2 สายอัลฟาเป็นฮีโมโกลบินในรูป $\alpha_2\gamma_2$ ระยะกลางของการอู้มท้องมีการลดการสังเคราะห์ของสายแกมมาลง ขณะที่ 2 สายเบต้าถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นแล้วจะไปรวมตัวกับ 2 สายอัลฟา เป็นฮีโมโกลบินอยู่ในรูป $\alpha_2\beta_2$ ไปจนกระทั่งเมื่อสัตว์โตเต็มวัย (Sripanitan, 1983)

โดยทั่วไปในระยะโตเต็มวัย (adult state) จะพบฮีโมโกลบิน 3 รูปแบบ ได้แก่ Hb A ประมาณ 97 เปอร์เซ็นต์ Hb A₂ ประมาณ 1.5 - 3 เปอร์เซ็นต์ และ Hb F ไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบฮีโมโกลบินซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Hb A โดยที่สายเบต้ามีกลูตาไธโอน (glutathione) จับอยู่เรียกว่า Hb A₃ ซึ่งพบอยู่ในปริมาณน้อยมาก (Srichayanont, 1974)

กลอบินมีจำนวนกรดอะมิโนในสายอัลฟา 141 หน่วย ส่วนสายเบต้า แกมมา และเดลต้า มี 146 หน่วยเท่ากัน โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรง (linear polymer) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) สายพอลิเมอร์นี้สามารถหมุนได้อิสระ จึงเกิดส่วนที่เป็นเกลียวเฮลิคัล (helical segment) และส่วนที่ไม่เป็นเกลียวเฮลิคัล (non-helical segment) กลายเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ซึ่งสามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และพบว่าส่วนเป็นเกลียวมี 80 เปอร์เซ็นต์ สายเบต้ามี 8 เกลียว ได้แก่ A B C D E F G และ H ส่วนสายอัลฟามี 7 เกลียว ไม่มีเกลียว D โดยนับจากปลาย N (N - terminus) ไปยังปลาย C (C - terminus) ส่วนที่ไม่เป็นเกลียวมี 20 เปอร์เซ็นต์ เช่น NA AB และ BC เป็นต้น (Sripanitan, 1983)

โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของฮีโมโกลบินมีลักษณะการม้วนตัวของโครงสร้างทุติยภูมิ โดยหันส่วนมีขั้ว (polar side chain) สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำบริเวณผิวด้านนอก โดยมีหมู่ฮีมอยู่ด้านในมีลักษณะแบบกระเปาะ (pocket) ซึ่งเชื่อมกับสายกลอบินส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic sidechain) อะตอมของ Fe^{2+} ในฮีมมีการสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับกรดอะมิโนฮิสทีดีน F8 (histidine F8 หรือ proximal histidine) ที่ตำแหน่ง 87 ของสายอัลฟาและตำแหน่ง 92 ของสายเบต้าและยังมีตำแหน่งลิแกนด์ (ligand) ที่สำคัญ คือ กรดอะมิโนฮิสทีดีน E7 (histidine E7 หรือ distal histidine) ที่ตำแหน่ง 58 ของสายอัลฟา และตำแหน่ง 63 ของสายเบต้า ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จับกับออกซิเจนเมื่อ Fe^{2+} จับกับออกซิเจนแล้ว (Boonyarat, 1977 and Sripanitan, 1983)

โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) ของฮีโมโกลบินคนที่อยู่ในรูปเดตระเมอร์ ภายในโมเลกุลมีรูปแบบการเชื่อมกัน 2 ลักษณะ ลักษณะที่ 1 เป็นการเชื่อมระหว่างสายที่คล้ายกัน ได้แก่ $\alpha_1\alpha_2$ และ $\beta_1\beta_2$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการเชื่อมกันระหว่างหมู่ฮีม (heme – heme interaction) Bohr effect และการขนส่งคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 carriage) (Sripanitan, 1983) และลักษณะที่ 2 เป็นการเชื่อมกันระหว่างสายต่างกัน ได้แก่ $\alpha_1\beta_1$ หรือ $\alpha_2\beta_2$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับส่วนเกลียว B G H และส่วนมุม GH และ $\alpha_1\beta_2$ หรือ $\alpha_2\beta_1$ ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับส่วนเกลียว CG และส่วนมุม FG (Shikama and Matsuoka, 2003) พันธะที่พบในโครงสร้างนี้ คือ พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งเกิดขึ้นเองจากหมู่ไทโธลของกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine – SH group) ที่พบมากในสายฮีโมโกลบิน (Ritter, 1996)

เมื่อฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนรูปแบบจะเปลี่ยนจากดีออกซีฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin form) ไปเป็นออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin form) โครงสร้างของฮีโมโกลบินจะมีการหมุนไปจากเดิม 15 องศา เป็นผลจากการเชื่อมกันระหว่าง $\alpha_1\beta_2$ หรือ $\alpha_2\beta_1$ ที่เรียกว่า sliding contacts และจะเกิดช่องว่าง (gap) ระหว่างสายเบต้า ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการจับของฟอสเฟตอินทรีย์ (organic phosphate) ที่จะลดความชอบต่อออกซิเจน เรียกรูปแบบโครงสร้างนี้ว่า รูปแบบ relaxed state (R state) และยังมีการเชื่อมกันระหว่าง $\alpha_1\beta_1$ หรือ $\alpha_2\beta_2$ ที่เรียกว่า packing contacts ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงเล็กน้อย เชื่อว่าการเชื่อมแบบนี้มีผลต่อความคงตัวของฮีโมโกลบินกับออกซิเจนคอมเพล็กซ์ที่อยู่ในรูปแบบเดตระเมอร์ และยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (oxidation) โดยเฉพาะกับสายเบต้าที่มีค่า pH เป็นกรด เรียกรูปแบบโครงสร้างนี้ว่า รูปแบบ tense state (T state) (Prisco *et al.*, 2000; Shikawa and Matsuoka, 2003)

คุณสมบัติของฮีโมโกลบิน

ฮีโมโกลบินของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrates) เกือบทุกชนิดมีหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนจากปอดไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงานในร่างกาย (Ritter, 1996) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals) พบฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่ละลายอยู่ในเม็ดเลือดแดงของคนมีจำกัดที่ 330 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณของฮีโมโกลบินในเลือดมีค่า 100 – 220 กรัมต่อลิตร โดย 1 กรัมของฮีโมโกลบินสามารถจับออกซิเจนได้ 1.34 มิลลิตรออกซิเจน อายุของฮีโมโกลบินในคนเท่ากับ 120 วัน และมีอัตราการสังเคราะห์เพื่อทดแทน 6 กรัมต่อวัน

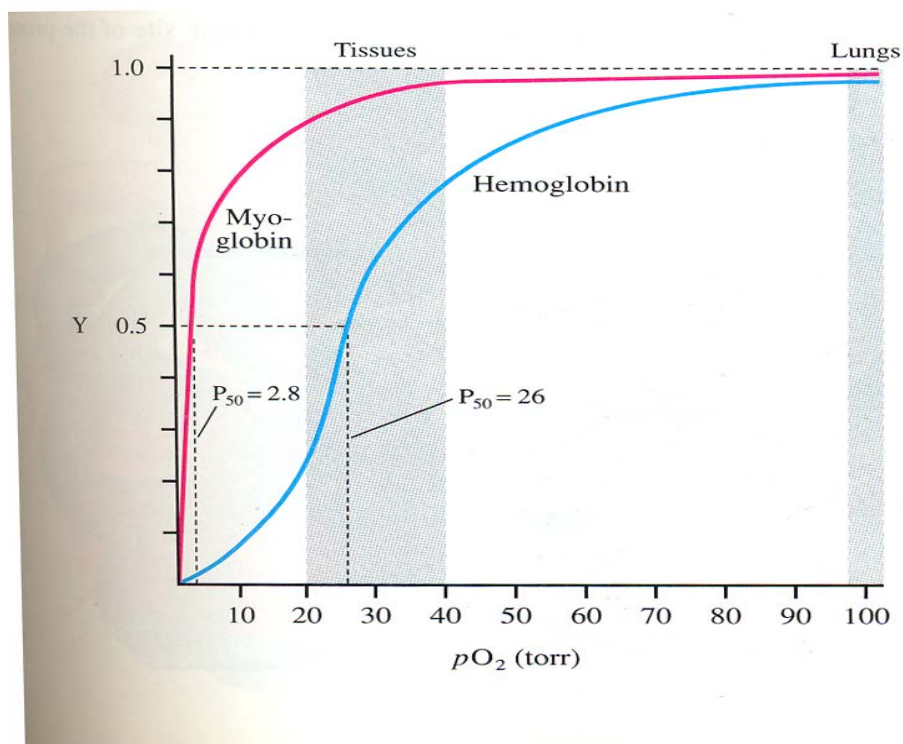
ฮีโมโกลบินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ (low oxygen affinity) มีโครงสร้างเป็นรูปแบบ T state มี salt bridge จำนวนมากยึดโครงสร้างไว้อยู่ในสภาพเครียดซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ได้จับกับออกซิเจนหรือคือออกซีฮีโมโกลบิน (deoxyhemoglobin) และกลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูง (high oxygen affinity) มีโครงสร้างเป็นรูปแบบ R state โดยไม่มี salt bridge อยู่ในสภาพคลาย ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จับกับออกซิเจนหรือออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin) (Bunn, 1971) T state มีความเสถียรมากกว่า R state เนื่องจากมี ionic salt bridge จำนวนมากที่ $\alpha_1\beta_2$ (Lehninger *et al.*, 1993) นอกจากนี้ Perutz และ Imai (1980) ได้รายงานเพิ่มเติมถึงความแตกต่างระหว่างฮีโมโกลบิน 2 กลุ่ม ซึ่งมีความแตกต่างที่ปลาย N ของกรดอะมิโนในสายเบต้าตำแหน่งที่ 2 (NA2 β) ตรงบริเวณที่ไม่ใช่เกลียวเฮลิคซ์ โดยกลุ่มที่ชอบต่อออกซิเจนต่ำเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophobic ที่มีกรดอะมิโนลิวซีน (leucine) กับเมทไธโอนีน (methionine) หรือ เฟนิลอะลานีน (phenylalanine) ขณะที่กลุ่มที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูงเป็นกรดอะมิโนพวก hydrophilic ได้แก่ พวกกรดอะมิโนฮิสทีดีน กลูตามีน (glutamine) หรือ แอสพาราจีน (asparagine)

ฮีโมโกลบินมีกลไกการจับออกซิเจนเป็นแบบ positive cooperativity คือ เมื่อมอโนเมอร์ (monomer) ใดภายในโมเลกุลของฮีโมโกลบินสามารถจับกับออกซิเจน จะทำให้โครงสร้างของฮีโมโกลบินทั้งโมเลกุลหมุนจากแกนเดิมไป 15 องศา และหมู่ฮีมที่มีออกซิเจนจะมีการสื่อสารสัญญาณไปยังหมู่ฮีมของมอโนเมอร์อื่นๆ (heme – heme interaction) ส่งผลให้หมู่ฮีมในมอโนเมอร์อื่นมีความสามารถจับออกซิเจนได้ดีขึ้น เป็นลักษณะการเพิ่มความชอบต่อออกซิเจน (Sripanitan, 1983; Ritter, 1996 and Horton *et al.*, 2002)

ความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินวัดได้ด้วยค่า P_{50} หมายถึงความดันของออกซิเจนที่ทำให้มีปริมาณของฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจนเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด โดยพิจารณาจากการสร้างกราฟระหว่างความดันออกซิเจน (pO_2) มีหน่วยเป็นทอร์ (torr) (1 มิลลิเมตรปรอท = 760 ทอร์ = 1 บรรยากาศ) เป็นแกน X และค่าความอิ่มตัวของออกซิเจน (oxygen saturation) ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิฮีโมโกลบินต่อปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด เป็นแกน Y เรียกกราฟนี้ว่า oxygen binding curve หรือ oxygen dissociation curve ดังแสดงในภาพที่ 2 (Ritter, 1996 and Horton *et al.*, 2002)

Horton *et al.* (2002) กล่าวว่า ค่า P_{50} เป็นค่าที่บ่งบอกว่าโปรตีนมีความชอบต่อออกซิเจนมากน้อยเพียงใด ถ้าโปรตีนชนิดใดมีค่า P_{50} ต่ำ แสดงว่ามีความชอบต่อออกซิเจนสูง กล่าวคือ เมื่อความดันของออกซิเจนต่ำโปรตีนสามารถอิ่มตัวด้วยออกซิเจนถึงครึ่งหนึ่ง ในทางกลับกัน ถ้าโปรตีนชนิดใดมีค่า P_{50} สูง แสดงว่ามีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ กล่าวคือ ต้องมีความดันของออกซิเจนสูงเพื่อให้โปรตีนอิ่มตัวด้วยออกซิเจนถึงครึ่งหนึ่ง

Oxygen binding curve ของฮีโมโกลบินมีลักษณะเป็นแบบ sigmoid (S shape) ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แตกต่างจากไมโอโกลบิน (myoglobin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เช่นเดียวกับฮีโมโกลบินแต่อยู่ในกล้ามเนื้อ และมีโครงสร้างที่คล้ายกับมอโนเมอร์ของฮีโมโกลบิน มีลักษณะของ oxygen binding curve เป็นแบบ hyperbola (ภาพที่ 2) ทั้งนี้บ่งบอกถึงความแตกต่างซึ่งเป็นเอกลักษณ์ (unique) และรูปร่างที่จำเพาะ (specifically shape) ของการทำงานของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ (Ritter, 1996) P_{50} ของฮีโมโกลบินเท่ากับ 26 ทอร์ ขณะที่ค่า P_{50} ของไมโอโกลบิน เท่ากับ 2.8 ทอร์ แสดงว่าฮีโมโกลบินมีความชอบต่อออกซิเจนต่ำกว่าไมโอโกลบิน (Horton *et al.*, 2002) นอกจากนี้ กราฟแบบ sigmoid ของฮีโมโกลบินยังบ่งบอกถึงการทำงานแบบ positive cooperativity ของเตตระเมอร์ (tetramer) ซึ่งแตกต่างจากมอโนเมอร์ของไมโอโกลบิน (Boonyarat, 1997)

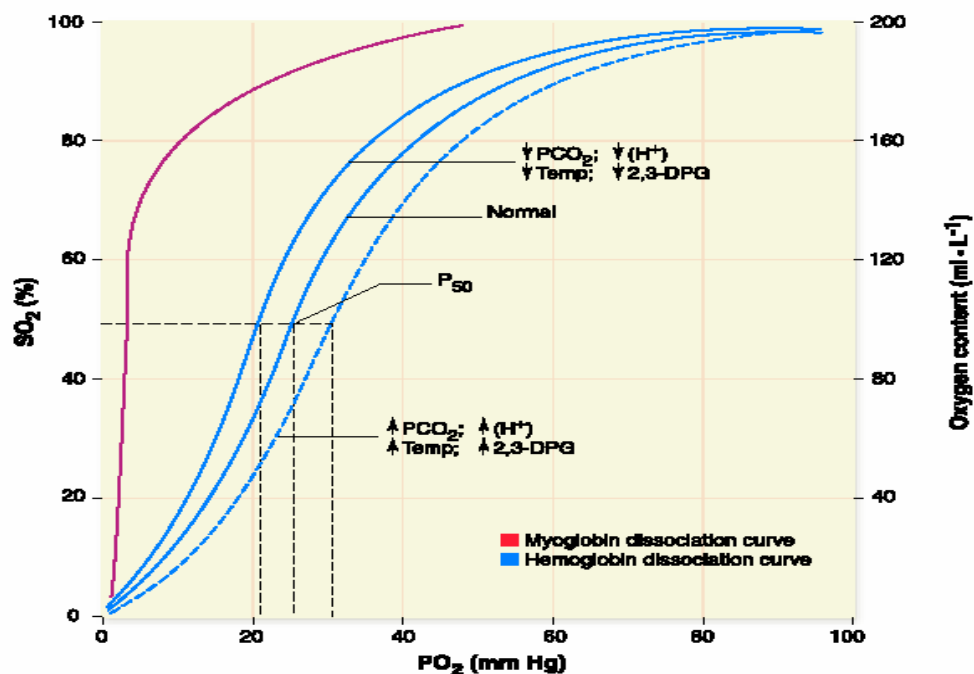


ภาพที่ 2 Oxygen binding curve ของฮีโมโกลบินและไมโอโกลบิน

ที่มา: Horton *et al.* (2002)

Moss *et al.* (1984) ได้กล่าวถึงลักษณะเฉพาะของฮีโมโกลบินไว้ 3 ประการ คือ ประการแรก ฮีโมโกลบินที่อิ่มตัว 1 กรัม มีความสามารถที่จะจับออกซิเจนได้ 1.3 ซีซี สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมปกติจะมีฮีโมโกลบินเฉลี่ย 10 – 15 กรัมเปอร์เซ็นต์ ดังนั้นความจุออกซิเจนมีค่าประมาณ 13.9 – 21 ซีซีต่อเลือด 100 ซีซี หรืออาจกล่าวได้ว่าความจุของออกซิเจนจะมีค่าประมาณ 13.9 – 21 เปอร์เซ็นต์ ประการที่สอง ฮีโมโกลบินมีความสามารถที่จะจับกับออกซิเจนได้อย่างอิ่มตัวในสภาวะที่มีออกซิเจน และประการที่สามที่ความดันย่อยของออกซิเจนประมาณ 40 ทอร์ร ในเส้นเลือดแดง (artery blood) ออกซิเจนจะถูกปล่อยจากฮีโมโกลบินที่อยู่ในเส้นเลือดฝอยไปยังเนื้อเยื่อโดยรอบ (peripheral tissue) นอกจากนี้ ความชอบออกซิเจนของฮีโมโกลบินขึ้นอยู่กับความเป็นกรดเบสของเลือด ความดันย่อยของ CO_2 และ 2,3 - บิสฟอสโฟกลีเซอเรต ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ความสามารถในการจับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลงไป เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH ที่เกิดจากกรดในเมแทบอลิซึมหรือ CO_2 เป็นผลทำให้ฮีโมโกลบินจับกับออกซิเจนได้น้อยลง ทำให้กราฟเส้นโค้งของการจับออกซิเจนเลื่อนไปทางขวา และทำให้ความดันย่อยที่ฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจน 50 เปอร์เซ็นต์ (P_{50}) เพิ่มขึ้นเมื่อความ

เข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนลดลงเส้นโค้งการจับออกซิเจนเลื่อนไปทางซ้ายเป็นผลให้ P_{50} ลดลง (ภาพที่ 3) (Guyton and Hall, 1996)



ภาพที่ 3 แสดงผลของ pH CO_2 2,3-BPG และอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของกราฟเส้นโค้งของการจับกันของออกซิเจนและฮีโมโกลบิน (SO_2 = saturated O_2)

ที่มา: Guyton and Hall (1996)

Varijavand *et al.* (2000) ได้กล่าวว่ากราฟเส้นโค้งที่แสดงการจับกันของออกซิเจนและฮีโมโกลบินเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ทราบถึงการนำพาและการปลดปล่อยออกซิเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีความสำคัญเกี่ยวกับการอิ่มตัวของออกซิเจนและความดันย่อยของออกซิเจนในเลือดซึ่งถูกกำหนดโดยความสามารถของฮีโมโกลบินที่จับกับออกซิเจนและปลดปล่อยโมเลกุลออกซิเจนให้กับเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆนั้น การที่ฮีโมโกลบินสามารถจับกับออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็นลำดับนั้น โมเลกุลจำนวนมากที่เพิ่มขึ้นทำให้ความดันย่อยของออกซิเจนเพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งถึงปริมาณสูงสุดที่สามารถจะจับกับฮีโมโกลบินได้ เส้นโค้งของการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินมีลักษณะเป็นรูปตัวเอส (sigmoidal) ซึ่งระยะเจริญวัยของคนที่มี Hb A ภายใต้สภาพที่ปกติ (pH 7.4 37 องศาเซลเซียส) ฮีโมโกลบินจับออกซิเจนประมาณร้อยละ 75 ที่ระดับความดันออกซิเจน 26 ± 1 มิลลิเมตรปรอท เมื่อฮีโมโกลบินจับออกซิเจนเพิ่มขึ้นทำให้

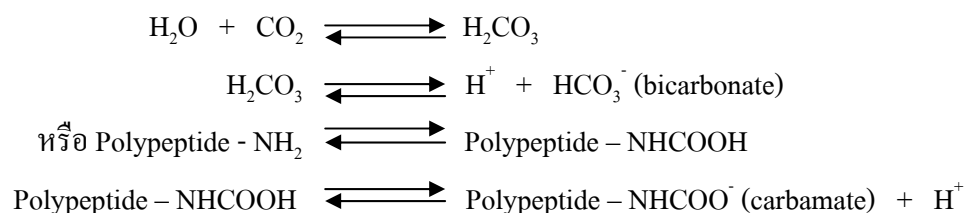
เส้นโค้งของการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินเลื่อนไปทางซ้าย แสดงให้เห็นว่า P_{50} มีค่าลดลง แม้ว่าจะมีความดันย่อยของออกซิเจนเพียงเล็กน้อย

Sripanitan (1983) กล่าวว่า ความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ pH สารอินทรีย์ฟอสเฟต และความดันของ CO_2 ($p\text{CO}_2$) ถ้าเพิ่ม pH ลดค่าอุณหภูมิและลดสารอินทรีย์ฟอสเฟต จะทำให้ค่าความชอบต่อออกซิเจนสูง ค่า P_{50} จะต่ำลง ในทางกลับกันถ้าลด pH เพิ่มค่าอุณหภูมิและสารอินทรีย์ฟอสเฟตจะทำให้ค่าความชอบต่อออกซิเจนต่ำ ค่า P_{50} จะสูงขึ้น

Rapoport and Guest (1984) ได้กล่าวว่า 2,3 - BPG เป็นสารอินทรีย์ฟอสเฟตในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวนมาก และ Horton *et al.* (2002) พบว่า 2,3 - BPG ซึ่งถูกสร้างขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมแบบ allosteric modulator หรือ allosteric effector ของฮีโมโกลบิน คือ ทำหน้าที่เลือกจับกับไดออกซีฮีโมโกลบินแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง ส่งผลให้มีค่าความชอบต่อออกซิเจนลดลง เป็นการเพิ่มการปลดปล่อยออกซิเจนของออกซีฮีโมโกลบินแก่เนื้อเยื่อ โดยไม่มีการจับออกซิเจนอีก การทำงานในลักษณะนี้เป็นการปรับสมดุลทางโครงสร้างของฮีโมโกลบินระหว่างรูปไดออกซีฮีโมโกลบินและออกซีฮีโมโกลบิน ($T \leftrightarrow R$ equilibrium) นอกจากนี้ยังพบว่า 2,3 - BPG จะถูกสร้างมากขึ้นในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เช่นบริเวณที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล (altitude) มากๆ

นอกจากนี้ยังมีสารฟอสเฟตอินทรีย์อื่นๆที่มีผลต่อการทำงานของฮีโมโกลบินในลักษณะเดียวกัน ได้แก่ อินซิทอลเพนตาฟอสเฟต ที่ทำหน้าที่ในนก อะดีโนซีนไตรฟอสเฟตที่ทำหน้าที่ในปลาและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibian) และกวาโนซีนไตรฟอสเฟตที่ทำหน้าที่ในปลากระดูกแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าในเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี ATP ประมาณ 2 มิลลิโมลาร์ ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ฮีโมโกลบินจับกับ Mg^{2+} เกิดเป็นสารเชิงซ้อน (อาภัสตรา, 2547)

บอร์เอฟเฟกต์ (Bohr effect) เป็นผลจากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตอน (H^+) หรือการเพิ่มภาวะความเป็นกรด หรือการลดค่า pH ที่ทำให้มีการปลดปล่อยออกซิเจนออกจากโมเลกุลของฮีโมโกลบิน หรือลดค่าความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบิน ซึ่งปริมาณของโปรตอนสร้างมาจากการบอนด์ไดออกไซด์ที่อยู่ในเลือดและจากสายฮีโมโกลบิน ดังสมการ



บอร์เอฟเฟคเป็นสิ่งที่สำคัญต่อการทำงานของฮีโมโกลบิน กล่าวคือ ช่วยให้มีการถ่ายโอนออกซิเจนจากฮีโมโกลบินในเลือดสู่เนื้อเยื่อ และฮีโมโกลบินสามารถกลับมาทำหน้าที่ได้อีกครั้งจึงเกิดการทำงานอย่างต่อเนื่อง (Ritter, 1996)

