

589.3

ก 234 ก

ร 3

การศึกษาสมบัติและการประยุกต์ใช้สารอาร์-ไพโคอิทธิฤทธิ์สกัดได้จากสาหร่ายทะเล
สกุลกราซีลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี

๒๑ ต.ค. 2535

ปริญญานิพนธ์
ของ
สมชัย อวเกียรติ



เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม 2535

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการควบคุม และคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปัญหานี้นับบัดนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน
(ผศ.ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ)

.....กรรมการ
(ผศ.สวลี จันทร์กระจำง)

.....กรรมการ
(รศ.นิตยา ธรรมนาเลิศ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน
(ผศ.ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ)

.....กรรมการ
(ผศ.สวลี จันทร์กระจำง)

.....กรรมการ
(รศ.นิตยา ธรรมนาเลิศ)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร.ธวัช นาคษมตงรัตน์)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร.วิระวรรณ สิทธิกรกุล)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปัญหานี้นับบัดนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศ. ดร.สมพร บัวทอง)

วันที่...6...เดือน...พฤษภาคม...พ.ศ...2535...

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จมาด้วยความช่วยเหลือ แนะนำและความอนุเคราะห์อย่างใกล้ชิด ด้วยดีจาก ผศ.ดร.ธารารัตน์ คมศิริ ผศ.สวลี จันทร์กระจ่าง และ รศ.นิตยา ชรรพนาเลิศ รวมทั้ง ดร.ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ และดร.วิระวรรณ สิทธิกรกุล ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำทั้งมาร่วมเป็นกรรมการในการสอบ นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความช่วยเหลืออีกจากหลายหน่วยงานคือ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนวิทยา คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย (กทวท.)

หน่วยวิจัยไบโอพอลิเมอร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมืออุปกรณ์ สารเคมี และทุนในการวิจัย ซึ่งผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ทั้งนี้ต้องขอขอบพระคุณ ท่าน รศ.ดร.สมณฑา พรหมบุญ คณาจารย์ภาควิชาเคมี-ชีววิทยา คณาจารย์หน่วยวิจัยไบโอพอลิเมอร์ เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ บิดามารดา และผู้มีพระคุณที่ได้กล่าวนาม ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และที่สำคัญที่สุดคือกำลังใจที่มอบให้ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

สมชัย อวเกียรติ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำและเอกสารอ้างอิง	1
	บทนำ	1
	สาหร่ายทะเลสกุลกราซีลาเรีย	2
	อาร์-ไฟโคอิริทริน	6
	การแยกสกัดสารอาร์-ไฟโคอิริทริน	10
	เชื้อ <i>Entamoeba histolytica</i>	11
	โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibodies ; MAh)	14
	การประยุกต์ใช้สารจำพวกไฟโคอิริทริน	15
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	16
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	16
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	17
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	17
2	วิธีดำเนินการค้นคว้าทดลอง	18
	การแยกอาร์-ไฟโคอิริทริน จากสาหร่ายทะเลสกุล กราซีลาเรีย จาก จังหวัดปัตตานี	18
	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้	21
	การศึกษาลมับติบางประการ ของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้	22
	การเตรียม MAbIgG ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i> จากหนู mouse (mouse monoclonal antibody immunoglobulin G fraction ..	24
	การเตรียม สารควบคู่ (conjugate) ระหว่าง อาร์-ไฟโคอิริทริน กับ MAbIgG ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i>	26
	การประยุกต์ใช้สารควบคู่ทำปฏิกิริยาทาง immunofluorescent ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i>	26
3	ผลการทดลอง	29
	การแยกสารอาร์-ไฟโคอิริทรินจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซีลาเรีย	29
	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สาหร่ายที่ 4 องศาเซลเซียส	29
	การแยกรงควัตถุโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	30

การทำสารอาร์-ไฟโคอิริทรินให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส ..	32
การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้	35
การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส	35
สมบัติทางประการของ อาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้	36
การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอาร์-ไฟโคอิริทรินที่ความยาวคลื่นต่างๆ	36
การศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของ อาร์-ไฟโคอิริทริน	37
การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอาร์-ไฟโคอิริทริน ด้วยเทคนิค เจลฟิลเทรชัน	38
การศึกษาหน่วยย่อย ของ อาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้ด้วย เอสดีเอส- พอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	44
การเตรียม MAbIgG จาก mouse ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i>	46
การเตรียมสารควบคุม ระหว่างอาร์-ไฟโคอิริทรินกับ MAbIgG	47
การประยุกต์ใช้สารควบคุมทาง immuno fluorescent ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i>	48
4 สรุปและอภิปรายผล	49
ข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก ก.	63
ภาคผนวก ข.	69
ประวัติผู้วิจัย	75

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ชนิดของไฟโคบิลินที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนของสาหร่ายต่าง ๆ	8
2	ขนาดสายพอลิเพปไทด์ของหน่วยย่อยบิลิโปรตีน	9
3	อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 กับ 280 นาโนเมตร .	33

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 วงจรชีวิตของสาหร่ายสกุลกราซีลาเรีย	5
2 พันธะไทโออีเทอร์ ของเพปไทด์ที่จับกับไฟโคบิลิน ของไฟโคไซยานินลิน ไฟโคอิริโทรบิลิน และไฟโคโยโรบิลิน	7
3 การวางตัวของสารรงควัตถุในเม็ดคลอโรพลาสต์และการขนส่งประจุ	8
4 วงชีวิตของ เชื้อ <i>Entamoeba histolytica</i>	13
5 พยาธิสภาพของการติดเชื้อ <i>Entamoeba histolytica</i>	14
6 แผนภูมิการสกัดแยกรงควัตถุ อาร์-ไฟโคอิริทริน ออกจากสาหร่าย	20
7 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเลี้ยงและแยก MAbIgG ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i> ..	27
8 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำสารควบคู่ของ MAbIgG ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i> กับ อาร์-ไฟโคอิริทริน	28
9 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ได้จากการแช่สาหร่ายบดที่ 4 องศาเซลเซียส ในเวลา 5 ถึง 30 วัน	29
10 ตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	30
11 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนที่ความเข้มข้น ของการละลายของแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 30-50	31
12 ผลการแยกตะกอนที่ความเข้มข้นของการละลายของแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 30-50 ด้วยดีไอเออี เซลลูโลส 52 คอลัมน์โดยชะด้วยสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ละลายอยู่ร้อยละ 40 30 20 และไม่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ	32
13 สารที่แยกได้จากคอลัมน์ ดีไอเออี เซลลูโลส 52	34
14 ผลของอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจล พอลิอะคริลาไมด์เข้มข้นร้อยละ 7	35
15 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ อาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้ จากคอลัมน์ ดีไอเออี เซลลูโลส-52 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 6.7	36
16 สเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของอาร์-ไฟโคอิริทริน	37
17 ผลการแยกอาร์-ไฟโคอิริทรินด้วยคอลัมน์ เซฟาคริล เอส-300	38
18 ผลการแยกโปรตีนมาตรฐานด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300	40

19	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{uv} กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน	40
20	ผลการแยกอาร์-ไฟโคอิริทริน ด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC-250	41
21	ผลการแยกโปรตีนมาตรฐานด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC-250	42
22	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{uv} ของโปรตีนมาตรฐาน และอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้ด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC-250	43
23	ผลของอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์ เข้มข้น ร้อยละ 10 ที่ pH 8.9	44
24	ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของสารไฟโคอิริทรินโดยเปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐาน ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจล เอสดีเอส- พอลิอะคริลาไมด์ เข้มข้นร้อยละ 10 pH 8.9	45
25	ผลการแยกอาร์-ไฟโคอิริทริน และ MAbIgG ของหนู mouse ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i> ด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC-250	46
26	ผลการแยกอาร์-ไฟโคอิริทริน MAbIgG ของหนู mouse ต่อเชื้อ <i>E. histolytica</i> และสารควบคุมของสารทั้งสอง ด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC-250	47
27	เซลล์ <i>E. histolytica</i> ที่ติดฉลากด้วยสารควบคุมของอาร์-ไฟโคอิริทริน- MAbIgG เมื่อดูผ่านกล้อง fluorescent microscopy ที่มีกำลังขยาย 25 เท่า	48
28	รูปสมมติของการรวมจับกันของหน่วยย่อยของอาร์-ไฟโคอิริทริน	51
29	ปฏิกิริยาในกระบวนการเกิดสารควบคุมของ MAbIgG กับ อาร์-ไฟโคอิริทริน ..	52
30	สำหรับทะเลสาบกลกราชิลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี	64
31	เชื้อ <i>E. histolytica</i> สายพันธุ์ HM-1:IMSS ในอาหารเหลว มองผ่านกล้อง จุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ (กำลังขยาย 20 เท่า)	65
32	กราฟการแยก MAbIgG ของหนู mouse ด้วยคอลัมน์เซฟาโรส โปรตีน เอ ..	66

ภาพประกอบ	หน้า
33 ภาพที่ทำการทดสอบ ELISA ที่ปรากฏสีเหลืองของปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับ MAB1gG ที่เตรียมได้	67
34 กระจุกลไลด์ที่มีการตรึงเซลล์เชื้อ <i>E. histolytica</i> สายพันธุ์ HM-1:IMSS	68

บทที่ 1

บทนำและเอกสารอ้างอิง

บทนำ

จากความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีที่มนุษย์พยายามนำทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่มาใช้ประโยชน์ให้มากที่สุด สำหรับทะเลนั้นเป็นทรัพยากรธรรมชาติประเภทหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาลักษณะของสาหร่าย พร้อมทั้งการเพาะเลี้ยงและกระบวนการแปรรูปให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม ในประเทศไทยมีชายฝั่งทะเล มีระยะทางประมาณ 2,420 กิโลเมตร คือ มีฝั่งทะเลด้านอ่าวไทยประมาณ 1,930 กิโลเมตร และ ทางฝั่งทะเลอันดามันประมาณ 490 กิโลเมตร ดังนั้นทรัพยากรธรรมชาติในท้องทะเลจำพวกสาหร่ายทะเลในน่านน้ำของประเทศไทย จึงเป็นแหล่งที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้น นอกจากทรัพยากรอื่น ๆ ในประเทศต่าง ๆ และประเทศไทย ได้มีการพัฒนาการแปรรูปสาหร่ายทะเลให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น นำมาทำเป็นอาหารเสริมทดแทนภาวะขาดอาหารพวกโปรตีน หรือ ไอโอดีน (iodine) แปรรูปในรูปของวุ้น (agar) คาราจีแนน (carrageenan) แอลจิน (algin) สารสี และอนุพันธ์ของสารเหล่านี้ วุ้นเป็นผลิตภัณฑ์อย่างหนึ่งที่ได้มาจากสาหร่ายทะเล และมีการพัฒนาเป็นอุตสาหกรรม ในประเทศไทยมีการนำวุ้นมาพัฒนาจนเป็นอาภาโรสที่เป็นสารที่มีราคาแพง (เสาวนีย์ เสาวภาวสิฐา. 2533) สาหร่ายทะเลที่ใช้ในการแปรรูปเป็นวุ้นส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายทะเลสีแดง สกุลกราซิลาเรีย (*Gracilaria* spp.) และเจลลิเดียม (*Gelidium*) ในประเทศไทยได้มีการสำรวจพบสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียอยู่หลายท้องที่ เช่น ในทะเลสาบสงขลา พบสาหร่ายกราซิลาเรีย ฟิชเชอร์ไลน์ (*Gracilaria fisheri*) ที่อ่าวปุน ในจังหวัดปัตตานี พบสาหร่ายกราซิลาเรีย เทนูลิสทีปีตาตา (*Gracilaria tenuistipitata*) เป็นต้น หน่วยวิจัยไบโอพอลิเมอร์ได้ทำการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเลในฟาร์มกึ่งที่จังหวัดปัตตานี เป็นสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย ฟิชเชอร์ไลน์ (ทำการวิเคราะห์พันธุ์โดย ศ. กาญจนภาชนะ ลีวัฒน์ คณະประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตวุ้นในระดับอุตสาหกรรม (หน่วยวิจัยไบโอพอลิเมอร์. 2532) นอกจากนี้ยังพบว่าสารรงควัตถุที่อยู่ในสาหร่ายทะเล เป็นสารเรืองแสงที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย สารเรืองแสงเป็นสารที่หายาก ได้มีการพัฒนาหาสารเรืองแสงมาใช้งานโดยเฉพาะอย่างยิ่งงานวิจัยทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา หรืองานวิเคราะห์ห่อหุ้มระดับโมเลกุลในการให้การเรืองแสง (Ullman and Khanm. 1981) และมีการนำรงควัตถุนี้มาใช้งานทางด้านชีวเคมี จุลชีววิทยาและงานด้านการแพทย์ โดยอยู่ในรูปของสารติดตามหรือฉลากติดโปรตีน (Kronick.

1986; Oi, Glazer and Stryler. 1982) ซึ่งรังควัตถุดังกล่าวนี้มีอยู่หลายชนิด เช่น อาร์-ไฟโคอิริทริน เป็นรงควัตถุที่มีการนำมาประยุกต์ใช้มากและมีมากในสาหร่ายทะเลสีแดง เป็นต้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาสมบัติของ อาร์-ไฟโคอิริทรินจากสาหร่ายทะเลสีแดงสกุลกราซิลาเรีย ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในฟาร์มกึ่งจากจังหวัดปัตตานี และศักยภาพในการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านการแพทย์ สาขาอิมมูโนวิทยาเพื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบ (Probe) โดยติดฉลากกับแอนติบอดีต่อเชื้ออโมบีบา *Entamoeba histolytica* เพื่อตรวจหาเชื้อนี้ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคบิดมีตัวหรือบิดในลำไส้ (amoebic dysentery) ซึ่งเป็นโรคในเขตเมืองร้อน และยังคงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย สารอาร์-ไฟโคอิริทรินนี้ได้มีการผลิตออกจำหน่าย และส่งเข้ามาในประเทศไทยบ้างแล้ว หากประยุกต์ใช้ได้จะสามารถลดเงินตราการนำเข้าได้จำนวนหนึ่ง

สาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย

สาหร่ายทะเลให้วัน ส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายทะเลสีแดง สาหร่ายพวกนี้จัดอยู่ในวงศ์ (Family) กราซิลารีเอซีอี (Gracilariaceae) การจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานมีดังนี้

Division Rhodophyta

Class Rhodophyceae

Subclass Florideophycidae

Order Gigartinales

Family Gracilariaceae

Genus *Gracilaria*

สาหร่ายทะเลให้วันสกุลกราซิลาเรีย มีอยู่หลายสายพันธุ์ (species; spp.) และมีชื่อตามท้องถิ่น เช่น ในประเทศไทย มี สาหร่ายผมนาง สาย สายวัน สาหร่ายข้อ และสาหร่ายเขากวาง สาหร่ายทะเลให้วันมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น แม้ในเขตแอนตาร์ติก (Kim. 1970; Bird. 1967) ในประเทศไทย มีการแพร่กระจายของสาหร่ายอยู่ตามชายฝั่งอ่าวไทย และฝั่งมหาสมุทรอินเดีย เช่น จังหวัดตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สงขลา สุราษฎร์ธานี ระนอง ปัตตานี และนราธิวาส (กาญจนภาชน์ ลีวโนมนต์. 2521; สุชาติ วิเชียรสรรค์. 2511; Lewmanomont. 1982) ส่วนมากจะขึ้นในบริเวณดินปนทราย มีการสำรวจสาหร่ายทะเลให้วันสกุลกราซิลาเรียที่พบในประเทศไทย และรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายทะเลให้วันในอ่าวไทย

ด้านตะวันออกและตะวันตกรวมทั้งฝั่งทะเลอันดามัน รวมได้ 15 ชนิด และทำอนุกรมวิธานแล้ว มี 12 ชนิด (กาญจนาภรณ์ ลีวโนมน์ และคนอื่น ๆ. 2534) ได้แก่

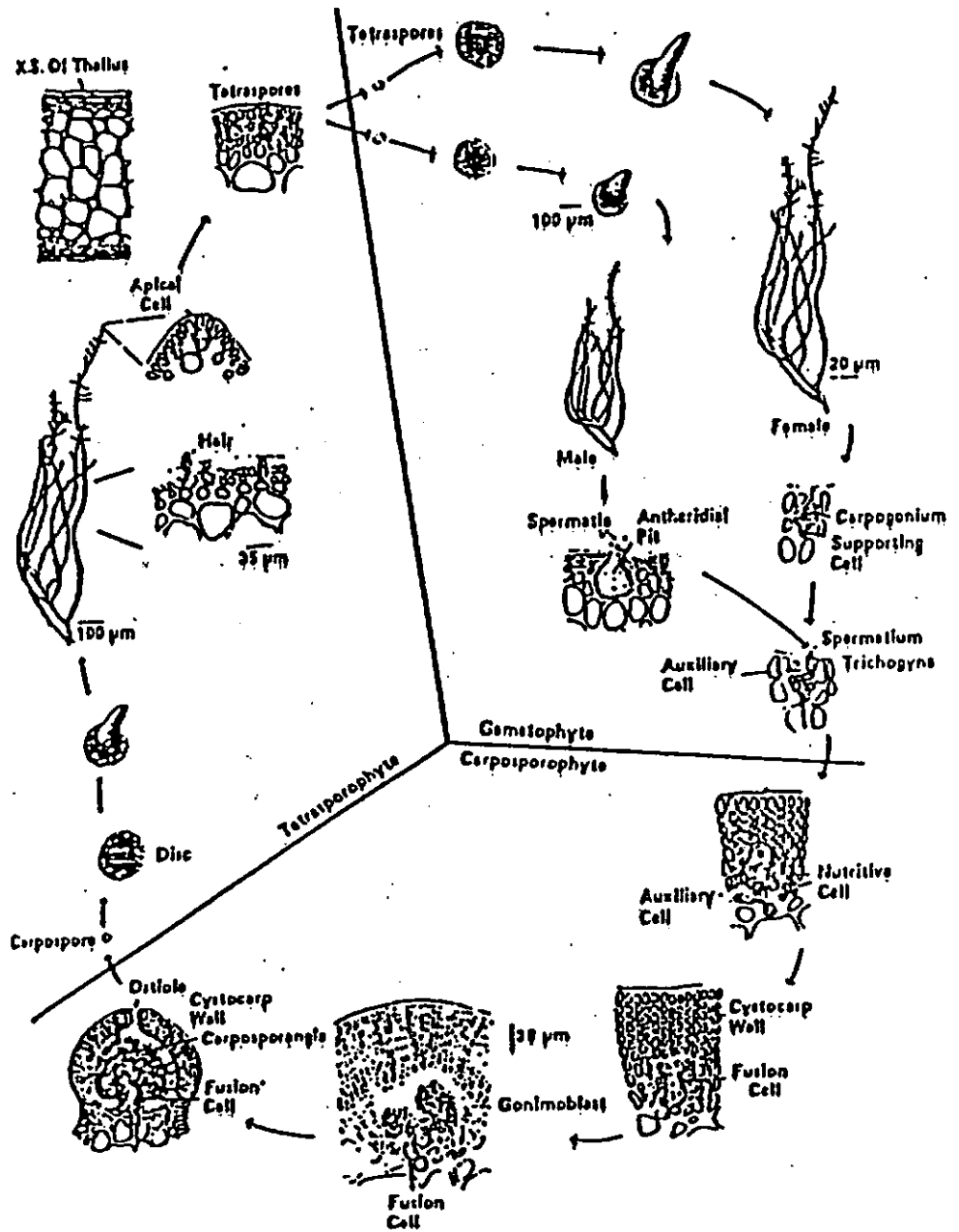
1. *Gracilaria eucheumoides* Harvey
2. *G. firma* Chang & Xia
3. *G. irregularis* Abbott
4. *G. tenuistipitata* Chang & Xia
5. *G. textorif* (Suringar) De Toni
6. *G. salicornia* (C. Agardh) Dawson
7. *G. arvillei* (Motagne) Xia & Abbott
8. *Gracilaria* sp. 1
9. *Gracilaria* sp. 2
10. *G. changii* Xia & Abbott
11. *G. fastigiata* Chang & Xia
12. *G. fisheri* Xia & Abbott
13. *G. percurrentis* Abbott
14. *G. ramulosa* Chang & Xia
15. *Gracilaria* sp.

(ตั้งแต่ 10 ถึง 15 แต่เดิมเรียกสกุล *Polycarvernosa*)

สาหร่ายสกุลกราซีลาเรีย โดยทั่วไปเจริญเติบโตได้ดีในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 ppt. (หนึ่งในพันล้านส่วน) และที่อุณหภูมิ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส (Shang, 1976) สภาพพื้นดินเป็นทรายปนโคลนหรือตะกอนโคลน โดยสาหร่ายยึดเกาะกับก้อนกรวด หรือเปลือกหอยที่กระจายอยู่ ฤดูกาลที่พบสาหร่ายทะเลนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแต่ละท้องถิ่น

สำหรับวงจรชีวิตของสาหร่ายสกุล กราซีลาเรีย มี 3 ระยะ (triphase type) คือ 1. ระยะแกมีโตไฟต์ (gametophyte phase) 2. ระยะคาร์โปสปอโรไฟต์ (carposporophyte phase) และ 3. ระยะเททรสปอโรไฟต์ (tetrasporophyte phase) โดยระยะที่ 1 และระยะที่ 2 นี้เกิดขึ้นอยู่บนต้นแกมีโตไฟต์ (gametophyte plant) ส่วนระยะที่ 3 เกิดขึ้นบนต้นเททรสปอโรไฟต์ (tetrasporophyte plant) ลักษณะของต้นแกมีโตไฟต์และต้นเททรสปอโรไฟต์มีลักษณะเหมือนกัน (isomorphic) (Dawson, 1966)

การสืบพันธุ์มีทั้งแบบไม่อาศัยเพศ (asexual) และแบบอาศัยเพศ (sexual) แบบไม่อาศัยเพศเป็นการสร้างเทรสปอร์ ส่วนแบบอาศัยเพศเป็นการสร้างเพศผู้ และเพศเมียอยู่บนต้นแกมีโตไฟต์ต่างต้นกัน บนต้นแกมีโตไฟต์เพศผู้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า "สเปิร์มาเทียม" ขึ้นภายในสเปิร์มาแทนเจียม (spermatangium) ซึ่งเกิดขึ้นบนแขนงพิเศษที่เรียกว่า "สเปิร์มาแทนเจียลฟีลาเมนต์" (spermatangial filament) ส่วนทาลัสเพศเมียสร้างคาร์โปโกเนียม (carpogonium) อยู่บนคาร์โปโกเนียลฟีลาเมนต์ (carpogonial filament) เมื่อถึงเวลาสืบพันธุ์ สเปิร์มาเทียมหลุดลอยตามน้ำมาผสมกับคาร์โปโกเนียมบนทาลัสเพศเมีย ได้เป็นไซโกต (zygote) เมื่อไซโกตแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) ได้คาร์โปโกเนียลฟีลาเมนต์เป็นปุ่มมีคาร์โปสปอแรนเจียม (carposporangium) อยู่ตรงทาลัส และมีเพอริคาร์พ (pericarp) เป็นเปลือกหุ้ม เรียกระยะนี้ว่าระยะคาร์โปสปอโรไฟต์ เมื่อเจริญเต็มที่จะมีลักษณะเป็นตุ่มกลม ๆ กระจายอยู่ตามผิวของทาลัส เรียกว่า "ซิสโตคาร์พ" (cystocarp) ภายในคาร์โปสปอแรนเจียมมี 1 คาร์โปสปอร์ เมื่อแก่เต็มที่ก็จะหลุดออกจากซิสโตคาร์พไปงอกเป็นต้นดิพลอยด์ (diploid plant) เป็นระยะเทรสปอโรไฟต์ เมื่อโตเต็มที่ก็จะสร้างเทรสปอร์ขึ้นภายในเทรสปอแรนเจียม โดยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ได้เทรสปอร์ที่มีโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ (haploid) ที่งอกเป็นต้นแกมีโตไฟต์เพศผู้และเพศเมียอย่างละเท่า ๆ กัน เป็นการเจริญครบวัฏจักรดังภาพประกอบ 1