คาร์บอนไดออกไซด์ทำให้ความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินลดลง ซึ่งจากสมการข้างต้น คาร์บอนไดออกไซด์ทำให้เกิดโปรตอนที่มีผลต่อการเกิดบอร์เอฟเฟค โดยส่วนใหญ่คาร์บอนไดออกไซด์จะถูกขนส่งในรูปไบคาร์บอเนต 78 เปอร์เซ็นต์ ขนส่งในรูปคาร์บาเมต 13 เปอร์เซ็นต์ และในรูปสารละลายคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ 9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฮีโมโกลบินในรูปคาร์บาเมตมาที่ปอด ซึ่งเป็นบริเวณที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำแต่มีออกซิเจนสูง ทำให้ฮีโมโกลบินมีการจับกับออกซิเจนและปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ปอดเพื่อขับออกจากร่างกาย (Ritter, 1996 and Horton *et al.*, 2002)

ฮีโมโกลบินของปลา

Martin *et al.* (1979a) กล่าวว่า เลือดปลาทุกชนิดมีฮีโมโกลบินจำนวนหลายชนิดมาก (multiplicity) ซึ่งความหลากหลายนี้อาจเป็นประโยชน์ในการดำรงชีวิต และได้จัดกลุ่มฮีโมโกลบินของปลาเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีทั้งฮีโมโกลบินแบบเดี่ยว (single) และแบบหลากหลาย (multiple) มีความไวต่ออุณหภูมิและ pH โดยฮีโมโกลบินแบบหลากหลายไม่ได้ถูกจัดจำแนกตามความสัมพันธ์ด้านการทำหน้าที่ ฮีโมโกลบินกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยฮีโมโกลบินแบบหลากหลายโดยแต่ละแถบของฮีโมโกลบินมีความแตกต่างอย่างชัดเจนทางด้านการทำหน้าที่ และกลุ่มนี้ถือว่าเป็นกลุ่มที่พัฒนาแล้ว (advanced) ตามวิวัฒนาการฮีโมโกลบินของปลา และกลุ่มที่ 3 เป็นฮีโมโกลบินที่ไวต่อ pH แต่ไม่มีผลจากอุณหภูมิ

Martin *et al.* (1979b) ได้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของฮีโมโกลบินปลา Amazon Stringrays สกุล *Potamotrygon* พบว่า ฮีโมโกลบินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54,000 – 58,000 ดาลตัน มีบอร์เอฟเฟค โดยมีค่า P_{50} ของฮีโมโกลบินที่ไม่มีฟอสเฟตลดลง 33 เท่า ระหว่าง pH 5.95 และ 9.0 ฮีโมโกลบินแสดงพฤติกรรม cooperative โดยพิจารณาค่า n ในสมการของฮิลล์ (Hill

equation) ซึ่งค่า n จะลดลงภายในช่วง pH 6.0 และ 9.0 เมื่อเพิ่ม pH ระหว่าง 6.3 และ 8.8 ค่า oxygen dissociation rate จะลดลง และค่า carbonmonoxide combination rate จะเพิ่มขึ้น โดยค่าทั้ง 2 จะเปลี่ยนแปลง 4 เท่า และค่า oxygen dissociation rate จะไวต่อฟอสเฟตอินทรีย์ ซึ่งเมื่อเติม 1 mM ATP ที่ pH 6.3 จะมีค่า oxygen dissociation rate จะเพิ่มขึ้นประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความชอบต่อออกซิเจนสูงกว่าปลาในกลุ่มเดียวกันด้วย $P_{50} = 12$ มิลลิเมตรปรอท ที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อไม่มี CO_2

Martin *et al.* (1979a) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Mylossoma* sp. ซึ่งเป็นปลาคาร์แคส พบว่า ฮีโมโกลบินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57,000 ดาลตัน และมีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 14,000 ดาลตัน ฮีโมโกลบินของปลาชนิดนี้ประกอบด้วยกลุ่มเฮโมโกลบิน 89 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมด มีรูทเอฟเฟกต์ (root effect) โดยมีค่าการอิ่มตัวด้วยออกซิเจน 45 เปอร์เซ็นต์ที่ pH 5.9 ความดันบรรยากาศ 1 บรรยากาศ (atm) และที่ 1 mM ATP และยังคงแสดงบอร์เอฟเฟกต์เมื่อมี 1 mM ATP ส่วนค่า cooperativity ที่พิจารณาจาก n ในสมการของฮิลล์ ที่ pH ต่างๆ พบว่า ที่ pH 6.7 และ 1 mM ATP จะได้ค่า $n < 1$ และค่าจะต่ำลงอีกเมื่อ pH เป็น 8.2 นอกจากนี้ยังมีฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติกโดยมีคุณสมบัติที่มีรีเวิร์สบอร์เอฟเฟกต์ (reverse bohr effect) ซึ่งค่า $\Delta \log P_{50} / \Delta pH = 0.14$ ระหว่าง pH 7.0 และ 8.0 และจะเปลี่ยนเป็นบอร์เอฟเฟกต์ปกติ คือ $\Delta \log P_{50} / \Delta pH = -0.13$ เมื่อเติม 1 mM ATP และฮีโมโกลบินนี้ยังแสดง cooperativity ในทุกค่า pH ที่ศึกษา แต่ไม่มีรูทเอฟเฟกต์ และยังพบว่าค่า carbonmonoxide combination rate และ oxygen dissociation rate ของฮีโมโกลบินทั้ง 2 ชนิดขึ้นอยู่กับ pH

Martin *et al.* (1979c) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Pseudodoras* ซึ่งเป็นปลาคาร์แคสของอเมริกาใต้ พบว่า ฮีโมโกลบินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66,000 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 14,300 ดาลตัน ไม่พบรูทเอฟเฟกต์ มีค่าบอร์เอฟเฟกต์เพียงเล็กน้อย มีค่า cooperativity จากค่า n ในสมการของฮิลล์ต่ำ ประมาณ 0.8 – 1.7 ระหว่าง pH 6.1 และ 8.6 และกรณีไม่มีฟอสเฟตมีค่า P_{50} ต่ำมากประมาณ 0.5 มิลลิเมตรปรอท ที่ทุกค่า pH ระหว่าง 6.1 – 9.0 แสดงว่ามีค่าความชอบต่อออกซิเจนสูง ซึ่งเป็นผลจากค่า carbonmonoxide combination rate โดยพบว่า ระหว่าง pH 6.2 และ 8.1 ค่า carbonmonoxide combination rate จะเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า ขณะที่ไม่มีฟอสเฟตและเมื่อเติม 1 mM ATP ค่า carbonmonoxide combination rate จะลดลงทุกค่า pH ของการทดลอง ส่วนค่า oxygen dissociation rate จะลดลง 7 เท่า ที่ pH 6.0 – 8.2 ขณะที่ไม่มีฟอสเฟตและเมื่อเติม 1 mM ATP จะทำให้ค่าลดลงเป็น 10 เท่า และที่ pH ต่ำกว่า 6 จะลดค่า oxygen dissociation rate ซึ่งแสดงว่าภาวะกรดทำให้เกิดบอร์เอฟเฟกต์ นอกจากนี้ Martin และคณะ (1979d)

ยังได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Brachyplatystoma* sp. ซึ่งเป็นปลาคูกแถบเขตร้อน พบว่าฮีโมโกลบินมีน้ำหนักประมาณ 69,000 ดาลตัน ฮีโมโกลบินแสดงคุณสมบัติมีบอร์เอฟเฟกต์ ฟอสเฟตเอฟเฟกต์ แต่ไม่มีรูทเอฟเฟกต์ โดยค่า P_{50} ของฮีโมโกลบินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จะเปลี่ยนจาก 0.3 มิลลิเมตรปรอท ที่ pH 8.4 เป็น 4.5 มิลลิเมตรปรอท ที่ pH 5.9 หลังจากเติมคาร์บอนไดออกไซด์ 5.6 เปอร์เซ็นต์ และค่า $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ ขณะที่ไม่มีฟอสเฟตเท่ากับ -0.23 แต่เมื่อเติม 1 mM ATP จะเป็น -0.58 ที่ pH ระหว่าง 7.0 และ 8.0 และค่า n จากสมการของฮิลล์ของฮีโมโกลบินขณะที่ไม่มีฟอสเฟตจะเปลี่ยนจาก 1 ที่ pH 5.9 เป็น 1.7 ที่ pH 7.0 และเมื่อเติม 1 mM ATP ค่าจะเพิ่มเป็น 2 ที่ pH 7.4 ส่วนค่า oxygen dissociation rate และค่า carbonmonoxide combination rate จะขึ้นอยู่กับ pH โดยค่า carbonmonoxide combination rate จะเกิดขึ้นเองที่ pH ต่ำๆ ซึ่งบ่งถึงการมี positive subunit interaction และ oxygen dissociation rate จะเท่ากันที่ทุกค่า pH

Garlick *et al.* (1979a) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Hoplosternum littorale* (Hancock) ซึ่งเป็นปลา Air Breathing Catfish พบว่า ฮีโมโกลบินขณะที่ไม่มีฟอสเฟตมีค่าความชอบต่อออกซิเจนสูง ซึ่งการเกิดบอร์เอฟเฟกต์ที่ pH เป็นค่า (normal alkaline bohr effect) และมีรูทเอฟเฟกต์ โดยค่าบอร์เอฟเฟกต์และรูทเอฟเฟกต์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเติม 1 mM ATP และฮีโมโกลบินของปลาชนิดนี้แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ HbI และ HbII โดย HbI ขณะที่ไม่มีฟอสเฟตมีความชอบต่อออกซิเจนสูง มีรีเวิร์สบอร์เอฟเฟกต์ ที่ pH 6.0 และ 8.0 ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} > 0$) แต่ไม่มีรูทเอฟเฟกต์ เมื่อเติม 1 mM ATP จะทำให้ค่าความชอบต่อออกซิเจนลดลง ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} < 0$) และไม่มีรูทเอฟเฟกต์เช่นเดียวกัน ส่วน HbII ขณะที่ไม่มีฟอสเฟตมีค่าความชอบต่อออกซิเจนต่ำกว่า HbI ที่ pH ต่ำ แต่มีค่าความชอบต่อออกซิเจนสูงกว่า HbI ที่ pH สูง แสดงว่ามีบอร์เอฟเฟกต์ที่ pH เป็นค่า และเมื่อเติม 1 mM ATP จะเกิดรูทเอฟเฟกต์ที่ pH ต่ำ

Garlick *et al.* (1979b) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Sternopygus macrurus* หรือปลา Amazon Knife Fish พบว่า มีค่า p_{50} เป็น 5.2 มิลลิเมตรปรอท ที่ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ และเมื่อเติมคาร์บอนไดออกไซด์ 5.6 เปอร์เซ็นต์ ค่า P_{50} จะเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า ส่วนค่าความชอบต่อออกซิเจนขณะที่ไม่มี ATP จะเพิ่มเป็น 20 เท่า ระหว่าง pH 5.8 และ 8.6 ที่ 20 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเติม 1 mM ATP จะเพิ่มเป็น 100 เท่า นอกจากนี้ฮีโมโกลบินยังแสดงรูทเอฟเฟกต์ คือมีเพียง 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อิ่มตัวด้วยออกซิเจนที่ pH ต่ำกว่า 6 เมื่อ equilibrate ด้วยอากาศ ส่วนค่า n จากสมการของฮิลล์ในช่วง pH 7.0 – 7.5 มีค่าเป็น 1 ที่ pH สูง และเป็น 1.5 ที่ pH ต่ำ ขณะที่ไม่มี ATP และเมื่อเติม 1 mM ATP จะได้ค่าประมาณ 1.0 ส่วนค่า oxygen dissociation rate จะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ต่ำลง

Galdames – Portus *et al.* (1979) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Osteoglossum bicirrhosum* ซึ่งเป็นปลาที่หายใจในน้ำ และปลา *Arapima gigas* ซึ่งเป็นปลาที่หายใจในอากาศ พบว่าฮีโมโกลบินของปลาทั้ง 2 ชนิด มีรูทอเฟลคและมีความชอบต่อออกซิเจนน้อยมากซึ่งเป็นลักษณะที่หายไประหว่างสมรรถนะของการจับกับลิแกนด์ (ligand) แบบ cooperativity เมื่ออยู่ในโครงสร้างที่มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ หรือ T state จะมีการจับกันของหน่วยย่อยแบบหน่วยย่อยต่างกันจับกันได้ดี (heterogeneity) ซึ่งพบได้ในฮีโมโกลบินของปลาทั้ง 2 ชนิด ซึ่งบ่งชี้จากค่าในสมการของฮิลล์ต่ำและมีจลนศาสตร์ของ carbonmonoxide combination rate เป็นแบบ biphasic ส่วนความแตกต่างของฮีโมโกลบินของปลาทั้ง 2 ชนิดนี้ จะพบที่ pH สูงกว่า 8 ซึ่งแสดงค่า ligand affinity สูงที่สุด โดยพบว่าปลา *Arapima gigas* มีค่า ligand affinity ต่ำสุด แต่มีค่า cooperativity สูงที่สุด

Riggs *et al.* (1979) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Hoplias malabaricus* ซึ่งเป็นปลาที่สามารถหายใจในอากาศได้เมื่อน้ำมีปริมาณออกซิเจนต่ำ และปลา *Hoplerhythrinus unitaeniatus* ปลาทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นปลาชั้นต่ำ พบว่าเมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Hoplias* จะมี 3 แถบ (band) ส่วนปลา *Hoplerhythrinus* มี 4 แถบ ค่าความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินปลา *Hoplerhythrinus* ขณะที่ไม่มีฟอสเฟตมีประมาณ 3 เท่า ของปลา *Hoplias* โดยค่า P_{50} ของฮีโมโกลบินปลา *Hoplias* มีประมาณ 1.3 มิลลิเมตรปรอท ที่ pH 6.9 และ 20 องศาเซลเซียส เมื่อเติม 1 mM ATP จะลดค่าความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินปลาแต่ละชนิดลง 2.6 เท่า นอกจากนี้ฮีโมโกลบินปลาทั้ง 2 ยังแสดงรูทอเฟลคและบอร์เอเฟลค โดยค่า $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -0.40$ ขณะที่ไม่มีฟอสเฟตที่ pH 7 – 8 ส่วนค่า oxygen dissociation rate ของฮีโมโกลบินปลาแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งมีค่าทางจลนศาสตร์เป็นแบบหน่วยย่อยที่เหมือนกันจับกันได้ดี (homogeneous) ด้วยอัตราคงที่จาก 200 – 250 ต่อวินาที ที่ pH 6.2 และเหลือประมาณ 25 – 26 ต่อวินาที ที่ pH 7.7 ทั้งที่มีและไม่มีฟอสเฟต

Brunori *et al.* (1979) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Pterygoplichthys pardalis* หรือปลา Acaribodo ซึ่งเป็นปลาในกลุ่ม Cypriniformes พบว่าเมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสศึกษาปลาชนิดนี้จะมีฮีโมโกลบิน 4 แถบ โดย แถบที่ 1 (HbI) มีประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมดซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างจากแถบที่ 2, 3 และ 4 (HbII) แถบที่ 1 แสดงคุณสมบัติมีรีเวิร์สบอร์เอเฟลค ขณะที่ไม่มีฟอสเฟต โดยค่าความชอบต่อออกซิเจนขึ้นกับ ATP เพียงช่วง pH ต่ำๆ ค่าทางจลนศาสตร์ของ ATP ทำให้ค่า carbonmonoxide combination rate ลดลงและเพิ่มค่า oxygen dissociation rate ส่วนฮีโมโกลบินแถบที่ 2, 3 และ 4 มีคุณสมบัติคล้ายกัน คือ มีค่าบอร์เอเฟลคสูงค่าความชอบต่อออกซิเจนจะลดลงระหว่าง

pH 6.2–8.5 ซึ่งเมื่อลด pH จะทำให้ค่า oxygen dissociation rate เพิ่มขึ้น แต่ carbonmonoxide combination rate มีค่าลดลง ส่วนผลของ ATP มีเพียงเล็กน้อยในช่วง pH ที่ทดลอง

คุณสมบัติที่พิเศษของฮีโมโกลบินของปลาบางชนิด คือ การมีรูทเอฟเฟก เมื่อเลือดมีภาวะเป็นกรดหรือ pH ต่ำ จะทำให้ฮีโมโกลบินมีการบรรจุออกซิเจน (oxygen capacity) ลดลง หรือทำให้คุณสมบัติ cooperative ลดลง เป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ค่ารูทเอฟเฟกสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจน เมื่อให้ความดันคาร์บอนไดออกไซด์ ($p\text{CO}_2$) ในปริมาณสูง ขณะที่ความดันออกซิเจน ($p\text{O}_2$) คงที่ แล้วพิจารณาปริมาณออกซิฮีโมโกลบินเปรียบเทียบกับปริมาณฮีโมโกลบิน ถ้ามีรูทเอฟเฟกจะมีการเพิ่มขึ้นของฮีโมโกลบิน การเกิดลักษณะนี้เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนในสายฮีโมโกลบินของปลาที่แตกต่างจากสัตว์อื่น เมื่อสายฮีโมโกลบินจับกับโปรตอนจะทำให้โครงสร้างเกิดการล็อก (locking) ให้อยู่ในรูปฮีโมโกลบิน (T state) ทำให้ความสามารถในการบรรจุออกซิเจนลดลงและการทำงานแบบ cooperative ก็ลดลง และยังพบว่ารูทเอฟเฟกในปลาเป็นแบบ biphasic คือ มี 2 รูปแบบที่เกิดขึ้นพร้อมกัน คือ เกิดขึ้นเร็วเกิดที่สายอัลฟาและเกิดขึ้นช้าเกิดที่สายเบต้า ทั้งนี้เป็นเพราะตำแหน่งหมู่ฮีมภายในสายกลอบินทั้ง 2 ที่เอื้อต่อการจับโปรตอนแตกต่างกัน (Martin *et al.*, 1979d; Farmer *et al.*, 1979; Perry and Tufts, 1998)

Southard *et al.* (1986) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินจากปลา *Saimo ciarki* หรือ ปลา Cutthroat Trout พบว่ามีฮีโมโกลบิน 9 ชนิด และเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบฮีโมโกลบิน 8 ชนิด ซึ่งเมื่อศึกษาลักษณะของสายกลอบิน พบว่ามี 6 ชนิดเป็นแบบ $\alpha_2\beta_2$ และอีก 2 ชนิด เป็นแบบ $\alpha\alpha\beta_2$ และ $\alpha\alpha\beta\beta'$ ซึ่งเป็นลักษณะ heterotetramers และพบว่ามีฮีโมโกลบิน 5 ชนิด ที่มี pI ระหว่าง 7.1 – 9.1 และฮีโมโกลบินอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีขนาดเล็ก มี $pI = 5.9$ ซึ่งฮีโมโกลบินขนาดเล็กนี้ มีความจำเป็นต่อการจับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบินทุกแบบดังที่กล่าวมาข้างต้น และฮีโมโกลบินทุกแบบมีคุณสมบัติเหมือนกันเกี่ยวกับการจับออกซิเจน คือ ไม่ขึ้นกับ pH และอุณหภูมิ และไม่มีผลจากปริมาณ ATP นอกจากนี้ยังพบว่าฮีโมโกลบินขนาดเล็กอื่นๆ ที่มี $pI < 5.9$ ซึ่งมีคุณสมบัติเกี่ยวกับการจับออกซิเจนเหมือนกัน ยกเว้นขึ้นอยู่กับ pH และฮีโมโกลบินอีก 2 ชนิด ที่มี $pI = 6.5$ และ 6.4 มีคุณสมบัติคล้ายกันเกี่ยวกับการจับออกซิเจนที่ต้องขึ้นอยู่กับ pH และอุณหภูมิ ATP และ GTP จะทำให้ความชอบต่อออกซิเจนลดลงแต่ไม่มีผลต่อ cooperativity โดยผลของ GTP จะน้อยกว่า ATP และเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลานี้มี ATP และ GTP จำนวนมาก ด้วยอัตราส่วน ATP : GTP = 3:1 แสดงว่าฟอสเฟตอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด เป็นตัวควบคุมที่สำคัญ ซึ่งต่างจากปลา *S. gairdneri* ซึ่งมีปริมาณ GTP ต่ำกว่ามาก

Nakamoto and Mochado (1986) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินและสายกลอบินของฮีโมโกลบินของปลา *Synbranchus marmoratus* จากอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแป้งเจล (agar – starch gel electrophoresis) บัฟเฟอร์สำหรับเจลใช้ 42 มิลลิโมลาร์ ทริส 1.7 มิลลิโมลาร์ EDTA และอิเล็กโตรด บัฟเฟอร์ใช้ 6.1 มิลลิโมลาร์บอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) pH 8.8 พบว่า ฮีโมโกลบินของปลาชนิดนี้มี 3 แถบ คือ HbI เป็นกลุ่มแคโรติก ส่วนกลุ่มแอโนดิก คือ HbII และ HbIII และโดยใช้เทคนิค เซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 800 มิลลิโมลาร์ ทริส 2.1 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.9 ที่มี 6 โมลาร์ยูเรีย (urea) และ 2.25 มิลลิโมลาร์เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) พบว่า ฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายกลอบิน 4 สาย ได้แก่ สายอัลฟา 1 อัลฟา 2 เบต้า และแกมมา โดยลักษณะการจับกันเป็นเตตระเมอร์ของฮีโมโกลบิน คือ HbI เป็นแบบ $\alpha_{(2)}\gamma_2$ HbII เป็นแบบ $\alpha_{(12)}\gamma_2$ และ HbIII เป็นแบบ $\alpha_{(12)}\beta_2$

Harrington (1986) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินจากปลา *Oncorhynchus tshawytscha* หรือปลา King Salmon พบว่า ฮีโมโกลบินของปลาชนิดนี้มีหลายชนิด แบ่งออกเป็นกลุ่มแอโนดิก ซึ่งจะพบทุกระยะของการเจริญเติบโต และกลุ่มแคโรติกที่พบเฉพาะในช่วงปลาโตเต็มวัย ฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติกจะแสดงคุณสมบัติการมีค่าความชอบต่อออกซิเจน ($P_{50} = 10.2$ มิลลิเมตรปรอท ที่ 13 องศาเซลเซียส pH 7.3) มากกว่ากลุ่มแอโนดิก ($P_{50} = 21.8$ มิลลิเมตรปรอท ที่ 13 องศาเซลเซียส pH 7.3) การจับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบินกลุ่มแอโนดิก จะไวต่อ pH อุณหภูมิ ซึ่งมีความต้านทานต่ออุณหภูมิในการเสื่อมสภาพต่ำ (temperature denaturation) ที่ pH 6.0 – 8.0 และขึ้นกับสารฟอสเฟตอินทรีย์ (ATP และ GTP) ส่วนการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติก จะไม่ขึ้นกับ pH และสารฟอสเฟตอินทรีย์ นอกจากนี้พบว่ามีปฏิกิริยาออกซิเดชัน (autoxidation) ที่ pH 7 หรือต่ำกว่า และปฏิกิริยาจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ Cl^- มากขึ้น

Fago *et al.* (1995) กล่าวว่า ฮีโมโกลบินของปลาไหลยุโรป *Anguilla anguilla* มี 2 กลุ่มที่สำคัญตามเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ ฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติก ซึ่งมีค่า pI สูง มีความชอบต่อออกซิเจนสูง มีบอร์เอฟเฟกเพียงเล็กน้อยหรืออาจมีรีเวิร์สบอร์เอฟเฟกด้วย และสารฟอสเฟตอินทรีย์ชนิด GTP และ ATP มีผลต่อการทำงานมากกว่าฮีโมโกลบินของอีกกลุ่ม โดยกล่าวว่ากลุ่มแคโรติก ช่วยเก็บออกซิเจนเข้าเหงือกภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำและภาวะเป็นกรด และฮีโมโกลบินอีกกลุ่มคือ กลุ่มแอโนดิก ซึ่งมีค่า pI ต่ำ มีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ และ pH มีผลต่อการทำงานมาก

Pellegrini *et al.* (1995) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินจากปลา *Muraena Helena* หรือปลา Moray พบว่าการศึกษาโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ฮีโมโกลบินมีฟิโนไทป์แตกต่างกัน 3 แถบ โดย

ฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติก 1 แแถบ และกลุ่มแอโนติก 2 แแถบ ฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติก จะแสดงการมีความชอบต่อออกซิเจนเป็น 4 เท่าของชนิดแอโนติก ทั้ง 2 แแถบ มีบอร์เอฟเฟกต์น้อยมาก และเมื่อเติม ATP และ GTP จะลดค่าความชอบต่อออกซิเจนได้อย่างมีนัยสำคัญ ประมาณ 3 – 4 เท่าขณะที่ไม่มีฟอสเฟต ส่วนฮีโมโกลบินกลุ่มแอโนติก ไม่พบลักษณะที่แตกต่างจากนี้ และแสดงการเพิ่มบอร์เอฟเฟกต์และรูทเอฟเฟกต์ ภายใต้การควบคุมของ ATP และ GTP ที่แตกต่างจากชนิดแคโรติก แต่ส่งผลต่อความชอบต่อออกซิเจนที่เหมือนกัน