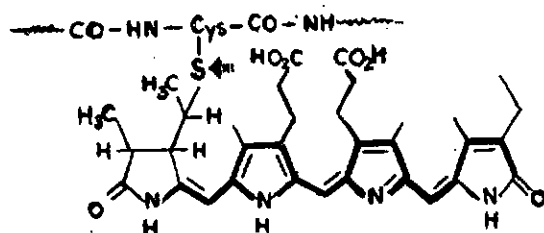


ภาพประกอบ 1 วงชีวิตของสาหร่ายสกุลกราซีลาเรีย (Lee, 1980)

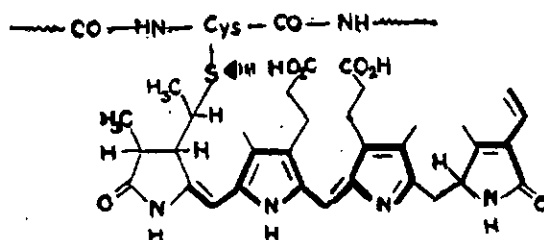
อาร์-ไฟโคอิทริน

รงควัตถุในสาหร่ายประกอบด้วยสารหลายชนิดเช่น สารพวกคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) สารพวกบิลิโปรตีน (Biliproteins) สารพวกแคโรทีน (Carotenes) และสารพวกแซนโทฟิลล์ (Xanthophylls) (Bogorad, 1962; Senger, 1967; Goodwin, 1966) การที่มองเห็นเป็น สีเหลือง สีส้ม หรือแดงนั้น เนื่องจากจำนวนของหน่วยไอโซพรีน (isoprene) ในสตรโครสร้าง (Gerosa, 1966) นอกจากกลุ่มของคลอโรฟิลล์ และกลุ่มของแคโรทีน ยังพบว่า มีกลุ่มของบิลิโปรตีน (Biliproteins) และแซนโทฟิลล์ สาหร่ายดิวซ์ต่าง ๆ มีรงควัตถุส่วนใหญ่ที่ถูกนำไปใช้ในการกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายดิวซ์ Rhodophyta มีรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์ เอ และดี สารพวก บิลิโปรตีน คือ ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ไฟโคอิทริน (Phycocerythrin) และแอลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin) สารพวกแคโรทีน คือ เบตา-แคโรทีน และแอลฟา-แคโรทีน และสารพวกแซนโทฟิลล์ คือ ทารานแซนทิน (Taraxanthin) ซีแซนทิน (Zeaxanthin) และลูทีน (Lutein) (Bogorad, 1962) สารพวกบิลิโปรตีนเป็นกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ ที่มีสมบัติในการเรืองแสงที่เกิดจากกลุ่มของบิลิน (bilin) ที่เป็นกลุ่มที่มีเตตระไพโรล (tetrapyrrole) และจะไปสร้างพันธะโควาเลนต์กับสายโปรตีนอื่น เป็นสายบิลิโปรตีน (Glazer and Stryer, 1983) กลุ่มของบิลินเป็นกลุ่มที่แสดงความเป็นโครโมฟอร์ (chromophores) กลุ่มของโครโมฟอร์ที่สำคัญมีอยู่หลายชนิด ได้แก่ ไฟโคบิลิน (phycobilin) ไฟโคอิทรินบิลิน (phycoerythrobilin) และไฟโคไซโรบิลิน (phycocourobilin) ที่มีสตรโครสร้างคล้ายรงควัตถุของน้ำดี (bile-pigment) ของสัตว์ รงควัตถุเหล่านี้จะพบได้ในสาหร่ายสีแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (กาญจนภานัน ลี้วมนันต์, 2527) กลุ่มของไฟโคบิลินเมื่อรวมกับโปรตีนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เรียกว่า "บิลิโปรตีน" สารบิลิโปรตีนที่พบในสาหร่ายมี 3 ชนิด คือ ไฟโคอิทริน มีสีส้มแดง ไฟโคไซยานิน มีสีน้ำเงิน และแอลโลไฟโคไซยานิน มีสีน้ำเงิน โดยที่ อาร์-ไฟโคอิทริน มีองค์ประกอบของ ไฟโคบิลินที่สำคัญคือ ไฟโคอิทรินบิลิน (phycoerythrobilin) และไฟโคไซโรบิลิน (phycocourobilin) อาร์-ไฟโคไซยานิน มีองค์ประกอบของไฟโคบิลินที่สำคัญคือ ไฟโคไซยานินบิลิน (phycocyanobilin) และไฟโคอิทรินบิลิน ส่วนแอลโลไฟโคไซยานิน มีองค์ประกอบของไฟโคบิลินที่สำคัญคือ ไฟโคไซยานินบิลิน บิลิโปรตีนในสาหร่ายต่างชนิดกันจะมีสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงได้มีการใช้อักษรนำหน้าไฟโคบิลิโปรตีน เพื่อแสดงถึงชนิดของสาหร่ายที่เป็นที่มาของรงควัตถุนั้น ๆ คือ ซี (C) อาร์ (R) และ บี (B) เช่น ซี-ไฟโคอิทริน คือ ไฟโคอิทรินที่พบในสาหร่าย ดิวซ์ไซยาโนไฟตา (Division Cyanophyta) อาร์-ไฟโคอิทริน คือ ไฟโคอิทรินที่พบในสาหร่าย ดิวซ์โรโดไฟตา (Division Rhodophyta) และบี-ไฟโคอิทริน คือ ไฟโคอิทริน ที่มาจากกลุ่มย่อยแบงกิโอฟีซีอี (Subclass Bangiophyceae)

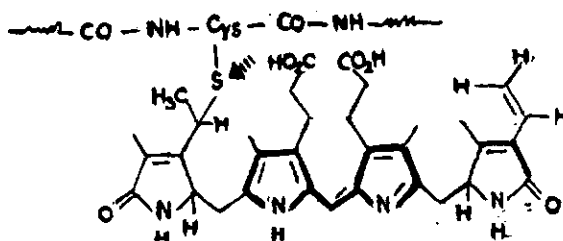
โครงสร้างของไฟโคบิลิโปรตีน ประกอบด้วย เทตระพิวโรลที่จับกับเพปไทด์ (peptide) ด้วยพันธะไทโออีเทอร์ (thio-ether) ดังแสดงในภาพประกอบ 2



สูตรโครงสร้างของไฟโคไซยานิน (PCB)



สูตรโครงสร้างของไฟโคอีริโทรบิลิน (PEB)



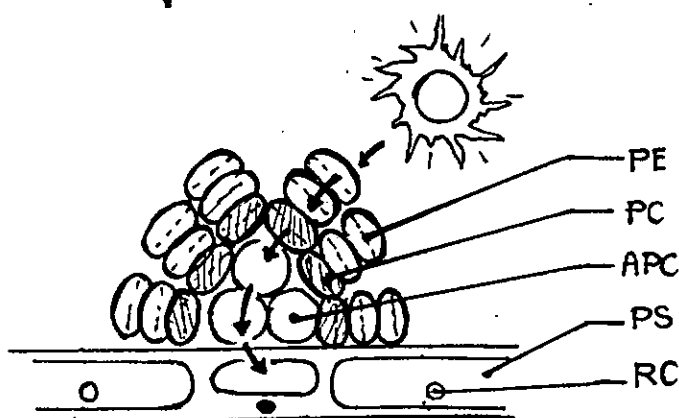
สูตรโครงสร้างของไฟโคยูโรบิลิน (PUB)

ภาพประกอบ 2 พันธะไทโออีเทอร์ (ที่ลูกศรชี้) ของเพปไทด์ที่จับกับไฟโคบิลินของไฟโคไซยานิน ไฟโคอีริโทรบิลิน และไฟโคยูโรบิลิน (KILLIES and O'CARRA, 1985)

ตาราง 1 ชนิดของไฟโคบิลินที่เป็นองค์ประกอบหลักของบิลิโปรตีนของสาหร่ายต่าง ๆ
(Goodwin, 1976)

บิลิโปรตีน (Biliprotein)	ไฟโคบิลิน (Phycobilin)
ซี-ไฟโคอีรีทริน (C-phycoerythrin)	ไฟโคอีรีโทรบิลิน (Phycoerythrobilin)
ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin)	ไฟโคไซยานินบิลิน (Phycocyanobilin)
แอลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin)	ไฟโคไซยานินบิลิน
อาร์-ไฟโคไซยานิน (R-phycocyanin)	ไฟโคไซยานินบิลิน และไฟโคอีรีโทรบิลิน
อาร์-ไฟโคอีรีทริน (R-phycoerythrin)	ไฟโคอีรีโทรบิลิน และไฟโคยูโรบิลิน (Phycourobilin)
คริปโตโมนาด (Cryptomonad)	ไฟโคอีรีทริน ไฟโคอีรีโทรบิลิน
คริปโตโมนาด ไฟโคไซยานิน	ไฟโคไซยานินบิลิน และไฟโคไวโอลิน (Phycoviolin)

จากภาพประกอบ 2 และตาราง 1 เห็นได้ว่าทั้ง 3 สตรโครสร้างมีองค์ประกอบส่วนใหญ่ของสตรโครสร้างคล้ายกัน คือ ประกอบด้วยสายเพปไทด์ที่จับกับบิลินด้วยพันธะไทโอ-อีเทอร์ แต่มีจำนวนของพันธะคู่ที่เกิดโครโมฟอร์แตกต่างกัน (Glazer and Stryer, 1983)



PE = Phycoerythrin, PC = Phycocyanin, APC = Allophycocyanin

RC = Reaction center, PS = Chlorophyll a

ภาพประกอบ 3 การวางตัวของสารรงควัตถุในเมมคโลโรพลาสต์และการขนส่งประจุ(ตามลูกศร)
(Yamazaki and others, 1988)

รงควัตถุเหล่านี้ทำให้สาหร่ายมีสีน้ำตาลเข้ม และเวลาที่สาหร่ายใกล้ตายจะมีสีแดง จากนั้นก็จะเขียวและตายไป เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าสารไฟโคไซยานินนั้นถูกทำลายได้ง่ายที่สุด เมื่อถูกทำลายไปทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสง (ภาพประกอบ 3) ถูกทำลายไปด้วย จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้สาหร่ายนั้นตายในที่สุด

มีการศึกษาสมบัติของสารรงควัตถุหลายประการในสาหร่าย โดยเฉพาะในด้านของการดูดกลืนแสง (absorption) และการปล่อยแสง (emission) ว่าสารรงควัตถุที่มาจากสาหร่ายต่างชนิดกัน ให้ค่าของการดูดกลืนแสง และให้ความเรืองแสงในช่วงคลื่นที่ต่างกัน คือ สารแอลโลไฟโคไซยานินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 650 นาโนเมตร และค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 660 นาโนเมตร อาร์-ไฟโคไซยานินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 555 และ 618 นาโนเมตร มีค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ 642 นาโนเมตร อาร์-ไฟโคอิริทรินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 495 536 และ 565 นาโนเมตร และค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ 576 นาโนเมตร และ บี-ไฟโคอิริทริน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 546 และ 562 นาโนเมตร และค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ 576 นาโนเมตร (Kronick, 1986) นอกจากนี้รงควัตถุในสาหร่ายแต่ละชนิดยังมีองค์ประกอบย่อยอีกหลายชนิด เช่น แอลฟา (α) เบตา (β) และแกมมา (γ) ที่ประกอบเป็นสายเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด เช่น อาร์-ไฟโคอิริทริน ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ α β และ γ โดยมี α และ β อย่างละ 6 หน่วย และ γ อีก 1 หน่วยย่อย และเมื่อรวมจำนวนบิลินเท่ากับ 34 บิลิน (Glazer and Stryer, 1983)

ตาราง 2 ขนาดสายพอลิเปปไทด์ของหน่วยย่อยบิลิโพรตีน (Goodwin, 1976)

บิลิโพรตีน	หน่วยย่อย	ขนาดพอลิเปปไทด์	สีของหน่วยย่อย
อาร์-ไฟโคไซยานิน	α	18,500	น้ำเงิน
(MW= 110,000)	β	20,500	แดง
อาร์-ไฟโคอิริทริน	α	19,500	แดง
(MW= 240,000)	β	19,500	ส้ม
บี-ไฟโคอิริทริน	α	19,500	แดง
(MW= 240,000)	β	19,500	แดง
แอลโลไฟโคไซยานิน	-	15,500	น้ำเงิน
(MW= 100,000)			

ปริมาณของสารไฟโคอิริทรินกับไฟโคไซยานิน ในสาหร่ายขึ้นอยู่กับระดับความเข้มของแสง โดยที่ระดับน้ำลึกจะมีความเข้มของแสงต่ำ มีผลทำให้ปริมาณของสารไฟโคอิริทรินมากกว่าไฟโคไซยานิน ในการแยกอาร์-ไฟโคอิริทรินออกมานั้นทำได้โดยทำให้เซลล์ของสาหร่ายแตก แล้วนำไปสกัดด้วย น้ำหรือสารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นแยกโปรตีนที่ปนอยู่ออกโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Fritsch, 1965) สารพวกไฟโคบิลิโปรตีนที่แยกได้จะมีจุดไฟฟ้าเสมอกัน (isoelectric point) ในช่วง 4.3-4.9 และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250,000-300,000 ดาลตัน (Goodwin, 1976) นิยม ชลิตะนาวัน ได้ทำการศึกษาหาวิธีการแยกรงควัตถุนี้จากสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียที่มาจากแหลมหิน ในจังหวัดตราด พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุล 175,000 ดาลตัน (นิยม ชลิตะนาวัน, 2531) White และ Stryer ได้รายงานว่ อาร์-ไฟโคอิริทริน มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (extinction coefficient) ที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร เท่ากับ $1.96 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (White and Stryer, 1987) และมีค่าสูงสุดของผลที่ได้จากควอนตัม (quantum yields, Q) ของการเรืองแสง เท่ากับ 0.98 ของ อาร์-ไฟโคอิริทริน (White and Stryer, 1987)

การแยกสกัดสารอาร์-ไฟโคอิริทริน

การแยกสารรงควัตถุต่าง ๆ จากสาหร่าย โดยทั่วไปทำการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี โดยในปี ค.ศ. 1967 มีการแยกสารไฟโคอิริทริน จาก *Porphyridium cruentum* เพื่อศึกษาหน่วยประกอบย่อย (subunits) และสมบัติทางด้านการดูดกลืนแสงของสาร โดยนำสาหร่ายมาบดแล้วทำการแยกสกัดด้วยการตกตะกอนโปรตีน โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ มาแช่สาหร่ายไว้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์แตก แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 30,000 g และ 100,000 g แล้วนำสารละลายส่วนบนมาผสม 1- บิวทานอล (1-butanol) แล้วปั่นแยกสารสีเหลือง และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 8 ชั่วโมง จะได้สีน้ำเงิน ของ ไฟโคไซยานิน และสีแดงของไฟโคอิริทริน ทำในห้องที่ให้อากาศ (Fujimori and Pecci, 1967) ส่วนในปี ค.ศ. 1974 Grantt และ Lipschultz ได้ทำการแยกสารไฟโคบิลิโซม และไฟโคบิลิโปรตีน โดยใช้การหมุนเหวี่ยงสารในสารละลายน้ำตาลซูโครส (sucrose) ที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2, 1, 0, 0.75, 0.5 และ 0.25 โมลาร์ เมื่อปั่นแยกจะได้ ไฟโคบิลิโซมที่ 0.75-1 โมลาร์ จากนั้นค่อย ๆ ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 เข้มข้น 0.01

ถึง 0.005 โมลาร์ และปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แยกแรงควัตถุออกมาตามส่วนที่ละลาย (Grantt and Lipschultz. 1974)

ในปี ค.ศ. 1981 Yu และคนอื่นๆ (Yu and others. 1981) ได้ทำการแยกสารไฟโคอิริทรินจากสาหร่ายสีแดง *Callithamnion* ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยยังคงใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วมาผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ไบโอเจล (Bio-gel) มาช่วยแยกให้สารมีความบริสุทธิ์มากขึ้น วิธีการแยกสารไฟโคอิริทรินส่วนใหญ่จะมีวิธีการคล้ายกันคือใช้การตกตะกอนโปรตีน และใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ส่วนในปี ค.ศ. 1990 ได้มีการพัฒนาใช้เครื่อง HPLC (High-performance Liquid Chromatography) (MacColl, Guard-Frier and Ryon. 1990) และการใช้เครื่อง FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) ใช้คอลัมน์โมโน คิว (mono Q) (Sawanson and Glazer. 1990) ในการแยกหน่วยย่อยของสารไฟโคอิริทริน

เชื้อบิดอะมีบา *Entamoeba histolytica*

เชื้อ *Entamoeba histolytica* เป็นจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคบิดชนิดที่เรียกว่าโรคบิดมีตัว หรือบิดในลำไส้ (amoebic dysentery) ถ้าเชื้อนี้เข้าสู่ลำไส้เล็กและซอนไชผนังลำไส้จนทะลุเชื้อสามารถแพร่กระจายสู่กระแสโลหิต และกระจายไปสู่สมอง ตับ และปอดได้ ทำให้เกิดบิดนอกลำไส้ได้ บิดนอกลำไส้ที่พบบ่อยคือ บิดที่ตับ ที่เรียกว่า ผีดิบในตับ บางครั้งเมื่อมีการรับเชื้อบิดเข้าไปแล้วอาจไม่แสดงอาการของโรคและตรวจไม่พบเชื้อ จัดเป็นพาหุพาหะ (carrier) ของโรคที่สามารถเป็นผู้กระจายเชื้อไปสู่บุคคลอื่นได้ การแพร่จะมาจากน้ำดื่มหรืออาหารไม่สะอาดที่มีเชื้อปนอยู่เข้าไป (Goldmeier and others. 1986) จุลชีพนี้สามารถแพร่ไปสู่ คน หรือสัตว์ เช่น สุนัข หรือ ลิง ได้ (Katz, Despommier and Gwardz. 1988)

ลักษณะชีววิทยาของ *Entamoeba histolytica* นั้นโดยจัดตามอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum protozoa

Subphylum Sarcodina

Superclass Rhizopoda

Class Lobosea

Subclass Gymnamoeba

Order Amoebida

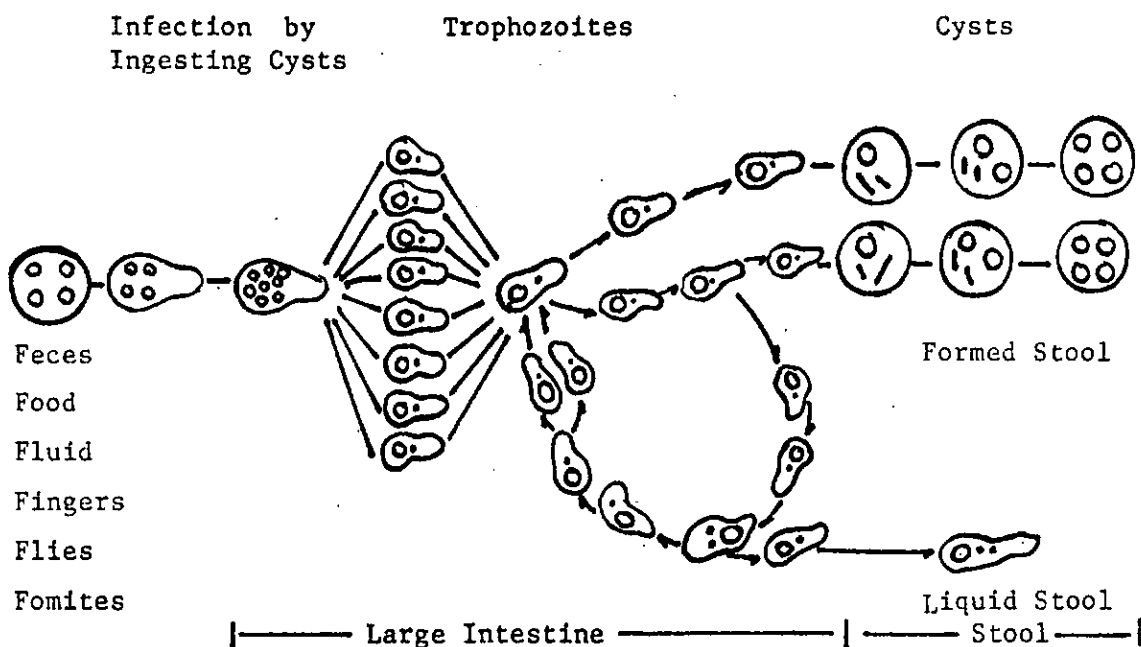
Family Entamoebidae

Genus *Entamoeba*

เชื้อบิดอะมีบาที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคน มีอยู่ด้วยกัน 7 ชนิดคือ *Entamoeba histolytica* *E. hartmanni* *Dientamoeba fragilis* *Entamoeba coli* *Endolimax nana* *E. polecki* และ *Iodamoeba butschlii* เชื้อที่พบน้อย ๆ คือ *E. histolytica* *E. coli* และ *E. hartmanni* เฉพาะ *E. histolytica* เท่านั้นที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคบิด ความแตกต่างของอะมีบาแต่ละชนิดสังเกตได้จากรูปร่างลักษณะ (morphology) ของจำนวนนิวคลีไอ (nuclei) และขนาดของซิสต์เป็นหลัก ใน Genus *Entamoeba* นี้มีอยู่หลายชนิดที่รู้จักดี (recognized species) คือ *E. coli* *E. hartmanni* และ *E. histolytica* เชื้อ *E. hartmanni* มีขนาดเล็กกว่าเชื้อ *E. histolytica* เชื้อ *E. hartmanni* ไม่เป็นสาเหตุให้เกิดโรค เชื้อ *E. histolytica* นี้มี 2 รูปแบบ คือ ระยะติดเชื้อ ซิสต์ (cysts) และ ระยะโทรโฟซอइट (trophozoites) เป็นระยะไม่ติดเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ *E. histolytica* ประมาณ 25 ไมโครเมตร (อยู่ในช่วง 10-60 ไมโครเมตร) ภายในเซลล์ มี 1 นิวเคลียส ถ้าอยู่ในรูปของ ซิสต์ จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12 ไมโครเมตร และมี 4 นิวคลีไอ เชื้อ *E. histolytica* มีทั้งชนิดที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic *E. histolytica*) และชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (nonpathogenic *E. histolytica*) ได้มีการศึกษาไอโซเอนไซม์ของเชื้อ *E. histolytica* จากคนไข้มาแยกด้วยวิธีการแยกสารด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแ่ง (starch gel electrophoresis) โดยการเทียบกับแถบของเอนไซม์ต่อไปนี้ คือ กลูโคสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (glucose phosphate isomerase; GPI) ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucumutase; PGM) เอนไซม์มาลิก (malic enzyme; ME) และเฮกโซไคเนส (hexokinase; HK) พบว่าแถบของไอโซเอนไซม์ที่บ่งบอกชนิดของอะมีบาที่ทำให้เกิดโรค โดยศึกษาจากแถบของไอโซเอนไซม์ เฮกโซไคเนส กับ ฟอสโฟกลูโคมิวเตสเป็นหลัก แถบของเอนไซม์เฮกโซไคเนสจากเชื้อชนิดที่ทำให้เกิดโรคเคลื่อนที่ได้ไกลมากกว่าเฮกโซไคเนสของเชื้อชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค และถ้าดูไอโซเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส ของเชื้อชนิดที่ทำให้เกิดโรคจะไม่มีแถบของแอลฟา (α) แต่มีแถบของเบตา (β) ซึ่งตรงข้ามกับเชื้อชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (Sargeaunt & Williams, 1979) เชื้อบิดอะมีบาที่พบในประเทศไทยชนิดที่ทำให้เกิดโรคมักเป็น โซโมติค II (Zymodeme II) เป็นส่วนใหญ่ (Thammapalerd, unpublished data) ในผู้ป่วยที่มีอาการมักพบเห็นแถบของเอนไซม์เฮกโซไคเนสเคลื่อนได้เร็วกว่า ผู้เป็นพาหะที่มีซิสต์อยู่ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายซิสต์จะพักตัวอยู่ระยะหนึ่ง อาจเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน แล้วเริ่มเปลี่ยนเป็นเซลล์ปกติมีขนาดเล็กลงและมีการแบ่งเซลล์มากขึ้นและทำให้ผู้รับเชื้อเกิดอาการท้องเสีย ปวดท้อง ปวดบิด ๆ อูจจาระมีมูกเลือดหรือเหลว จะพบเชื้อบิดในระยะโทรโฟซอइट ปนอยู่กับเม็ดเลือดแดง (haemotophagus) ด้วย ส่วนผู้ที่เป็พาหะ (cyst carrier) จะไม่มีอาการ อูจจาระค่อนข้างแข็ง พบเชื้อบิดในระยะซิสต์เท่านั้น พร้อมทั้ง

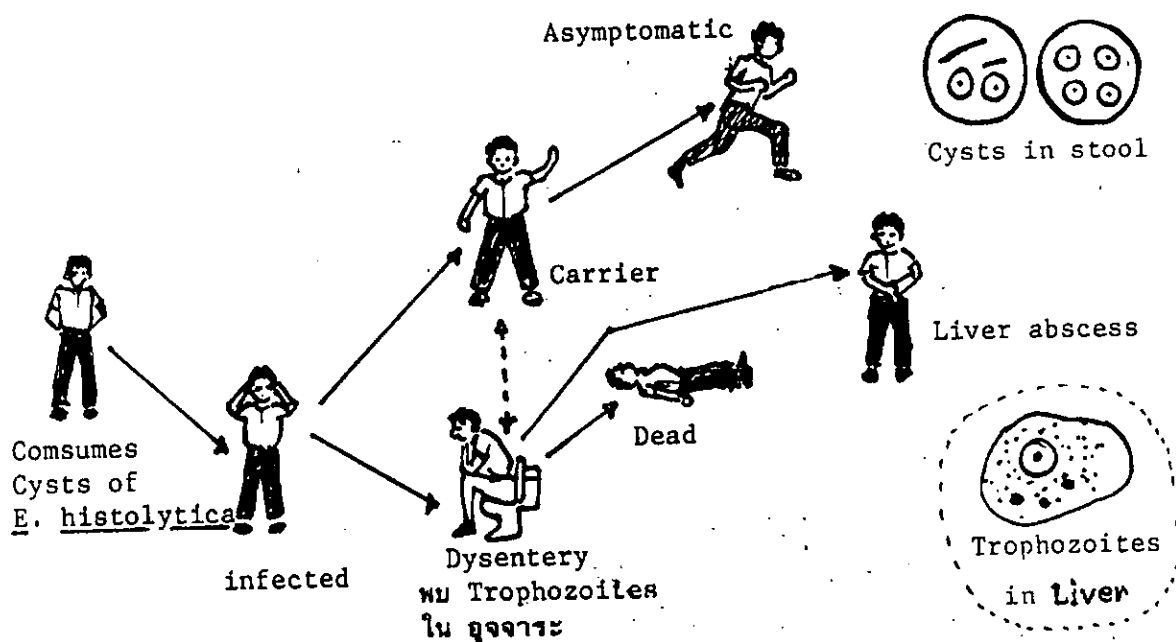
อาจมีการสร้างซิสต์ที่มี 4 นิวเคลียส พบว่าผู้ป่วยอาจปล่อยซิสต์ออกมาประมาณ 45 ล้านตัวต่อวัน (Ravdin, 1986) วงชีวิตของเชื้อ *E. histolytica* ตั้งในภาพประกอบ 4 และ พยาธิ-สภาพของการติดเชื้อ ตั้งในภาพประกอบ 5

ENTAMOEBAS HISTOLYTICA



ภาพประกอบ 4 วงจรชีวิตของ เชื้อ *Entamoeba histolytica*

AMOEBIASIS *Entamoeba histolytica*



ภาพประกอบ 5 พยาธิสภาพของการติดเชื้อ *Entamoeba histolytica*

โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibodies; MAbs) ต่อเชื้อบิดะมีนา

โดยทั่วไปการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีการสร้างสารบางอย่างขึ้นมาเพื่อป้องกันหรือกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย สารที่สร้างขึ้นนี้เป็นสารพวกโปรตีน คือ แอนติบอดี (antibody; Ab) ที่จะต่อต้านกับสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาคือ แอนติเจน (antigen; Ag) การสร้างแอนติบอดีนี้จะเป็นการสร้างที่จำเพาะเจาะจงกับชนิดของแอนติเจน แอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นมานี้มักมาจากเซลล์พลาสมาหลายชนิด จึงได้เป็นพอลิโคลนอล แอนติบอดี (polyclonal antibodies; PAb) กลุ่มโปรตีนของแอนติบอดีที่สำคัญ คือ กลุ่มอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) ที่พบมีอยู่ 5 พวก คือ IgG IgM IgA IgD และ IgE ที่พบมีปริมาณมากที่สุด คือ IgG โมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละหน่วยจะประกอบด้วย สายพอลิ-เพปไทด์ 2 คู่ คือ สายเฮฟวี่ (heavy chain; H) 1 คู่ และสายไลต์ (light chain; L) 1 คู่ เชื่อมติดต่อกันด้วย พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond; S-S) สายเฮฟวี่มีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 และสายไลต์มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 อิมมูโนโกลบูลินพวก IgG มีน้ำหนักโมเลกุล 150,000 ในปัจจุบันนี้อาศัยเทคโนโลยีทางไฮบริโดมา (Hybridoma Technology) มาช่วยผลิตแอนติบอดี โดยสามารถเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตเพียงแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว

(monoclonal antibodies; MAbs) ภายในหลอดทดลองได้สำเร็จ (Koher and Milstein. 1975) ทางภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน สามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อเชื้อบิตชนิดที่ทำให้เกิดโรคได้สำเร็จ และนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจชนิดของเชื้อบิตอะมีบาที่ทำให้เกิดโรคโดยวิธี MAb-based IFA (indirect immunofluorescent antibody assay) และ ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในอุจจาระโดยวิธี MAb-PAb-Based ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Thammapalerd and Tharavanij. 1991; Wonsit and others. 1992)

การประยุกต์ใช้สารจำพวกไฟโคอิริทริน

สารไฟโคอิริทริน เป็นสารที่ละลายตัวง่าย แต่ยากกว่าไฟโคไซยานิน และสามารถให้ความเรืองแสงมาก ทำให้มีผู้สนใจนำสารเรืองแสงชนิดนี้มาใช้งานมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานทางชีววิทยา ทางด้านการแพทย์ งานทางด้านชีวเคมี เป็นผลมากในการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีงานวิจัยที่นำสารไฟโคอิริทรินที่บริสุทธิ์มาเป็นตัวติดฉลากเพื่อศึกษา IgG และ IgM (Ol, Glazer and Stryer. 1982) โดยทำการสกัดแยกสารไฟโคอิริทรินออกจากสาหร่ายและแยกออกจากโปรตีนชนิดอื่นด้วยเทคนิคทางชีวเคมี วิธีการของ Ol เมื่อได้ไฟโคอิริทรินที่บริสุทธิ์จากนั้นนำเอาไฟโคอิริทรินที่ได้มาทำการควบคู่กับโปรตีน คือ IgG และ avidin โดยใช้สาร SPDP [N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate] เข้าไปเป็นสารตัวกลางที่ทำให้เกิดสารควบคู่ขึ้น โดยสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) ระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่เกิดการควบคู่การจับของ SPDP จะจับกับโปรตีนที่ด้านหมู่ $-NH_2$ ของโปรตีน (Carlson, Drevin and Axen. 1978)

ในปี 1982 Glazer และ Stryer ได้มีการใช้สารควบคู่ของไฟโคอิริทรินโดยยังใช้ SPDP เป็นตัวกลางในการสร้างสารควบคู่ของไฟโคอิริทริน (Glazer and Stryer. 1983) และในปี 1986 Kronick ได้ทำการใช้ SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate) หรือ SMPB (succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrate) ร่วมกับ SPDP เพื่อได้ไฟโคอิริทรินที่มีความสามารถในการจับโปรตีนชนิดอื่นได้ดีขึ้น (Kronick. 1986) ปี 1988 Guy, Crichton และ Ross ได้ทำสารประกอบเชิงซ้อน PEAPC (phyco-erythrin anti-phycoerythrin complexes) มาเป็นผลฉลากตรวจหา Immunoglobulin ชนิดต่าง ๆ โดยวิธีอ้อม (indirect method) ที่ทำสารควบคู่โดยหลักการจับกันของแอนติบอดีต่อแอนติเจน ได้มีการนำสารประกอบเชิงซ้อนนี้ไปใช้ในการ ตรวจสอบไวรัสเอดส์ (Guy, Crichton and Ross, 1988) ส่วนในปี 1989 Rai และคนอื่น ๆ ได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของจุลินทรีย์เพื่อทำการแยก *Moslocc* 7801 (Rai and others. 1989) โดยนำ

สารไฟโคอิริทรินมาใช้เป็นฉลากย้อมเซลล์ นอกจากนี้ในทางการแพทย์ยังมีการนำสารไฟโคอิริทรินมาใช้ในเทคโนโลยีใหม่ คือ การทำฟลูออริโดเมทรี (Flow Cytometry) โดยใช้สารไฟโคอิริทรินเป็นสารย้อม เพื่อเป็นสารที่สามารถตรวจจับสัญญาณได้จากการปล่อยพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นตรวจวัด (โกวิท พัฒนาปัญญาส์ตย์. 2534) เครื่องมือชนิดนี้ประเทศไทยได้มีการนำเข้ามาใช้บ้างแล้ว จึงเชื่อได้ว่าหากมีการศึกษาพัฒนาสารอาร์-ไฟโคอิริทรินให้มากขึ้น จะทำให้มีการนำสารอาร์-ไฟโคอิริทรินมาใช้งานในประเทศไทยมากขึ้น

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาวิธีการแยกสาร อาร์-ไฟโคอิริทริน จากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางประการของสารอาร์-ไฟโคอิริทริน เช่น การดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นต่าง ๆ ความสามารถในการเรืองแสง ขนาดของโมเลกุล และ องค์ประกอบย่อย
3. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียม MAbIgG จากหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica*
4. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมสารควบคู่ (conjugate) ระหว่าง อาร์-ไฟโคอิริทริน กับ MAbIgG จากหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica*
5. เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้สารควบคู่ที่เตรียมได้ทำปฏิกิริยา การตรวจตรงต่อเชื้อ *E. histolytica* ได้

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ให้ความรู้ถึงวิธีการแยกสารอาร์-ไฟโคอิริทริน จากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี
2. ให้ความรู้ถึงสมบัติเฉพาะทางประการของสาร อาร์-ไฟโคอิริทริน เช่น หน่วยย่อย ขนาดน้ำหนักโมเลกุล ช่วงคลื่นในการดูดกลืนแสงและการเรืองแสง
3. เป็นแนวทางในการใช้อาร์-ไฟโคอิริทรินจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย เป็นฉลากตรวจสอบทางวิทยามิคัมกัน
4. เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการแปรรูปสาหร่ายเพื่อเพิ่มมูลค่าสำหรับอุตสาหกรรมการแปรรูปสาหร่ายทะเลและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาครั้งนี้ใช้สาหร่ายทะเลสกุลกราซีลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี
2. ศึกษาวิธีการสกัดสารอาร์-ไฟโคอิรีทรินจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซีลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี
3. ศึกษาหน้าหนักโมเลกุลของสารอาร์-ไฟโคอิรีทรินที่แยกได้ด้วยเทคนิค เจล พิวเตรชัน
4. ศึกษาสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของอาร์-ไฟโคอิรีทรินที่แยกได้ ที่ความยาวช่วงคลื่น 200 - 700 นาโนเมตร
5. ศึกษาสเปกตรัมของการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectrum) ของอาร์-ไฟโคอิรีทริน ที่ความยาวช่วงคลื่น 500 - 700 นาโนเมตร
6. ศึกษาความเป็นหน่วยย่อย (subunit) ของ อาร์-ไฟโคอิรีทริน ด้วยเทคนิค เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
7. ศึกษาวิธีการเตรียม MAbIgG จากหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica*
8. ศึกษาวิธีการเตรียมสารควบคู่ (conjugate) ระหว่าง อาร์-ไฟโคอิรีทริน กับ MAbIgG ต่อเชื้อ *E. histolytica*
9. ศึกษาการประยุกต์ใช้สารควบคู่ที่เตรียมได้ในปฏิกิริยาตรงทางเทคนิค immuno fluorescent antibody assay ต่อเชื้อ *E. histolytica*

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ หมายถึง ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วนร้อยละของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่สภาวะการละลายอิ่มตัวที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หมายถึง สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0

บทที่ 2

วิธีดำเนินการค้นคว้าทดลอง

วิธีดำเนินการค้นคว้าทดลองนี้ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ คือ

1. การแยกสารอาร์-ไฟโคอิริทริน จากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย
2. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้
3. การศึกษาสมบัติทางประการของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้
4. การเตรียม MAbIgG จากหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica*
5. การเตรียม สารควบคู่ (conjugate) ระหว่าง อาร์-ไฟโคอิริทริน กับ MAbIgG
6. การประยุกต์ใช้สารควบคู่ทำปฏิกิริยาตรวจทาง immuno fluorescent

ต่อเชื้อบิดอะมีบา *E. histolytica*

1. การแยกอาร์-ไฟโคอิริทริน จากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี

1.1 วัสดุชีวภาพที่ใช้

ใช้สาหร่ายสด จากจังหวัดปัตตานี

(วิเคราะห์พันธุ์โดย ศ.กาญจนาภรณ์ ลีวโนมนต์ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

1.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ของ Beckmen รุ่น J2-21

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง UV-Vis Spectrophotometer รุ่น UV 240

ของ Shimadzu

ตู้เย็น เครื่องปั่นและบดอาหาร ผ่ากรอง กล้องทึบแสง

ชุดคอลัมน์ในการแยกประกอบด้วย คอลัมน์ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง

1.5 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร บรรจุด้วย ดีไอเออี เซลลูโลส (DEAE-

Cellulose; DE-52) Whatman และเครื่องเก็บแยกลำดับส่วน (fraction

collector) Frac 200 ของ Pharmacia ป้อนแบบ peristaltic รุ่น P-1

ของ Pharmacia แอมโมเนียมซัลเฟต ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

1.3 วิธีการแยก สาร อาร์-ไฟโคอิริทริน

1.3.1 นำสาหร่ายสดที่ล้างสะอาดแล้วจากช่องแช่แข็ง มาตัดให้เป็นท่อนเล็ก ๆ

แล้วนำไปปั่นจนละเอียดด้วยเครื่องบดบดอาหารในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียส ด้วยอัตราส่วน 1 กรัมสาหร่ายต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรของบัฟเฟอร์

1.3.2 นำมาแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่างกันจาก 1 ถึง 30 วัน

1.3.3 ทำการกรองเอากากออกด้วยผ้ากรอง แล้วนำสารที่กรองได้มาปั่นแยก ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ด้วยความเร็ว 10,200 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 35 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ปั่นแยกได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติม แอมโมเนียมซัลเฟต ให้มีความเข้มข้นร้อยละ ดังนี้ 0-20 20-30 และ 30-50 ตามลำดับ

1.3.4 นำตะกอนที่ได้ในช่วงความเข้มข้นของการละลายของแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 30-50 มาแยกด้วยคอลัมน์ที่บรรจุ ดีไอเออี-เซลลูโลส เป็นตัวสารค้ำจุน ขนาดของคอลัมน์ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 20 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่าง ๆ กัน โดยการค่อย ๆ ลดความเข้มข้นของเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับขั้น (stepwise gradient) เริ่มจากความเข้มข้นเป็นร้อยละ ของแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 50 40 30 20 และ 0 ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ออกมาจาก คอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกลำดับส่วน และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 615 565 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ

1.3.4.1 การบรรจุดีไอเออี-เซลลูโลส และสารที่แยกจากคอลัมน์ ทำดังนี้ นำดีไอเออี-เซลลูโลส ปริมาณ 8 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น ร้อยละของแอมโมเนียมซัลเฟต 50 และใช้บัฟเฟอร์นี้ชะจนคอลัมน์คงตัว โดยใช้อัตราการไหล 24 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชั่วโมง จากนั้นนำสารตัวอย่าง (ตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีน ที่ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 30-50) จำนวน 0.5 กรัมผสมกับ ดีไอเออี-เซลลูโลส จำนวน 0.5 กรัม ละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่ชะจนคอลัมน์คงตัวนั้น ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการบด อย่างละเอียดโดย homogenizer แล้วจึงเทบรรจุลงบนคอลัมน์ส่วนบน ชะด้วยสารละลายต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 50 ลูกบาศก์-
เซนติเมตร

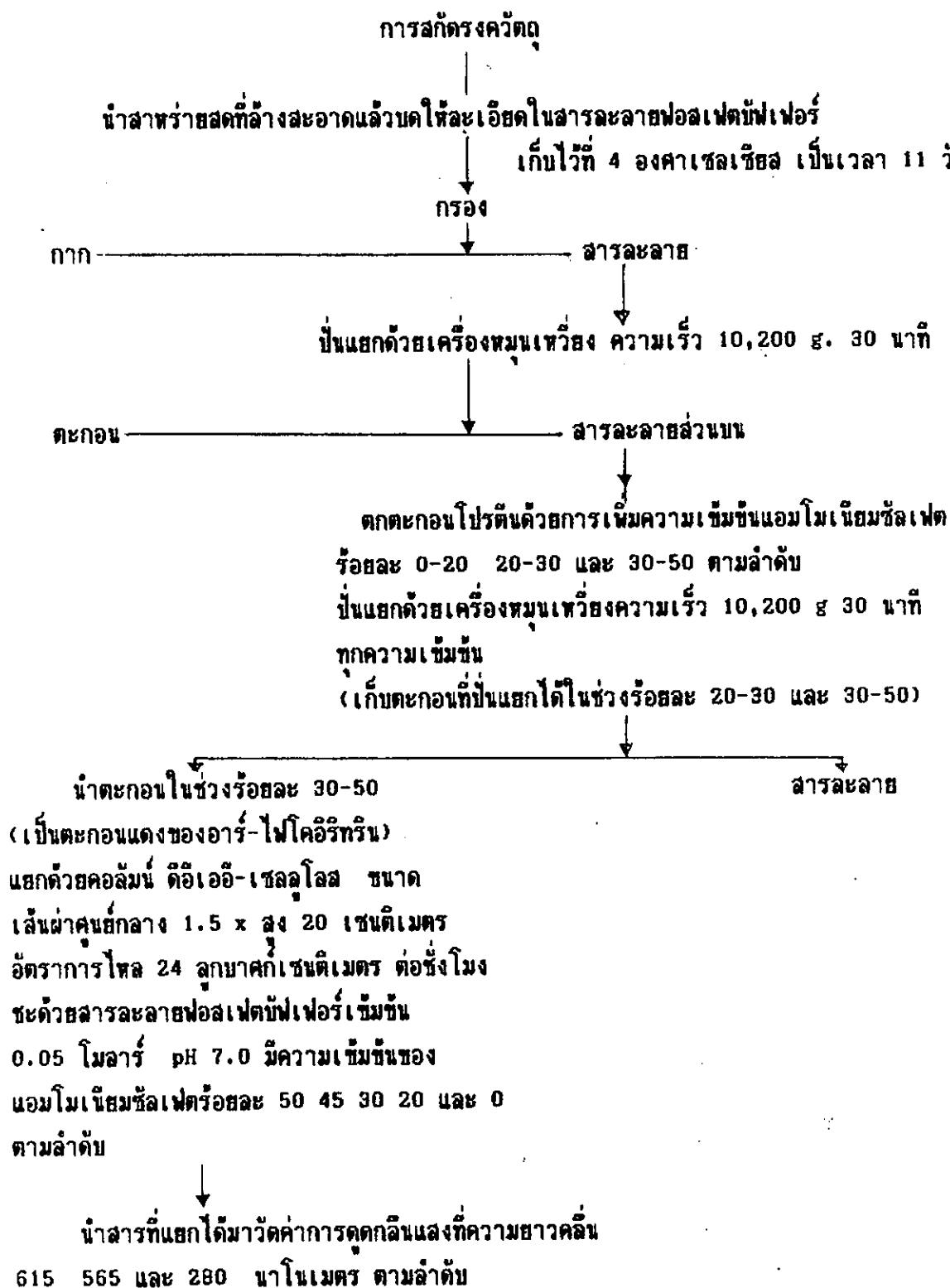
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 40 จำนวน 50 ลูกบาศก์-
เซนติเมตร

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 30 จำนวน 50 ลูกบาศก์-
เซนติเมตร

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 20 จำนวน 50 ลูกบาศก์-
เซนติเมตร

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0 จำนวน 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.0 จำนวน 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร



ภาพประกอบ 6 แผนภูมิแสดงการสกัดแยกแรงควัตถุ อาร์-ไพโคอิทธิริน ออกจากสารร่าย

2. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารอาร์-ไฟโคอิทรินที่แยกได้

2.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีการอิเล็กโทรโฟริซิส

2.1.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารอาร์-ไฟโคอิทรินที่แยกได้ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ให้ความเข้มข้นประมาณ 0.2 มิลลิกรัมต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับแอมเบิลบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) 0.005 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ้าความเข้มข้นของสารละลายไม่เหมาะสมให้ปรับโดยใช้ น้ำกลั่น

2.1.2 การเตรียมแผ่น พอลิอะคริลาไมด์ เจล

2.1.2.1 เตรียมบล็อก (block) กระจกขนาด 11.5 x 10 x 0.1

เซนติเมตร

2.1.2.2 เตรียมพอลิอะคริลาไมด์ เจล ความเข้มข้นร้อยละ 7

ในบัฟเฟอร์ pH 8.9 (ภาคผนวก ข) จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เรียกว่า รันนิ่ง เจล (running gel) ใส่ในบล็อกให้ความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร และเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ อย่าให้กระเทือนผิวหน้าให้ความสูงประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เพื่อปรับผิวหน้าให้เรียบเมื่อเจลแข็งตัวและกันไม่ให้ผิวหน้าเจลแห้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง หรือเก็บค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2.3 แทนที่น้ำกลั่นที่อยู่เหนือ รันนิ่ง เจล ด้วยพอลิอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 4 ในบัฟเฟอร์ pH 6.8 (ภาคผนวก ข) ซึ่งเรียกว่า สแตคกิง เจล (stacking gel) หรือสเปเซอร์เจล (spacer gel) พร้อมกับใส่หัว (comb) ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกเป็นซี่ฟัน 8 ซี่ แต่ละซี่กว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 2.0 เซนติเมตร เพื่อทำให้สแตคกิง เจล เป็นร่องลึกลงไปสำหรับหยอดสารดังกล่าว เจลนี้จะแข็งตัวภายใน 20 นาที ควรทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

2.1.2.4 ดึงหัวออกจากแผ่นกระจก แล้วนำแผ่นเจลนี้ไปประกอบติดกับกล่องอิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoretic chamber) ซึ่งใช้สำหรับใส่บัฟเฟอร์และเติมทริส-ไกลซีน (tris-glycine) บัฟเฟอร์ pH 8.3 (ภาคผนวก ข) ลงในกล่องให้ท่วมเนื้อเจล

2.1.2.5 หยอดสารตัวอย่างลงในหลุมของ สเปเซอร์ เจล แล้วจ่ายกระแสไฟฟ้ากระแสตรง 20 มิลลิแอมป์ ให้ขั้วลบอยู่ด้านบนและขั้วบวกอยู่ด้านล่าง แล้วหยอดจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโบรมิโนลบลู เคลื่อนมาถึงเหนือขอบเจลด้านล่าง 0.5 เซนติเมตร

2.1.2.6 แยกเอาแผ่นพอลิอะคริลาไมด์ เจล ออกจากแผ่นกระจก ตัดตำแหน่งของสี และส่อง UV ตัดตำแหน่งของแถบเรืองแสง และนำแผ่นเจลไปย้อมแถบโปรตีนด้วย สารละลายคัมมาสซี บริลเลียนท์ บลู (Coomassie Brilliant Blue) แล้วนำไปล้างสีส่วนที่-

ไม่ติดแถบโปรตีนออกจากสารละลายที่ประกอบด้วย กรดอะซิติก(acetic acid) เข้มข้นร้อยละ 5 และเมทานอล(methanol) เข้มข้นร้อยละ 10

3. การศึกษาสมบัติทางประการของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้

3.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทริน ด้วยเทคนิค เจล ฟิลเทรชัน (gel filtration)