Perry and Tufts (1998) กล่าวว่า การเกิด oxygenation ของฮีโมโกลบินเป็นแบบ exothermic คือ สามารถทำให้เกิดความร้อนขึ้น (enthalpy) โดยปกติความร้อนจะแทรกซึมอยู่กับออกซิเจนที่ยังไม่ได้ให้กับเนื้อเยื่อ และจะถูกปลดปล่อยขณะที่เกิด oxygenation ที่เหงือก สัญลักษณ์แทนค่าความร้อน คือ ΔH_{app} ซึ่งเท่ากับ $2.303R(\Delta \log P_{50} / \Delta (1/T))$ โดยค่า R เป็นค่าคงที่ของแก๊ส (gas constant) และค่า T เป็น absolute temperature ซึ่งความร้อนจะเกิดจากการแตกตัวเป็นไอออน และการจับและการปลดปล่อยไอออนทั้งโปรตอนและไอออนลบ (anion) ความร้อนที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินลดลง ทั้งนี้เกี่ยวกับ pH ที่ลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความร้อน (- 0.01 ถึง - 0.02 pH ยูนิตต่อองศาเซลเซียส) ซึ่งมีผลในลักษณะบอร์เอฟเฟกต์ และอาจเกี่ยวกับรูปฮีโมโกลบินที่ไม่ให้ออกซิเจนแก่เนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความร้อน จึงลดการบรรจุ (loading) ออกซิเจนที่เหงือกทำให้ปริมาณออกซิเจนในเลือดลดลง

Perry and Tufts (1998) กล่าวว่า ปลาที่มีฮีโมโกลบินหลายชนิด เช่น ในกลุ่มปลา Elasmobranchs มี 12 – 13 ชนิด เป็น ไอโซฮีโมโกลบิน (isohemoglobin; Iso Hbs) มีโครงสร้างคล้ายฮีโมโกลบินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแตกต่างกันตามการพัฒนา (development) เช่น ฮีโมโกลบินกลุ่มแอโนติก ของปลา Salmonid ที่มี 95 เปอร์เซ็นต์ขณะที่เป็นลูกปลาวัยอ่อน (fly) ในน้ำจืด และจะเหลือเพียง 55 เปอร์เซ็นต์เมื่อเป็นปลา Coho salmon ตัวเต็มวัยในทะเล ฮีโมโกลบินของปลาแต่ละชนิดมีลักษณะโครงสร้างแตกต่างกัน (Hb polymorphism) เรียกว่า allo Hbs โดยความแตกต่างนี้เป็นผลจากความแตกต่างกันตั้งแต่ระดับยีน (gene) เพื่อการดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน และมีการจัดกลุ่มฮีโมโกลบินในปลาได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดแอโนติกเป็นหลัก ซึ่งมีคุณสมบัติบอร์เอฟเฟกต์ รูทเอฟเฟกต์ ฟอสเฟตเอฟเฟกต์ (phosphate effect) และผลจากอุณหภูมิ (temperature effect) ได้แก่ ปลา Carp กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยฮีโมโกลบินกลุ่มแอโนติก ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนกลุ่มแรก และกลุ่มแคโรติก ซึ่งมีคุณสมบัติมีความชอบต่อออกซิเจนสูง มีบอร์เอฟเฟกต์เพียงเล็กน้อยหรือบางครั้งมีรีเวิร์สบอร์เอฟเฟกต์ และมีอุณหภูมิเอฟเฟกต์ต่ำ เช่น ปลา

เทร้าและปลาไหล และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยฮีโมโกลบินที่แสดงความไวต่อ pH แต่จะไม่มีผลจากอุณหภูมิ ได้แก่ ปลาทูน่า

Chong *et al.* (1999) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินจากปลา *Dasyatis akajei* หรือ ปลา Stingray ซึ่งเป็นปลาในกลุ่มปลาคกระดูกอ่อน (cartilaginous fish) พบว่า โครงสร้างคดียภูมิในรูปคือออกซีฮีโมโกลบินและรูป carbonmonoxyhemoglobin ของปลาชนิดนี้มีความเหมือนกับ HbA ของคน คือเป็น $\alpha_2\beta_2$ และโครงสร้างจตุรภูมิของปลาชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงที่สัมพันธ์กับสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีเขี้ยว (jawed vertebrate) มีความแตกต่าง (deviations) ระหว่างฮีโมโกลบินของปลาชนิดนี้กับ HbA ซึ่งถูกพบในหลายๆส่วนของโมเลกุล เช่น ที่เกลียว E และ F และพบว่ามี การกลาย (mutation) และ/หรือ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง β_2 บริเวณรอบๆฮีมที่บริเวณปลาย C ของหน่วยย่อยเบต้า ที่บริเวณผิวหน้า (interface) ระหว่างส่วน α_2 กับ β_2 และบริเวณที่ใช้จับฟอสเฟตอินทรีย์ของ HbA อย่างไรก็ตามความแตกต่างด้านโครงสร้างความชอบต่อออกซิเจน heme – heme interaction บอร์เอฟเฟก และผลของฟอสเฟตอินทรีย์ของฮีโมโกลบินของปลาชนิดนี้มีค่าลดลงพอประมาณ และเมื่อเปรียบเทียบกับ HbA ของคนจะพบว่าความแตกต่างทุกอย่างในอะตอมของสายหลักที่บริเวณเกลียวฮีโมโกลบินของปลาชนิดนี้มีมากกว่าในฮีโมโกลบินของปลาคกระดูกแข็ง (bony fish)

Prisco *et al.* (2000) กล่าวว่า ปลาที่มีฮีโมโกลบินหลายชนิดและมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน เรียกว่า Iso Hbs เช่น ปลากลุ่ม Salmonids มีฮีโมโกลบิน 8 – 19 ชนิด ความหลากหลายของฮีโมโกลบินในปลาพบว่ามีความแตกต่างตั้งแต่ระดับยีน ส่งผลให้มีหน้าที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสสามารถแบ่งฮีโมโกลบินของปลาเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแอโนดิก มีค่า pI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 และกลุ่มแคโทดิก มีค่า pI มากกว่าหรือเท่ากับ 8 โดยกลุ่มแอโนดิก สามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆและในปลา ดังนั้นกลุ่มแอโนดิกจึงถือว่าเป็นฮีโมโกลบินหลักในปลา ที่มีคุณสมบัติมีความชอบต่อออกซิเจนต่ำ มีบอร์เอฟเฟกและรูทเอฟเฟก ส่วนกลุ่มแคโทดิก จะพบในปลาเท่านั้น มีคุณสมบัติที่มีความชอบต่อออกซิเจนสูง ไม่มีบอร์เอฟเฟกหรือบางครั้งอาจมีรีเวิร์สบอร์เอฟเฟก เชื่อว่าเมื่อกลุ่มแอโนดิกได้รับผลกระทบจากบอร์เอฟเฟกและรูทเอฟเฟก กลุ่มแคโทดิกจะทำหน้าที่เป็นตัวเก็บออกซิเจน (oxygen carrier) ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและภาวะเลือดเป็นกรด (acidosis)

Tamburrini *et al.* (2001) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Gymnothorax unicolor* หรือปลา Brown Moray พบว่า ฮีโมโกลบินของปลาชนิดนี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแคโทดิกและกลุ่ม

แอนโอดิจตามความแตกต่างของค่า pI (ภาพที่ 4) คุณสมบัติการจับกับออกซิเจนของฮีโมโกลบินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยศึกษาอิทธิพลของ Cl^- และ/หรือ GTP หรือ ATP ในช่วง pH 6.5 – 8.0 พบว่า ฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติกขณะไม่มีฟอสเฟตจะแสดงรีเวิร์สเบอร์เอฟเฟกเพียงเล็กน้อย มีความชอบต่อออกซิเจนสูง และมี cooperativity ต่ำ ซึ่ง Cl^- มีผลลดค่าความชอบต่อออกซิเจนเพียงเล็กน้อย และ GTP หรือ ATP จะทำให้ค่าความชอบต่อออกซิเจนลดลง ส่วนค่า cooperativity จะสูงขึ้นและทำให้รีเวิร์สเบอร์เอฟเฟกหายไป ส่วนฮีโมโกลบินกลุ่มแอนโอดิกขณะที่ไม่มีฟอสเฟตจะมีค่าความชอบต่อออกซิเจนและค่า cooperativity ต่ำเหมือนกัน แต่แสดงเบอร์เอฟเฟกปกติ เมื่อเติม Cl^- จะทำให้เพิ่มค่า cooperativity ขณะที่ ATP และ GTP จะลดค่าความชอบต่อออกซิเจนที่ pH เป็นกรด และการเพิ่มเบอร์เอฟเฟกจะเพิ่มรูทเอฟเฟก



ภาพที่ 4 แสดงค่า pI ของฮีโมโกลบินจากปลา *G. unicolor* (เลนที่ 1) ฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติก (เลนที่ 2) ฮีโมโกลบินกลุ่มแอนโอดิก (เลนที่ 3) ด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง แอมโฟไลต์ pH 3.5 - 10.0 ฮีโมโกลบินได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิด DEAE – เซลลูโลส (DEAE- cellulose)

ที่มา: Tamburrini *et al.* (2001)

เกรียงไกร (2548) ได้ศึกษาฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เมื่อใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าฮีโมโกลบินของปลานิลมี 9 – 11 ชนิด โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสและเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถแบ่งฮีโมโกลบินเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแอนโอดิก มีประมาณ 45.72 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมด และกลุ่มแคโรติก ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย คือกลุ่มแคโรติก I และกลุ่มแคโรติก II มีประมาณ 47.62 และ 6.66 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินทั้งหมด กลุ่มแอนโอดิกเคลื่อนที่ในระบบอิเล็กโตรโฟรีซิสจากซ้ายไปขวามากกว่ากลุ่มแคโรติก โดยเทคนิค

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่า ฮีโมโกลบินกลุ่มแอนดิก มีค่า pI 5 - 9 ค่าซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 5.28 – 6.80 และกลุ่มแคธodik มีค่า pI 8 – 10 ค่ามีค่าอยู่ในช่วง 7.27 – 9.71 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ ฮีโมโกลบินโดยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเดกซ์ G-100 พบว่า ฮีโมโกลบินของปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุล 60,792 ดาลตันและโดยเทคนิคแมสเปกโตรเมทรี พบว่า ฮีโมโกลบินของปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุล 62,954 ดาลตัน ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน โดยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14,021 - 16,561 ดาลตัน โดยเฉลี่ยประมาณ 15,415 ดาลตัน และโดยเทคนิคแมสเปกโตรเมทรี พบว่า หน่วยย่อยของฮีโมโกลบินของปลานิล มีน้ำหนักโมเลกุล 15,340 15,621 และ 16,126 ดาลตัน ซึ่งเป็นสายของกลอบิน 3 ชนิด คือ α_1 , α_2 และ β ตามลำดับและจากการศึกษาคุณสมบัติทางโลหิตวิทยา พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยของปลานิลมีค่า 25.80 ± 3.71 เปอร์เซ็นต์ (mean $\pm$ S.E.) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 21.00 - 34.00 เปอร์เซ็นต์และค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลานิลมีค่าอยู่ในช่วง 5.21 - 9.49 กรัมต่อเดซิลิตร หรือเฉลี่ยที่ 7.05 ± 1.08 กรัมต่อเดซิลิตร (mean $\pm$ S.E.)

ปลาดุก

ปลาดุกมีถิ่นอาศัยแพร่กระจายทั่วไปในแถบเอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทวีปแอฟริกา (Teugels, 1996) ที่พบในประเทศไทยเป็นปลาดุกสกุล *Clarias* ซึ่งเป็นปลาพื้นบ้านที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดทั่วไป แม้แต่ในหนองน้ำขุ่นที่มีน้ำอยู่เพียงเล็กน้อยปลาชนิดนี้ก็สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากปลาดุกเป็นปลาที่มีอวัยวะพิเศษที่ช่วยในการหายใจ จึงสามารถดำรงชีวิตอยู่ในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำได้ หรือในน้ำที่ค่อนข้างกร่อยปลาดุกก็ยังสามารถอาศัยอยู่ได้เป็นอย่างดี (กองประมงน้ำจืด, 2538)

ปลาดุกสกุล *Clarias*

ปลาดุกในสกุล *Clarias* จัดเป็นปลากลุ่มใหญ่ที่สุดในปลาวงศ์ Clariidae ประกอบไปด้วยปลามากกว่า 45 ชนิด ปลาหลายชนิดในสกุลนี้มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Garcia-Franco, 1993) ปลาในสกุลนี้เป็นปลาไม่มีเกล็ด มีหนวด 4 คู่ ครีบหลังไม่มีก้าน ครีบแข็ง แต่มีก้านครีบบ่อน 48-78 อัน จำนวนก้านครีบกัน 41-61 อัน ครีบหางและครีบหลังไม่ติดกัน ครีบอกมีก้านครีบแข็ง (pectoral spine) ข้างละ 1 อัน ลักษณะกลมใหญ่ปลายแหลม อาจะหยักทั้งสองด้านหรือ

ด้านหน้าด้านเดียว ลักษณะปลายกระดูกท้ายทอย (occipital process) อาจแหลมหรือป้าน และความยาวกระดูกท้ายทอยจะเป็นกึ่งเท่าของฐานและจุดเริ่มต้นของครีบท้องจะอยู่ใกล้หรือห่างจากกระดูกท้ายทอยขึ้นอยู่กับชนิด ปลาตุ๊กสกุล *Clarias* ที่พบในประเทศไทยโดยการรายงานของโสภา (2513) ได้แก่

1. ปลาตุ๊กค้ำ (Clarias batrachus)

ปลาตุ๊กค้ำมีชื่อท้องถิ่นหลายชื่อ เช่น ตุ๊กเลา ตุ๊กแดง ตุ๊กเอน ตุ๊กเผือก เป็นปลาที่มีรูปร่างยาว ความลึกของลำตัวประมาณ 1 ใน 6.0-7.5 และหัวยาวประมาณ 1 ใน 3.50-3.75 ของความยาวมาตรฐาน กระดูกท้ายทอยค่อนข้างแหลม ความกว้างของฐานประมาณ 2 เท่าของความยาวกระดูก frontal frontanelle ลักษณะของกระดูกหัวขรุขระ ตาเล็ก ช่องว่างระหว่างตาใหญ่กว่าช่องปาก แต่เล็กกว่าหัว 2 เท่า หนวดที่ขากรรไกรบนยาวถึงก้านครีบท้องอันที่ 7 หรือ 8 หนวดที่คางยาวถึงปลายครีบอก ระยะห่างระหว่างจุดเริ่มต้นของครีบท้องกับปลายกระดูกท้ายทอยประมาณ 4.0 - 5.5 เท่าของระยะปลายสุดของจงอยปากถึงปลายสุดของกระดูกท้ายทอย จำนวนก้านครีบท้องอยู่ระหว่าง 65-77 อัน ก้านครีบก้น 41-58 อัน ครีบท้องกลมไม่ติดกับครีบท้องและครีบก้น ครีบท้องกลมมีก้านครีบอก 6 อัน มีความยาวถึงครีบก้นและยาวประมาณ 2 ใน 3 ของครีบอก ครีบอกกลม มีก้านครีบอก 1 อัน มีปลายแหลมหยักทั้งสองด้านความยาวเท่ากับระยะห่างจากหลังตาถึงช่องเปิดเหงือก ลักษณะฟันที่เพดานปากและที่ขากรรไกรบนเป็นฟันซี่เล็กๆ จำนวนกระดูกซี่กรอง (gill raker) 16-19 อัน ลำตัวมีสีเทาปนดำหรือสีขาว (ตุ๊กเผือก) และสีค่อนข้างแดง (ตุ๊กแดงหรือตุ๊กเอน) ปลาตุ๊กค้ำส่วนมากจะมีจุดขาวเล็กๆตามตัว มีรายงานพบทั่วประเทศไทย โดยพบอาศัยอยู่ในน้ำค่อนข้างนิ่งและขุ่น มีพื้นเป็นโคลนตม เช่น ห้วย หนอง บึง บ่อ คูน้ำ นาข้าว และในแอ่งน้ำขังหลังฤดูน้ำหลาก (โยธิน, 2524)

2. ปลาตุ๊ก (Clarias meladerma)

ปลาตุ๊กเป็นปลาที่มีลำตัวยาว ความสูงของลำตัวประมาณ 1 ใน 5.5-7.0 ของความยาวมาตรฐาน หัวยาวประมาณ 1 ใน 5.0-5.75 ของความยาวมาตรฐาน จากปลายจงอยปากถึงปลายกระดูกท้ายทอยยาวประมาณ 1 ใน 4.0-4.25 ของความยาวมาตรฐาน ส่วนหัวยาวเท่ากับส่วนลึก ลักษณะหัวแบน ขอบด้านหลังเฉียงลาด กระโหลกศีรษะด้านบนขรุขระ ปลายกระดูกท้ายทอยมีลักษณะป้านคล้ายกับปลาตุ๊กอู ระยะห่างระหว่างตาเกือบเท่ากับความกว้างของปาก มีหนวด 4 คู่ หนวดที่จมูกยาวถึงครีบท้อง หนวดที่ขากรรไกรยาวถึงครีบท้อง แต่หนวดที่คางสั้นกว่า ครีบท้องมีก้านครีบอก 52-61 อัน ครีบท้องมีก้านครีบอก 1 อัน ก้านครีบอก 9 อัน ครีบท้องและครีบก้นไม่ติดกับ

ครีบบาง ครีบบ้างกลมยาวถึงครีบก้นและยาวประมาณ 2 ใน 3 เท่าของความยาวของครีบบู มีกระดูกซี่กรอง 15 อัน มี 2 อันอยู่ทางส่วนหน้า ฟันที่ขากรรไกรบนและล่างและที่กระดูกส่วนกลางของเพดานปากมีลักษณะเล็กและแหลมคม ปลาชนิดนี้มีลักษณะเด่นที่เห็นได้ชัดเจน คือ ก้านครีบก้น ด้านหน้าของครีบอกเป็นหยักหรือเป็นหนามแหลมเห็นได้ชัด ปลาฉีกนอกจากจะมีกระดูกหัวคล้ายกับปลาฉีกอยู่แล้วยังมีลำตัวเป็นสี่เหลี่ยมคางหมูคล้ายกันด้วย แหล่งที่สำรวจพบ คือ จังหวัดพิจิตร และจังหวัดนครสวรรค์ (Mongkolprasit *et al.*, 1997)

3. ปลาฉีก (Clarias macrocephalus)

ปลาฉีกมีลักษณะคล้ายกับปลาฉีกด้านมาก แต่ลักษณะที่แตกต่างกัน คือ ปลา occipital process มีลักษณะโค้งมน ความกว้างของฐานประมาณ 3-5 เท่าของความยาวฐานครีบก้น ครีบบางและครีบก้นไม่ติดกัน ระยะจากปลายกระดูกท้ายทอยถึงจุดเริ่มต้นของครีบก้นประมาณ 1 ใน 5-7 ของความยาวจากปลายสุดของจงอยปากถึงปลายกระดูกท้ายทอย ครีบก้นมีก้านครีบก้น 68-72 อัน ครีบก้น 47-52 อัน มีจำนวนกระดูกซี่กรอง (gill raker) ประมาณ 32 ซึ่งลักษณะสีของลำตัวมีสีเทาปนดำและสีเหลือง เมื่อดูอย่างผิวเผินคล้ายปลาฉีกแต่ต่างกันตรงก้านครีบก้นของครีบอก มีรายงานพบทั่วประเทศ แหล่งที่พบคือ แม่น้ำ ลำคลอง หนองบึง (Mongkolprasit *et al.*, 1997)

4. ปลาฉีกลำพัน (Clarias nieuhofii)

ปลาฉีกลำพันมีรูปร่างลักษณะทั่วไปคล้ายกับปลาฉีกมาก แต่ลำตัวจะค่อนข้างยาว เดิมเชื่อกันว่าลักษณะเด่นของปลาฉีกลำพันคือ ครีบก้น ครีบก้นและครีบบางติดกัน แต่ภายหลังพบว่า ลักษณะดังกล่าวมีความแปรปรวนภายในชนิดสูง นอกจากนี้ลักษณะฟันที่กระดูกส่วนกลางเพดานปาก (vomerine teeth) มีลักษณะแตกต่างไปตามชนิด Smith (1945) รายงานว่าปลาฉีกสกุล *Prophagorus* (ชื่อสกุลเก่าของปลาฉีกลำพัน) ที่พบในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ *P.nieuhofii* และ *P. cataractus* ลักษณะของปลาฉีกลำพันชนิด *P.nieuhofii* คือ มีลำตัวยาวมาก ความลึกของลำตัวประมาณ 1 ใน 8.8-9.0 ของความยาวทั้งหมด หัวยาวประมาณ 1 ใน 6.2 ของความยาวทั้งหมด กระดูกท้ายทอยแบนคล้ายปลาฉีก frontal fontanel อยู่ห่างจากหลังขอบตามาก และมีขนาดเท่ากับ occipital fontanel ตาเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ใน 13 ของหัว ระยะห่างระหว่างตา ยาวกว่าช่องเปิดของปากซึ่งยาวไม่ถึงครึ่งหนึ่งของหัว หนวดที่งอกยาวถึงขอบหลังของ occipital fontanel หนวดที่ขากรรไกรบนยาวถึงปลายของครีบอก หนวดที่ขากรรไกรล่างยาวถึงฐานครีบอก ระยะจากปลายกระดูกท้ายทอยถึงหน้าครีบก้นประมาณ 1 ใน 2.6 ของหัว (วัดจากปลายสุดของจงอยปากถึง

ปลายสุดของกระดูกท้ายทอย) ครีบหางกลม ฐานของครีบหลัง ครีบกันและครีบหางติดกัน แต่แยกกันตรงปลายครีบเล็กน้อย ครีบท้องค่อนข้างกลมอยู่ใกล้กับรูทวารมากและตรงส่วนปลายทับครีบกันยาวประมาณ 1 ใน 3.5 ของหัว ครีบอกสั้นกลม ยาวไม่ถึงระดับเดียวกับจุดเริ่มต้นของครีบหลัง หรือยาวประมาณ 1 ใน 3.1 ของหัว ก้านครีบเดี่ยวของครีบอกแข็งแรง มีจำนวนก้านครีบหลังและครีบกันอยู่ระหว่าง 87-106 อัน และ 69-95 อัน ตามลำดับ ฟันที่กระดูกส่วนกลางของเพดานปาก (vomerine teeth) เป็นแถบรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescentric band) และมีปุ่มยื่นจากบริเวณกลางแถบฟันออกไปทางด้านหลัง ซึ่งปุ่มที่ยื่นออกไปนี้ ใช้แยกความแตกต่างจาก *P. cataractus* ซึ่งแถบฟันดังกล่าวเป็นแถบโค้งมนเล็กน้อย และไม่มีปุ่มลักษณะดังกล่าว ปลาตุ๊กตาฟันมีสีลำตัวค่อนข้างดำ มีจุดสีขาวตามลำตัว ยกเว้นที่ท้อง จุดสีขาวทางด้านบนของลำตัวเรียงกันเป็นแถวตามขวางประมาณ 13-20 แถว สราวุธ และคณะ (2538) รายงานว่า ลักษณะสีของลำตัวปลาตุ๊กตาฟันจะเปลี่ยนไปตามอายุ ขนาด และสภาพแวดล้อม โดยปลาขนาดโตเต็มวัยมีสีน้ำตาลเข้ม แต่เมื่อนามาเลี้ยงในบ่อจะมีสีน้ำตาลเหลือง ปลาตุ๊กตาฟันพบแพร่กระจายในหมู่เกาะอินโด-ออสเตรเลีย แถบหมู่เกาะมะละกาในฟิลิปปินส์ ในประเทศไทยสำรวจพบในภาคใต้ฝั่งตะวันออก ในภาคตะวันออกพบที่จังหวัดตราด (โสภณ, 2513) ปลาตุ๊กตาฟันเป็นปลาที่ค่อนข้างทนทานและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพดินหรือน้ำที่เป็นกรดและมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ จึงทำให้ปลาชนิดนี้มีการแพร่กระจายค่อนข้างแคบ มีแหล่งอาศัยจำกัดเฉพาะในสภาพป่าพรุที่รกทึบเท่านั้น ไม่มีรายงานพบว่าพบปลาชนิดนี้เลยในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป ปัจจุบันปลาตุ๊กตาฟันเป็นปลาที่ค่อนข้างหายากและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (สราวุธ และคณะ, 2538)

5. ปลาตุ๊กตา (Clarias gariepinus)