3.1.1 นำเซฟาคริล S - 300 (Sephacryl S - 300)บรรจุลงในคอลัมน์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร สูง 70 เซนติเมตร และชะคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.1.2 เติมสารละลายผสมของบลูเด็กซ์แทรน (blue dextran) และ โพแทสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์ (potassium ferricyanide) เข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อ ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร บนผิวเจลในคอลัมน์และชะคอลัมน์ด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.1.3 เก็บสารละลายที่ชะจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ ส่วนละ 1.0 ลูกบาศก์- เซนติเมตร ด้วยเครื่องเก็บแยกลำดับส่วน นำสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์ไปตรวจวัดค่าดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 630 และ 340 นาโนเมตร ตามลำดับ เพื่อหาตำแหน่งของส่วนที่ไม่มีเนื้อเจล (void volume, V_0) และปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ (total volume, V_t)

3.1.4 หาตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน โอวัลบูมิน (ovalbumin) แคตาเลส (catalase) อัลโดเลส (aldolase) และไรโบนิวคลีเอส เอ (ribonuclease A) โดยใช้ ความเข้มข้นอย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมนลงบนผิวเจลในคอลัมน์ตามลำดับ โดยวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2 และ 3.1.3 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3.1.5 นำตะกอนของไฟโคอิริทรินจำนวนหนึ่งละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำ สารละลายที่ได้จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมนลงบนผิวเจลในคอลัมน์ตามลำดับ โดยวิธี เดียวกับข้อ 3.1.2 - 3.1.3 นำสารละลายไฟโคอิริทรินจากคอลัมน์ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความ- ยาวคลื่น 565 และ 280 นาโนเมตร

3.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินด้วยเทคนิค เจล ฟิลเทรชัน โดยเครื่อง FPLC 250 ใช้คอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 (Superose 12) มีอัตราการไหล 12 ลูกบาศก์- เซนติเมตรต่อชั่วโมง ปริมาตรสารที่สารแยก 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร เตรียมสารและใช้ สารตัวอย่างเดียวกับ คอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 และใช้ DNA จากเลือดไก่มาหาตำแหน่งของ V_0 ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตั้งความยาวคลื่นตรวจสอบ ที่ 565 และ

280 นาโนเมตร โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ คือ ไทโรโกลบูลิน (thyroglobulin) เฟอริทิน (ferritin) ไคโมทรอปซินเอน เอ (chymotrypsinogen A) แคตาเลส อัลโตเลส โอวัลบูมิน และสารอื่น คือ บลูเด็กซ์แทรน โปแตสเซียมเฟอริริโซยานด์

3.3 การศึกษาหน่วยย่อยของสารอาร์-ไฟโคอิริทริน ด้วยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส

3.3.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารอาร์-ไฟโคอิริทริน ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้นประมาณ 0.2 มิลลิกรัมต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับแอมเปิล-บัฟเฟอร์ 0.005 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่มีเอสดีเอส (ภาคผนวก ข) ถ้าความเข้มข้นของสารละลาย ไม่เหมาะสมให้ปรับโดยใช้น้ำกลั่น

3.3.2 การเตรียมแผ่น เอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์ เจล

3.3.2.1 เตรียมบล็อก กระดาษขนาด $11 \times 10 \times 0.1$ เซนติเมตร

3.3.2.2 เตรียม เอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์ เจล ความเข้มข้น ร้อยละ 10 pH 8.9 จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เรียงกว่าหนึ่ง เจล ใส่ในบล็อกให้มี ความสูงประมาณ 7 เซนติเมตร และเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ อย่าให้กระเทือนผิวหน้า ให้มีความสูงประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เพื่อปรับผิวหน้าให้เรียบเมื่อเจลแข็งตัวและกันไม่ให้ผิวหน้า เจลแห้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง หรือเก็บค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2.3 แทนที่น้ำกลั่นที่อยู่เหนือรันนิ่ง เจล ด้วยเอสดีเอส - พอลิ-อะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 pH 6.8 ซึ่งเรียกว่า สแตคกิง เจล หรือสเปเชอ เจล พร้อมกับใส่หัว ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกเป็นชิ้น 8 ชิ้น แต่ละชิ้นกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 2.0 เซนติเมตร เพื่อทำให้สแตคกิง เจล เป็นร่องลึกลงไปสำหรับหยอดสารดังกล่าว เจลนี้จะแข็งตัว ภายใน 20 นาที ควรทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

3.3.2.4 ดึงหัวออกจากแผ่นกระดาษ แล้วนำแผ่นเจลนี้ไปประกบติดกับ กล่องอิเล็กโตรโฟริซิส ซึ่งใช้สำหรับใส่บัฟเฟอร์ และเติมทริส-ไกลซิน เอสดีเอส บัฟเฟอร์ pH 8.3 (ภาคผนวก ข) ลงในกล่องให้ท่วมเนื้อเจล

3.3.2.5 หยอดสารตัวอย่างลงในหลุมของ สเปเชอ เจล แล้วจ่าย กระแสไฟฟ้ากระแสตรง 20 มิลลิแอมป์ ให้ขั้วลบอยู่ด้านบนและขั้วบวกอยู่ด้านล่าง และหยุดจ่าย กระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโบรโมฟินอลบลู เคลื่อนมาถึงเหนือขอบเจลด้านล่าง 0.5 เซนติเมตร

3.3.2.6 แยกเอาแผ่นเอสดีเอส - พอลิอะคริลาไมด์ เจล ออกจาก แผ่นกระดาษและนำแผ่นเจลนี้ไปย้อมแถบโปรตีนด้วยสารละลาย คูมาลซี บิลเลียนท์ บลู แล้วนำไป

ล้างสีส่วนที่ไม่ติดแถบโปรตีนออกจากสารละลายที่ประกอบด้วยกรดอะซิติก เข้มข้นร้อยละ 5 และ เมทานอล เข้มข้นร้อยละ 10

3.4 การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอาร์-ไฟโคอิริทริน

3.4.1 นำสารอาร์-ไฟโคอิริทริน ที่แยกได้ จากข้อ 1 ที่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไปบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วงต่าง ๆ คือ ที่ความยาวคลื่น 200 ถึง 700 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectro photometer ของ Shimadzu รุ่น RF-520 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารเปรียบเทียบ

3.5 การศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์

3.5.1 นำสารของอาร์-ไฟโคอิริทริน ที่แยกได้จากข้อ 1 ที่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไปบันทึกการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น 500 ถึง 700 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectro fluorometer ของ Shimadzu, model Emission 250

4. การเตรียม MAbIgG ต่อเชื้อ *E. histolytica* จากหนู mouse (mouse monoclonal antibody immunoglobulin G fraction)

วัสดุอุปกรณ์

- วัตถุดิบชีวภาพ
1. หนู mouse ได้รับการอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสหรัฐ ประเทศไทย (Department of Veterinary Medicine, AFRIMS, Bangkok, Thailand)
 2. เชื้อ *E. histolytica* สายพันธุ์ HM-1:IMSS และ เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) Eh 208 C₂₋₂ ซึ่งสร้างโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อเชื้อ *E. histolytica* สายพันธุ์ HM-1 : IMSS ได้รับการอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

วิธีการเลี้ยงเซลล์และการแยก MAblgG ต่อเชื้อ *E. histolytica*

1. นำเซลล์ไฮบริโดมา Eh 208 C₂₋₂ ที่เก็บในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ออกมาอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรของ RPMI 1 (ภาคผนวก ข) โดยการเติมแล้วหมุนปั่นแยก ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 g จากนั้นเติมอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS (fetal bovine serum) เข้มข้นร้อยละ 20 และมี ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) เข้มข้น 0.05 โมลาร์ และมียาปฏิชีวนะ เพนนิซิลิน (penicillin) 100 หน่วยต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สเตรปโตไมซิน (streptomycin) 0.001 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และมีกานามายซิน (Kanamycin) 0.001 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ทำในสภาวะปลอดเชื้อ

2. นำเซลล์จากข้อ 1 มาเลี้ยงในภาดหลุมฝาปิด ขนาด 24 หลุมต่อแผ่น ปิดฝา ติดแถบกาวนำไปบ่มในตู้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีการให้ CO₂ ปริมาตรร้อยละ 5 นำออกมาตรวจดูการเจริญทุกวัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจการเจริญเติบโต และการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ เมื่อเซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นควรทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงทุก ๆ 2-3 วันแล้วทำการเจือจางเพื่อให้เกิด monoclonal ในภาดหลุมขนาด 96 หลุมต่อแผ่น (limiting dilution) แล้วเลี้ยงต่อไป

3. เมื่อเซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้น คือมีประมาณ 2,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ให้ดูดเซลล์ออกมาบรรจุในขวดเลี้ยง (tissue culture flask ของ Nunc) ตรวจดูสีของอาหารถ้ามีการเปลี่ยนสีจากสีส้ม มาเป็นสีเหลือง ให้ทำการเปลี่ยนอาหาร จากนั้นเมื่อพบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตมากแล้วให้ทำการปั่นแยกเอาเซลล์เพื่อมาฉีดในหนู (in vivo) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโมโนโคลนอล แอนติบอดีมากขึ้น โดยที่หนู mouse BALB/c จะต้องถูกฉีดสารพริสเทน (pristane) (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane) ที่ผ่นหน้าท้องมาแล้วเป็นเวลา 7-15 วัน โดยนำเซลล์ที่จะฉีดเข้าช่องท้องต้องมีปริมาตร 1×10^7 เซลล์ใน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร หลังจากฉีดเซลล์เข้าในตัวหนูแล้วประมาณ 7-15 วัน หนูจะมีการท้องบวม ให้ทำการเจาะเอาน้ำมานในช่องท้องออกมา แล้วปั่นเอาส่วนสารใสเก็บที่ 0 องศาเซลเซียส และเลี้ยงหนูต่อไปจนท้องบวมแล้วเจาะท้องอีก ทำซ้ำอีกจนกระทั่งหนูมีสภาพใกล้ตาย

4. นำน้ำمانที่เจาะจากท้องหนูมาจากตู้เย็นมาปั่นแยกเอาไขมันออก แล้วจึงนำไปแยก IgG ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) โดยใช้ คอลัมน์เซฟาโรส โปรตีน เอ (protein A Sepharose CL-4B) ของ Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden บรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร สูง 7 เซนติเมตร ทำการบรรจุสาร เชดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 8.0 และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์

แล้วเปลี่ยนสารละลายเป็น 0.01 โมลาร์ ของไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์ (glycine-HCl) pH 2.8 เก็บสารละลายที่แยกได้และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำสารที่เก็บและมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นนี้มาปรับค่า pH ให้เป็น 7.0 ด้วยผง Tris-base จากนั้นนำไปเก็บที่ 0 องศาเซลเซียส เพื่อมาทดสอบ ELISA และ IFA (ภาคผนวก ข)

5. การเตรียม สารควบคู่ (conjugate) ระหว่าง อาร์-ไฟโคอิริทริน กับ MAbIG ต่อเชื้อ

E. histolytica

5.1 นำ MAbIG ที่เตรียมได้จากข้อ 4 ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์-เซนติเมตรผสมกับสารละลาย SPDP ที่ละลายในเมทิลแอลกอฮอล์ที่ปราศจากน้ำให้มีความเข้มข้น 10.3 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน) 0.01 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเอา SPDP ที่ไม่เกิดการควบคู่ออกด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-25 (Sephadex G-25) คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 6 เซนติเมตร ชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.4 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่เข้มข้น 0.01 โมลาร์ และทำแบบนั้นกับสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่เตรียมได้จากข้อ 1.3 กับ SPDP

5.2 นำ MAbIG-PDP (MAbIG ที่ควบคู่กับ SPDP) ที่แยกได้มาเติมสารละลาย DTT (dithiotriitol) ให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ทิ้งไว้ 20 นาที ทำการแยกด้วย คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-25 เพื่อกำจัด เอา DTT ส่วนที่เหลือออกให้หมด

5.3 นำสารที่ได้จากข้อ 5.2 มาผสมกับสาร PE-PDP (สารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่ควบคู่กับ SPDP) ที่ได้จากข้อ 5.1 เขย่า เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงทำการเติมสารไอโอไดอะเซตามิด (iodoacetamide) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.03 โมลาร์ ผสมเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการแยกด้วย คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-25

5.4 นำสารที่ได้จากข้อ 5.3 มาทดสอบการเกิดสารควบคู่ ด้วยเครื่อง FPLC -250 ตรวจหามวลที่เพิ่มมากขึ้นโดยการเปรียบเทียบกับ MAbIG และสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่ไม่ได้ผ่านการควบคู่

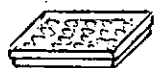
6. การประยุกต์ใช้สารควบคู่ทำปฏิกิริยาทาง immunofluorescent ต่อเชื้อ *E. histolytica*

นำแผ่นสไลด์ที่มีเชื้อ *E. histolytica* ถูกตรึงบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วมาหยดสารควบคู่ที่เตรียมได้ในข้อ 5 ทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เทคนิค Direct fluorescent antibody test แล้วล้างด้วย PBST (ภาคผนวก ข) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำให้แห้ง แล้วทำการตรวจหาเซลล์ *E. histolytica* HM-1 ที่ถูกย้อมด้วยสารควบคู่และให้สารเรืองแสงสีส้ม

hybridoma cell (Eh 208-C₂₋₂) ใน N₂ เหลว

- แห่อย่างช้า 37 องศาเซลเซียส
- ปั่นล้างด้วย RPMI

เลี้ยงในอาหาร RPMI ที่มี hypoxanthine



— ภาควัสดุเลี้ยง 24 หลุม

Limiting dilution เพื่อให้ได้ monoclonal



— เลี้ยงในภาควัสดุเลี้ยง 96 หลุม



— เลี้ยงในภาควัสดุเลี้ยง 24 หลุม



— เลี้ยงในขวดเลี้ยง ขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ฉีดเซลล์ monoclonal ที่ได้เข้าที่ช่องท้องพุง



(หนู BALB/c mouse ที่ฉีด pristane แล้ว 7-15 วัน)
หนูก้องขวม (7-10 วัน)

ทำการเจาะเอา ascitic fluid ที่ช่องท้องพุง

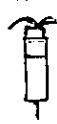


นำมาแช่เย็นให้ไขมันแข็งตัวที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน



— ปั่นแยกเอาของเหลว

แยก IgG ด้วยคอลัมน์ เซฟาโรส โปรตีน เอ



— ชะด้วย PBS

— ชะด้วย glycine-HCl pH 2.8 เข้มข้น 0.1 M

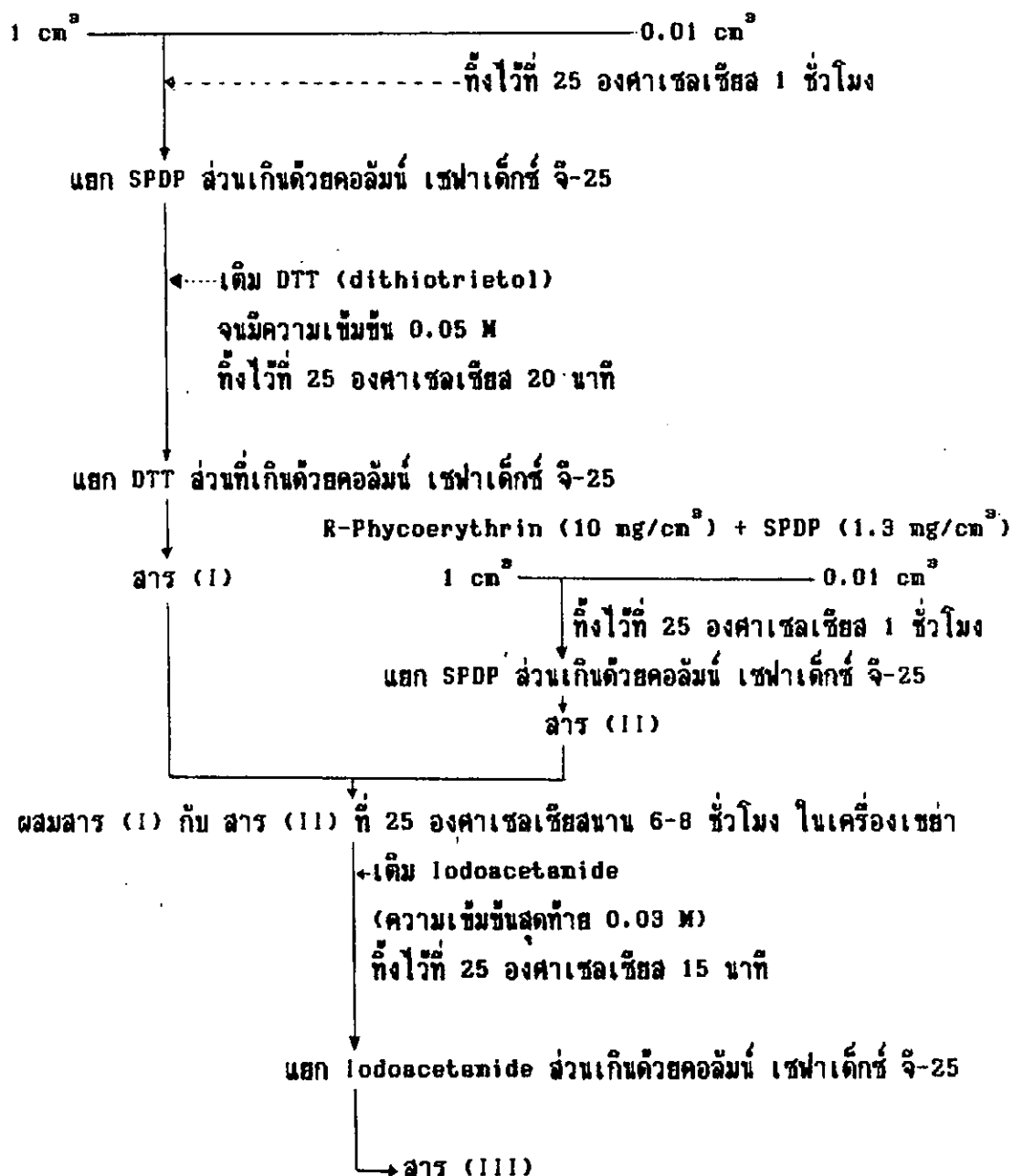
000 MAbIgG

— ทดสอบ ELISA และ IFA



ภาพประกอบ 7 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเลี้ยงและแยก MAbIgG ต่อเชื้อ *E. histolytica*

IgG (1 mg/1 cm³ PBS pH 7.4) + SPDP (1.3 mg/1 cm³ methanol anh.)
(MAb IgG ต่อเชื้อ *E. histolytica*)



สาร (III) (สารคู่ควบระหว่าง MAb IgG ต่อเชื้อ *E. histolytica* กับ R-Phycoerythrin
(เก็บในที่มืดที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเติม bovine serum albumin 1%))

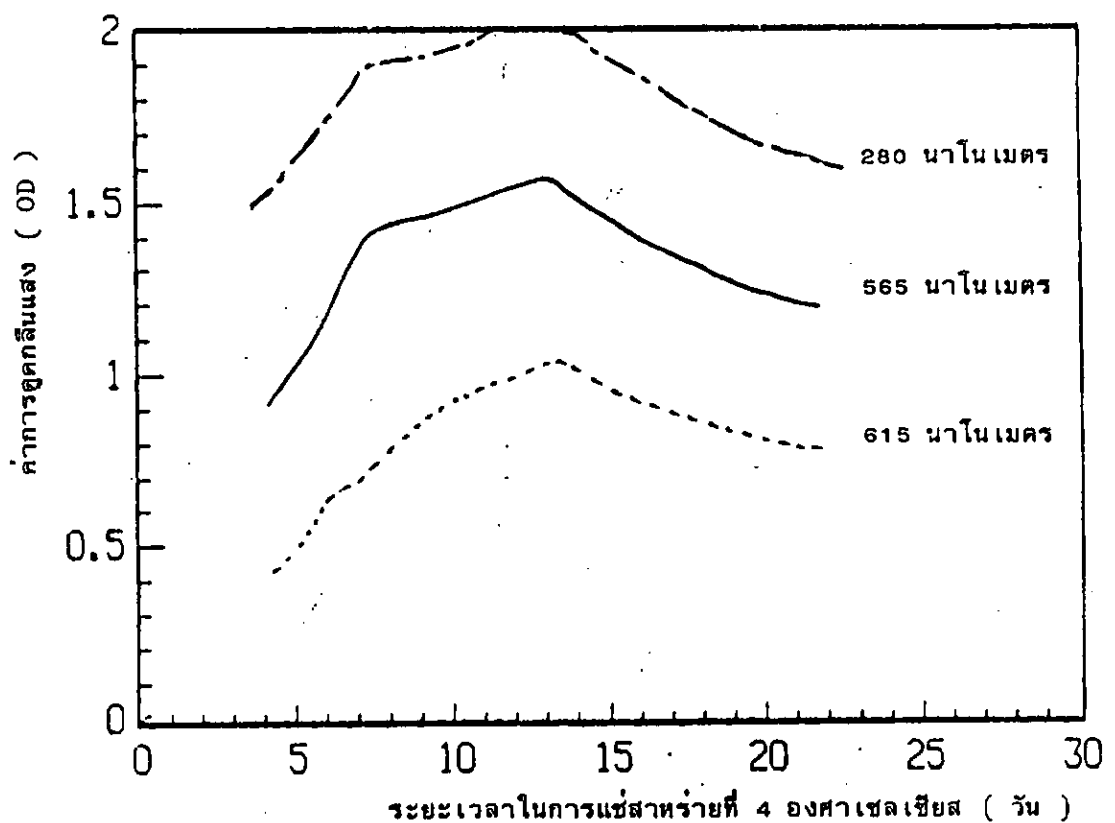
ภาพประกอบ 8 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำสารควบคู่ของ MAb IgG ต่อเชื้อ *E. histolytica*
กับ อาร์-ไฟโคอีรีทริน

ผลการทดลอง

1. การแยกสารอาร์-ไพโคอิทธิรียจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซีลาเรีย

1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สาหร่ายที่ 4 องศาเซลเซียส

ผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการแช่สาหร่ายที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อแช่สาหร่ายนานขึ้นและสูงสุดเมื่อแช่ไว้ 14 วัน จากนั้นค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อแช่ไว้นานขึ้น ดังในภาพประกอบ 9

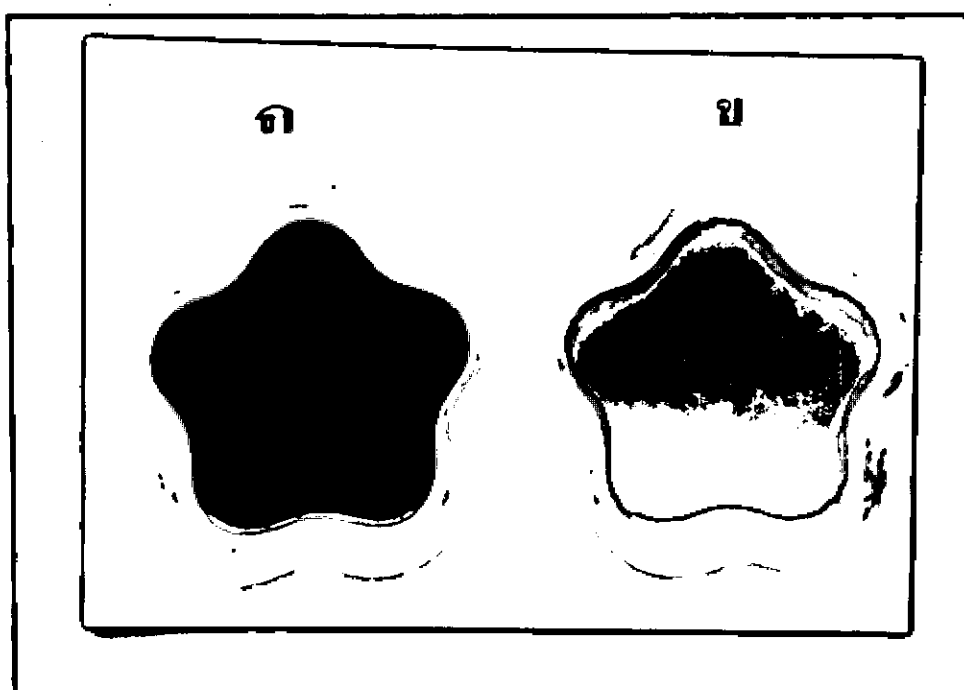


ภาพประกอบ 9 กราฟของค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ได้จากการแช่สาหร่ายชนิดที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ถึง 30 วัน (ที่ความยาวคลื่น 280 565 และ 615 นาโนเมตร)