ปลาตุ๊กตา ดุกเทศ หรือดุกรัสเซีย เป็นปลาที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา สันนิษฐานว่ามีการนำเข้ามาในประเทศไทย โดยผ่านทางสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ในปี พ.ศ. 2528 (มานพ และคณะ, 2533) ปลาตุ๊กตามีลักษณะเด่น คือ มีหัวใหญ่และแบน กระโหลกเป็นตุ่มๆไม่เรียบ มีรอยบุ๋มตรงกลางเล็กน้อย ใต้คางและผนังท้องมีสีขาวตลอดจนถึงโคนหาง มีหนวด 4 คู่ โคนหนวดใหญ่ ลักษณะกระโหลกเป็นหยักแหลม มี 3 หยัก ปากแบนแบนหนา ฟันที่เพดานเรียงตัวกันเป็นแผ่นรูปพระจันทร์เสี้ยว ที่ครีบหุ้มมีก้านครีบแข็งเป็นเงี่ยงใหญ่แต่สั้นนุ่มไม่แหลม และมีส่วนของเนื้อเยื่อหุ้มถึงปลายครีบแข็ง ปลายครีบหลังมีสีออกแดง ครีบหางกลมใหญ่ สีเทา ปลายครีบหางมีสีแดงและมีแถบสีขาวคาดบริเวณคอหาง สีลำตัวออกสีเทา หรือเทาอมเหลือง ไม่มีจุดประตามลำตัว เมื่อปลาโตเต็มวัยจะปรากฏลายคล้ายหินอ่อนอยู่ทั่วตัว ปลาตุ๊กตาเป็นปลาซึ่งทำให้การเพาะเลี้ยงปลาดุกในประเทศไทยเปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก หลังจากที่ถูกผู้วิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สถาบันวิจัย

ประมงน้ำจืด กรมประมง ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมข้ามพันธุ์ ระหว่างปลาดุกอุยเทศเมียกับ ปลาดุกยักษ์เพศผู้ ได้ลูกปลาผสมเรียกว่า “บักอูย” หรือ “ดุกอุยเทศ” ในปี พ.ศ. 2531 ปลาดุกลูกผสมที่ได้มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วกว่าและมีความต้านทานโรคต่างๆ ได้ดีกว่าปลาดุกอุย จึงได้ส่งเสริมให้เกษตรกรลองเลี้ยงดู ปรากฏว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ทำให้ปลาดุกอุยเทศเข้ามาแทนที่ตลาดปลาดุกอุยและปลาดุกด้านอย่างรวดเร็ว ส่วนการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุยเพศผู้กับปลาดุกเทศเมีย พบว่าลูกที่ได้ไม่แข็งแรงและมีอัตราการรอดต่ำ ส่วนการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกด้านกับปลาดุกยักษ์ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร (มานพ และคณะ, 2531)

ปลาตะเพียน

ปลาตะเพียนขาวจัดอยู่ในครอบครัว Cyprinidae ซึ่งเป็นครอบครัวของปลาน้ำจืดมีเกล็ดในประเทศไทยที่ใหญ่ที่สุด แบ่งเป็น 55 สกุลใน 4 ครอบครัวย่อย ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นปลาที่มีความสำคัญทางด้านการเศรษฐกิจและการอนุรักษ์ เช่น ปลาช่อนไทย (*Probarbus jullieni*) ปลาตะเพียนทอง (*Puntius altus*) ปลากระโห้ (*Catlocarpio siamensis*) ปลาตะโกก (*Cyclocheilichthys enoplos*) และปลาหางไหม้ (*Balantiocheilos melanopterus*) เป็นต้น สำหรับสกุลของปลาตะเพียนขาว มีผู้จำแนกแตกต่างออกเป็น 2 สกุล คือ สกุล *Barbus* และสกุล *Puntius* แต่โดยทั่วไปแล้วจะใช้สกุล *Puntius* ซึ่งลักษณะที่สำคัญของปลาในสกุลนี้ คือ ลำตัวแบนข้างมาก รูปร่างค่อนข้างยาวรี ปากยื่นหุบเฉียงลง มีหนวด 2-4 คู่ พบในประเทศไทยจำนวน 32 ชนิด (Smith, 1945) นอกจากนี้ Smith ยังพบว่าปลาตะเพียนขาวมีในแถบประเทศกลุ่มอินโดจีน เกาชาวกา เกาสุมาตราและประเทศไทย สำหรับในประเทศไทยนั้น Suvatti (1950) พบว่ามีปลาตะเพียนขาวในแม่น้ำตามจังหวัดต่างๆ ของภาคกลางและภาคเหนือ เช่น แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำนครนายก แม่น้ำป่าสัก แม่น้ำปิง สมโภชน์ และคณะ (2519) ได้พบการแพร่กระจายของปลาตะเพียนขาวในแม่น้ำปิงตอนบน แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำโขง แม่น้ำมูล กว๊านพะเยา บึงบอระเพ็ด หนองหาร อ่างเก็บน้ำเขื่อนภูมิพล อ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์ สำหรับในภาคใต้ไม่มีรายงาน

ปลาตะเพียนขาวเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของไทย เนื้อมีรสชาดดี นิยมรับประทาน เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว เป็นปลาเกล็ดใหญ่ ลำตัวสีเงิน ส่วนหลังมีสีคล้ำเล็กน้อย ส่วนท้องมีสีขาวครีม ครีบท้องและครีบแก้มมีสีเหลืองปนส้มเล็กน้อย ครีบหูมีสีเหลืองอ่อนจางๆ ครีบหางและครีบหลังมีสีเทาปนเหลือง ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 3 ก้าน และก้านครีบอ่อน 8 ก้าน ก้านครีบแข็งอันสุดท้ายของครีบหลังเป็นกระดูกแข็งและหักทางด้านหลัง ครีบแก้มมีก้านครีบแข็ง 3 ก้าน และก้านครีบอ่อน 6 ก้าน เส้นข้างตัวมี 1 เส้น และมีเกล็ดตามเส้นข้างตัว 26-28 เกล็ด ลำตัว

กว้างแบนข้าง ส่วนหลังยกสูงขึ้น ความลึกของลำตัวเป็น 2.2-2.6 เท่าของความยาวมาตรฐาน ความยาวหัวเป็น 3.9-4.2 เท่าของความยาวมาตรฐาน จอยปากกลม ปากเล็กอยู่ปลายสุด มีหนวด 2 คู่สั้นมาก (พินิจและ โยธิน, 2527) ปลาชนิดนี้เป็นปลาที่นิยมใช้ในโครงการปล่อยปลาเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการประมงให้กับแหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาเลี้ยงได้ในบ่อดินที่มีขนาดตั้งแต่ 200 ตารางเมตรขึ้นไป มีความลึกเฉลี่ย 1.0 เมตร และยังสามารถเลี้ยงได้ในร่องสวน นาข้าวและกระชัง เนื่องจากเป็นปลาที่กินอาหารได้หลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นพืชน้ำและพืชบกบางชนิด พืชที่มีขนาดใหญ่ปลาจะเลือกกินส่วนที่อ่อน เช่นใบและยอด ส่วนอาหารประเภทสัตว์ก็พบว่ากินบ้างแต่น้อยมาก ซึ่งมักเป็นอาหารประเภทตัวอ่อนของแมลง ปลวก ไหม และกุ้งฝอยขนาดเล็ก ปากปลาชนิดนี้มีขนาดกว้างพอประมาณ มีฟันบดในลำคอเป็นชนิดคักบด ช่วยให้เคี้ยวพืชได้ดี ในการเพาะเลี้ยงอาจมีการให้อาหารสมทบ จำพวกแห่นเป็ด ผักบุ้ง เศษผัก หรือให้อาหารผสมประกอบด้วย ปลาข้าว รำ ละออง ปลาป่น กากถั่วลิสง ฯลฯ โดยให้วันละ 1 ครั้ง ในอัตรา 3-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ผลผลิตจากการเลี้ยงจะมีความแตกต่างกันไปตามรูปแบบของการเลี้ยงและชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง ผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงในบ่อดินที่มีการให้อาหารสมทบมีผลผลิตเฉลี่ย 400-600 กิโลกรัมต่อไร่ (พินิจและ โยธิน, 2527)

Hora and Pillay (1962) พบว่าลูกปลาคะเพียนขาวขนาดเล็กจะกินสาหร่ายเซลล์เดียวแพลงตอนและสัตว์ขนาดเล็ก จึงจัดอยู่ในจำพวกกินแพลงก์ตอน (plankton feeder) สํารอง (2512) พบว่าเมื่อลูกปลาคะเพียนขาวมีความยาวมากกว่า 5 นิ้วขึ้นไป จะเริ่มเปลี่ยนนิสัยมากินอาหารจำพวกพืชขนาดใหญ่ จึงจัดอยู่ในพวกกินพืชผัก (vegetable feeder) ด้วย

ปลาคะเพียนขาวสามารถแพร่ขยายพันธุ์วางไข่ได้ในแม่น้ำธรรมชาติ เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมอาจจะผสมพันธุ์วางไข่เองในบ่อเลี้ยงที่เป็นบ่อดิน แต่มีอัตราการผสมเป็นด้วและอัตราการรอดตายของลูกปลาดำเมื่อเทียบกับลูกปลาที่ได้จากการแพร่ขยายพันธุ์โดยวิธีฮอร์โมนผสมเทียม ปลาตะเพียนขาวขนาดโตเต็มวัยที่สมควรใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ควรเป็นปลาที่มีอายุเกิน 1 ปีขึ้นไป แม่พันธุ์ปลาที่จะนำมาเพาะพันธุ์จะต้องคัดปลาตัวที่มีท้องอูมเป่งและนิ่ม บริเวณช่องเพศมีสีชมพูและบวม ถ้าใช้มือลูบคลำตามลำตัว ครีบทูและกระดูกก็จะรู้สึกลื่น ส่วนพ่อพันธุ์ที่เหมาะสมบริเวณดังกล่าวจะสาก ถ้าเอามือบีบเบาๆ บริเวณช่องเพศของปลาเพศผู้จะมีน้ำเชื้อสีขาวคล้ายน้ำมันไหลออกมา (พินิจและ โยธิน, 2527) การเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้จะใช้วิธีฉีดฮอร์โมนผสมเทียมเร่งให้แม่ปลาวางไข่ โดยฉีดฮอร์โมนให้กับแม่ปลาที่มีไข่แก่ในอัตราความเข้มข้น 1-2 โด๊ส (dose) ปริมาณฮอร์โมนที่ฉีดให้แม่ปลานั้นขึ้นกับฤดูกาลและความสุกแก่ของไข่ ถ้าไข่แก่มากขึ้นก็ใช้ฮอร์โมนปริมาณลดลง ภายหลังการฉีดฮอร์โมนเสร็จแล้ว ประมาณ 6 ชั่วโมงก็สามารถฉีดไข่ผสมกับน้ำเชื้อได้โดยวิธีแห้ง

แบบดัดแปลง (modified dry method) ถ้าไม่ใช้วิธีผสมเทียมก็อาจปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์ผสมกันเองได้ โดยใช้ตัวเมียต่อตัวผู้ 1:1 ปล่อยลงในกระชังเดียวกัน แล้วใช้น้ำพ่นลงในกระชังตลอดเวลาเพื่อเป็นการช่วยเพิ่มออกซิเจน เพราะปลาที่ฉีดฮอร์โมนแล้วจะใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และการที่ปลาได้รับน้ำใหม่จะช่วยกระตุ้นให้แม่ปลาพร้อมที่จะวางไข่ ภายหลังการฉีดฮอร์โมนประมาณ 4-6 ชั่วโมง ปลาจะเริ่มผสมพันธุ์กัน ปล่อยทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงปลาจะไข่ออกหมด นำไข่ที่ได้ไปฟักในกรวยฟักไข่ หรือกระชังเพาะฟักก็ได้ ไข่ที่ได้รับการผสมจะฟักเป็นตัวภายในเวลา 8-12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิของน้ำ 26-31 องศาเซลเซียส (พินิจและโยธิน, 2527) หลังจากไข่ออกเป็นตัวแล้ว ต้องอนุบาลลูกปลานาขนาดเล็กในกระชังต่อไป โดยให้ไข่แดงต้มสุกบดละเอียดเป็นอาหารประมาณ 2-3 วัน จึงย้ายไปอนุบาลต่อไปในบ่อดินที่เตรียมไว้เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ จะได้ลูกปลามีความยาวประมาณ 3 เซนติเมตร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือดปลาอุกและปลาตะเพียน

อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาเบอร์ 23 ความยาว 1.0 นิ้ว
2. กระบอกฉีดยาขนาด 3 ซีซี
3. หลอดเก็บตัวอย่าง

สารเคมี

เฮปาริน (heparin)

สัตว์ทดลอง

ปลาอุกและปลาตะเพียนที่นำมาใช้ในการทดลองในครั้งนี้เป็นปลาที่ได้มาจากบ่อเลี้ยงปลาแบบปล่อยตามธรรมชาติของคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน โดยปลาที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นปลาที่มีขนาดโตเต็มวัย ปลาอุกที่โตเต็มวัยมีขนาดความยาวลำตัวมากกว่า 25 เซนติเมตรและมีน้ำหนักตัวมากกว่า 150 กรัมขึ้นไป ส่วนปลาตะเพียนที่โตเต็มวัยมีขนาดความยาวลำตัวมากกว่า 20 เซนติเมตรและมีน้ำหนักตัวมากกว่า 100 กรัมขึ้นไป ปลาทั้งสองชนิดคัดมาแบบคละเพศ จำนวนอย่างละ 30 ตัว โดยปลาทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยทางคลินิกในวันที่ทำการเก็บตัวอย่าง

วิธีการ

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาอุกและปลาตะเพียน โดยเจาะเก็บจากเส้น caudal vein ตัวละประมาณ 2 มิลลิลิตร นำตัวอย่างเลือดที่ได้แบ่งใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่บรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเฮปาริน เพื่อทำการเก็บ whole blood

2. การศึกษาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit;hct หรือ packed cell volume; PCV) ตามวิธีของ Brown (1993)

อุปกรณ์

1. เครื่องเซนตริฟิวจ์ (hematocrit centrifuge, Hettich 2011)
2. หลอดไมโครแคปิลลารี (micro-capillary tube)
3. ดินน้ำมัน (plasticine)
4. แผ่นเทียบค่าฮีมาโตคริต (hematocrit chart)

สารตัวอย่าง

เลือดปลาตุกและปลาตะเพียน (whole blood)

วิธีการ

1. ใช้หลอดไมโครแคปิลลารีดูดเลือดปลาตุกและปลาตะเพียนประมาณ 2 ใน 3 ของหลอด โดยผสมเลือดก่อนการดูด ใช้นิ้วชี้หรือนิ้วกลางอุดปลายหลอดไว้
2. ทำการอุดปลายหลอดไมโครแคปิลลารีด้านที่เหลือด้วยดินน้ำมัน
3. นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยหันด้านที่อุดดินน้ำมันออกด้านนอกชิดกับขอบจานเครื่องปั่นเหวี่ยง และวางหลอดไมโครแคปิลลารีให้สมดุลกัน
4. เมื่อครบตามเวลาก็นำหลอดไมโครแคปิลลารีไปอ่านเทียบกับแผ่นเทียบค่าฮีมาโตคริต ค่าที่ได้จะเป็นเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาตุกและปลาตะเพียน

3. การศึกษาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินโดยวิธี cyanmethemoglobin (Bio Medical Laboratories, Thailand)

อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV – visible recording spectrophotometer UV – 160, Shimadzu, Japan)

สารเคมี

1. น้ำยาฮีโมโกลบิน (hemoglobin reagent, Bio-Medical Laboratories, Thailand)
2. สารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐาน (hemoglobin standard, Bio-Medical Laboratories, Thailand)

สารตัวอย่าง

เลือดปลาตุคและปลาตะเพียน (whole blood)

วิธีการ

ทำการทดลองดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายฮีโมโกลบินปลาตุคและปลาตะเพียน

สารละลาย	blank	ตัวอย่างเลือดปลาตุค/ปลาตะเพียน
น้ำยาฮีโมโกลบิน(มิลลิลิตร)	5.0	5.0
ตัวอย่างเลือด (มิลลิลิตร)	-	0.02
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	0.02	-

ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีโมโกลบิน

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

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตารางที่ 2 มาสร้างกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตารางที่ 1 กับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียน

4. การเตรียมสารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมไลสจากเลือดปลาฉลามและปลาตะเพียน

อุปกรณ์

1. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge, Hermle Z 233 MK-2)
2. ครอปเปอร์ไปเปต (dropper pipette)
3. เครื่องวอร์เท็กซ์มิกเซอร์ (vortex mixer, Vortex Genie – 2TM)
4. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (0.90% sodium chloride, NaCl)
2. สารละลายฮีโมไลส (hemolysate reagent) ประกอบด้วย 0.005 โมลาร์ EDTA และ 0.07 เปอร์เซ็นต์โพแทสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide)

สารตัวอย่าง

เลือดปลาฉลามและปลาตะเพียน (whole blood)

วิธีการ

นำตัวอย่างเลือดของปลาฉลามและปลาตะเพียนมาปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้งด้วย 0.9 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเลือด แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสทิ้งและนำเม็ดเลือดแดงที่ได้มาเติมสารละลายอีโมไลเซตในอัตราส่วน 1 : 6 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์มิกเซอร์เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก นำไปปั่นที่ความเร็ว 11,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัดเศษเซลล์ (cell debris) และผนังเซลล์ (cell membrane) เก็บของเหลวหรือสารละลายอีโมโกลบินหรืออีโมไลเซตที่อยู่ด้านบนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป (ดัดแปลงจาก Tamburrini *et al.*, 2001; Fago *et al.*, 1995)

5. การศึกษาฟิโนไทป์และชนิดของอีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียนโดยวิธีเซลล์โลสอะซีเตติเล็กโตรโฟรีซิส และวิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

5.1 วิธีเซลล์โลสอะซีเตติเล็กโตรโฟรีซิส (Helena Laboratories, France, 2001)

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือเซลล์โลสอะซีเตติเล็กโตรโฟรีซิส (Helena Laboratories, France)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Titan Plus, Helena Laboratories, France)
3. แผ่นเซลล์โลสอะซีเตต (TITAN III-H) ขนาด 76 x 60 มิลลิเมตร
4. จานแก้ว
5. ตู้อบ (Memmert UM 500, Germany)
6. กระดาษกรอง เบอร์ 1

7. แผ่นสไลด์

8. กระดาษกรองแผ่นยาว (wick)

9. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล Quantity One (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-EDTA-กรดบอริก (Supre-Heme Buffer) pH 8.2-8.6

2. สีย้อมพองโซเอส (Ponceau S) ประกอบด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์พองโซเอส ในสารละลาย 3.5 เปอร์เซ็นต์กรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulfosalicylic acid) และ 3.5 เปอร์เซ็นต์กรดไทรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid)

3. สารล้างสีย้อม (destaining reagent) ประกอบด้วย 5 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก

4. สารละลาย clearing ประกอบด้วย

- กรดอะซิติก (acetic acid) 30 ส่วน
- เมทานอล (methanol) 70 ส่วน
- Clear aid 4 ส่วน (Helena Laboratories, France)

5. สารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐาน [hemoglobin control (AFSA₂)] (Helena Laboratories, France)

สารตัวอย่าง

สารละลายฮีโมโกลบินหรือฮีโมโกลเตคของปลาฉลามและปลาตะเพียน

วิธีการ

1. นำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์และเริ่มจับเวลาเมื่อบัฟเฟอร์ท่วมแผ่นเป็นเวลา 5 นาที

2. เทสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในอ่างอิเล็กทรอนิกส์ทั้ง 2 ข้างของชุดเครื่องมืออิเล็กทรอนิกส์ ใช้กระดาษกรองเป็นสะพานเชื่อมกระแสไฟฟ้าระหว่างแผ่นเซลล์โลส

อะซีเตตและสารละลายบัฟเฟอร์ โดยแช่ให้ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์และวางพาดลงในอ่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 ข้าง

3. หยอดสารละลายอีโมโกลบินของปลาฉลาม ปลาตะเพียนและสารละลายอีโมโกลบินมาตรฐานปริมาตร 8 ไมโครลิตรในช่องใส่ตัวอย่าง ปิดด้วยแผ่นสไลด์เพื่อป้องกันการระเหย

4. นำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตที่แช่ในบัฟเฟอร์ครบ 5 นาทีมาซับด้วยกระดาษกรองให้หมาด วางแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตบนเพลทแอปพลิเคเตอร์ (applicator plate) ที่ตำแหน่งขั้วลบ (cathode application) แล้วใช้แอปพลิเคเตอร์ (applicator) เคลือบสารละลายอีโมโกลบินของปลาฉลาม ปลาตะเพียนและสารละลายอีโมโกลบินมาตรฐานที่หยอดไว้ในช่องใส่ตัวอย่างมาลงบนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตต

5. นำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตที่ใส่ตัวอย่างแล้วมาวางคว่ำหน้าบนอ่างอิเล็กโทรด โดยหันด้านที่ใส่ตัวอย่างไว้ทางขั้วลบ ใช้แผ่นสไลด์วางทับลงบนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตเพื่อให้ผิวหน้าสัมผัสกับกระดาษกรองและปิดฝาอ่างอิเล็กโทรด

6. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 350 โวลต์ เป็นเวลานาน 25 นาที

7. เมื่อครบกำหนดเวลานำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตมาข้อมสีในสารละลายสีย้อมฟองโซเฮสเป็นเวลา 8 นาที

8. ล้างสีย้อมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก จนมองเห็นแถบของอีโมโกลบินชัดเจนหรือสังเกตจากแถบของสารละลายอีโมโกลบินมาตรฐาน

9. นำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตมาแช่ลงในเมธานอล 4 นาที หลังจากนั้นแช่ลงในสารละลาย clearing เป็นเวลา 9 นาที

10. นำแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้แผ่นเซลล์โลสอะซีเตตเปลี่ยนจากแผ่นทึบแสงเป็นแผ่นโปร่งแสง

11. ทำการสแกนแผ่นเซลล์โลสอะซีเตตและวิเคราะห์เพื่อศึกษาฟิโนไทป์หรือชนิดของอีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนโดยโปรแกรมวิเคราะห์ Quantity One

5.2 วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ดัดแปลงจาก Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

- ชุดเครื่องมืออิเล็กโทร โฟรีซิส (Mini Protein II, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power PAC 200, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3. ไมโครไซริงค์ (micro syringe, Fortuna[®], Transferpette[®]-digital) ขนาด 25 ไมโครลิตร
4. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)
5. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล Quantity One (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมแผ่นเจล ประกอบด้วย

- 1.1) สารละลายอะคริลาไมด์/บิส มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร (30%T, 2.67%C) (30% acrylamide / N,N' - methylene - bis – acrylamide stock solution) ประกอบด้วย อะคริลาไมด์ 14.6 กรัม และบิส 0.4 กรัม
- 1.2) 1.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.8
- 1.3) 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)
- 1.4) N, N, N', N' เทตราเมทิลีนไดเอมีน (N, N, N', N', - tetramethylenediamine; TEMED)

2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer) ประกอบด้วย

- 2.1) 0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 6.8
- 2.2) 99.99 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล
- 2.3) 1 เปอร์เซ็นต์บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue)
- 2.4) น้ำกลั่น

3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด pH 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 ประกอบด้วย

โคแมสซึบลูอาร์-250 (coomassie blue R-250) ในสารละลายล้างสีย้อม

สารตัวอย่าง

สารละลายอีโมโกลบินหรืออีโมไลเตสของปลาฉลามและปลาตะเพียน

วิธีการ

1. ทำการเตรียมแผ่นเจลดังนี้

- 1.1) เตรียมสารละลายสำหรับ continuous gel (12%T, 2.67%C และ 15%T, 2.67%C) ทั้งหมดยกเว้น TEMED และ 10 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตดังตาราง แล้วดูดอากาศออกด้วยปั๊มสุญญากาศ
- 1.2) ประกอบชุดเตรียมเจล ใส่ comb ในช่องว่างระหว่างกระจกเอียงทำมุมประมาณ 10 องศา
- 1.3) เติม TEMED และ 10 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลายเจลที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 แล้วปิดฝาช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนถึงขอบกระจก
- 1.4) จัด comb ให้อยู่ในแนวเส้นตรง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้เจลแข็งตัว (polymerization) ประมาณ 30 - 45 นาที

ตารางที่ 3 สูตรการเตรียมเจล

สารในการเตรียมเจล	ปริมาณสารในการเตรียมเจล	
	12%T	15%T
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	6.9	4.9
1.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.8 (มิลลิลิตร)	5	5
30 % สารละลายอะครีลาไมด์/บิส (มิลลิลิตร)	8	10
10 % แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ไมโครลิตร)	200	200
TEMED (ไมโครลิตร)	10	10

หมายเหตุ: สูตรสำหรับเจล 4 แผ่น

1.5) ทำการคั่ง comb อย่างระมัดระวังแล้วล้างหลุมเจดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด pH 8.3 จะได้เจดที่พร้อมใช้งาน จากนั้นประกอบแผ่นเจดเข้ากับชุดอิเล็กโทรด เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด pH 8.3 ในอ่างอิเล็กโทรดบนและล่างและให้ท่วมผิวหน้าเจด

2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยผสมสารละลายอีโมไลเซดกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสม ประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปหยอดใส่หลุมเจดด้วยไมโครไซริงค์

3. ต่อชุดอิเล็กโทรดโพริซิสที่พร้อมทำงานกับเครื่องจ่ายกระแสไฟ โดยตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 200 โวลต์คงที่และค่ากระแสไฟฟ้าที่ 60 มิลลิแอมแปร์ ต่อเจด 1 แผ่น ใช้เวลา 45 นาที

4. นำแผ่นเจดออกมาข้อมสี เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะข้อม)

5. ล้างสีข้อมโดยเปลี่ยนสารละลายล้างสีข้อม (เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะล้างสีข้อม) จนกระทั่งเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจดใส

6. เก็บแผ่นเจดในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

7. ทำการสแกนแผ่นเจดและนำภาพที่ได้มาทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาอีโมโกลบินฟิโนไทป์ของปลาอุกและปลาตะเพียนโดยโปรแกรมวิเคราะห์ Quantity One

6. การทำอีโมโกลบินให้บริสุทธิ์และการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินปลาอุกและปลาตะเพียนโดยวิธีเจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี (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 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ (sodium axide; NaN_3) pH 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

สารละลายอีโมโกลบินหรืออีโมไลเซตของปลาฉลามและปลาตะเพียน

วิธีการ

1. การเตรียมคอลัมน์

- 1.1) ชั่งเซฟาเดกซ์ G – 100 ในปริมาณที่ต้องการ (5 กรัม ได้ปริมาตรเจล 30 มิลลิลิตร) ทำให้พองอัมตัว (swelling) ด้วย 0.05 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ pH 7.4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- 1.2) เตรียมคอลัมน์ไว้ในตู้เย็น ปิดปลายล่างของคอลัมน์ เดิมบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์สูงประมาณ 1/3 ของคอลัมน์ รินบัฟเฟอร์ในเจลทิ้งให้เหลือบัฟเฟอร์ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของเจล แล้วทำการบรรจุเจลลงในคอลัมน์ โดยคนและเทเบาๆ ให้หมดในครั้งเดียว
- 1.3) เมื่อเจลเรียงตัวในคอลัมน์ ใส่ adapter และ equilibrate ด้วยทริสบัฟเฟอร์ที่อัตราไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาทีจนปริมาตรของเจลคงที่แล้วหาปริมาตรเจลที่

แน่นอนจากนั้น equilibrate ต่อไปประมาณ 1.5 เท่าของปริมาตรเจลจะได้คอลัมน์
เจลที่พร้อมใช้งาน

2. แยกโปรตีนมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 10
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และแยกโปรตีนในฮีโมไลสของปลาตุกและปลา
ตะเพียนที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชะ
ด้วยทริสบัฟเฟอร์ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

3. เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.8 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง
ที่ 280 นาโนเมตรสำหรับโปรตีน

4. สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกับปริมาตร (มิลลิลิตร)
ของแต่ละหลอด (fraction) ที่ได้ จากกราฟคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution
coefficient, K_d) ดังสูตร

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

โดยที่ V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ที่บรรจุเม็ดเจล (total volume)

V_e คือ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารออกมา (elution volume)

V_o คือ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ล้อมรอบเม็ดเจล (void volume)

5. นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การกระจายกับค่าลอการิทึมของ
น้ำหนักโมเลกุล (log molecular weight) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของปลาตุกและ
ปลาตะเพียน

7. การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของฮีโมโกลบินปลาตุกและปลาตะเพียนโดย
วิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทิโนอุสเจล
(discontinuous gel) (Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

- ชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini Protein II, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power PAC 200, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
- ไมโครไซริงค์ขนาด 25 ไมโครลิตร

4. เครื่องให้ความร้อน (Stuart Scientific รุ่น SHT 1, United Kingdom)
5. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker, MiniRocker MR-1, BioSan)
6. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล Quantity One (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมแผ่นเจล ประกอบด้วย

- 1.1) 30 เปอร์เซ็นต์สารละลายอะคริลาไมด์ / บิส จำนวน 50 มิลลิลิตร (30% T, 2.67% C) ประกอบด้วย อะคริลาไมด์ 14.6 กรัม และบิส 0.4 กรัม
- 1.2) 1.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.8
- 1.3) 0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 6.8
- 1.4) 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต
- 1.5) N, N, N', N' เทตราเมทิลลินไดเอมีน
- 1.6) 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (10% sodium dodecylsulfate; 10% SDS)

2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง

- 2.1) 0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 6.8
- 2.2) 99.9 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล
- 2.3) 1 เปอร์เซ็นต์บรอมฟินอลบลู
- 2.4) 2 - เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)
- 2.5) 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด pH 8.3 ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- 3.1) ทริส
- 3.2) ไกลซีน
- 3.3) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
- 3.4) น้ำกลั่น

4. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย

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

5. สีย้อม ประกอบด้วย

โคเมสซึบลูอาร์-250 ในสารละลายล้างสีย้อม

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

ประกอบด้วย

- 6.1) ไมโอซิน (myosin) น้ำหนักโมเลกุล 200 กิโลดาลตัน
- 6.2) เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) น้ำหนักโมเลกุล 116.25 กิโลดาลตัน
- 6.3) ฟอสโฟริเลส บี น้ำหนักโมเลกุล 97.4 กิโลดาลตัน
- 6.4) ซีรัมอัลบูมินของโค น้ำหนักโมเลกุล 66.2 กิโลดาลตัน
- 6.5) โอวัลบูมิน น้ำหนักโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน
- 6.6) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) น้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน
- 6.7) ตัวยับยั้งทริปซินของถั่วเหลือง (soy bean trypsin inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 21.5 กิโลดาลตัน
- 6.8) ไลโซไซม์ (lysozyme) น้ำหนักโมเลกุล 14.4 กิโลดาลตัน
- 6.9) อะโปรทีนิน (aprotinin) น้ำหนักโมเลกุล 6.5 กิโลดาลตัน

สารตัวอย่าง

สารละลายอีโมโกลบินของปลาดุกและปลาตะเพียนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน
เจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. ทำการเตรียมแผ่นเจลดังนี้

- 1.1) เตรียมสารละลายสำหรับ separating gel (18%T, 2.67%C) ทั้งหมดยกเว้น
TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตดังตาราง แล้วดูดอากาศออก
ด้วยปั๊มสุญญากาศ
- 1.2) ประกอบชุดเตรียมเจลและทำเครื่องหมายแสดงความสูงของ separating gel
บนแผ่นกระจก

- 1.3) เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลาย เจลแล้วเปิดฝาช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนถึงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมาย ปิดฝิหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นเบาๆ
- 1.4) ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 - 45 นาที
- 1.5) เตรียม stacking gel (4%T, 2.67%C) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับการเตรียม separating gel ดังตาราง

ตารางที่ 4 สูตรการเตรียมเจล

สารในการเตรียมเจล	ปริมาตรสารในการเตรียมเจล	
	18%T	4%T
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	2.7	6.1
1.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.8 (มิลลิลิตร)	5	-
0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ pH 6.8 (มิลลิลิตร)	-	2.5
10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (ไมโครลิตร)	200	100
30 % สารละลายอะครีลาไมด์/บิส (มิลลิลิตร)	12	1.3
10 % แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ไมโครลิตร)	200	100
TEMED (ไมโครลิตร)	10	5

หมายเหตุ: สูตรสำหรับเจล 4 แผ่น

- 1.6) เมื่อเจลแข็งตัวจะเกิดแนวเส้นตรงบริเวณผิวหน้าเจล ชับน้ำบนผิวหน้าเจลแล้วใส่ comb ในช่องว่างระหว่างกระจกเอียงทำมุมประมาณ 10 องศา
- 1.7) เติม TEMED และ 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ลงในสารละลาย stacking gel ปิดสารละลายเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกทันทีจนเต็ม แล้วจัด comb ให้อยู่ในแนวเส้นตรง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 - 45 นาที
- 1.8) ทำการดึง comb อย่างระมัดระวังแล้วล้างหลุมเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด pH 8.3 จะได้เจลพร้อมใช้งาน จากนั้นประกอบแผ่นเจลเข้ากับชุดอิเล็กโทรด เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรด pH 8.3 ในอ่างอิเล็กโทรดบนและล่างและให้ท่วมผิวหน้าเจล

2. เตรียมสารละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยผสมละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความร้อนสารละลายอีโมไลเซตและสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปหยอดใส่หลุมเจดด้วยไมโครไพริงค์

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

4. นำแผ่นเจลออกมาย้อมสีเป็นเวลา 30 นาที (เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะย้อม)

5. ล้างสีย้อม (เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะย้อม) จนกระทั่งเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจดใส

6. เก็บแผ่นเจลในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

7. ทำการสแกนแผ่นเจลและนำภาพที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของอีโมโกลบินปลาดุกและปลาดูเคเพียนโดยโปรแกรมวิเคราะห์ Quantity One

8. การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของอีโมโกลบินปลาดุกและปลาดูเคเพียนโดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี

หลักการ

อาศัยหลักการยิงแสงเลเซอร์ลงไปบนเพลท (plate) ที่มีตัวอย่างโปรตีนจับอยู่กับเมทริกซ์ ทำให้เกิดการแตกตัวของไอออน (ion) แล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้า ภายได้สภาวะดังกล่าว สารที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบกับตัวตรวจจับ (detector) ซึ่งจะส่งสัญญาณต่อไปยังซอฟต์แวร์คอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป

อุปกรณ์

1. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) แบบ MALDI – TOF (BRUKER DALTONICS Reflex IV, U.S.A.)

2. เพลทตัวอย่าง (sample plate) ที่มีโปรตีนอีโมโกลบินจับอยู่กับเมทริกซ์

สารเคมี

กรดไซแนพินิก (sinapinic acid) 0.01 โมลาร์เป็นเมทริกซ์

สารตัวอย่าง

สารละลายอีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิльтраชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างอีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนโดยนำอีโมโกลบินผ่านเจลฟิльтраชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G – 100 แล้วเก็บหลอดที่เป็นสารละลายอีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
2. ผสมสารละลายอีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนประมาณ 1 ไมโครลิตร (10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) กับกรดไซแนพินิกประมาณ 1 ไมโครลิตร ใส่ลงบนเพลทตัวอย่างผสมกันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดเบาๆ ปั่นอย่างช้าๆ ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
3. นำไปเข้าเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เมื่อยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์ (nitrogen laser) เครื่องจะรายงานผลตามน้ำหนักโมเลกุลผ่านทางหน้าจอคอมพิวเตอร์

9. การศึกษาค่า pI ของอีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียน โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini Protein II, 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. โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล Quantity One (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) เอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสของโค (bovine carbonic anhydrase) pI 6.00
 - 1.4) เอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสของคน (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) เลนทิลเล็คติน (lentil lectin) pI 7.80, 8.00 และ 8.20
 - 1.9) ไซโตโครมซี (cytochrome C) pI 9.60
2. แผ่นเจล IEF สำเร็จรูป ช่วง pH 3-10 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)
3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้แก่
 - 3.1 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับขั้วแคโทด (cathode buffer) ประกอบด้วย 20 มิลลิโมลาร์ไลซีนและอาร์จินีน (20 mM lysine และ 20mM arginine)
 - 3.2 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับขั้วแอโนด (anode buffer) ประกอบด้วย 7 เปอร์เซ็นต์กรดฟอสฟอริก (7% phosphoric acid)
4. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง ประกอบด้วย 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล (50% glycerol)
5. สารละลายที่ใช้ในการตรึง (fixing solution) ประกอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์กรดไทรคลอโรอะซีติก (10% trichloroacetic acid)
6. สารละลายล้างสีย้อม ประกอบด้วย กรดอะซีติก 10 ส่วน เอทานอล 25 ส่วนและน้ำกลั่น 65 ส่วน
7. สีย้อม ประกอบด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์โคแมสซิบลูอาร์ 250 ในสารละลายล้างสีย้อม

สารตัวอย่าง

สารละลายอีโมโกลบีนของปลาฉลามและปลาตะเพียนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน
เจลฟิเลทรันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่าง โดยผสมสารละลายอีโมโกลบีนของปลาฉลามและปลาตะเพียนในสารละลายสำหรับตัวอย่าง อัตราส่วน 1 : 5 ผสมให้เข้ากัน
2. นำเจลสำเร็จรูปใส่ในชุดเตรียมเจล
3. เทสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับหัวแคโรทอยใน chamber จนท่วมแผ่นเจล และเทสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับหัวแอโนดภายนอก chamber จนท่วมหัวแอโนด
4. ทำการต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าและ prerun ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์คงที่ กระแสไฟฟ้าที่ 10 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 60 นาที
5. หยอดสารตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานในหลุมเจล อย่างละ 10 ไมโครลิตร และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ
6. ปรับค่าการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนี้
 - 6.1) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์คงที่ ค่ากระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์ เวลา 60 นาที
 - 6.2) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์คงที่ ค่ากระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์ เวลา 60 นาที
 - 6.3) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 300 โวลต์คงที่ ค่ากระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์ เวลา 60 นาที
7. เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสครบตามลำดับแล้ว นำแผ่นเจลออกจากกระบอก แล้วตรึงโดยแช่แผ่นเจลใน 20 เปอร์เซ็นต์กรดไทรคลอโรอะซิติกเป็นเวลา 30 นาทีพร้อมกับเขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ
8. นำแผ่นเจลมาล้างด้วยสารละลายล้างสีข้อมและแช่เป็นเวลา 5 นาที เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ
9. ทำการล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ
10. ข้อมเจลด้วยสีข้อม เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติขณะข้อม

11. ล้างสีย้อม เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติจนเห็นแถบชัดเจนและพื้นหลังเจลอัส หลังจากนั้นเก็บเจลในน้ำกลั่นที่ 4 องศาเซลเซียส

12. ทำการสแกนเจลและนำภาพที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาค่า pI ของอีโมโกลบินปลาดุก และปลาตะเพียนโดยโปรแกรมวิเคราะห์ Quantity One

สถานที่ทำการวิจัย

1. ศึกษาฟิโนไทป์อีโมโกลบินของปลาดุกและปลาตะเพียนและคุณสมบัติทางชีวเคมีของอีโมโกลบิน ที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

2. ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินและของหน่วยย่อยอีโมโกลบินของปลาดุกและปลาตะเพียน โดยใช้เครื่องวิเคราะห์มวลสารแมสสเปกโตรมิเตอร์ ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ระยะเวลา

เริ่มการทำวิจัยตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2549 และสิ้นสุดการวิจัยในเดือนมกราคม พ.ศ. 2551

ผลและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

เมื่อนำปลาดุกและปลาคะเพียนที่มีขนาดโตเต็มวัย คละเพศ ชนิดละ 30 ตัว ที่ได้มาจากบ่อเลี้ยงปลาแบบปล่อยตามธรรมชาติของคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน โดยปลาดุกมีขนาดความยาวลำตัวมากกว่า 25 เซนติเมตรและมีน้ำหนักตัวมากกว่า 150 กรัมขึ้นไป ส่วนปลาคะเพียนมีขนาดความยาวลำตัวมากกว่า 20 เซนติเมตรและมีน้ำหนักตัวมากกว่า 100 กรัมขึ้นไป โดยปลาทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยทางคลินิกในวันที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างโดยการเจาะเลือดจาก caudal vein ตัวละประมาณ 2 มิลลิลิตร โดยใช้เฮปารินเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด มาวิเคราะห์ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยหรือค่า % PCV และค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยหรือค่า %PCV เฉลี่ยและค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ยของปลาดุกและปลาคะเพียนแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยหรือค่า %PCV และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน (Hb) ของปลาดุกและปลาคะเพียน

ชนิดของปลา	จำนวน (ตัว)	mean Hb $\pm$ SEM (g/dl)	mean %PCV $\pm$ SEM
ปลาดุก	30	8.17 ± 0.01^a	30.17 ± 1.25^a
ปลาคะเพียน	30	7.83 ± 0.01^a	39.45 ± 1.70^b

หมายเหตุ: SEM = standard error of the mean

^{ab} หมายถึงค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

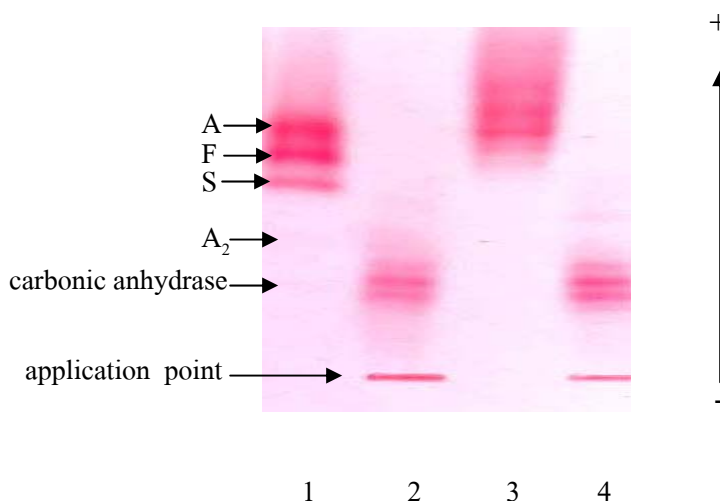
จากตารางพบว่าปลาดุกมีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินสูงกว่าปลาคะเพียนแต่มีค่า %PCV ต่ำกว่า โดยค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลาดุกและปลาคะเพียนมีค่าเท่ากับ 8.17 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร และ 7.83 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตรตามลำดับ ส่วนค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยของปลาดุกและปลาคะเพียนมีค่า 30.17 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์และ 39.45 ± 1.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลาดุกและปลาคะเพียนมีค่าต่ำกว่าค่า

ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลาดุกแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) และปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่มีการศึกษาในประเทศ Tanzania (Mlay *et al.*, 2007) นอกจากนี้ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลาดุกและปลาดุกและปลาตะเพียนและค่า %PCV มีค่าต่ำกว่าค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของปลาดุกตามที่ Bittencourt *et al.* (2003) ได้รายงานไว้ ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ค่าเหล่านี้ต่างกัน ได้แก่ ภูมิประเทศที่มีความแตกต่างของอุณหภูมิ ชนิดของอาหาร พฤติกรรมของปลา ปริมาณของก๊าซออกซิเจนรวมทั้งสารพิษในแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ความเครียด สายพันธุ์ สรีระและพันธุกรรมของปลา รวมทั้งเพศและสุขภาพของปลา (Mlay *et al.*, 2007) และวิธีการที่ใช้ศึกษา มีรายงานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า %PCV และความยาวของตัวปลา กล่าวคือ ค่า %PCV เพิ่มขึ้นตามความยาวของปลา (Jawad *et al.*, 2004 and Murachi, 1959) เช่นเดียวกับที่ Joshi and Tandon (1977) ได้ศึกษาในปลา *Tenualosa ilisha* เพราะฉะนั้นในการเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาเหล่านี้ในปลาที่มาจากแหล่งน้ำต่างกันจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้ด้วย

2. การศึกษาฟิโนไทป์และชนิดของฮีโมโกลบินปลาดุกและปลาตะเพียน

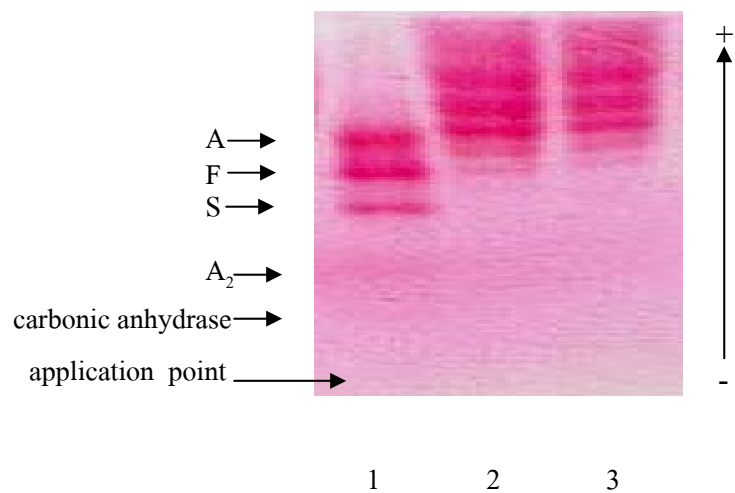
2.1 วิธีเซลล์โลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส

เมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลล์โลสอะซีเตต ศึกษาฟิโนไทป์และชนิดของฮีโมโกลบินปลาดุกและปลาตะเพียนละเพศและมีอายุโตเต็มที่โดยใช้สารละลายฮีโมไลสเตร พบว่าฮีโมโกลบินของปลาทั้ง 2 ชนิดแสดงการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกันกล่าวคือ ฮีโมโกลบินของปลาดุกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนและแสดงจำนวนหลายแถบ (ภาพที่ 5) ฮีโมโกลบินปลาดุกแสดง 1 ฟิโนไทป์ที่มี 7 แถบ ส่วนฮีโมโกลบินปลาตะเพียนแสดง 1 ฟิโนไทป์เช่นกันแต่มี 5 แถบ ดังแสดงในภาพที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

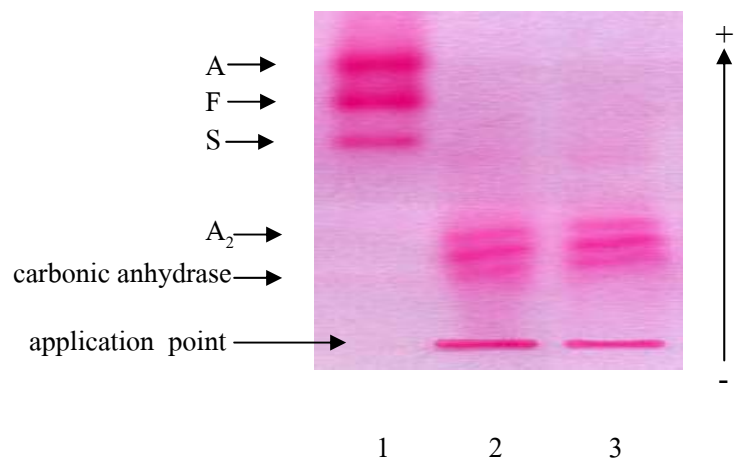


ภาพที่ 5 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสของคน (เลนที่ 1) ปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 4) และปลาดุก (เลนที่ 3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่ pH 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)

จากภาพที่ 5 พบว่า ฮีโมโกลบินของปลาดุกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนและแสดงจำนวนหลายแถบ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Martin *et al.* (1979a) กล่าวว่า เลือดปลาเกือบทุกชนิดมีฮีโมโกลบินหลากหลายชนิด เช่นเดียวกับ Weber (2000) and Prisco *et al.* (2000) ที่กล่าวว่า ปลาไม่มีฮีโมโกลบินหลายชนิด และมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน เรียกว่า Iso Hbs เช่น ในปลากลุ่ม Salmonids ที่มีฮีโมโกลบิน 8 – 19 ชนิด ความหลากหลายของฮีโมโกลบินในปลาพบว่ามีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ระดับยีน และส่งผลให้มีหน้าที่แตกต่างกัน และด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถแบ่งฮีโมโกลบินปลาออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มแอนดิก เป็นฮีโมโกลบินหลักในปลา มีคุณสมบัติความชอบต่อออกซิเจนต่ำ และกลุ่มแคโรดิก พบในปลาบางชนิดเท่านั้น เช่นในปลาที่อาศัยในบริเวณน้ำลึก น้ำขุ่น หรือบริเวณที่มีก๊าซออกซิเจนน้อย กลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นตัวเก็บสำรองก๊าซออกซิเจนในภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนต่ำเหมือนกับเกริงไกร (2548) ที่ศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต สามารถแบ่งฮีโมโกลบินของปลานิลออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแอนดิก และ กลุ่มแคโรดิก ขณะที่ Perry and Tufts (1998) ศึกษาในปลากลุ่ม Elasmobranchs ซึ่งเป็นปลากระดูกอ่อน พบว่ามีฮีโมโกลบิน 12 – 13 ชนิด ที่เรียกว่า Iso Hbs และมีโครงสร้างคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยฮีโมโกลบินของปลาแต่ละชนิดจะมีฟิโนไทป์ที่มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน คือ มี polymorphism เรียกว่า Allo Hbs โดยมีความแตกต่างมาตั้งแต่ระดับยีน