1.2 การแยกรังควัตถุโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

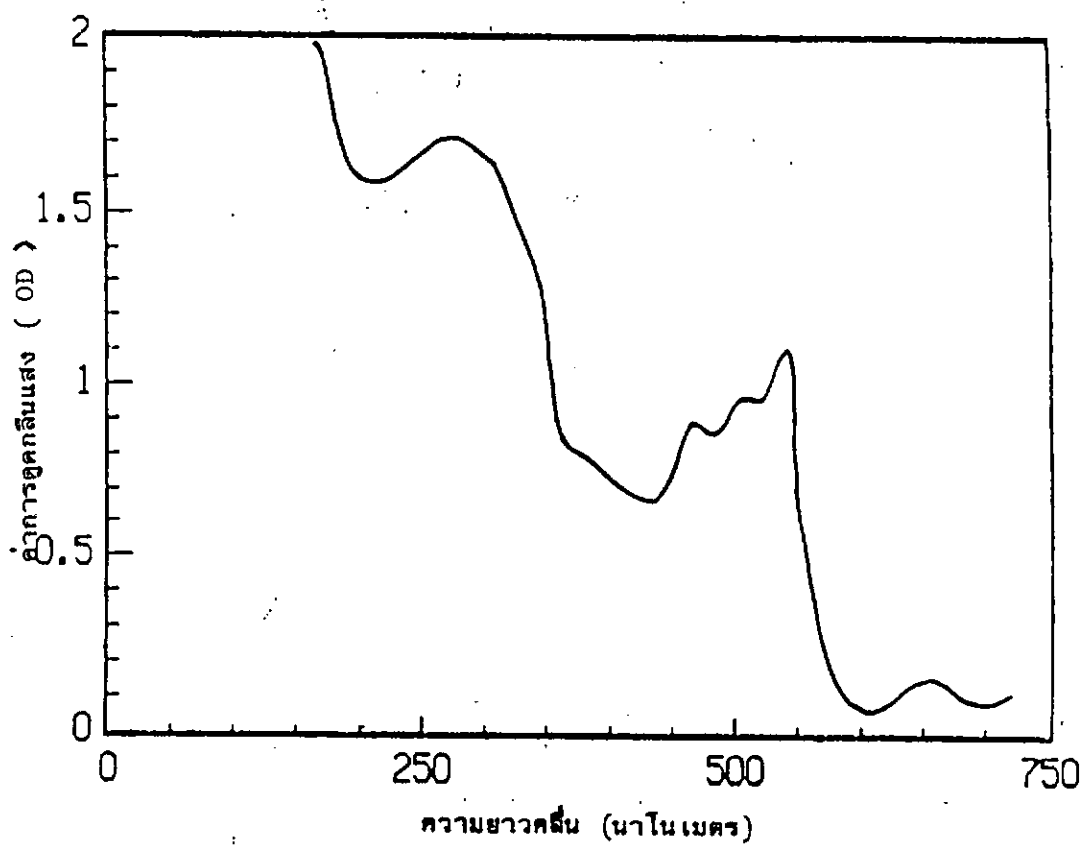
ตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 0-20 จะได้ตะกอนสีดำปนเขียว และจะได้ตะกอนสีน้ำเงินในช่วงความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 20-30 และจะได้ตะกอนสีชมพูม่วงที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 30-50 (ภาพประกอบ 10) ส่วนสารละลายที่เหลืออยู่เป็นสีขาวปนเหลือง

ตะกอนสีชมพูม่วงที่ได้เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตร มีอัตราส่วนที่ต่ำคือ 0.48 (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 10 ตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยสารแอมโมเนียมซัลเฟต

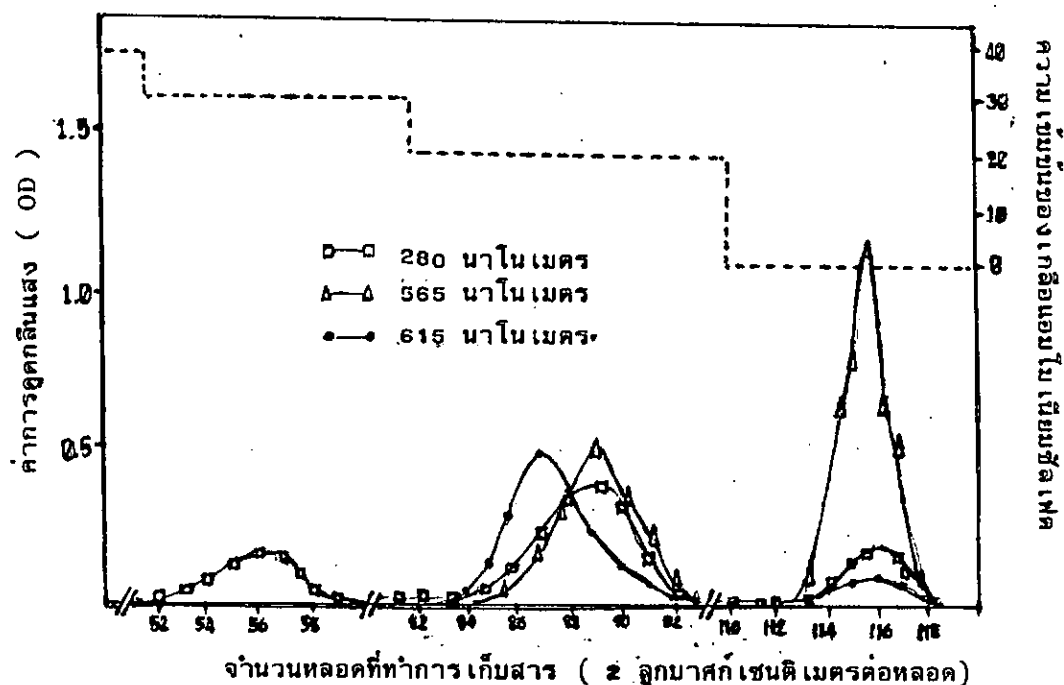
- ก. ตะกอนที่ได้ที่ความเข้มข้นของการละลายร้อยละ 20-30
- ข. ตะกอนที่ได้ที่ความเข้มข้นของการละลายร้อยละ 30-50



ภาพประกอบ 11 กราฟของค่าการดูดกลืนแสงของตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 30-50 อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 0.48

1.3 การทำสารอาร์-ไฟโคอิทรินให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส

เมื่อนำตะกอนสีชมพูม่วงจากข้อ 1.2 มาแยกด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส พบว่าจะได้สารสีน้ำเงินและสีแดงปนกันจำนวนหนึ่งที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 20 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และได้สารละลายสีชมพูของ อาร์-ไฟโคอิทริน เมื่อชะด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0 (หลอดที่ 114-118) อัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตร ของสารละลายสีชมพู (หลอดที่ 116) มีค่าเท่ากับ 6.7



ภาพประกอบ 12 ผลการแยกตะกอนที่ความเข้มข้นของการละลายของแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 30-50 ด้วยดีอีเออี เซลลูโลส คอลัมน์โดยชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ละลายอยู่ร้อยละ 40 30 20 และไม่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ (ทำการเก็บหลอดละ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร)

ตาราง 4 อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 กับ 280 นาโนเมตร

	ค่าการดูดกลืนแสง		อัตราส่วน 565 ต่อ 280	ผลผลิตร้อยละ* (% yield)
	565 นาโนเมตร	280 นาโนเมตร		
ตะกอนที่แยก โดย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ร้อยละ 0-20	120	250	0.48	100
ตะกอนที่แยก โดย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ร้อยละ 30-50	60	58	1.03	50
ผ่านคอลัมน์ ดีไอเออี เซลลูลอส ที่ไม่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30.15	4.5	6.7	25.13

หมายเหตุ การคำนวณหาค่า ผลผลิตร้อยละ จากตะกอนเริ่มต้น

$$\text{ผลผลิตร้อยละ}^* = \frac{\text{ค่า OD ที่ 565} \times 100}{\text{ค่า OD ที่ 565 ของตะกอนเริ่มต้น}}$$

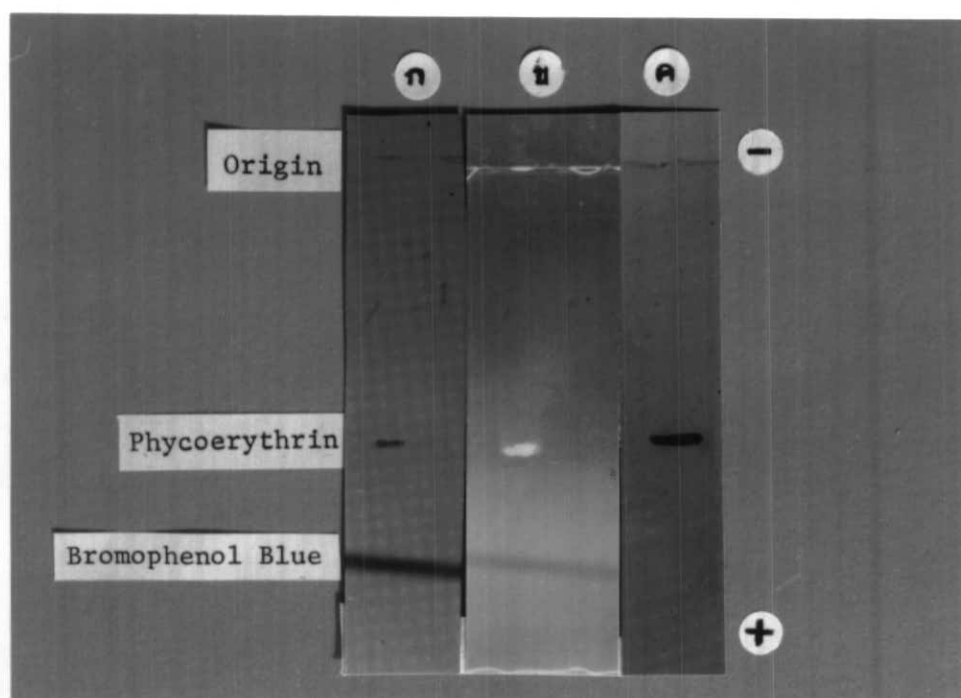


ภาพประกอบ 13 สารที่แยกได้จากคอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส

2. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์-ไฟโคอิทรินที่แยกได้

2.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ อาร์-ไฟโคอิทริน ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พอลิอะคริลาไมด์ เจล เข้มข้นร้อยละ 7 ได้แถบโปรตีนสีชมพู 1 แถบ และเมื่อทำการส่องด้วยแสง UV พบว่าการเรืองแสงตำแหน่งเดียวกับแถบสีชมพู และเมื่อย้อมโปรตีนก็พบว่าแถบสีชมพูนั้นติดสีน้ำเงินด้วย ดังในภาพประกอบ 14

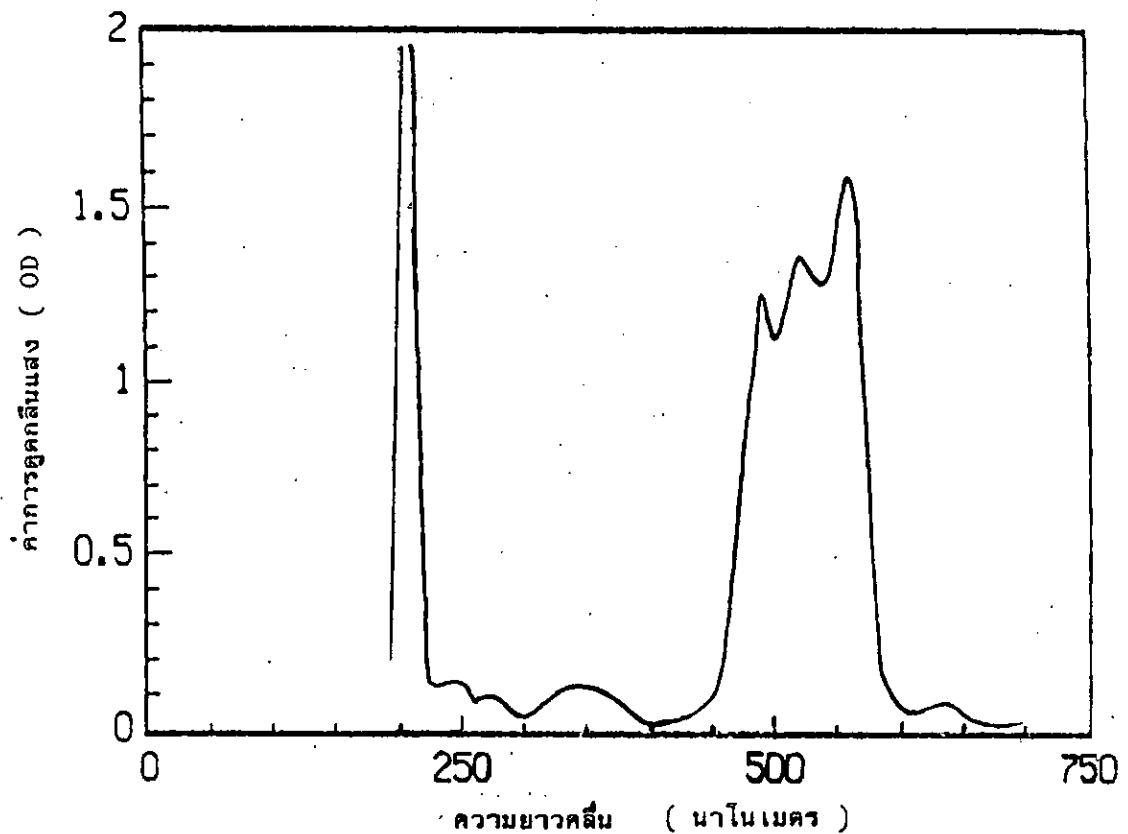


ภาพประกอบ 14 ผลของอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเจล พอลิอะคริลาไมด์เข้มข้นร้อยละ 7

- ก. แถบสีชมพูที่เห็นด้วยตาเปล่า
- ข. แถบเรืองแสงเมื่อส่องด้วยแสง UV
- ค. แถบสีน้ำเงินเมื่อย้อมด้วย คูมาลีน บลู

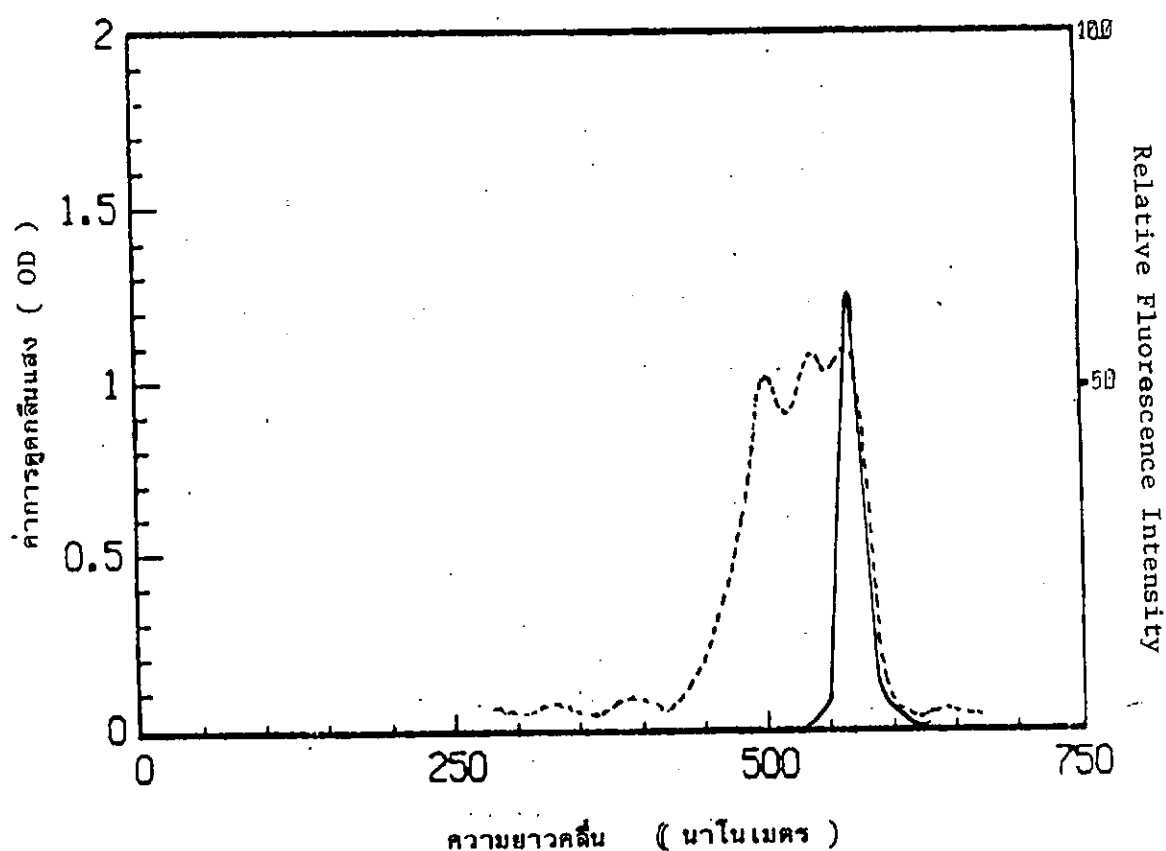
3. สมบัติทางประการของอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้

3.1 การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอาร์-ไฟโคอิริทรินที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ การดูดกลืนแสงของสารอาร์-ไฟโคอิริทริน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 3 จุดคือ ที่ความยาวคลื่น 495 545 และ 565 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่นที่ 565 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ อาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้จาก คอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส (ที่ความยาวคลื่น 250 ถึง 700 นาโนเมตร) อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 6.7

3.2 การศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของ อาร์-ไฟโคอิริทริน
 สเปกตรัมของการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของ อาร์-ไฟโคอิริทรินมีค่าการปล่อย
 แสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดเพียงความยาวคลื่นเดียว ที่ความยาวคลื่น 573 นาโนเมตร
 ดังภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 สเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารอาร์-ไฟโคอิริทริน

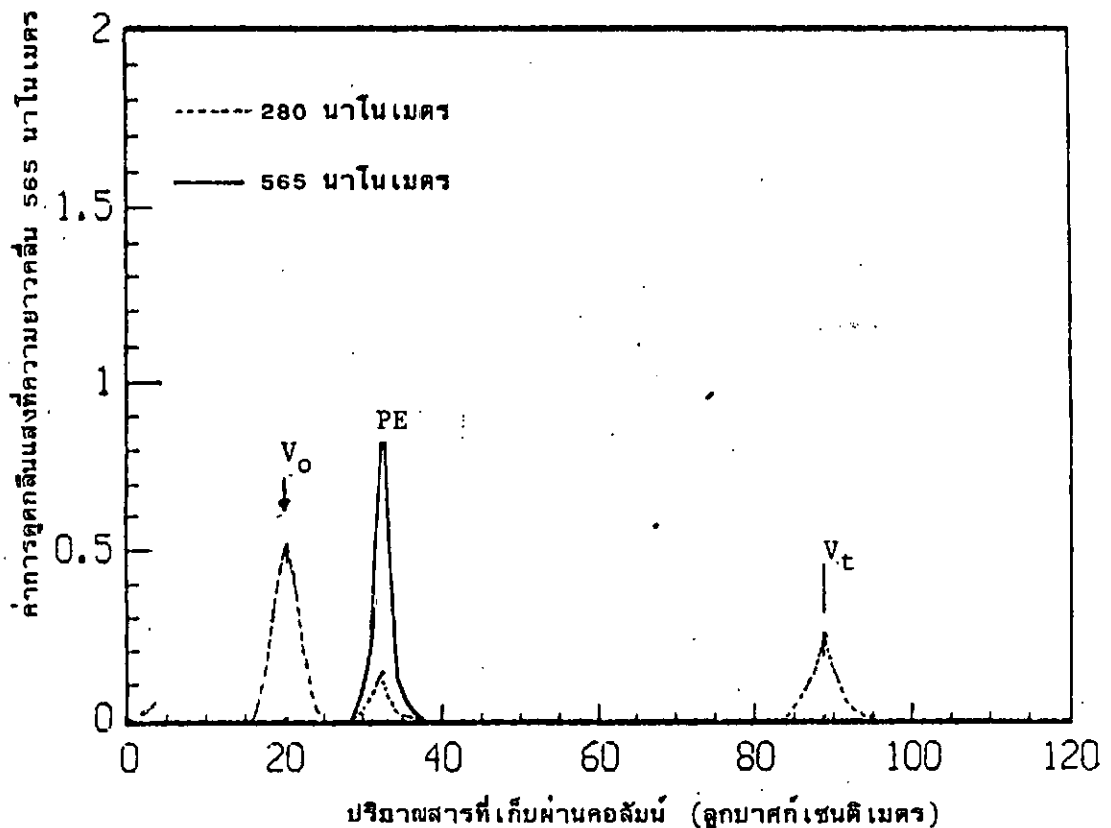
———— emission spectrum

----- excitation spectrum

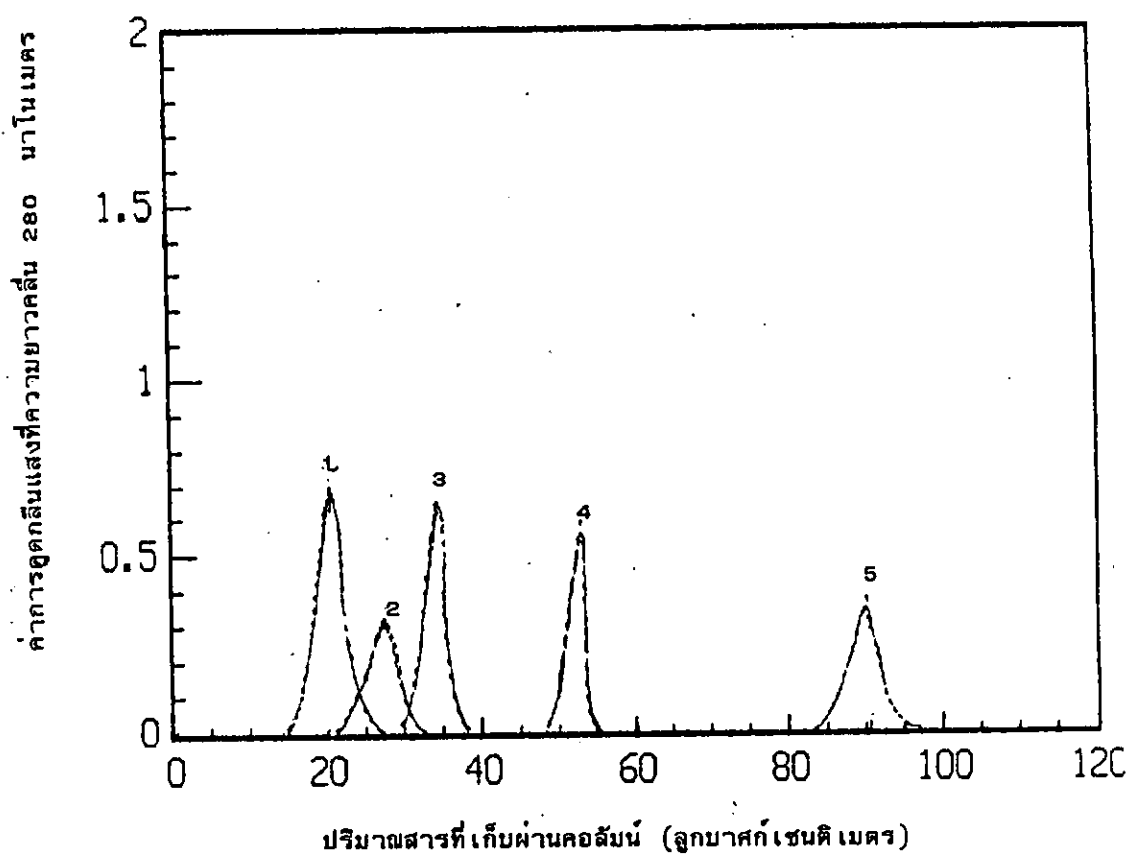
3.3 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของอาร์-ไฟโคอิริทริน ด้วยเทคนิค เจล ฟิลเทรชัน

3.3.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ อาร์-ไฟโคอิริทรินด้วยคอลัมน์ เซฟาคริล-เอส-300

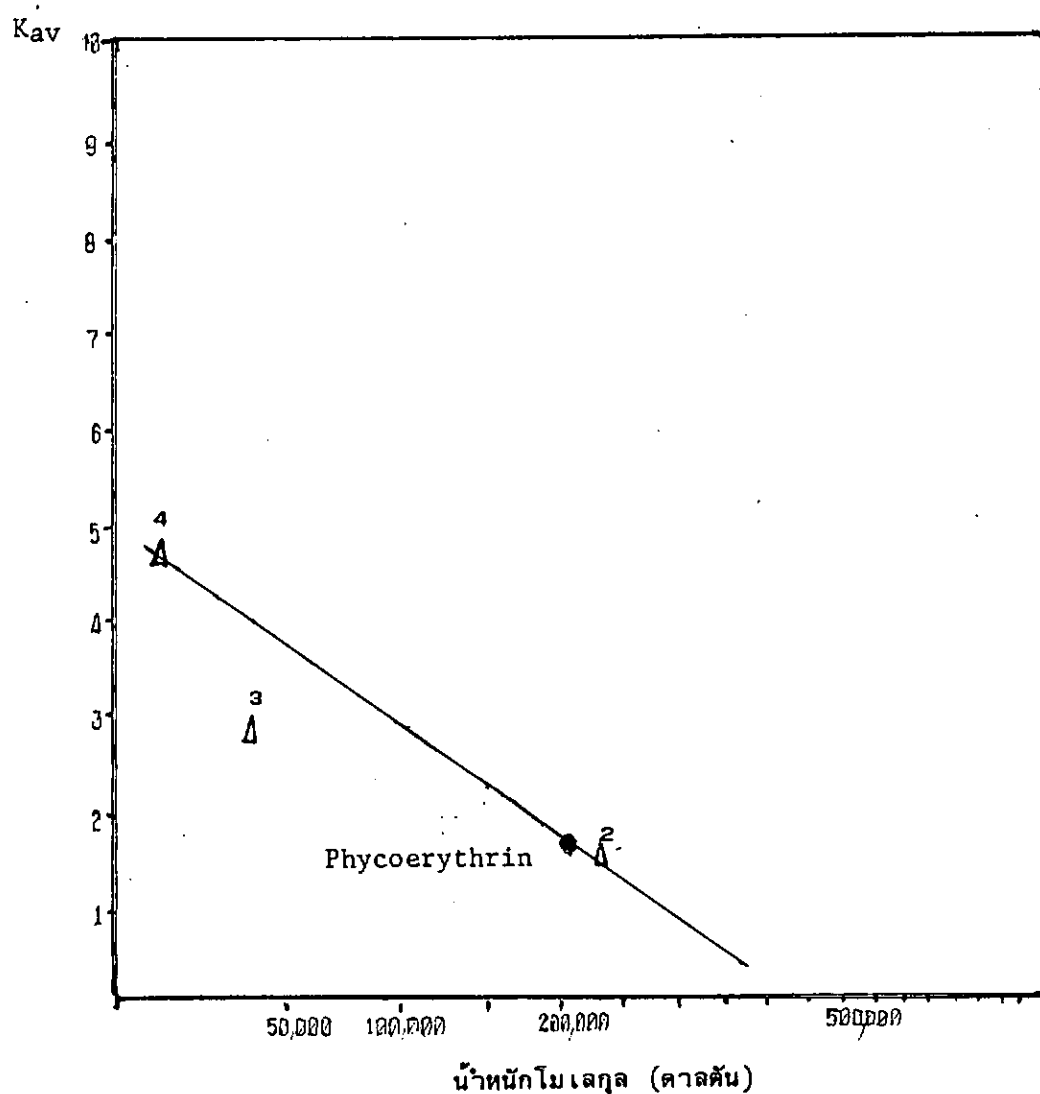
เมื่อนำอาร์-ไฟโคอิริทรินที่ได้จากคอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส มาผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 พบว่าได้สารละลายเพียงกลุ่มเดียวที่ช่วง 30-38 ลูกบาศก์-เซนติเมตร โดยไม่พบสารอื่นนอกเหนือจากกลุ่มนี้ ดังในภาพประกอบ 17 และจากการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาพประกอบ 18 , 19) พบว่าสาร อาร์-ไฟโคอิริทริน ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 ตาลตัน



ภาพประกอบ 17 ผลการแยกอาร์-ไฟโคอิริทรินด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300



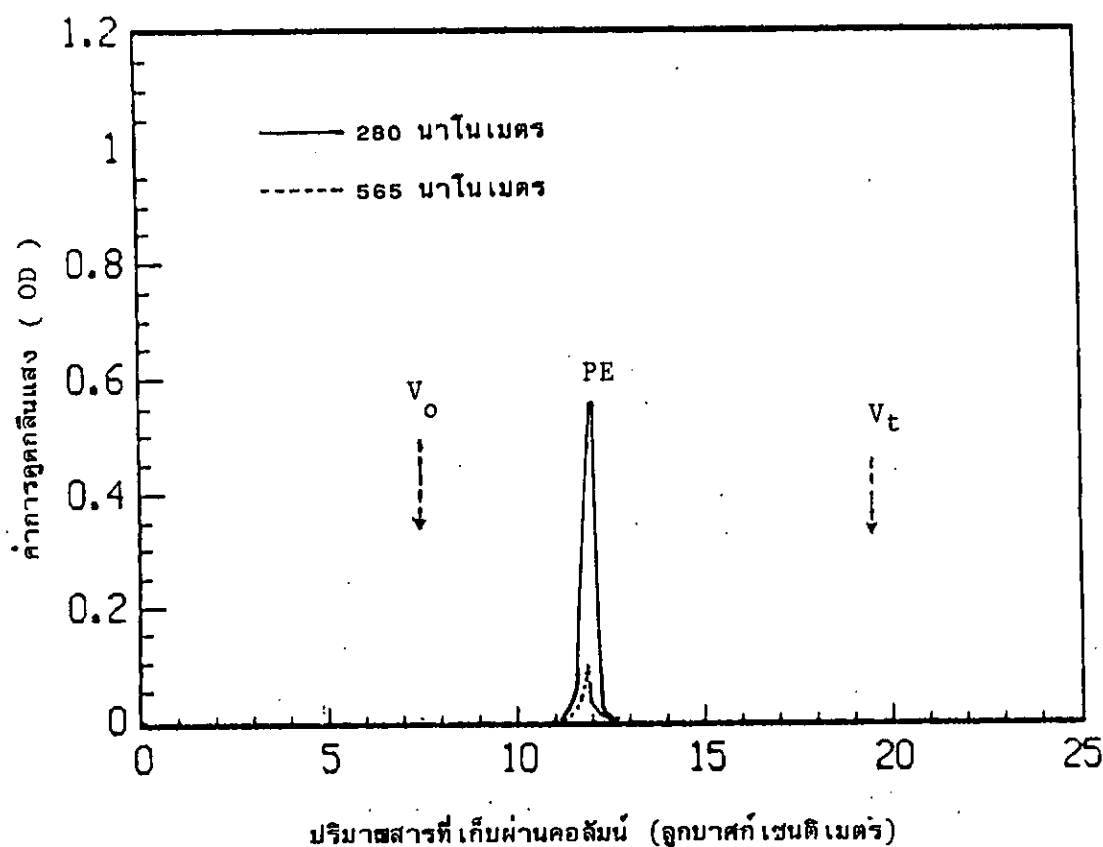
ภาพประกอบ 18 ผลการแยกสารมาตรฐานด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 สารมาตรฐานที่ใช้ คือ 1 บลูเด็กซ์แทรน 2 แคตาเลส 3 โอวัลบูมิน 4 โรโบนิวคลีเอส และ 5 โปแตสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์



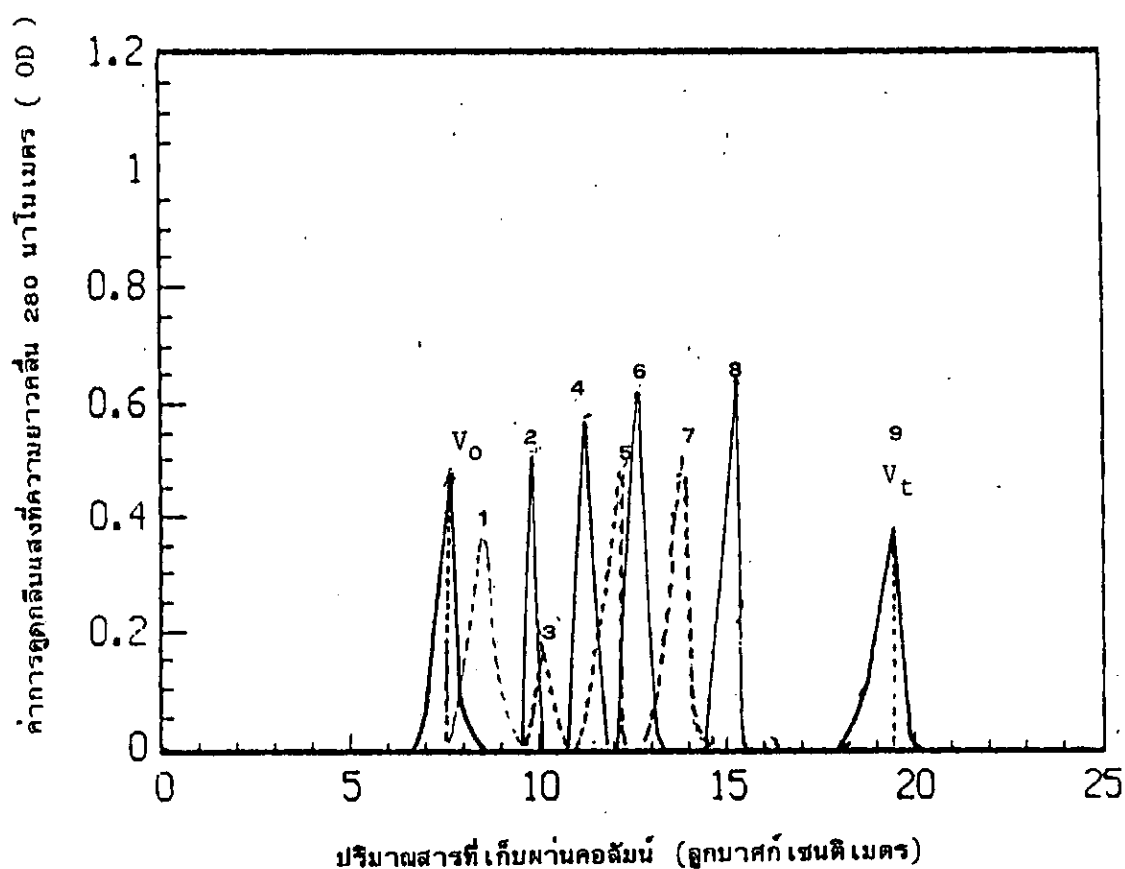
ภาพประกอบ 19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{av} กับน้ำหนักโมเลกุลของสารมาตรฐาน คือ 1-บลูเด็กซ์แทรน (MW 2000,000) 2 แคตาเลส (MW 232,000) 3 โอวัลบูมิน (MW 43,000) 4 ไรโบนิวคลีเอส (MW 13,000) และ 5 โปรตีนเชื่อมเฟอร์ริไซยาไนต์ (MW 329.26)

3.3.2 การหาน้ำหนักโมเลกุล ของ อาร์-ไฟโคอิริทรินด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 ด้วยเครื่อง FPLC-250

การหาน้ำหนักโมเลกุล ของ อาร์-ไฟโคอิริทรินด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 ด้วยเครื่อง FPLC-250 เมื่อสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้ผ่านคอลัมน์ได้ยอดของอาร์ไฟโคอิริทรินเพียงยอดเดียวดังภาพประกอบ 20 เมื่อผ่านสารโปรตีนมาตรฐาน คือ ไทโรโกลบูลิน เฟอริทิน แคตาเลส อัลโคเลส โอวัลบูมิน โคโมทรินลิโนเจน เอ และ โรโบนิวคลีเอส เอ ได้ยอดของโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ ดังภาพประกอบ 21 เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{av} กับน้ำหนักโมเลกุล ดังภาพประกอบ 22 ทำให้ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของ อาร์-ไฟโคอิริทรินเท่ากับ 190,000 ดาลตัน

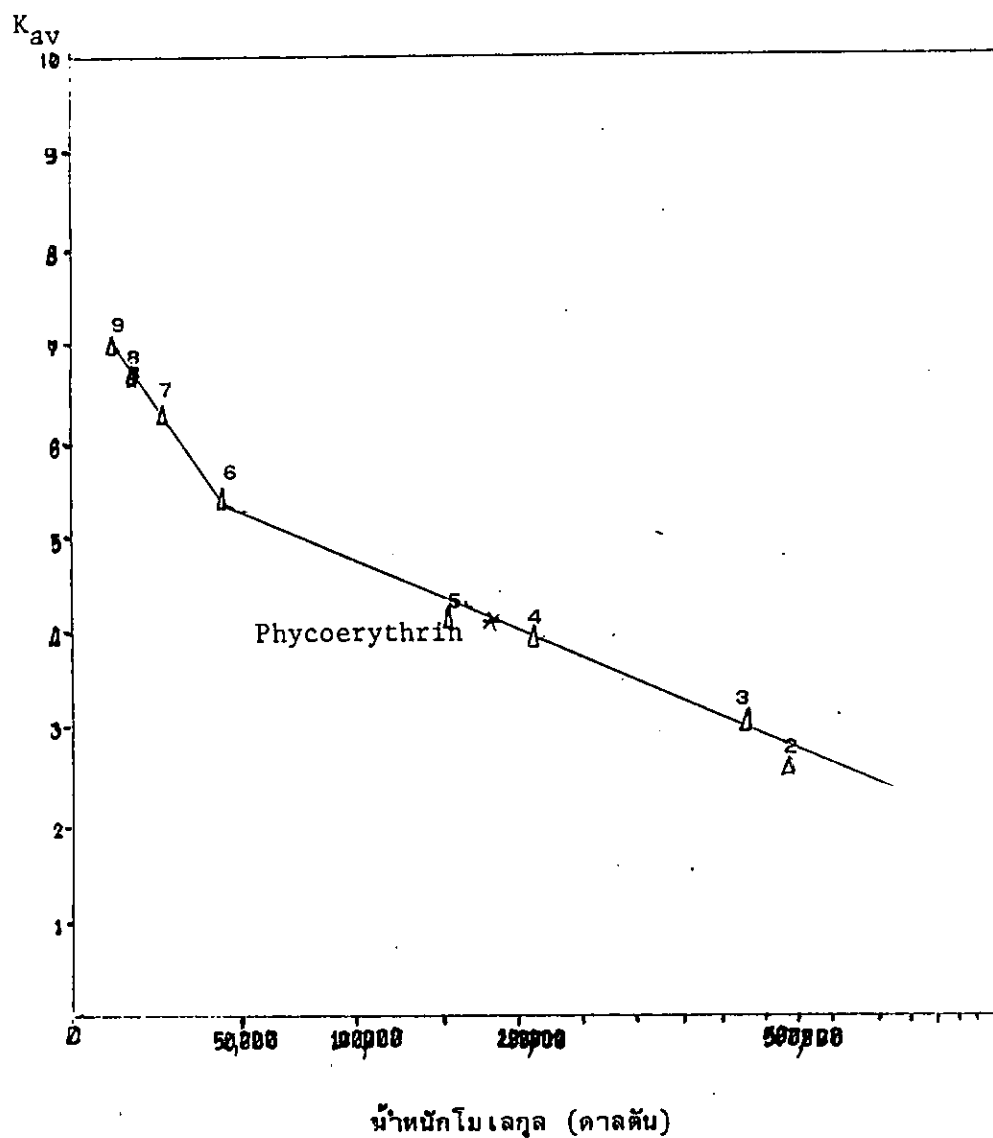


ภาพประกอบ 20 ผลการแยกอาร์-ไฟโคอิริทริน ด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC 250



ภาพประกอบ 21 ผลการแยกโปรตีนมาตรฐานด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC 250 สารมาตรฐานที่ใช้มีดังต่อไปนี้

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| 1 ขลุ่เด็กซ์แทรน (MW 2,000,000) | 2 ไทโรโกลบูลิน (MW 669,000) |
| 3 เฟอรัทีน (MW 440,000) | 4 แคตาเลส (MW 232,000) |
| 5 อัลโดเลส (MW 158,000) | 6 โอวัลบูมิน (MW 43,000) |
| 7 ไคโมทรินลิโนเจน เอ (MW 25,000) | 8 โรโบนิวคลีเอส เอ (MW 13,000) |
| 9 โปแตสเซียมเฟอรัไรโซไซด์ (MW 329.26) | |



ภาพประกอบ 22 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน

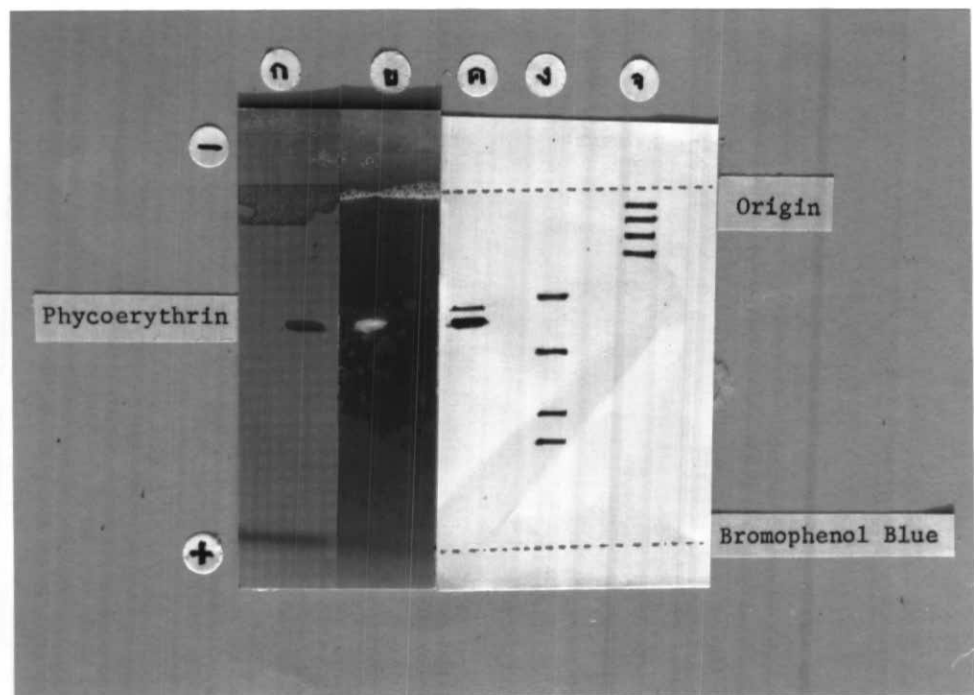
- | | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 1 บลูเด็กซ์แทรน (MW 2,000,000) | 2 ไทโรโกลบูลิน (MW 669,000) |
| 3 เฟอริทิน (MW 440,000) | 4 แคตาเลส (MW 232,000) |
| 5 อัลบูมิน (MW 158,000) | 6 โอวัลบูมิน (MW 43,000) |
| 7 โคโมทรินส์ในเจน เอ (MW 25,000) | 8 โรโบนิวคลีเอส เอ (MW 13,000) |

และ อาร์-ไฟโคอีริทรินที่แยกได้ และ MABI 6 ด้วยคอลัมน์ ซูเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC 250

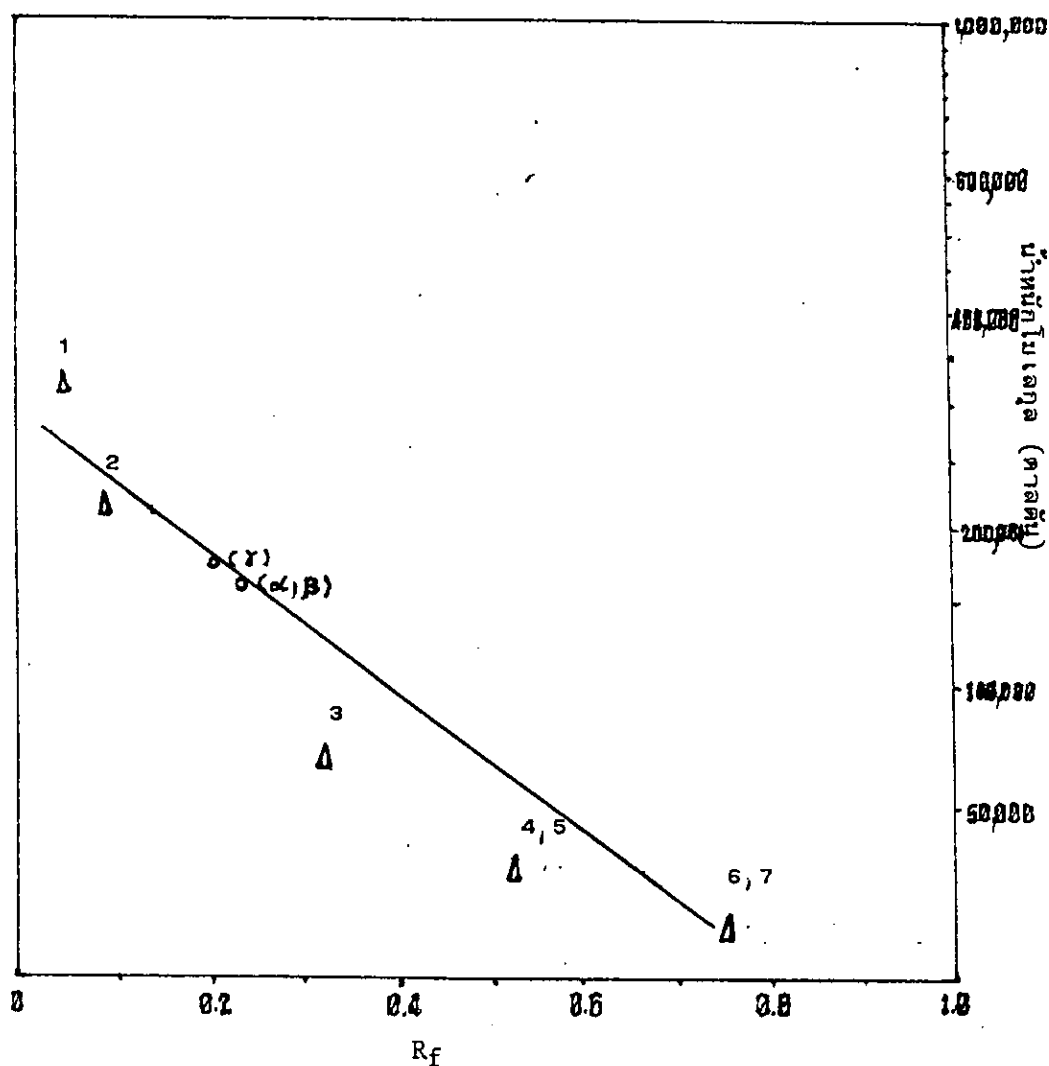
3.4 การศึกษาหน่วยย่อยของ อาร์-ไฟโคอิทรินที่แยกได้ด้วย เอสดีเอส-พอลิอะคริลละไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

ผลจากการนำ อาร์-ไฟโคอิทริน ไปแยกด้วย เอสดีเอส-พอลิอะคริลละไมด์ เจล พบว่า เห็นแถบสีชมพูด้วยตาเปล่า 1 แถบ และเมื่อนำไปส่องด้วยแสง UV พบว่า มีการเรืองแสงที่แถบสีชมพูด้วย เมื่อนำแผ่นเจลนี้ไปย้อมโปรตีน พบว่าได้แถบสีน้ำเงิน 2 แถบ โดยแถบที่อยู่ทางซ้ายมีขนาดกว้างกว่าแถบที่อยู่ทางขวา และแถบหนาเป็นแถบที่อยู่ตรงกับแถบสีชมพูที่เรืองแสงด้วย (ภาพประกอบ 23)

จากการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนที่แยกได้จากโปรตีนมาตรฐาน (ภาพประกอบ 24) พบว่ามีค่าประมาณ 180,000 และ 160,000 ดาลตัน