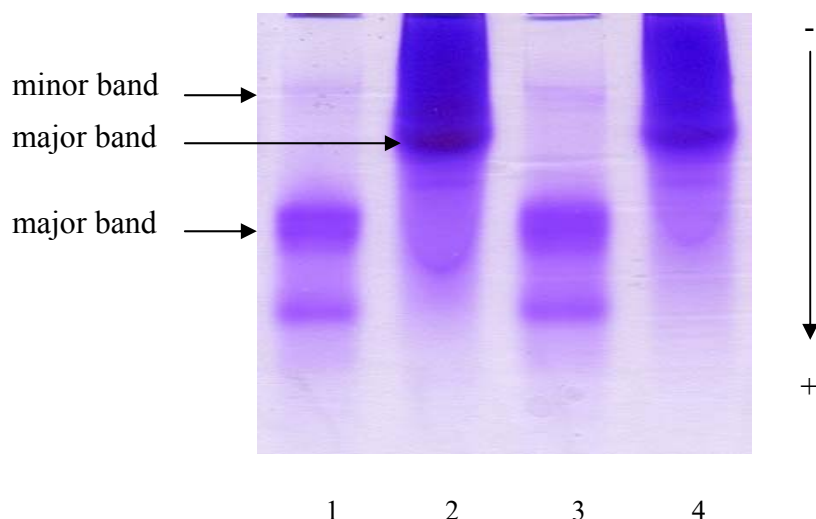
ภาพที่ 6 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสของคน (เลนที่ 1) และปลา
 ดุก (เลนที่ 2 และ 3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่ pH 8.2-8.6
 (350 โวลต์ 25 นาที)



ภาพที่ 7 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสของคน (เลนที่ 1) ปลา
 ตะเพียน (เลนที่ 2 และ 3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตที่ pH
 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25 นาที)

2.2 วิธีเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

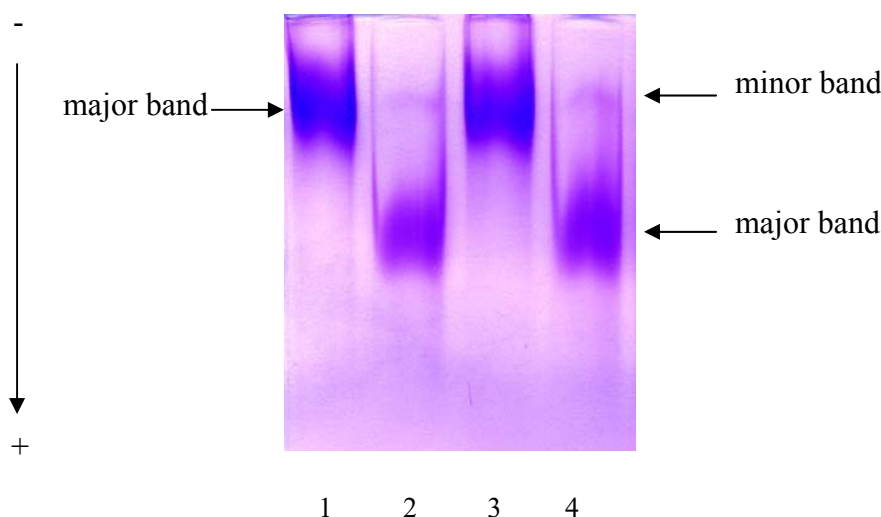
เมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลศึกษาฟิโนไทป์และชนิดของฮีโมโกลบินในสารละลายฮีโมไลสของปลาทั้ง 2 ชนิด พบว่าได้ผลการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเหมือนกันกับวิธีเซลลูโลสอะซีเตต คือ ฮีโมโกลบินของปลาคูกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียน แต่รูปแบบ (pattern) ในการเคลื่อนที่ต่างจากเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต ฮีโมโกลบินปลาคูกแสดง 1 ฟิโนไทป์ที่มี 2 แถบ ส่วนฮีโมโกลบินปลาตะเพียนแสดง 1 ฟิโนไทป์เช่นกัน แต่มีแถบเดียว ดังแสดงในภาพที่ 8



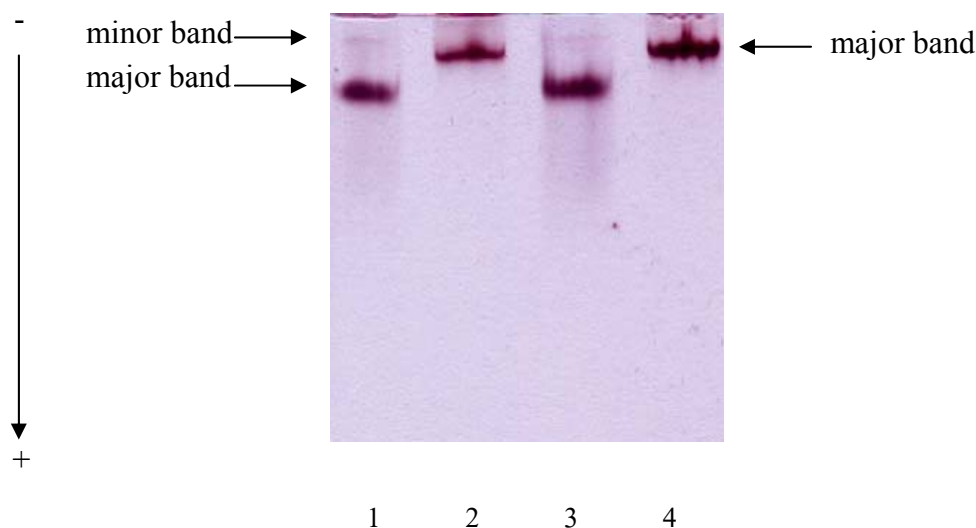
ภาพที่ 8 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินจากสารละลายฮีโมไลสของปลาคูก (เลนที่ 1 และ 3) และปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่ pH 8.3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซึบลูอาร์ - 250

เมื่อนำสารละลายฮีโมไลสส่วนหนึ่งไปแยกฮีโมโกลบินให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี สารละลายฮีโมโกลบินบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาศึกษาฟิโนไทป์และชนิดของฮีโมโกลบินโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (ภาพที่ 9 และ 10) พบว่าฮีโมโกลบินของปลาคูกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนเช่นกัน ปลาคูกแสดงฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์ประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดหลัก (98%) และชนิดรอง (2%) ส่วนปลาตะเพียนแสดงฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์เช่นกันแต่มีฮีโมโกลบินเพียงชนิดเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนเกรียงไกร (2548) ที่ได้ศึกษาฟิโน

ไทป์ของอีโมโกลบินของปลานิล โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต พบว่า สารละลายอีโมโกลบินของปลานิลแสดงการเคลื่อนที่ของอีโมโกลบินในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวก ได้ระยะทางใกล้เคียงกับสารละลายอีโมโกลบินของปลาดุก และแสดงพีโนไทป์เดียว เมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่ pH 8.3) อีโมโกลบินของปลานิลในสารละลายอีโมโกลบินแสดงพีโนไทป์เดียวเช่นกัน ประกอบด้วยอีโมโกลบิน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแอนดิกและกลุ่มแคโรติก และสามารถแสดงผลที่เหมือนกันเมื่อใช้เทคนิคไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง ในช่วง pH 3-10 เมื่อใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุแอนไอออน (anion exchange chromatography) ชนิด DEAE – เซลลูโลส (เกรียงไกร, 2548) สามารถแยกอีโมโกลบินกลุ่มแอนดิกและอีโมโกลบินกลุ่มแคโรติกออกจากกันได้



ภาพที่ 9 แสดงการเคลื่อนที่ของอีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของปลาดุก (เลนที่ 1 และ 3) และ ปลาดุก (เลนที่ 2 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (12% T 2.67% C ที่ pH 8.3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยโคแมสซึบลูอาร์ - 250



ภาพที่ 10 แสดงการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของปลาดุก (เลนที่ 1 และ 3) และ ปลาตะเพียน (เลนที่ 2 และ 4) บนเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล (15% T 2.67% C ที่ pH 8.3) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมด้วยซิลเวอร์ (silver staining)

มีรายงานต่างประเทศถึงการศึกษาถึงชนิดของฮีโมโกลบินในปลาน้ำเค็มและปลาน้ำจืดซึ่งแสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินของปลาแตกต่างจากของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม กล่าวคือ ปลาฮีโมโกลบินหลายชนิดและกลไกในการควบคุมการจับก๊าซออกซิเจนมีความสัมพันธ์กับการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม เมื่อใช้การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าสามารถแบ่งฮีโมโกลบินของปลาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแอโนดิก ที่มีค่า pI ต่ำ (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 8) และกลุ่มแคโทดิกที่มีค่า pI สูง (มากกว่าหรือเท่ากับ 8) ทั้ง 2 กลุ่มมีโครงสร้างและหน้าที่ที่ต่างกัน ปลาไหลยุโรป (*Anguilla anguilla* และ *Gymnothorax unicolor*) เป็นตัวอย่างของปลาที่มีฮีโมโกลบินทั้ง 2 กลุ่มนี้เช่นเดียวกับปลาเทราต์ กลุ่มแคโทดิกมีความสามารถในการจับกันของก๊าซออกซิเจนกับฮีโมโกลบินสูงและ pH มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกันของก๊าซออกซิเจนกับฮีโมโกลบินน้อย ทำหน้าที่สำคัญในการขนส่งก๊าซออกซิเจนในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนต่ำและเป็นกรด กลุ่มแอโนดิกแสดงความสามารถในการจับกันของก๊าซออกซิเจนกับฮีโมโกลบินต่ำและ pH มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกันของก๊าซออกซิเจนกับฮีโมโกลบินมากเหมือนกลุ่มแอโนดิกของปลาหลายชนิด กลุ่มแคโทดิกของปลาไหลยุโรป แสดงความสามารถในการจับกันของก๊าซออกซิเจนกับฮีโมโกลบินขึ้นกับสารฟอสเฟตอินทรีย์ คือ GTP และ ATP มากกว่ากลุ่มแอโนดิก ในขณะที่กลุ่มแคโทดิกของปลาเทราต์ แสดงความสามารถในการจับกันของก๊าซออกซิเจนกับ

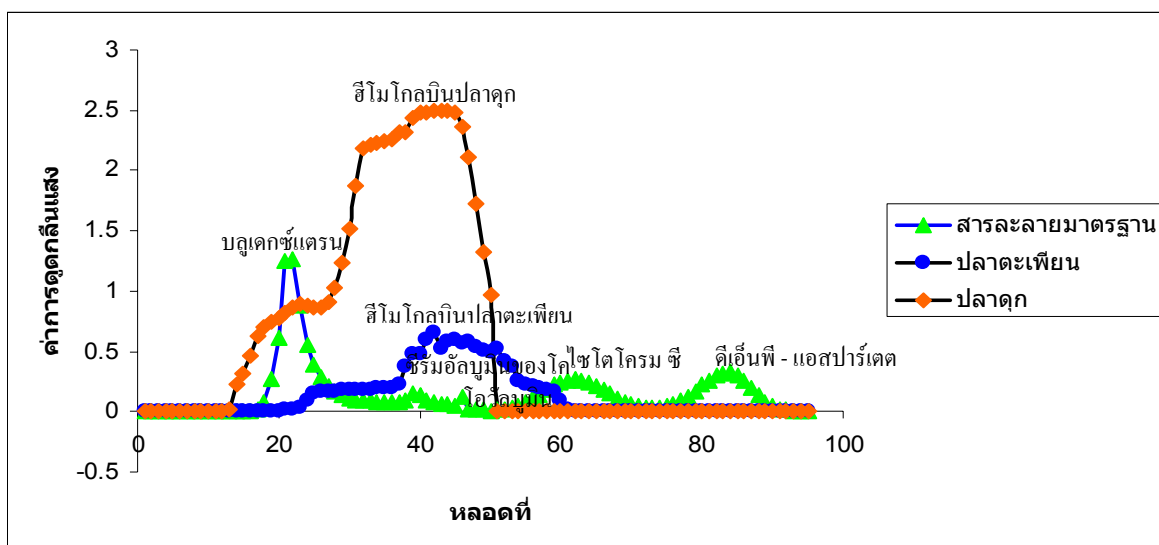
ฮีโมโกลบินไม่ขึ้นกับ GTP และ ATP (Fago *et al.*, 1995; Fago *et al.*, 1997 and Tamburrini *et al.*, 2001) ปลาที่อยู่ในลุ่มน้ำอะเมซอน คือ *Pterygoplichthys pardalis* และ *Hoplosternum littorale* ปลาทั้ง 2 ชนิดนี้นอกจากจะมีเหงือกแล้วยังมีระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนที่เกี่ยวข้องกับลำไส้ (gut) จึงเป็นปลาที่หายใจในอากาศได้ด้วย *Pterygoplichthys pardalis* แสดงฮีโมโกลบิน 4 ชนิด คือ Hb I Hb II Hb III และ Hb IV ทั้ง 4 ชนิดมีคุณสมบัติในการทำหน้าที่ที่ต่างกัน Hb I เป็นชนิดหลัก (Bossa *et al.*, 1982) *Hoplosternum littorale* แสดงฮีโมโกลบิน 2 ชนิด คือ ฮีโมโกลบินแอนดิก (Hb^{An}) และฮีโมโกลบินแคโรติก (Hb^{Ca}) ทั้ง 2 ชนิดมีโครงสร้างและคุณสมบัติในการทำหน้าที่ที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการเปรียบเทียบคุณสมบัติของฮีโมโกลบินของปลาน้ำจืดในลุ่มน้ำอะเมซอน 2 ชนิดซึ่งมีกลไกการหายใจที่ต่างกัน เพื่อที่จะศึกษาถึงการปรับเปลี่ยนโมเลกุลให้เข้ากับระบบการหายใจที่ต่างกัน คือ ปลา *Osteoglossum bicirrhosum* และปลาช่อนอะเมซอน (*Arapaima gigas*) ปลา *Osteoglossum bicirrhosum* เป็นปลาที่มีเหงือกหายใจในน้ำ ส่วนปลาช่อนอะเมซอนหายใจในอากาศ ปลา *Osteoglossum bicirrhosum* มีฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์ที่มีฮีโมโกลบิน 1 ชนิด ในขณะที่ปลาช่อนอะเมซอนมีฮีโมโกลบิน 2 ฟิโนไทป์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำหน้าที่คล้ายคลึงกัน และพบว่า 1 ฟิโนไทป์มีฮีโมโกลบิน 2 ชนิดคือ ชนิดหลัก 65% และชนิดรอง 35% (Galdames - Portus *et al.*, 1979)

จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของฮีโมโกลบินของปลาน้ำจืด 2 ชนิดของไทย คือ ปลาดุกและปลาตะเพียนที่มีความแตกต่างทั้งสายพันธุ์ พันธุกรรม รูปร่างลักษณะ และพฤติกรรมการดำรงชีวิต เมื่อศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินในสารละลายฮีโมไลเซตโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต ฮีโมโกลบินของปลาดุกและปลาตะเพียนแสดงการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกที่ต่างกันมาก ฮีโมโกลบินของปลาดุกเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า พบจำนวนแถบของโปรตีนจำนวนมากแต่มีแบบที่เหมือนกันในทุกตัวอย่างปลา เมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจลศึกษาฟิโนไทป์ของฮีโมโกลบินในสารละลายฮีโมไลเซต พบจำนวนแถบของโปรตีนลดลงแต่ยังคงมีแบบที่เหมือนกันในทุกตัวอย่างปลา แสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินของปลาดุกและปลาตะเพียนมี 1 ฟิโนไทป์ เมื่อทำให้ฮีโมโกลบินในสารละลายฮีโมไลเซตบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโตกราฟีสามารถสรุปได้ว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนมี 1 ฟิโนไทป์ที่มีฮีโมโกลบิน 1 ชนิด ในขณะที่ปลาดุกมีฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์เช่นกันแต่มีฮีโมโกลบิน 2 ชนิดคือ ชนิดหลักและชนิดรอง เมื่อศึกษาผลการทดลองทั้งหมดมีความเป็นไปได้ว่าทั้งปลาดุกและปลาตะเพียนน่าจะมีฮีโมโกลบินกลุ่มแอนดิกไม่มีฮีโมโกลบินกลุ่มแคโรติก ซึ่งต่างจากปลาน้ำจืดที่มีทั้ง 2 กลุ่ม

3. การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินและน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของอีโมโกลบินปลา ดุกและปลาตะเพียน

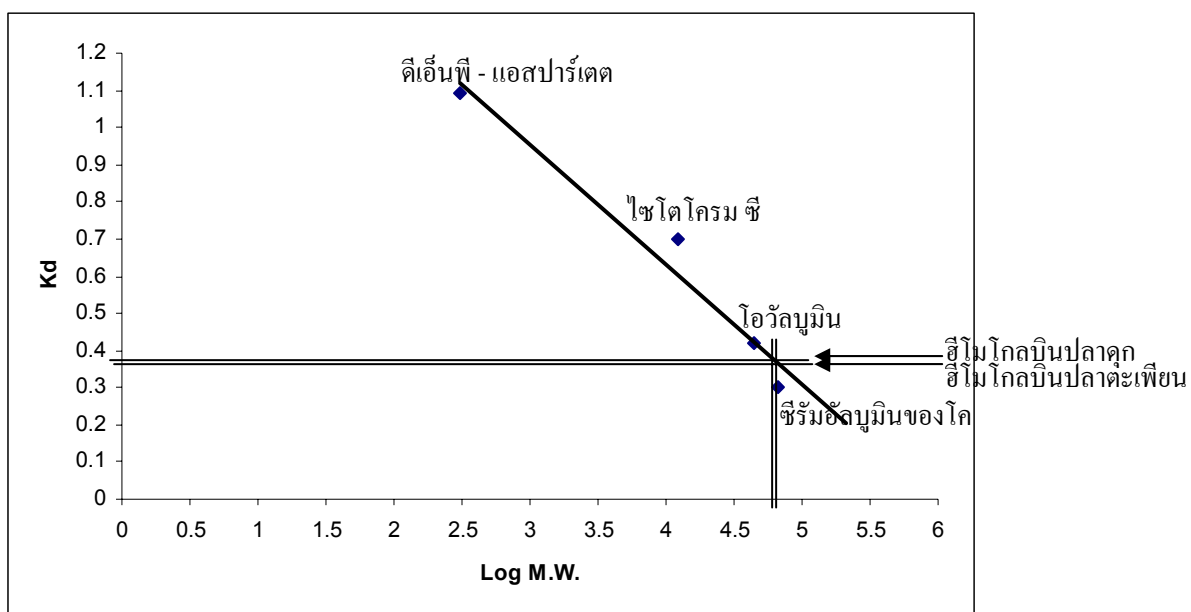
3.1 วิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การทำเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 เกรด fine ซึ่งมีระดับการเชื่อมโยงเป็นตาข่ายร่างแหอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,000 - 150,000 ดาลตัน ผลจากการชะสารของสารละลายบัฟเฟอร์ แสดงดังภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_d ของสารและโปรตีนมาตรฐานและค่าลอการิทึมน้ำหนักโมเลกุล (Log M.W.) ของสารและโปรตีนมาตรฐาน (ภาพที่ 12) จากกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินปลาดุกและปลาตะเพียนได้ 63,096 ดาลตัน และ 64,565 ดาลตัน ตามลำดับ



ภาพที่ 11 แสดงผลการชะสารชนิดต่างๆ ที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

การหาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินปลาอุกและปลาตะเพียนโดยการสร้างกราฟระหว่างค่า K_d และค่า $\log M.W.$



ภาพที่ 12 แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินปลาอุกและปลาตะเพียนจากค่า K_d และ $\log M.W.$ ของโปรตีนมาตรฐาน

หมายเหตุ: น้ำหนักโมเลกุลของสารและโปรตีนมาตรฐาน

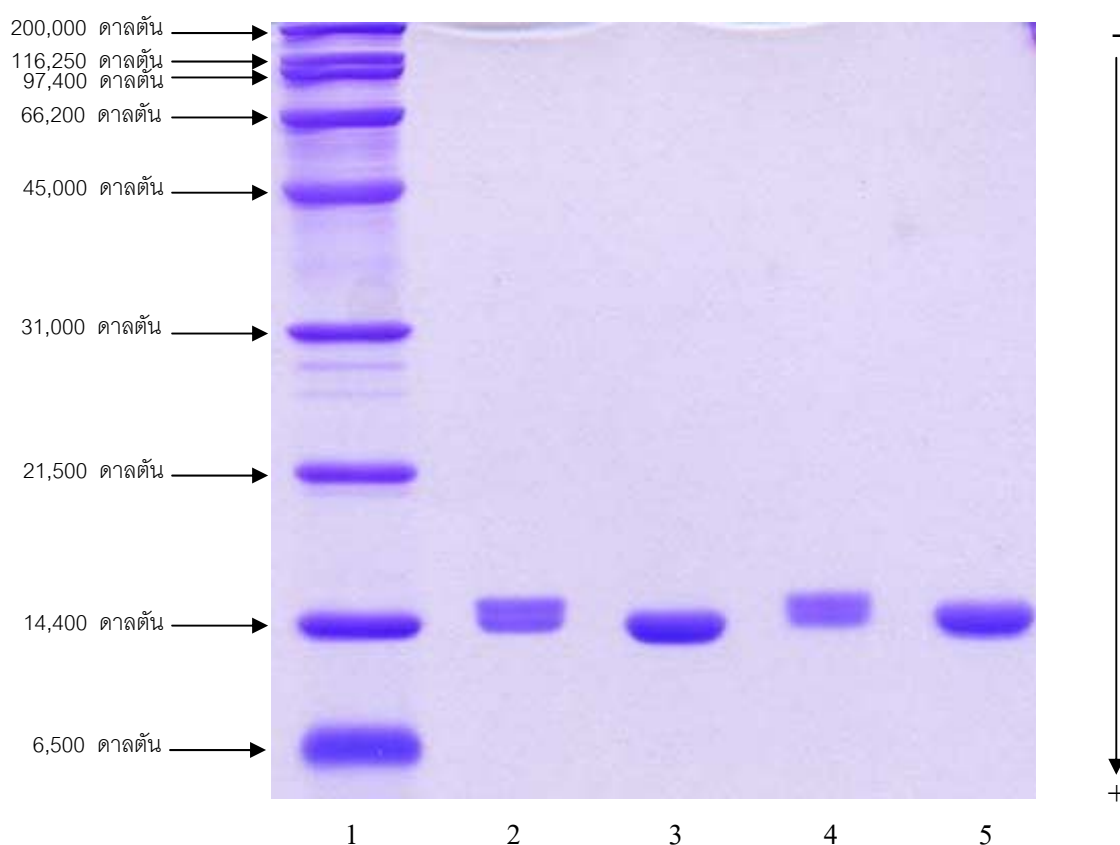
บคูเดกซ์แทรน	2,000,000	ดาลตัน
ซีรัมอัลบูมินของโค	68,000	ดาลตัน
โอวัลบูมิน	45,000	ดาลตัน
ไซโตโครม ซี	12,384	ดาลตัน
ดีเอ็นพี - แอสปาร์เตต	299.2	ดาลตัน

เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินที่ได้จากการทำเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 เกรด fine ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินปลาอุกและปลาตะเพียนเท่ากับ 63,096 ดาลตัน และ 64,565 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากเกรียงไกรและคณะ (2548) ที่ศึกษาอีโมโกลบินปลานิลโดยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 เกรด fine เช่นกัน พบว่าอีโมโกลบินของปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุล 60,792 ดาลตัน ซึ่งเป็น

น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินในสภาพธรรมชาติ ที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย มีรายงานการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลฮีโมโกลบินของปลาในต่างประเทศ Martin *et al.* (1979c) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Pseudodoras* ซึ่งเป็นปลาคูอเมริกาใต้ พบว่า ฮีโมโกลบินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66,000 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 14,300 ดาลตัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลา *Brachyplatystoma* sp. ซึ่งเป็นปลาคูแถบเขตร้อน พบว่า ฮีโมโกลบินมีน้ำหนักประมาณ 69,000 ดาลตัน Whitaker (1963) ได้รายงานถึงการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี เช่น น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน พบว่าความเสถียรของโมเลกุลฮีโมโกลบินมีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดการแยกตัวออกจากกันของหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินหรือเจมมีการดูดซับกับโปรตีนตัวอย่างที่ทำการศึกษาจึงทำให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ต่ำกว่าค่าที่เป็นจริง

3.2 วิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล

จากการทำเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล ที่ pH 8.3 ด้วย separating gel 18%T, 2.67%C และ stacking gel 4%T, 2.67%C ของสารละลายฮีโมโกลบินที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี เมื่อเชื่อมแผ่นเจลด้วยสปีโคแมสซิบลูอาร์ - 250 พบแถบฮีโมโกลบินจำนวน 2 แถบในปลาคูและพบ 1 แถบในปลาตะเพียน เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล Quantity One พบว่าหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินปลาคูมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 15,260 ดาลตัน และ 14,740 ดาลตันตามลำดับ และของปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 14,630 ดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 13