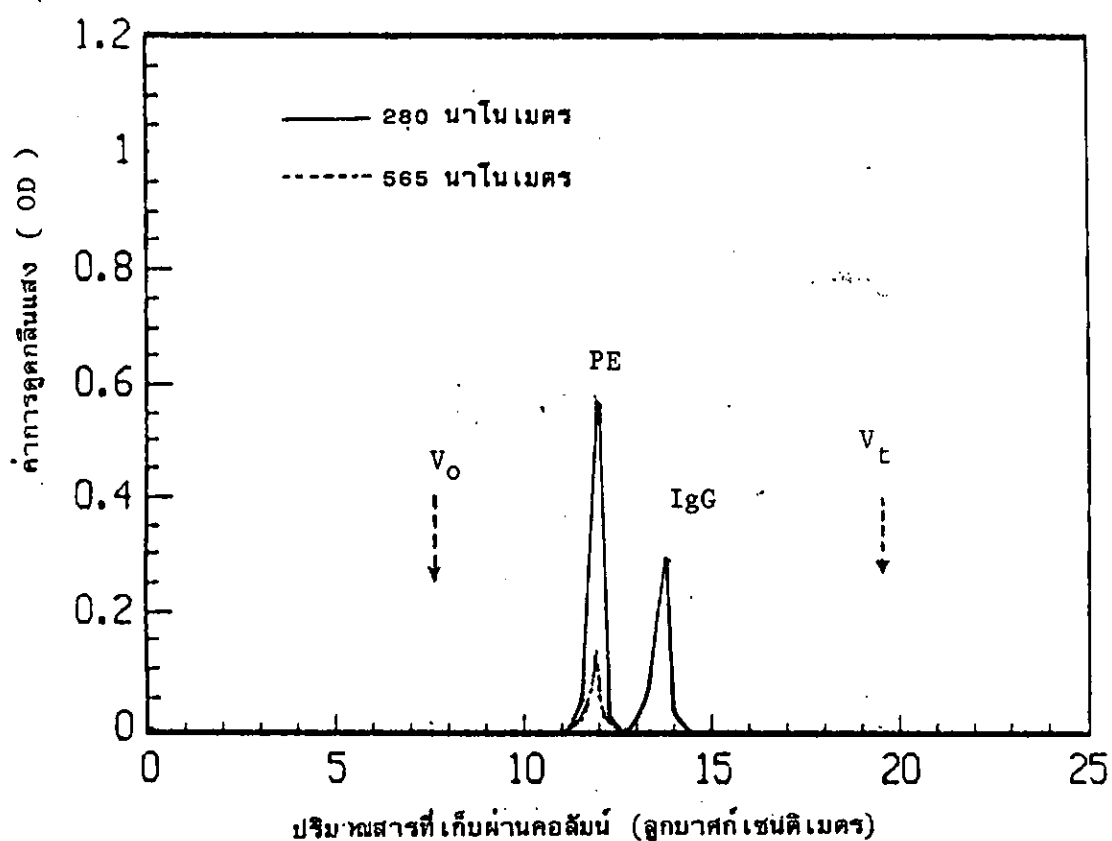
ภาพประกอบ 23 ผลของอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลเอสดีเอส-พอลิอะคริลละไมด์เข้มข้นร้อยละ 10 ที่ pH 8.9 โดย ก ข และ ค คือแถบของอาร์-ไฟโคอิทรินที่แยกได้ ส่วน ง คือแถบของโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) และ จ คือแถบของโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight)



ภาพประกอบ 24 ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของสารไฟโคอิรีทรินโดยเทียบกับสารโปรตีนมาตรฐาน ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เข้มข้นร้อยละ 10 ที่ pH 8.9 โปรตีนมาตรฐานหน่วยย่อย คือ 1 Thyroglobulin (Mw 330,000) 2 Feritine (MW 220,000) 3 Albumine (MW 67,000) 4 Ovalbumine (MW 43,000) 5 Carbonic Anhydrase (MW 30,000) 6 Trypsin Inhibitor (Mw 20,100) 7 α -lactalbumin (MW 14,400) และสารอาร์-ไฟโคอิรีทรินที่แยกได้

4. การเตรียม MAbIgG จาก mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica*

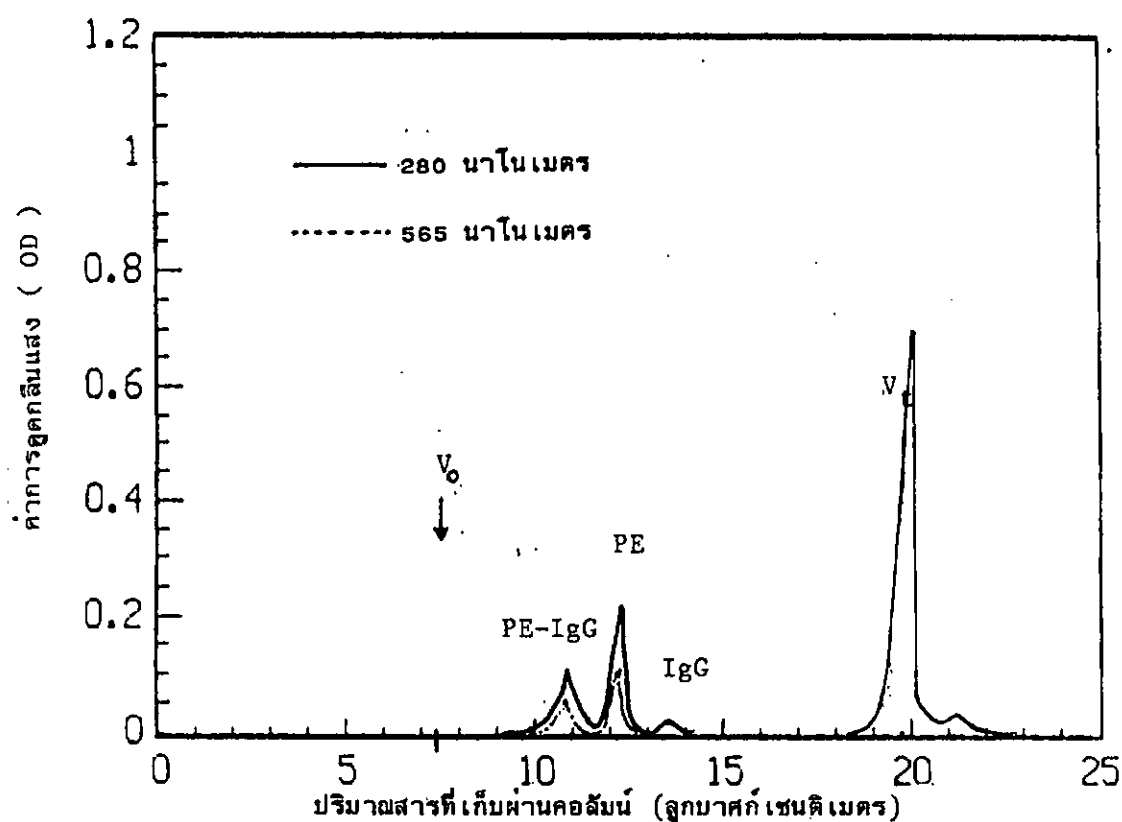
MAbIgG จากหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica* ที่เตรียมได้จาก hybridoma cell (Eh 208-C₂-2) นั้นมีปฏิกิริยาตรวจสอบได้ด้วยวิธี IFA และ ELISA และเมื่อนำมาหา น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง FPLC-250 ด้วยคอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 ได้ขนาดโมเลกุลประมาณ 160,000 คาลตัน จากภาพประกอบ 22 และภาพประกอบ 25 และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า อาร์-ไฟโคอิรีทริน



ภาพประกอบ 25 ผลการแยกอาร์-ไฟโคอิรีทรินและ MAbIgG ของหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica* ด้วยคอลัมน์ ซูเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC-250

5. การเตรียมสารควบคุม ระหว่างอาร์-ไฟโคอิริทริน กับ MAb IgG

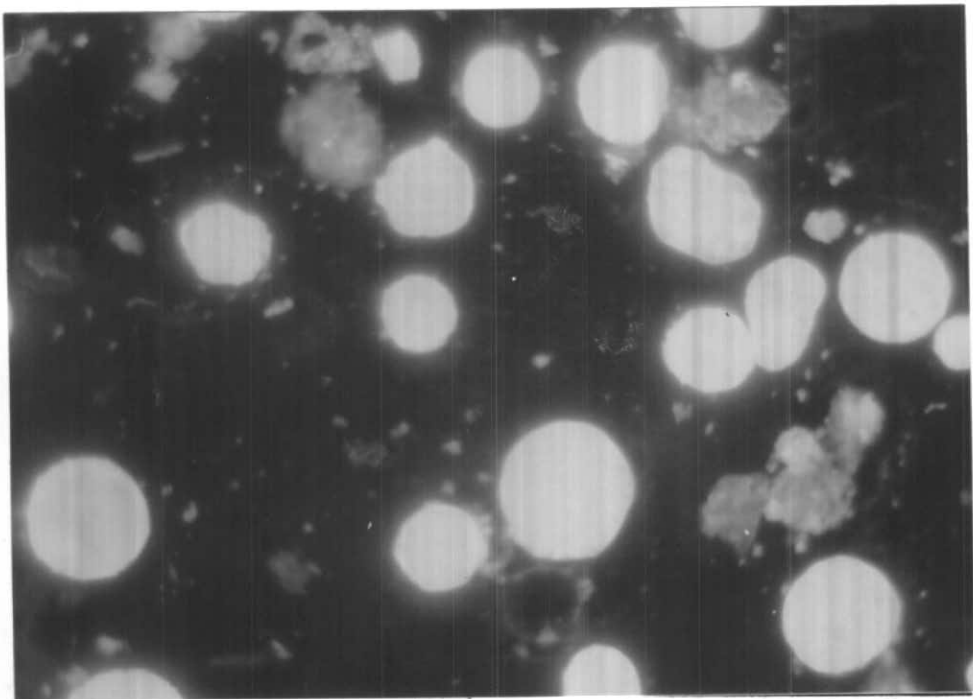
เมื่อนำสารควบคุมระหว่าง อาร์-ไฟโคอิริทรินกับ MAb IgG ของหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica* ที่เตรียมได้มาผ่านคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC-250 พบว่า ได้สารประกอบที่บริเวณ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า อาร์-ไฟโคอิริทริน และ MAb IgG ของหนู mouse ดังในภาพประกอบ 26 และยังได้สารจำนวนมากที่มีขนาดเล็กที่บริเวณเดียวกับ V_0



ภาพประกอบ 26 ผลการแยกอาร์-ไฟโคอิริทริน MAb IgG ของหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica* และสารควบคุมของสารทั้งสอง ด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC-250

6. การประยุกต์ใช้สารควบคู่ทาง immuno fluorescent ต่อเชื้อ *E. histolytica*

เมื่อนำสารควบคู่ของ อาร์-ไฟโคอิทรินกับ MAbIgG ของหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica* มาตรวจสอบเชื้อ *E. histolytica* HM-I ด้วยเทคนิค Direct immuno fluorescene antibody test ให้ความเรืองแสงสีส้มทองทั่วทั้งเซลล์ของเชื้อ *E. histolytica* HM-I ดังในภาพประกอบ 27



ภาพประกอบ 27 เซลล์ *E. histolytica* ที่ติดฉลากด้วยสารควบคู่ของอาร์-ไฟโคอิทริน กับ MAbIgG เมื่อผ่านกล้อง fluorescent microscopy ที่มีกำลังขยาย 25 เท่า (ใช้ฟิล์ม ความไว 400 ใช้เวลานาน 2 นาที 30 วินาที)

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

สรุปและอภิปรายผล

ในการสกัดสารอาร์-ไฟโคอิริทรินให้ออกจากเซลล์ของสาหร่ายทะเล ต้องนำสาหร่ายไปแช่ในบัฟเฟอร์เพื่อให้เซลล์บวมและแตกง่าย พบว่าถ้าแช่สาหร่ายบดละเอียดที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 10-14 วันจะให้สารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 565 และ 615 นาโนเมตรสูงที่สุด และหลังจากนั้น ค่าการดูดกลืนแสงก็จะลดลง ซึ่งแสดงว่าเกิดการเน่า หรือสลายตัวของสาหร่ายหรือ ของสารรงควัตถุ จึงได้ทำการแช่สาหร่ายเป็นเวลานาน 10-11 วัน ก่อนที่จะนำไปกรองเพื่อแยกเอาสารละลายไปผ่านขั้นตอนการทำให้รงควัตถุบริสุทธิ์ขึ้น

จากการตกตะกอนโปรตีนในสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ เกลือ-แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นลำดับขั้น พบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0-20 ได้ตะกอนโปรตีน กาก และคลอโรฟิลล์ ส่วนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 20-30 จะได้ตะกอนสีน้ำเงินของอาร์-ไฟโคไซยานินส่วนใหญ่ที่ปนอยู่กับโปรตีนอื่น ๆ และส่วนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 30-50 ได้ตะกอนสีชมพูแดง ของอาร์-ไฟโคอิริทรินส่วนใหญ่ที่อยู่รวมมากับโปรตีนอื่น โดยอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 ต่อ 280 นาโนเมตร มีค่าค่อนข้างต่ำ คือเท่ากับ 0.43 ซึ่งหมายถึงยังมีโปรตีนชนิดอื่นปนอยู่อีกมาก

ขั้นตอนต่อไปคือการกำจัดเอาโปรตีนอื่น ๆ ที่ปนอยู่กับตะกอนสีชมพูแดงของสารอาร์-ไฟโคอิริทริน ที่ได้จากการตกตะกอน คือการนำตะกอนไปผสมกับ ดีไอเออี เซลลูโลส โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตผสมอยู่ด้วยความเข้มข้นร้อยละ 50 ซึ่งสภาวะนี้ สารอาร์-ไฟโคอิริทรินและโปรตีนอื่น ๆ จะตกตะกอนเกาะติดอยู่กับดีไอเออี เซลลูโลสที่เป็นตัวดูดซับอยู่ในคอลัมน์ และเมื่อทำการชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตจากมากไปน้อย โดยค่อย ๆ ลดลงเป็นขั้น ๆ จะทำให้โปรตีนบางชนิดที่ปนอยู่ในตะกอนของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินมีการละลายออกมาตามช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในสารชะออกจากคอลัมน์ดีไอเออี เซลลูโลสได้ และพบว่า สารอาร์-ไฟโคอิริทรินถูกชะออกมาจากคอลัมน์เมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ไม่มีเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 6.7 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธิ์สูง โดย Kronick ได้รายงานไว้ว่า ค่าความบริสุทธิ์ ของ ไฟโคอิริทรินที่สามารถใช้งานได้จะต้องมีค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 ต่อ 280 นาโนเมตร ไม่น้อยกว่า 4 (Kronick. 1986) นอกจากอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงทั้งสองแล้ว ยังทำการทดสอบ

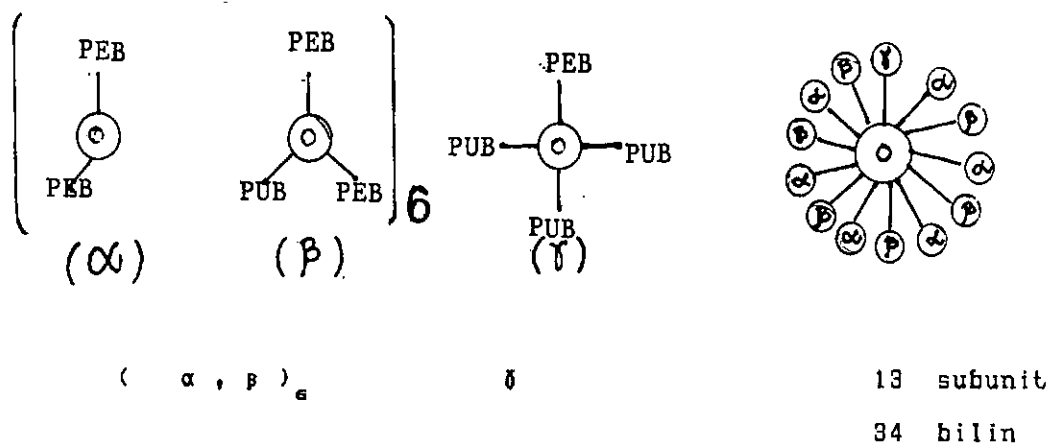
ความบริสุทธิ์ของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่ได้ด้วยพอลิอะคริลาไมด์อีเล็กโทรโฟรีซิส เข้มข้นร้อยละ 7 ได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนเพียงแถบเดียว และแถบนี้เห็นเป็นแถบสีชมพูแดงเมื่อมองด้วยตาเปล่า และเป็นแถบที่เรืองแสงสีส้มทองเมื่อส่องด้วยแสง UV ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่ทำการแยกได้อีกทางหนึ่ง

เมื่อทำการศึกษาสมบัติทางประการของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้นี้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ พบว่ามีค่าความยาวคลื่นสูงสุด ที่ความยาวคลื่น 565 545 และ 495 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่ 565 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และรองลงมาคือ 545 และ 495 นาโนเมตร ตามลำดับ และลักษณะของค่าการดูดกลืนแสงของอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้จากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลารีย จากจังหวัดปัตตานี เหมือนกับสาร อาร์-ไฟโคอิริทรินที่มีรายงานไว้ (Kronick, 1986) และน่าที่จะเป็นไปได้ว่า ที่ค่าการดูดกลืนแสงมีลักษณะเช่นนี้อาจมาจากการที่สารอาร์-ไฟโคอิริทรินประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ แอลฟา เบตา และแกมมา (Glazer and Hixson, 1977) แต่ละไฟโคบิลินมีจำนวนของบิลินไม่เท่ากัน และแต่ละบิลินก็มีจำนวนโครโมฟอร์ไม่เท่ากันจึงทำให้ค่าของการดูดกลืนแสงมี 3 ความยาวคลื่น และจากการทดลองยังพบอีกด้วยว่าถ้าทำการแยกสารอาร์-ไฟโคอิริทรินใหม่ ๆ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร จะสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 และ 495 นาโนเมตร มากถึง 0.5 เท่า และจะลดลงภายใน 24 ชั่วโมง อันมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ซึ่งไปทำให้จำนวนพันธะคู่ในโครโมฟอร์ของบิลินเปลี่ยนแปลงไป แต่การลดลงนี้จะลดลงจะมากตามระยะเวลาที่อยู่ในสภาวะอุณหภูมิ และแสงนั้น

จากการทดสอบค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์พบว่ามีการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 574 นาโนเมตร ซึ่งมีความสอดคล้องกับค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Callithamnion byssoides* (Yu and others, 1981) จึงเป็นหลักฐานอย่างหนึ่งที่แสดงว่าสารที่แยกมาจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลารียนี้ เป็นสารอาร์-ไฟโคอิริทริน

ในการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของอาร์ไฟโคอิริทรินด้วยเทคนิคเจล นิวเทรชัน ด้วยคอลัมน์ เซฟาคิล เอส 300 กับ คอลัมน์ ซูเปอร์โรส 12 ของเครื่อง FPLC 250 นั้น พบว่าอาร์-ไฟโคอิริทรินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 ดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับ สารไฟโคอิริทริน ที่แยกจาก *Porphyridium cruentum* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 240,000 ดาลตัน (Glazer and Hixson, 1977) และเมื่อทำการศึกษาหน่วยย่อยของสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่สกัดได้ด้วย เอสดีเอส พอลิอะคริลาไมด์ เจล อีเล็กโทรโฟรีซิส เข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีน 2 แถบ คือ แถบหนา 1 แถบ และแถบบางอีก 1 แถบ ทำให้คาดคะเนว่า สารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้อาจประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากันและอีก

1 หน่วยย่อยที่มีขนาดใหญ่กว่า คือ อาจเป็นหน่วยย่อยของ α และ β ที่มีขนาดเท่ากันและอีกหน่วยย่อยน่าจะเป็น δ โดย Glazer และ Stryer ได้ศึกษาองค์ประกอบหน่วยย่อยของอาร์-ไฟโคอิริทริน ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ $(\alpha, \beta)_6$ โดยแต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วยกลุ่มของบิลิน คือ α ประกอบด้วย PEB จำนวน 2 บิลิน β ประกอบด้วย PEB จำนวน 2 บิลิน และ PUB จำนวน 1 บิลิน และ δ ประกอบด้วย PEB จำนวน 1 บิลิน และ PUB จำนวน 3 บิลิน เมื่อรวมจำนวนบิลินทั้งหมด 34 บิลิน (Glazer and Stryer, 1984) ถ้าทำการเขียนรูปสมมติของการจับรวมกันของหน่วยย่อย และบิลินทั้งหมดของอาร์-ไฟโคอิริทริน โดยทำการตัดแปลงจาก ของ Laousoontonsiri. (Laousoontonsiri, 1990) ที่แสดงการจับรวมกันของหน่วยย่อยของ ซี-ไฟโคไซยานิน น่าจะได้ดังภาพประกอบ 28

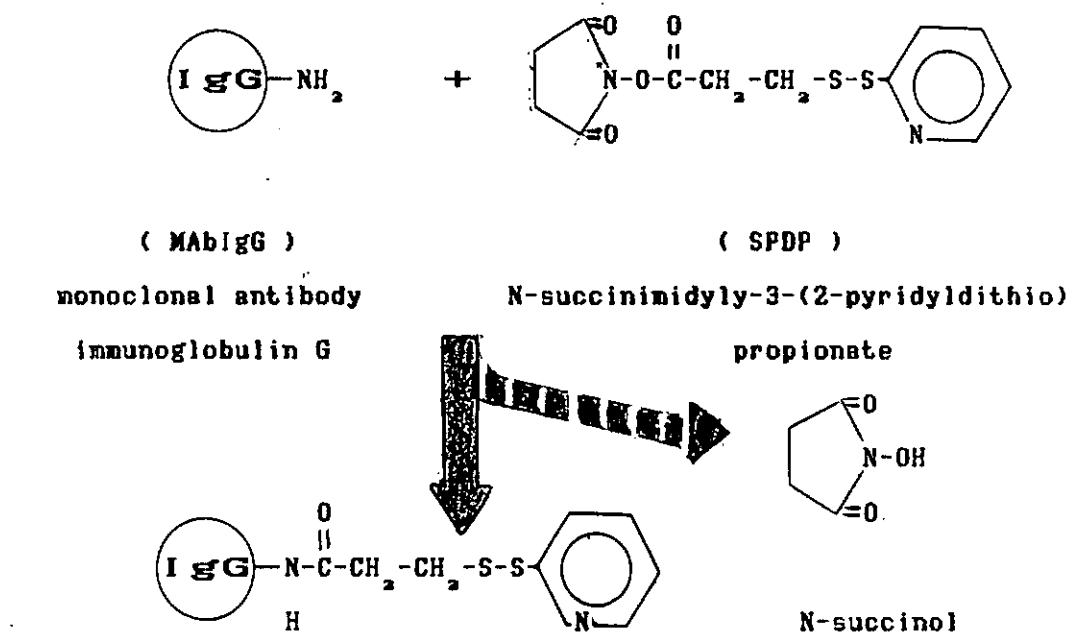


ภาพประกอบ 28 รูปสมมติของการรวมจับกันของหน่วยย่อยของอาร์-ไฟโคอิริทริน

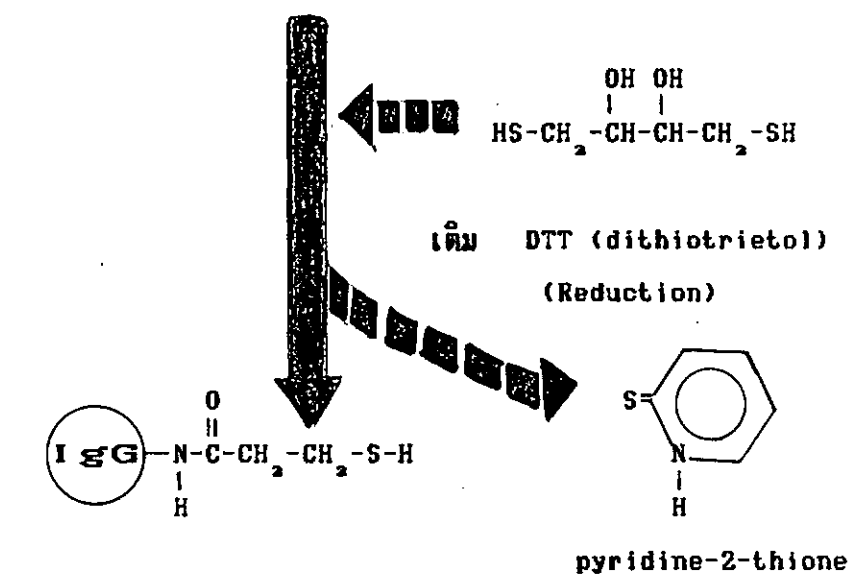
จากการเตรียม MAbIgG ของหนู mouse จากเซลล์ไฮบริโดมา EH 208 C₂₋₂ ต่อเชื้อ *E. histolytica* นั้น เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี IFA และวิธี ELISA มีผลบวกในการทดสอบทั้งสองวิธี และ MAbIgG ที่เตรียมขึ้นนี้เมื่อมาทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยคอลัมน์ซูเปอร์โรส 12 เครื่อง FPLC 250 นั้นพบว่ามีความยาวประมาณ 170,000 ดาลตัน