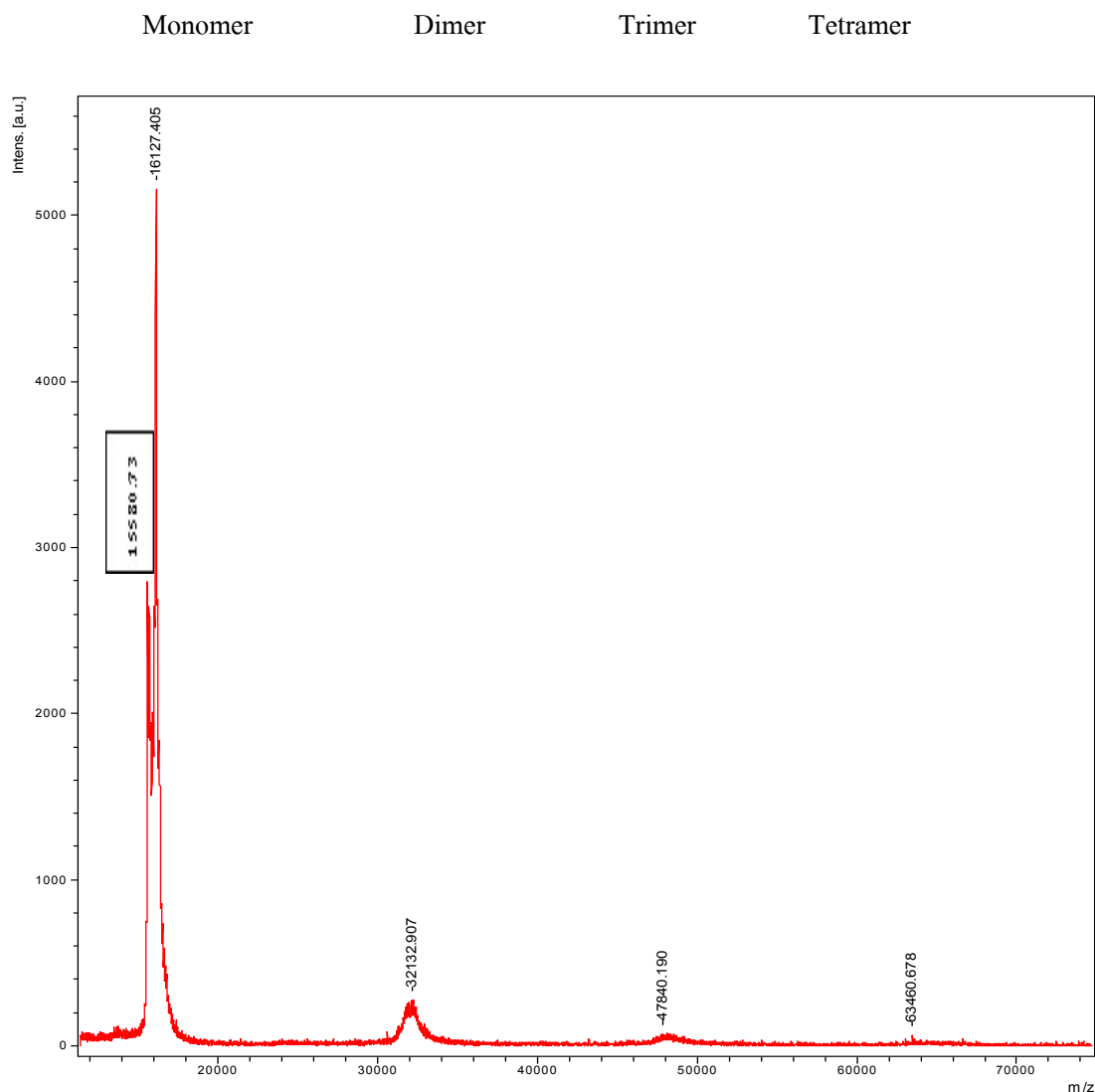
ภาพที่ 13 แสดงผลน้ำหนักรโมเลกุลหน่วยย่อยของอีโมโกลบินของปลาตุก (เลนที่ 2 และ 4) และปลาตะเพียน (เลนที่ 3 และ 5) และเลนที่ 1 คือ broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) โดยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ pH 8.3 ด้วย separating gel 18%T, 2.67%C และ stacking gel 4%T, 2.67%C (200 โวลต์คงที่ 60 มิลลิแอมป์ต่อเจล 1 แผ่น เวลา 45 นาที)

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

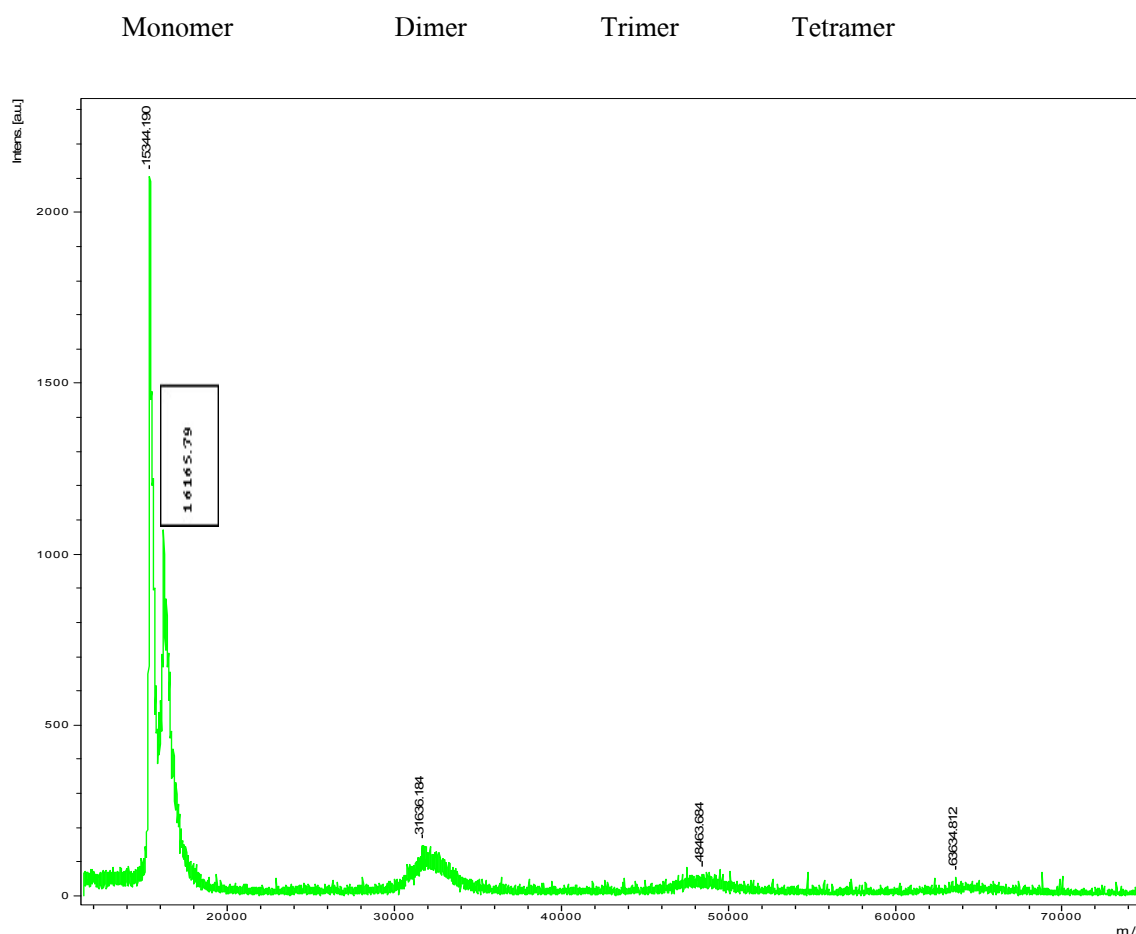
ไมโอซิน	200,000 ดาลตัน
เบต้ากาแลคโตซิเดส	116,250 ดาลตัน
ฟอสโฟรีเลส บี	97,400 ดาลตัน
ซีรัมอัลบูมินของโค	66,200 ดาลตัน
โอวัลบูมิน	45,000 ดาลตัน
คาร์บอนิกแอนไฮเดรส	31,000 ดาลตัน
ตัวยับยั้งทริปซินของถั่วเหลือง	21,500 ดาลตัน
ไลโซไซม์	14,400 ดาลตัน
อะโปรทีนิน	6,500 ดาลตัน

จากเทคนิคโซเดียมไดเคซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจลเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลในแต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบิน พบว่าฮีโมโกลบินปลาคูปรากฏ 2 แถบ ขณะที่ฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนปรากฏ 1 แถบ เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายกลอบินโดยเครื่องวิเคราะห์แผ่นเจลพบว่าฮีโมโกลบินของปลาคูมีน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินเฉลี่ยเท่ากับ 15,260 ดาลตัน และ 14,750 ดาลตัน ตามลำดับ ส่วนฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินเฉลี่ยเท่ากับ 14,630 ดาลตัน แสดงว่าหน่วยย่อยหรือสายกลอบินทั้งสี่ของฮีโมโกลบินปลาคูและปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน แต่ฮีโมโกลบินปลาคูประกอบด้วยหน่วยย่อยหรือสายกลอบิน 2 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน

3.3 วิเคราะห์แมสสเปกโตรเมทรี



ภาพที่ 14 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินปลาฉลาม โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมฟีนิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์



ภาพที่ 15 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยอีโมโกลบินปลาตะเพียนโดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์

เมื่อนำอีโมโกลบินของปลาดุกและปลาตะเพียนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G – 100 มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีผ่านเครื่อง MALDI - TOF แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์ พบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินปลาดุกในรูปแบบมโนเมอร์ มีค่าเท่ากับ 15,580.730 ดาลตัน และ 16,127.405 ดาลตัน ส่วนรูปแบบไดเมอร์ ไตรเมอร์และเตตระเมอร์ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32,132.907, 47,840.190 และ 63,460.678 ดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 14) ส่วนค่าน้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินปลาตะเพียนในรูปแบบมโนเมอร์ มีค่าเท่ากับ 15,344.190 ดาลตัน และ 16,165.790 ดาลตัน ส่วนรูปแบบไดเมอร์ ไตรเมอร์และเตตระเมอร์ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 31,636.184, 48,463.684 และ 63,634.812 ดาลตัน

ตามลำดับ (ภาพที่15) แสดงว่าโมเลกุลของฮีโมโกลบินของทั้งปลาฉลามและปลาตะเพียน ประกอบด้วยสายกลอบิน 2 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินชนิด สายอัลฟา 1 สายอัลฟา 2 และสายเบต้า เท่ากับ 15,340, 15,621 และ 16,126 คาลตัน ตามลำดับ (Southard *et al.*, 1986 and Chong *et al.*, 1999)

น้ำหนักโมเลกุลในรูปแบบไดเมอร์ของฮีโมโกลบินปลาฉลามที่มีน้ำหนักโมเลกุล 32,132.907 คาลตัน เกิดจากสายกลอบินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16,127.405 คาลตันมาจับกัน เมื่อรูปแบบที่เป็นไดเมอร์จับกับสายกลอบินอีกสายหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,580.730 คาลตัน ได้เป็นรูปแบบไตรเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 47,840.190 คาลตัน และรูปแบบเตตระเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 63,460.678 คาลตันเกิดจากการจับกันของสายกลอบินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16,127.405 คาลตัน และ 15,580.730 คาลตัน อย่างละ 2 สาย ส่วนฮีโมโกลบินของปลาตะเพียน พบว่ารูปแบบไดเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 31,636.184 คาลตันเกิดจากสายกลอบินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,344.190 คาลตัน และ 16,165.790 คาลตันมาจับกัน รูปแบบไตรเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 48,463.684 คาลตันเกิดจากสายกลอบินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16,165.790 คาลตันมาจับกันสามสายและเมื่อรูปแบบไตรเมอร์มาจับกับสายกลอบินอีกสายหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,344.190 คาลตันจึงเกิดเป็นรูปแบบเตตระเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 63,634.812 คาลตัน

เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบินทั้ง 4 สายที่ได้จากวิธีโซเดียมโดเดซิล ซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปลาฉลามมีน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินเท่ากับ 60,000 คาลตัน ส่วนปลาตะเพียนมีค่าเท่ากับ 58,520 คาลตัน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลรวมของฮีโมโกลบินที่ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียน 63,096 คาลตัน และ 64,565 คาลตันตามลำดับ และวิธีแอสสเปกโทรเมทรี ที่มีค่า 63,461 คาลตัน และ 63,635 คาลตัน ตามลำดับ เป็นไปได้ที่สายกลอบินซึ่งอยู่ในรูปโปรตีนก้อนกลม ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ โดยเบต้าเมอร์แคปโตเอธานอล นอกจากนี้ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตสามารถจับกับสายกลอบินเป็นคอมเพล็กซ์ ทำให้สายกลอบินนี้มีรูปร่างเป็นแท่ง ส่งผลให้โครงสร้างของฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลงไปทำให้น้ำหนักโมเลกุลรวมของสายกลอบินทั้ง 4 สายต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลรวมของฮีโมโกลบิน ในขณะที่เกรียงไกร (2548) ได้ศึกษาโดยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าฮีโมโกลบินของปลานิลปรากฏ 1 แถบ เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายกลอบินโดยเครื่องวิเคราะห์แผ่นเจลมีค่าเท่ากับ 15,415 คาลตัน เมื่อรวมกันอยู่ในรูปเตตระเมอร์มีค่า 61,660 คาลตัน ซึ่งมีค่ามากกว่าน้ำหนักโมเลกุลรวมของฮีโมโกลบินที่ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค

เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของปลานิล เท่ากับ 60,792 ดาลตัน แต่ค่าน้อยกว่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินของปลานิลที่ศึกษาโดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี พบว่า มีค่า 62,954 ดาลตัน

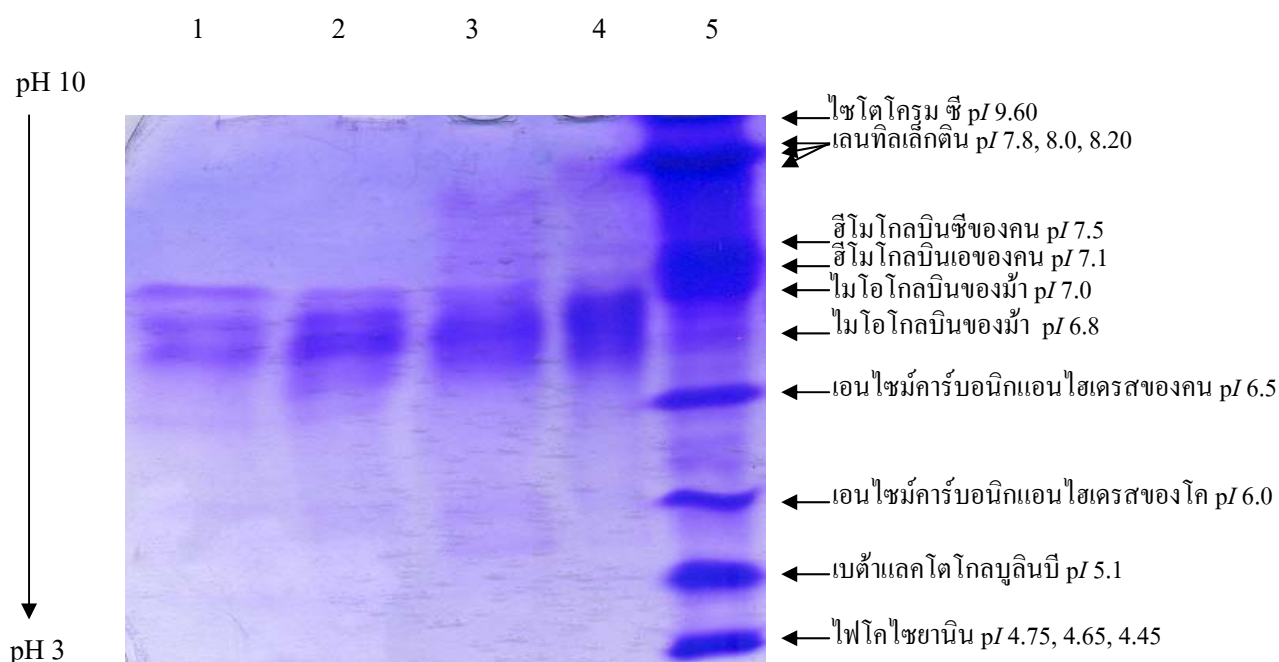
จากผลการทดลองการหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยฮีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล พบว่าฮีโมโกลบินปลาฉลามปรากฏ 2 แถบ ส่วนฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนปรากฏ 1 แถบ ซึ่งอธิบายได้ว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนที่ปรากฏ 1 แถบ เป็นหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมากหรือเท่ากัน จึงปรากฏให้เห็นเพียงแถบเดียว แต่เมื่อใช้วิธีแมสสเปกโตรเมตรีศึกษาพบว่าทั้งฮีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนประกอบด้วยสายกลอบิน 2 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ทั้งนี้ถ้าใช้วิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเกรเดียนท์เจล (gradient gel) น่าจะสามารถแยกฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนออกจากกันได้

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียนแบ่งตามวิธีการศึกษา

โมเลกุล ของ ฮีโมโกลบิน	วิธีการศึกษาน้ำหนักโมเลกุล					
	Gel filtration		SDS-PAGE		Mass spectrometry	
	Hb (ปลาฉลาม)	Hb (ปลา ตะเพียน)	Hb (ปลาฉลาม)	Hb (ปลา ตะเพียน)	Hb (ปลาฉลาม)	Hb (ปลา ตะเพียน)
เตตระเมอร์	63,096	64,565	-	-	63,460.678	63,634.812
ไดเมอร์	-	-	-	-	47,840.190	48,463.684
โมโนเมอร์	-	-	-	-	32,132.907	31,636.184
โมโนเมอร์	-	-	15,260 และ 14,740	14,630	15,580.730 และ 16,127.405	15,344.190 และ 16,165.790

จากตารางที่ 6 เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียนโดยการศึกษาด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี วิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตและวิธีแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินปลาฉลามมีค่าน้อยกว่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินปลาตะเพียน สอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธีแมสสเปกโตรเมทรี และน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของฮีโมโกลบินปลาฉลามด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตแสดง 2 ค่า สอดคล้องกับวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ส่วนในปลาตะเพียนพบว่าฮีโมโกลบินของปลาตะเพียนแสดงเพียงค่าเดียว แตกต่างจากผลที่ได้จากวิธีแมสสเปกโตรเมทรีที่แสดง 2 ค่า เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของเกรียงไกร (2548) ที่ศึกษาฮีโมโกลบินของปลานิลพบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินและหน่วยย่อยหรือสายกลอบินของฮีโมโกลบินปลานิลมีค่าแตกต่างจากฮีโมโกลบินของปลาฉลามและฮีโมโกลบินของปลาตะเพียน สอดคล้องกับ Weber (2000) and Prisco *et al.* (2000) ที่กล่าวว่า ปลาฮีโมโกลบินหลายชนิด และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันเรียกว่า Iso Hbs แต่วิธีแมสสเปกโตรเมทรีมีความไวและแม่นยำมากกว่าวิธีการอื่นๆ ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียนจึงใช้ค่าที่ได้จากวิธีแมสสเปกโตรเมทรีเพื่อให้ค่าที่ได้มีความแม่นยำมากที่สุด

4. การศึกษาค่า pI ของอีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียน



ภาพที่ 16 แสดงค่า pI ของอีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียน โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) แอมโฟไลต์ pH 3-10 เลนที่ 1 และ 3 คือ อีโมโกลบินของปลาตะเพียนและปลาฉลาม เลนที่ 2 และ 4 คือ อีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี และเลนที่ 5 คือ broad range standard pI 4.45-9.60 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

เมื่อนำอีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนที่ผ่านเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเดกซ์ G-100 มาหาค่า pI ของอีโมโกลบินปลาทั้งสองชนิด โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ด้วยแผ่นเจลสำเร็จรูป (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) แอมโฟไลต์ pH 3-10 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Quantity One พบว่า อีโมโกลบินของปลาฉลามและปลาตะเพียนมีค่า pI ที่ใกล้เคียงกัน โดยปลาทั้งสองชนิดมีค่า pI หลายค่า ปลาตะเพียนมีค่า pI อยู่ในช่วงระหว่าง 5.8 – 7.0 ส่วนปลาฉลามมีค่า pI อยู่ในช่วงระหว่าง 5.5 – 8.0 ทั้งปลาฉลามและปลาตะเพียนต่างมีค่า pI ที่คาบเกี่ยวกัน กล่าวคือมี pI ที่เท่ากันที่ pI เท่ากับ 7.0 และมีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 5.8 – 7.0 ส่วนที่ต่างกันคือ ปลาฉลามมีค่า pI 8.0 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของเกรียงไกร (2548) ที่ได้ค่า pI ของอีโมโกลบินปลานิลโดยใช้เทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ในช่วง pH 3-10 เช่นกันพบว่า อีโมโกลบินของปลานิลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแอนโนดิก มีค่า pI อยู่ในช่วง 5.28 - 6.80 และกลุ่มแคโทดิก มีค่า pI

อยู่ในช่วง 7.27 – 9.71 Prisco *et al.* (2000) กล่าวว่า สามารถแบ่งฮีโมโกลบินปลาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแอโนดิก มีค่า pI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 กลุ่มนี้เป็นฮีโมโกลบินหลักในปลา มีคุณสมบัติความชอบต่อออกซิเจนต่ำ และกลุ่มแคโทดิก มีค่า pI มากกว่าหรือเท่ากับ 8 พบในปลาบางชนิดเท่านั้น เช่นในปลาที่อาศัยในบริเวณน้ำลึก น้ำขุ่น หรือบริเวณที่มีก๊าซออกซิเจนน้อย เป็นตัวเก็บสำรองก๊าซออกซิเจนในภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนต่ำ เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มฮีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียน สามารถจัดฮีโมโกลบินของปลาทั้งสองชนิดเข้ากลุ่มแอโนดิก การดำรงชีวิตในธรรมชาติของปลาฉลามและปลาตะเพียนซึ่งเป็นปลาน้ำจืด ปลาฉลามเป็นปลาที่อาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึก แม้แต่ในหนองน้ำขุ่นที่มีน้ำอยู่เพียงเล็กน้อย น้ำที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ น้ำที่ค่อนข้างกร่อย ปลาฉลามก็ยังสามารถอาศัยอยู่ได้เป็นอย่างดี (กองประมงน้ำจืด, 2538) แตกต่างจากปลาตะเพียนที่อาศัยอยู่ในน้ำใสและบริเวณผิวน้ำมีปริมาณออกซิเจนมากกว่า จากผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบฮีโมโกลบินของปลาฉลามที่เป็นกลุ่มแคโทดิกพบเฉพาะกลุ่มอะโนดิกเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาพทางธรรมชาติของปลาฉลามและปลาตะเพียนที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นปลาที่อาศัยอยู่ในบ่อตามธรรมชาติที่น้ำใส มีปริมาณออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำสูง ในต่างประเทศได้มีการศึกษาค่า pI ในปลาหลายชนิด Fago *et al.* (1995) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินของปลาไหล *Anguilla anguilla* พบว่า ฮีโมโกลบินกลุ่มแคโทดิกมีค่า pI สูง ขณะที่กลุ่มแอโนดิก มีค่า pI ต่ำ ส่วน Southard *et al.* (1986) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินจากปลา *Salmo clarki* (ปลา cutthroat trout) พบว่า ฮีโมโกลบินมีค่า pI หลายชนิด ฮีโมโกลบิน 5 ชนิด มีค่า pI อยู่ระหว่าง 9.10 – 7.10 และฮีโมโกลบินอีกชนิดหนึ่งที่มีขนาดเล็ก มีค่า pI เท่ากับ 5.90 ซึ่งมีความสำคัญต่อการจับกับออกซิเจน โดยฮีโมโกลบินที่กล่าวมาข้างต้น จะมีคุณสมบัติเหมือนกันเกี่ยวกับการจับกับออกซิเจนซึ่งไม่ขึ้นกับ pH อุณหภูมิ และ ATP นอกจากนี้ยังพบว่า มีฮีโมโกลบินขนาดเล็กอื่นๆ ที่มีค่า pI น้อยกว่า 5.90 มีคุณสมบัติเกี่ยวกับการจับออกซิเจนเหมือนกัน แต่จะขึ้นอยู่กับ pH และยังมีฮีโมโกลบินอีก 2 ชนิด ที่มีค่า pI 6.40 และ 6.50 มีคุณสมบัติคล้ายกันเกี่ยวกับการจับออกซิเจนที่ต้องขึ้นอยู่กับ pH และอุณหภูมิ ส่วน ATP และ GTP จะทำให้ความชอบต่อออกซิเจนลดลงแต่ไม่มีผลต่อการจับกันของออกซิเจนกับฮีโมโกลบิน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์ ชนิดและคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินของ ปลาดุกและปลาดุกเพียน จำนวนชนิดละ 30 ตัว ขนาดโตเต็มวัย คละเพศ ปลาดุกขนาดความยาว ลำตัวมากกว่า 25 เซนติเมตรและมีน้ำหนักตัวมากกว่า 150 กรัมขึ้นไป ปลาดุกเพียนมีขนาดความยาว ลำตัวมากกว่า 20 เซนติเมตรและมีน้ำหนักตัวมากกว่า 100 กรัมขึ้นไป โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส โครมาโทกราฟี สเปกโตรเมทรี และไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่า

1. ปลาดุกมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย 30.17 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ (28.92 – 31.42 เปอร์เซ็นต์) และปลาดุกเพียนมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ย 39.45 ± 1.70 เปอร์เซ็นต์ (37.75 – 41.15 เปอร์เซ็นต์)
2. ปลาดุกมีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ย 8.17 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร (8.16 – 8.18 กรัมต่อเดซิลิตร) และปลาดุกเพียนมีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเฉลี่ย 7.83 ± 0.01 กรัมต่อเดซิลิตร (7.82 – 7.84 กรัมต่อเดซิลิตร)
3. จากการศึกษาด้วยเทคนิคเซลล์โลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าฟิโนไทป์ของ ฮีโมโกลบินปลาดุกมี 1 ฟิโนไทป์ที่ประกอบด้วยโปรตีน 7 แถบ ส่วนฮีโมโกลบินปลาดุกเพียนมี 1 ฟิโนไทป์เช่นกันแต่ประกอบด้วยโปรตีน 5 แถบ ฮีโมโกลบินปลาดุกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า เข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินปลาดุกเพียน
4. จากการศึกษาด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเนทีฟพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่า ปลาดุกแสดงฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์ประกอบด้วยฮีโมโกลบินชนิดหลัก (98%) และชนิดรอง (2%) ส่วนปลาดุกเพียนแสดงฮีโมโกลบิน 1 ฟิโนไทป์เช่นกันแต่มีฮีโมโกลบินเพียงชนิดเดียว ฮีโมโกลบินปลาดุกมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินปลาดุกเพียน
5. จากการศึกษาด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าฮีโมโกลบินของ ปลาดุกและปลาดุกเพียนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63,096 ดาลตัน และ 64,565 ดาลตัน ตามลำดับ

6. จากการศึกษาด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ฮีโมโกลบินของปลาฉลามมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลของสายกลอบิน 2 ค่า เท่ากับ 15,260 ดาลตัน และ 14,740 ดาลตัน ส่วนปลาตะเพียนมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายกลอบินเท่ากับ 14,630 ดาลตัน

7. จากการศึกษาด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินปลาฉลามในรูปแบบมโนเมอร์ มี 2 ค่า เท่ากับ 15,580.730 ดาลตัน และ 16,127.405 ดาลตัน ส่วนรูปแบบไดเมอร์ ไตรเมอร์และเตตระเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32,132.907, 47,840.190 และ 63,460.678 ดาลตัน ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินปลาตะเพียนในรูปแบบมโนเมอร์ มี 2 ค่า เท่ากับ 15,344.190 ดาลตัน และ 16,165.790 ดาลตัน ส่วนรูปแบบไดเมอร์ ไตรเมอร์และเตตระเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 31,636.184, 48,463.684 และ 63,634.812 ดาลตัน ตามลำดับ

8. จากการศึกษาด้วยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าปลาตะเพียนมีค่า pI อยู่ในช่วงระหว่าง 5.8 – 7.0 ส่วนปลาฉลามมีค่า pI อยู่ในช่วงระหว่าง 5.5 – 8.0

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของสายกลอบินและศึกษาคุณสมบัติความชอบต่อออกซิเจนของฮีโมโกลบินกลุ่มเอนดิกและกลุ่มแคโรติก ได้

2. เมื่อทราบเกี่ยวกับคุณสมบัติความชอบต่อออกซิเจนแล้วสามารถนำความรู้ที่ได้ไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านการปรับปรุงพันธุ์ปลาให้มีความทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณก๊าซออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำน้อยได้ และนอกจากนี้ยังอาจนำความรู้ที่ได้ไปเป็นข้อมูลพื้นฐานส่วนหนึ่งของการผลิตเลือดเทียม (artificial blood) เพื่อใช้ในทางการแพทย์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เกรียงไกร ทองสาร. 2548. คุณสมบัติทางชีวเคมีของอีโมโกลบินของปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กองประมงน้ำจืด. 2538. ปลาอุก. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, สมศักดิ์ ล้วนปรีดา, สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัณยวุฒิ และสุภาพ แก้วละเอียด. 2531. การเพาะและอนุบาลปลาคูเทต. วารสารการประมง 41(6):535-544.
- มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, สุจินต์ หนูขวัญ, ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ และ กำชัย ลาวัณยวุฒิ. 2533. บิ๊กอู ปลาเศรษฐกิจชนิดใหม่. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- พินิจ สี่พิทักษ์เกียรติ และ โยธิน ลีลานนท์. 2527. ชีวประวัติและการเพาะเลี้ยงปลาตะเพียนขาว. เอกสารวิชาการ จ.39/2527. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- โยธิน ลีลานนท์. 2524. ชีวประวัติปลาคูก้าน. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- ศราวุธ เจะโสภา, สุวิมล สี่หิรัญวงศ์ และพรพนม พรหมแก้ว. 2538. ชีววิทยาบางประการของปลาคูก ลำพัน. ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดปัตตานี, กองประมงน้ำจืด, กรมประมง.
- สมโภชน์ อัครกะทิววัฒน์, วันเพ็ญ มินกาญจน์ และ จีรพรรณ รัตนเทวี. 2519. การแพร่กระจายของพันธุ์ปลาน้ำจืดในประเทศไทย. รายงานวิชาการ ปี 2519. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- โสภา อารีรัตน์. 2513. พันธุ์ปลาคูกที่พบในประเทศไทย. กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง.

สำรอง เผ่าหอม. 2512. การศึกษาชีวประวัติของปลาตะเพียนขาวด้วยวิธีเพาะพันธุ์และการเจริญของคัพภะ. รายงานประจำปี 2512. สถานีประมงน้ำจืดเชียงใหม่, เชียงใหม่. (อัคราณา)

อภัสสร ชูเทศะ. 2547. **ชีวเคมี**. ภาควิชาสรีรวิทยา, คณะสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Bio – Medical Laboratories. **Cyanmethemoglobin**. B. M. Lab. Limited Partnership. Thailand.

Bittencourt, N. de L.R., L.M., Molinari, D. de O., Scoaris, R.B., Pedroso, C.V., Nakamura, T.U., Nakamura, B.A. de A. Filho, and B.P.D. Filho. 2003. **Haematological and Biochemical Values for Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* Cultured in Semi-intensive System**. 25(2) : 385-389.

Boonyarat, D. 1977. **Hemoglobin Thailand: Structure Characterization and Oxyhemoglobin Dissociation Studies**. M. S. Thesis, Mahidol University.

Bossa, F., M.R Savi, D. Barra and M. Brunori. 1982. Structural comparison of the haemoglobin components of the armoured catfish *Pterygoplichthys pardalis*. **Biochem. J.** 205 : 39-42.

Brewer, G. J. 1972. **Hemoglobin and Red Cell Structure and Function**. Plenum Press. New York, U.S.A

Brown, B.A. 1993. **Hematology. Principles and Procedures**. 6th ed., Lea & Febiger, Philadelphia.

Brunori, M., J. Bonaventura, A. Focesi Jr., M. I. Galdames - Portus and M. T. Wilson. 1979. Separation and Characterization of the Hemoglobin Components of *Pterygoplichthys pardalis*, The Acaribodo. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 173-177.

- Bunn, H. F. 1971. Different in the Interaction of 2,3-Diphosphoglycerate with Certain Mammalian Hemoglobins. **Science**. 172: 1049-1050.
- Chong, K. T., G. Miyazaki, H. Morimoto, Y. Oda and S. Y. Park. 1999. Structure of the Deoxy and CO Forms of Haemoglobin from *Dasyatis akajei*, A Cartilaginous Fish. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallgr.** 55 (Pt): 1291-1300.
- 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.
- _____, A., Bendixen, E., Malte, H. and R.E., Weber. 1997. The Anodic Hemoglobin of *Anguilla anguilla*. Molecular Basis for Allosteric Effects in a Root-effect Hemoglobin. **J. Biol. Chem.** 272(25) : 15628-15635.
- Farmer, M., H. J. Fyhn, U. E. H. Fyhn and R. W. Noble. 1979. Occurrence of Root Effect Hemoglobins in Amazonian Fishes. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 115-124.
- Galdames-Portus, M. I., R. W. Noble, M. Farmer, D. A. Powers, A. Riggs, M. Brunori, H. J. Fyhn and U. E. H. Fyhn. 1979. Studies of the Functional Properties of the Hemoglobins of *Osteoglossum bicirrhosum* and *Arapaima gigas*. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 145-154.
- Garcia-Franco, M. 1993. **Intra - and Interspecific Relationships of the Clariid Catfish *Clarias batrachus***. Ph.D. Thesis. Tokyo University of Fisheries, Tokyo.
- Garlick, R. L., H. J. Fyhn, U. E. H. Fyhn, J. P. Martin, R. W. Noble and D.A. Powers. 1979a. Functional Studies on the Separated Hemoglobin Components of an Air-Breathing Catfish, *Hoplosternum littorale* (Hancock). **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 219-226.

- _____, R., J. Bonaventura, J. P. Martin and D. A. Powers. 1979b. Functional Studies on the Single component Hemoglobin from an Amazon Knife Fish, *Sternopygus macrurus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A:201- 205.
- Guyton, A. C., and J. E. Hall. 1996. **Textbook of Medical Physiology**. 8th. ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, U. S. A..
- Harrington, J. P. 1986. Structural and Functional Studies of the King Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, Hemoglobins. **Comp. Biochem. Physiol.** 84 B(1): 111-116.
- Helena Laboratories. 2001. **Hemoglobin Electrophoresis Procedure**. France.
- Hora, S. S. And T. V. R. Pillay. 1962. **Handbook of Fish Culture in the Indo-Pacific Region**, pp. 81-83. In FAO Fisheries Biology Technical Paper, No.14.
- 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..
- Imsland, A. K., Brix, O., Naevdal, G. and E. N., Samuelsen. 1997. Hemoglobin genotypes in turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque), Their oxygen affinity properties and relation with growth. **Comp. Biochem. Physiol.** 116 (2): 157-165.
- Jain, N.C. 1986. Schalm's **Veterinary Hematology**. 4th ed., Philadelphia: Lea & Febiger U.S.A.
Cited Feldman, F. B., J.G. Zinki and N.C. Jain. **Veterinary Hematology: Hemoglobin Synthesis and Destruction**. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U. S. A..
- Jawad, L.A., Al-Mukhtar, M.A. and H.K. Ahmed. 2004. **The Relationship between Haematocrit and some Biological Parameters of the Indian Shad, *Tenuulosa ilisha* (Family Clupeidae)**. Animal Biodiversity and Conservation. 27(2) : 47-52.

- Joshi, B.D. and R.S. Tandon. 1977. Seasonal Variations in the Haematologic Values of Freshwater Fishes. I. *Heteropneustes fossilis* and *Mystus vittatus*. **Comp. Physiol. Ecol.** 2(1) : 22-26.
- Kanko, S. and K. Autio. 1985. Electrophoretic Studies of Blood Globin Preparations. **J. Chromatogr.** 324 (2): 295-406.
- Karpov, L. K. and G. G., Novikov. 1980. The Haemoglobin Alloforms in Cod (*Gadus morhua* L.), Their Functional Characteristics and Distribution in the Populations. **J. Ichthyol.** 20 : 45-50.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680 – 685.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993. **Principles of Biochemistry: Chapter 8 Protein Functions as Illustrated by Oxygen - Binding Proteins.** Worth Pub. New York, U.S.A. p 169 – 202.
- Leone, B.J. 1998. **Artificial blood:** Available source:
<http://www.dcmsonline.org/jaxmedicine/1998journals/december98/artificialblood.htm>,
 November 8, 2000.
- Martin, J. P., J. Bonaventura, M. Brunori, H. J. Fyhn, U. E. H. Fyhn, R. L. Garlick, D. A. Powers and M. T. Wilson. 1979a. The Isolation and Characterization of the Hemoglobin Components of *Mylossoma sp.*, an Amazonian Teleost. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 155-162.
- _____, J. P., J. Bonaventura, H. J. Fyhn, U. E. H. Fyhn, R. L. Garlick, D. A. Powers. 1979b. Structural and Functional Studies of Hemoglobins Isolated from Amazon Stringrays of the Genus *Potamotrygon*. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 131- 138.

- _____, J. P., H. J. Fyhn, U. E. H. Fyhn, R. L. Garlick, R. W. Noble and D. A. Powers. 1979c. The Hemoglobins of *Pseudodoras*, a South American Catfish: Isolation, Characterization and Ligand Binding Studies. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 207-212.
- _____, J. P., M. Brunori, R. L. Garlick and D. A. Powers. 1979d. The Isolation and Characterization of the Hemoglobin of *Brachyplatystoma sp.*: A Tropical Catfish. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 213- 217.
- Mlay, P.S., M., Seth, S.T., Balthazary, R.T., Chibunda, E.C.J.H., Phiri, and O.B., Balemba. 2007. **Total Plasma Proteins and Hemoglobin Levels as Affected by Worm Burden in Freshwater in Morogoro**, Tanzania. Livestock Research for Rural Development. 19(2).
- Mongkolprasit, S., S. Sontirat, S. Vimollohakarn and T. Songsirikul. 1997. **Checklist of Fishes in Thailand**. Office of Environmental Policy and Planning, Bangkok, Thailand. 353p.
- Mork, J., Giskeodegard, R. and G., Sundnes. 1984. **The haemoglobin polymorphism in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) : Genotype differences in somatic growth and in maturing age in natural population**. In : Dahl, E., Danielsen, D. S., Moksness, E. and Solemdal, P. (eds). The Propagation of Cod *Gadus morhua* L. Flodevigen rapportserie. 1 : 721-732.
- Murachi, S. 1959. Haemoglobin contents, erythrocytes sedimentation rate and haematocrit of the blood in young of the carp. *Cyprinus carpio*. **J. Fac. Fish Anim. Husb.** 2 : 241-247.
- Moss, G. S., S. A. Gould, H. L. Sehgal, L. R. Sehgal and A. L. Rosen. 1984. **Hemoglobin Solution: from Tetramer to Polymer**. Surgery. 95: 249.
- 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.

- Pellegrini, M., B. Giardina, A. Olianias, M. T. Sanna, A. M. Deiana, S. Salvadori, G. Di Prisco, M. Tamburrini and M. Corda. 1995. Structure/Function Relationships in the Hemoglobin Components from Moray (*Muraena helena*). **Eur. J. Biochem.** 234(2): 431-436.
- Perry, S. F. and B. Tuffs. 1998. **Fish Respiration**. Academic Press, Sandiaco, California.
- Perutz, M. F. and K. Imai. 1980. Regulation of Oxygen Affinity of Mammalian Haemoglobins. **J. Mol. Biol.** 136: 183-191.
- Prisco, G. D., B. Giardina and R. E. Weber. 2000. **Hemoglobin Function in Vertebrates: Molrcular Adaptation in Extreme and Temperate Environments**. Springer, Verlag Italia, Milano.
- Rapoport, S. and G. M. Guest. 1984. J. Biol. Chem, p. 269. Cited Bunn, H. F. Differences in the Interaction of 2,3 - Diphosphoglycerate with Certain Mammalian Hemoglobins. **Science**. 172: 1049-1050.
- Riggs, A., H. J. Fyhn, U. E. H. Fyhn and R. W. Noble. 1979. Studies of the Functional Properties of the Hemoglobins of *Hoplais malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 62 A: 189-193.
- Ritter, P. 1996. **Biochemistry: A Foundation**. Brooks/COLE Publishing Company. Pacific Grove, U.S.A..
- Rule, G. 2000. **Oxygen binding by myoglobin & hemoglobin**. Available Source: <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/hemoglobin-myoglobin.html>, November 28, 2000.
- Sauer, J. and Harrington, J. P. 1988. Hemoglobins of the Sockeye Salmon. *Oncorhynchus nerka*. **Comp. Biochem. Physiol.** 91 A : 109-1114.

- Shikama, K. and A. Matsuoka. 2003. Human haemoglobin: a new paradigm for oxygen binding involving two types of $\alpha\beta$ contacts. **Eur. J. Biochem.** 270: 4041–4051.
- Smith, H.M. 1945. **The Freshwater Fishes of Thailand**. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.188p.
- 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.
- Srichayanont, S. 1974. **Hemoglobin Siam ($\alpha_2^{15\text{ARC}}\beta_2$): A New α -Chain Variant**. M.S. Thesis, Mahidol University.
- Sripanitan, R. 1983. **Structure Characterization of the Fourth Component of Hemoglobin Constant Spring**. M. S. Thesis, Mahidol University.
- Stryer, L. 1988. **Biochemistry**, 3rd ed., Freeman, New York.
- Suvatti, C. 1950. **Fauna of Thailand**. Dept. of Fisheries, Bangkok. 1100p.
- Tamburrini, M., C. Verde, A. Olinas, 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.
- Teugels, G.G. 1996. **Taxonomy, Phylogeny and Biogeography of Catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): An Overview**. pp. 9-34 *In* Lenendre, M. and J.P. Proteau (eds.) Aquatic Living Resources 9. Hors Serie.
- Vanderdon, T.L. and J.M. Colacino. 1989. Characterization of Hemoglobin from *Phoronis architecta* (Phoronida). **Comp. Biochem. Physiol.** 94 (1):mano, B.31 - 39.

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

Weber, R. E., 1982. **Intraspecific Adaptation of Hemoglobin Function in Fish to Oxygen Availability**. In : Addink, A. D. F., Spronk, N. (eds.). Exogenous and Endogenous Influences on Metabolic and Neural Control. Pergamon Press, Oxford : 87-102.

_____, R.E. 2000. Adaptations for Oxygen Trasport: Lessons from Fish Hemoglobin, pp. 22 – 37. In G. D. Prisco, B. Giardina and R.E. Weber. **Hemoglobin Function in Vertebrate: Molecular Adaptation in Extreme and Temperate Environments**. Springer, Verlag Italia, Milano.

Whitaker J R. 1963. Determination of Molecular Weight of Proteins by Gel Filtration on Sephadex. **Anal. Chem.** 35: 1950 – 3.

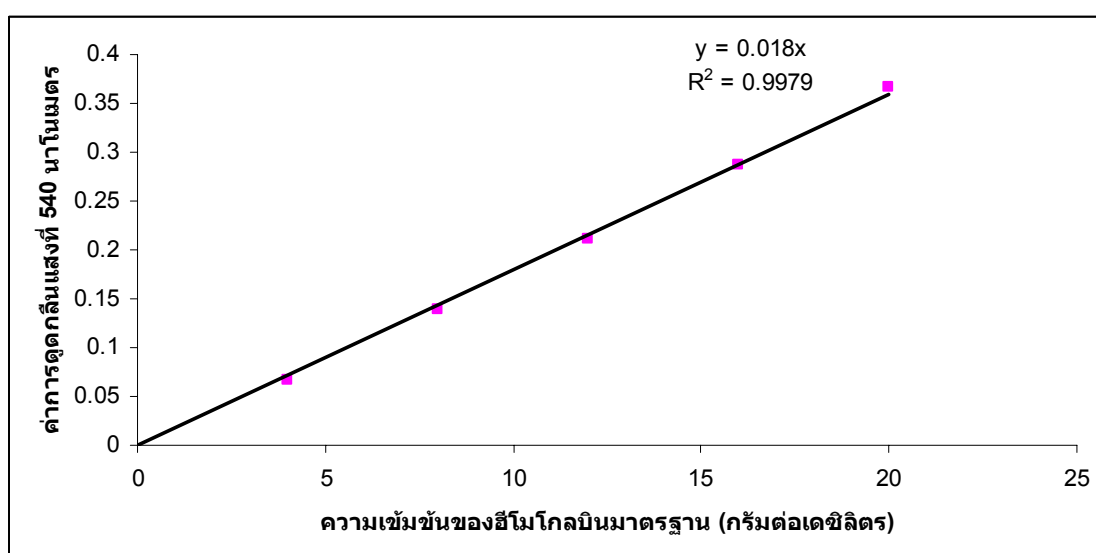
Zinoffsky, O. 1985. **On the size of the hemoglobin molecule**. Available Source: <http://www.udel.edu/chem/white/teaching/CHEM342/Zin1886.html>, November 3, 2000.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและความเข้มข้นของอีโมโกลบินมาตรฐาน

(หน่วย: กรัมต่อเดซิลิตร)

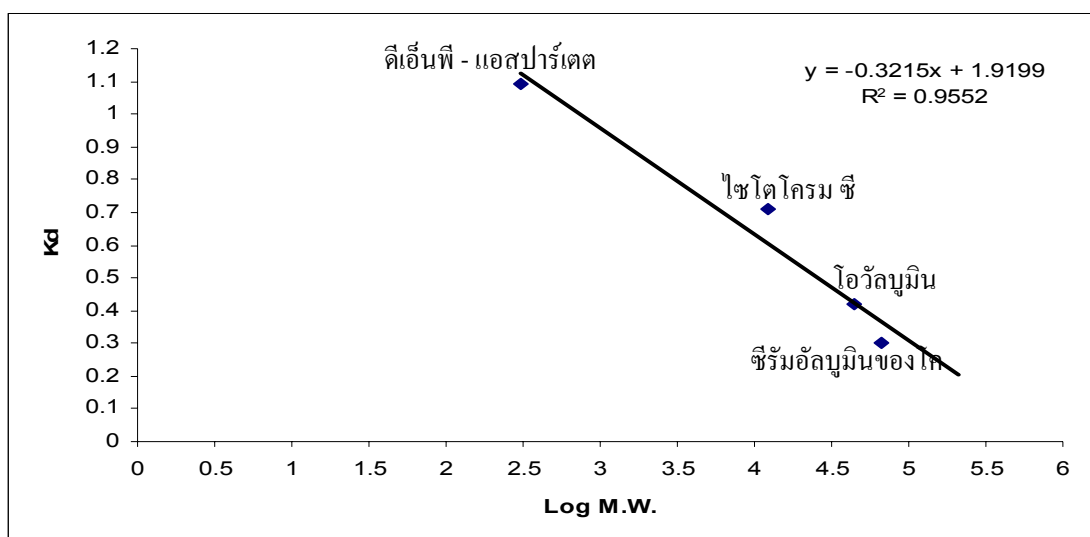
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของอีโมโกลบินมาตรฐาน
0.000	0.00
0.067	4.00
0.139	8.00
0.212	12.00
0.289	16.00
0.365	20.00



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของอีโมโกลบิน

ตารางผนวกที่ 2 หลอดที่สารถูกชะออกมามากที่สุด ค่า Kd ค่า Log M.W. และค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและของอีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียน ที่ผ่านเจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

สารละลาย	หลอดที่สารถูกชะออกมามากที่สุด	Kd	Log M.W.	M.W. (คาลตัน)
บลูเดกซ์แทรน	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 - แอสปาร์เตต	84	1.00	2.48	299.20
อีโมโกลบินปลาฉลาม	43	0.37	4.80	63,096
อีโมโกลบินปลาตะเพียน	42	0.35	4.81	64,565



ภาพผนวกที่ 2 กราฟแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและของอีโมโกลบินปลาฉลามและปลาตะเพียน ที่ผ่านเจลฟิเลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเซฟาเดกซ์ G-100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์โซเดียมเอไซด์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายคมสัน นามตะกู
วัน เดือน ปี ที่เกิด	เกิดวันที่ 23 กันยายน พ.ศ.2525
สถานที่เกิด	บ้านหนองเมย อำเภอเมยวดี จังหวัดร้อยเอ็ด
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากคณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2549
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ผลงานดีเด่น ได้รับรางวัลดีเด่นในการนำเสนอผลงานทางวิชาการภาคบรรยายด้าน Fishery Biotechnology การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษา เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ครั้งที่ 3 เมื่อวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2550 ผลงานวิจัย การศึกษาเปรียบเทียบฟิโนไทป์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของอีโมโกลบินในปลาดุก (<i>Clarias batrachus</i>) และปลาตะเพียน (<i>Puntius gonionotus</i>) อีโมโกลบินสุนัขพันธุ์ไทยหลังอาน: การแยกให้บริสุทธิ์โดยเจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีและศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยแมสสเปกโตรเมตรีและโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พ.ศ. 2551
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ทุนผู้ช่วยวิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร พ.ศ. 2550 ถึง พ.ศ. 2551