เมื่อนำสารอาร์-ไฟโคอิริทริน และ MAbIgG ของหนู mouse ที่เตรียมได้ มาทำการควมคู่ โดยใช้สาร SPDP เป็นสารตัวกลาง ตัดแปลงวิธีการทำการควมคู่จากการควมคู่ของเอนไซม์ horse radish peroxidase กับ ไฟโคอิริทริน (Hudson and Hay, 1989) โดยน่าจะมีปฏิกิริยาในการเกิดการควมคู่ดังในภาพประกอบ 29

ปฏิกิริยาขั้นที่ 1



MAbIgG-PDP complex
 N-MAbIgG-3-(2-pyridyldithio) propionate complex



MAbIgG-PT complex
 N-MAbIgG-3-propionylthiol complex

(สารประกอบ 1)

ในกระบวนการเตรียมสารควบคู่ของ MAbIG กับ อาร์-ไฟโคอิริทรินที่เตรียมได้ ควรที่จะได้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้น ดังนั้นเมื่อนำสารควบคู่ที่เตรียมได้ไปห้าน้ำหนักโมเลกุลด้วย คอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 โดยเครื่อง FPLC 250 พบว่ามียอดที่แสดงถึงน้ำหนักของโมเลกุลของสารเพิ่มขึ้นคือยวบเข้าใกล้ตำแหน่งของ V_0 ซึ่งแสดงว่ามีการเกิดสารควบคู่แล้ว แม้ว่าจะยังคงมีตำแหน่งยอดของ อาร์-ไฟโคอิริทริน และ MAbIG อยู่ เป็นการบอกให้ทราบว่าน่าจะมีอาร์-ไฟโคอิริทรินบางส่วนไม่เกิดการควบคู่ และยิ่งพบว่าที่ตำแหน่งของ V_0 นั้นมียอด ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่อนข้างสูง โดยที่ยอดนี้เป็นตำแหน่งของโปรตีนที่มีขนาดเล็กและสารอื่น ๆ ในกระบวนการทำสารควบคู่ การที่พบโปรตีนขนาดเล็กมาก แสดงว่ามีสาร อาร์-ไฟโคอิริทริน และ MAbIG เกิดการเสียสภาพไปในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา เช่นอาจเกิดการเสียสภาพจากสาร DTT ที่เติมลงไปในการเตรียมสารควบคู่ และถูกกำจัดไม่หมด เป็นต้น นอกจากนี้การทำสารควบคู่นี้ จะต้องมียอดหรือระยะรั่วที่สำคัญคือ สารที่ใช้ เช่น สาร SPDP จะต้องละลายในเมทานอลที่ปราศจากน้ำเพราะน้ำเป็นสารที่ทำให้สาร SPDP เสียสภาพการเป็นสารตัวกลางในการเกิดการควบคู่ไป เป็นต้น ระยะเวลา และอุณหภูมิ จะต้องระยะรั่ว เพราะในการใช้สาร DTT หรือ iodoacetamide นั้นใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไม่นานนัก เพราะสารทั้งสองนี้เป็นสารช่วยเสริมการเกิดสารควบคู่ แต่ถ้านานมากเกินไปจะไปทำลายสารไฟโคอิริทรินได้ด้วย นอกจากนี้จะต้องระวังปริมาณแสงในการทำสารควบคู่ เพราะสารที่ใช้ในการทำสารควบคู่ไม่เสถียรต่อแสง จึงควรให้ถูกแสงน้อยที่สุด

เมื่อเตรียมสารควบคู่ได้และพบว่ามีเกิดการควบคู่แล้วจากน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อนำสารควบคู่ที่เตรียมได้มาทดสอบการประยุกต์ใช้งานโดยนำมาตรวจสอบเชื้อ *E. histolytica* HM-1:IMSS ด้วยเทคนิค Direct immunofluorescent antibody assay พบว่ามีสารจับเซลล์ของเชื้อ *E. histolytica* ทั้งทั้งเซลล์ และให้ความเรืองแสงสีส้มทอง เป็นการนำสารควบคู่มาใช้งานได้จริง ในการนำสารควบคู่ที่เตรียมได้มาประยุกต์ใช้ตรวจสอบเชื้อ จะต้องใช้สารควบคู่นี้มาละลายในสารละลาย PBST เพราะมีสารดีเทอร์เจนต์ (detergent) คือ Tween-20 ป้อนอยู่ที่จะเข้าไปช่วยการกระจายตัวของสารควบคู่เพื่อไปจับเซลล์ของเชื้อได้ดีขึ้น เพราะหากไม่มีสารดีเทอร์เจนต์ผสมอยู่ จะทำให้ผลการตรวจสอบเชื้อได้ผลไม่ดี หรือไม่ได้อะไรเลย

สารอาร์-ไฟโคอิริทรินเสียสภาพได้ง่าย แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเข้าไปให้มีความเข้มข้นร้อยละ 20 ขึ้นไป จะช่วยเสริมความเสถียรมากขึ้น แม้จะเก็บที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิต่ำด้วยจะทำให้การเสียสภาพของอาร์-ไฟโคอิริทรินยากขึ้นทำให้สามารถเก็บได้นาน ทั้งนี้เนื่องจากกรดที่เกลี่ยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จึงไม่ไปทำลายสภาพของอาร์-ไฟโคอิริทริน นอกจากนี้แล้วแสงยังจะทำให้กลุ่มของโครโมฟอร์เสียสภาพไป เนื่องจากการที่พลังงานแสงเข้าไปทำให้อนุภาคในโมเลกุลเกิดโครโมฟอร์ เกิดการเคลื่อนระดับ

พลังงานจากสภาวะปกติไปสู่สภาวะกระตุ้นนาน ๆ จนทำให้เกิดการสร้างพันธะกับสารอื่น ๆ ทำให้พันธะที่เกิดโครโมฟอร์น้อยลง สีที่เห็นอันมาจากการตกกลืนแสงก็น้อยลง และความสามารถในการให้สารเรืองแสงก็ลดลงด้วย สารอาร์-ไฟโคอิทรินซึ่งเป็นสารกลุ่มโครโมฟอร์เมื่อถูกแสงก็ทำให้เสียสภาพได้ ดังนั้นนอกจากจะเพิ่มความเข้มข้นของเกลียวแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วควรเก็บในที่มืด มิงงานวิจัยของ Yu และ Rongzhao (Yu and Rongzhao, 1989) ได้เสนอการเพิ่มความเสถียรของสารไฟโคบิลิโปรตีน ที่สอดคล้องกับที่กล่าวมาแล้ว

การวิจัยนี้เป็นการนำสารอาร์-ไฟโคอิทรินจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ นอกจากที่จะนำสาหร่ายนี้มาแปรรูปให้วันเพียงอย่างเดียวเป็นการเพิ่มมูลค่าของสาหร่ายได้อีก ผลการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้น และแนวทางที่จะนำสารอาร์-ไฟโคอิทรินมาใช้เป็นสารตามรอย หรือ ฉลากให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยการวิจัยนี้ได้นำสารอาร์-ไฟโคอิทรินมาทำสารควบคุมและทำเป็นฉลากให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจสอบเชื้อ *E. histolytica* HM-1 ได้ การนำสารควบคุมนี้มาใช้ตรวจสอบด้วยวิธี direct immunofluorescent antibody assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ได้เฉพาะเจาะจงเกินไป ดังนั้นอาจทำการควบคุมกับสารอื่นให้ใช้งานได้กว้างขึ้นเช่น อาจนำมาทำการควบคุมกับ IgG จาก Rabbit ที่เป็นแอนติบอดีต่อ IgG จากหนู mouse ดังนั้นงานที่มีการใช้ IgG จากหนู mouse ก็จะสามารถใช้สารควบคุมนี้ได้ เป็นต้น หรืออาจหากระบวนการทำการควบคุมวิธีใหม่ เช่นได้มีการวิจัยการคัดแปลงการทำสาร APAAP (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase) ที่ใช้ในงานทดสอบ ELISA นั้นมาทำสารประกอบของ PEAPC (phycoerythrin anti-phycoerythrin complex) โดยวิธีนี้นะจะได้สารควบคุมที่เจาะจงเพราะจับกันด้วยระบบแอนติบอดี กับ แอนติเจน เป็นต้น (Rai, Singh and Bergman, 1989)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำสารควมค์ระหว่าง IEG จากกระทาย ต่อหนู กับ อาร์-ไฟโคอิริทริน เพื่อที่จะได้นำสารควมค์นี้ไปใช้ได้กว้างมากขึ้น
2. ควรทำการศึกษาหาสารตัวกลางที่มาทำให้เกิดการควมค์ ที่มีราคาถูก และมีประสิทธิภาพดี เพื่อลดต้นทุนการผลิต
3. ควรทำการศึกษาการนำสารอาร์-ไฟโคอิริทริน ถึงบริษัทอื่นมาใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น ๆ เช่น ทางด้านผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาหาร เป็นต้น เพราะมีแนวโน้มที่สามารถทำได้
4. ควรศึกษาทางด้านความเป็นพิษของสารอาร์-ไฟโคอิริทริน หรืออนุพันธ์ เพื่อเป็นการป้องกันหากมีการนำสารอาร์-ไฟโคอิริทรินมาใช้อย่างแพร่หลายในอนาคต
5. ควรศึกษาทางด้านเศรษฐกิจถึงแนวโน้มความเป็นไปได้ในการผลิต อาร์-ไฟโคอิริทริน ออกสู่ตลาด หรือกระบวนการทางอุตสาหกรรม
6. ควรศึกษาถึงวิธีการนำ อาร์-ไฟโคอิริทรินเป็นสารตามรอย หรือ ฉลากในรูปแบบอื่น

มกราคม ๒๕๖๓

บรรณานุกรม

- กาญจนภาณุฉัตร. "สาหร่ายบางชนิดของไทย ที่รับประทานได้," วิทยาสารเกษตรศาสตร์. 12 : 119-129 ; 2521.
- . สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2527.
- ., การเพาะเลี้ยงสาหร่ายวัน ในอุทยานวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ : 128-132 ; 2534.
- โกวิท พัฒนาปัญญาลัทย. "โฟลไฮโตเมตรี," จดหมายข่าวชีวเคมี . 2 (2) : 7-12 ; 2534.
- นิยม ชลิตะนาวิน. "การแยกอาร์-ไฟโคอิริทริน และ อาร์-ไฟโคไซยานิน จากสาหร่าย สกุลกราซีลาเรีย ในแหลมหิน จังหวัดตราด," ปริญญานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ; 2531.
- สุชาติ วิเชียรสรรค์ . "สายผสมนางที่จังหวัดสงขลา," วารสารการประมง. 21 (2) : 295-307 ; 2511
- . "สาหร่ายผสมนาง สาหร่ายที่ใช้ทำเป็นวัน," กลีกร . 42 : 220-233 ; 2512
- เสาวนีย์ เสาวภาโสภ. "การศึกษาวิธีการแยกและสมบัติของอากาศไรสจากสาหร่าย สกุลกราซีลาเรียในประเทศไทย," ปริญญานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร , 2533.
- หน่วยวิจัยไบโอพอลิเมอร์, Seaweed Production . ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ; 2532.
- Abbott, I.A. "Some Species of Gracilaria and Polycarvernosa from Thailand," unpublished data ; 1987.
- Bird, N. "Studies on Gracilaria : Ecology of Attached Population of Gracilaria sp. at Barrachois Harbour," Proceeding Nova Scotia Institute of Science. 27 : 144-158 ; 1967.
- Bogorad, L. "Chlorophylls," Physiology and Biochemistry of Algae, 385-404 ; 1962.
- Carlsson, R., J.H. Drevin and J.R. Axen. "Protein Thiolation and Reversible Protein-Protein Conjugation," Biochemical Journal. 173 : 723-737 ; 1978.
- Dawson, Y.A. "Marine Botany," An Introduction. Holt, Rinchart and Winston. Inc. New York : 371 p. ; 1966.

- Egger, K. "Review of Distribution and Function of Vegetable Carotenoids," Biological Rundsch, 5 : 112-124 ; 1967.
- Fujimori, E. and J. Pecci. "Distinct Subunits of Phycoerythrin from Porphyridium cruentum and Their Spectral Characteristics," Archives of Biochemistry and Biophysics. 118 : 448-455 : 1967.
- Gantt, E. and L.A. Claudia. "Phycobilisomes of Porphyridium cruentum : Pigment," Biochemistry. 13(14) : 2960-2966 ; 1974.
- Glazer, A.A. and Graig S. Xeseson. "Subunit Structure and Chromophore Composition of Rhodophytan Phycoerythrins," Journal of Biological Chemistry. 252(1) : 32-35 ; 1977.
- Glazer, A.N. and Lubert Strger. "Fluorescent Tandem Phycobiliprotein Conjugates," Biophysical Journal. 43 : 383-386 ; 1983.
- Goldmeier, D., P.G. Sorgeant and A.B. Price. "Is *Entamoeba histolytica* in Homosexual Man a Pathogen?," Lancet. 1 : 641-644 ; 1986.
- Goodwin, T.W. "Carotenoids," Compound Phytochemistry. 121-137 ; 1966.
- . "Algal Biliproteins and Phycobilins," Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. 1 : 328-376 ; 1976.
- Gryuner, V.S. "Chemical and Physicochemical Characterizations of Agaroid, Constituent of of the Alga. Phyllophora neyosa," Colloquial International Centre of Natural Research of Science 103 : 183-190 ; 1961.
- Guard-Friar, D., B.L. Eisenberg, M.R. Edwards and R. MacColl. "Immunochemistry on Cryptomonad Biliproteins," Plant Physiology. 80 : 38-42 ; 1986.
- Guy, K., D.N. Crichton and J.A. Ross. "Indirect Immunofluorescence Labelling with Complexes of Phycoerythrin and Monoclonal Anti-Phycoerythrin Antibodies (PEAPE complexes)," Journal of Immunological Method. 112 : 261-265 ; 1988.
- Hudson, L. and F.C. Hay. Practical Immunology. Blacwell Scientific Publications, Oxford London : p.506 ; 1989.
- Katz, M., D.D. Despommier, R. Gwardz. "Entamoeba histolytica," Parasite disease. 2nd. 136-142 ; 1988.
- Kellile, S.D. and P. O'CARRA. "Structure and Apoprotein Linkages of Phycourobilin," Biochemistry Journal. 226 : 723-731 ; 1985.

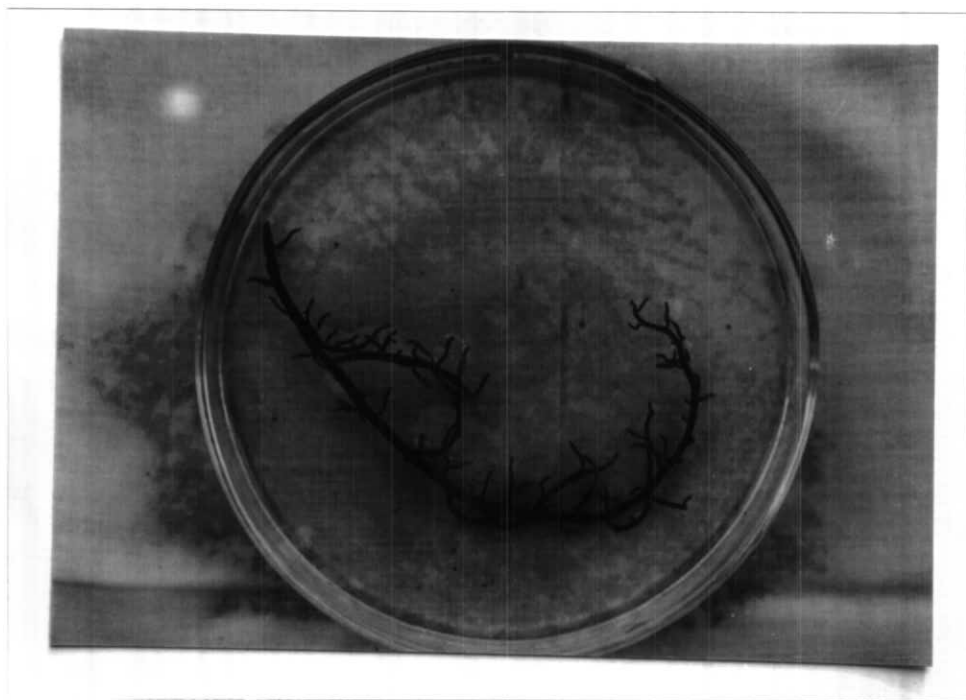
- Kim, D.H. "Economic Important Seaweeds in Chile-I.," Gracilaria Botany. Mar.(13) : 140-162 ; 1970.
- Kohler, G. and C. Milstein. "Continuous Cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," Nature. : 256-495 ; 1975.
- KOST-REYES, E. and Hans-Peter KOST. "The Protein-Chromophore Bond in B Phycoerythrin from Porphyridium cruentum," Journal Biochemistry. 102 : 83-91 ; 1979.
- Kronic, M.N. "The Use of Phycobiliproteins as Fluorescent Labels in Immunoassay," Journal of Immunological Method. 92 : 1-13 ; 1986.
- Kronic, M.N. and P.D. Grossman. "Immunoassay Techniques with Fluorescent Phycobiliprotein Conjugates," Clinical Chemistry. 19(9) : 1582-1586 ; 1983.
- Laemmli, U.K., "Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄," Nature. 227 : 680-685 ; 1970.
- Laousoontornsiri, L. "Purification and Characterization of Fluorescent probes from blue green algae," M.S.(thesis), Faculty of Graduate Studies. Mahidol University : 1990.
- Lee, R.E. Phycology. Cambridge University Press, Cambridge ; 1980.
- Lewmanomont, K. "Distibution of some algae in Thailand," Paper Presented at the Second International Symposium on Marine Biogeography and Evolution in the Pacific, Sydney, Australia ; 1982.
- MacColl, R., D. Guard-Friar and T.J. Ryon. "Biliprotein light-harvesting strategies, Phycoerythrin 566," Biochemistry. 29 : 430-435 ; 1990.
- Martin, C.D. and R.G. Heller. "Subunit and Chromophores of a type I Phycoerythrin from a Chrtomonas sp. (Cryptophyceae)," Biochimical et Biophysica Acta. 923 : 88-97 ; 1987.
- McHugh, Thomas M., R.C. Miner, L.H. Logan and D.P. Stites. "Simultaneous Detection of Antibodies to Cytometry and a Microsphere-Based Fluorescence Immunoassay," Journal of Clinical microbiology. October : 1957-1961 ; 1988.
- Oi, V.T., A.N. Glazer and L. Stryler. "Fluorescent Phycobiliprotein Conjugates for Analysis of Cells and Molecules," The Journal of Cell Biology. 93 : 981-986 ; 1982.

- RAI, A.N., M. Borthakur, S. Singh and B. Bergman. "Anthoceros-Nostoc Symbiosis," Journal of General Microbiology. 135 : 385-395 ; 1989.
- Ravdin, J.I. "Pathogenesis of amoebiasis : an overview, In Amoebiasis human infection by E. histolytica," Ravin Edition John Wiley and Sons Ins. 166-176 ; 1989.
- Sargeaunt, P.G. William J.E. and J.D. Grene. "The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis," Trans R. Society of Tropical Medicinol Hygenic 72 : 519 ; 1978.
- Sargeaunt, P.G. and J.E. William. "Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man.," Trans R. Society of Tropical Medicinol Hygenic 73 : 225 ; 1979.
- Sargeaunt, P.G. "The reliability of Entamoeba histolytica zymodenes in clinical diagnosis." Parasitology Today. 3 : 40 ; 1987.
- Shang, Y.C. "Economic aspects of Gracilaria culture in Taiwan.," Quaculture. 8 : 1-7 ; 1976.
- Swason, V.R. and A.N. Glazer "Separation of Phycobiliprotein Subunits by reverse phase high Pressure Liquid Chromatography," Analytical Biochemistry. 188 : 295-299 ; 1990.
- Thammapalerd, N. Unpublished ; 1989.
- Thammapalerd, N. and S. Tharavanij. "Biomedical applicational of monoclonal antibodies (McAb) against Entamoeba histolytica In : Biotechnology for Biological Control of Pest and Vectors," Maramorosch K (Editor). CRC Press, Inc. : 12 ; 1991.
- Ullman, E. and P. Khama "Fluorescent excitation transfer immunoassay," Methods in Enzymology. 74 : 28-60 ; 1981.
- Wonsit, R. "Solid-phase enzyme immunoassay for the detection of Entamoeba histolytica in clinical specimens," M.S. thesis, Faculty of Tropical Medicine Mahidol University ; 1990.
- Wonsit R., N. Thammapalerd, S. Tharavanig, P. Radomyos and D. Bunnag. "Enzyme-linked Immunosorbent Assay Based in Monoclonal and Polyclonal Antibodies for the Detection of Entamoeba histolytica. Antigens in Faecal Specimens," Trans R. Society of Tropical Medicinol Hygenic. 86 ; 1992.
- White, J.C. and L. Stryer. "Photostability Studies of Phycobiliprotein Fluorescent Labels," Analytical Biochemistry. 161 : 442-452 ; 1987.

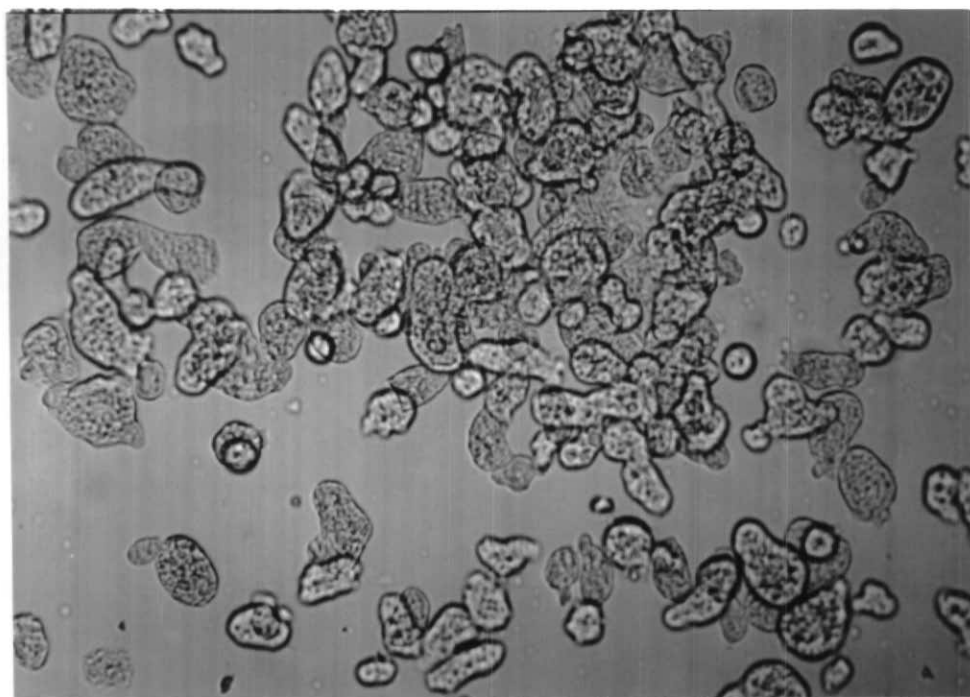
- Yamazaki, I., N. Tamai, T. Yamazaki, A. Murakami, M. Mimuro and Y. Fujita. "Sequential Excitation Energy Transport in Stacking Multilayers," The Journal of Physical Chemistry. 92 : 5035-5044 ; 1988.
- Yu, Mycong-Hee, A.N. Glazer, K.G. Spencer and J.A. West. "Phycoerythrin of the Red Alga Callithamnion," Plant physiology. 68 : 482-488 ; 1981.
- Yu, Y. and R. Lu. "Stability of Phycobilisomes II the Effects of Low Temperatures on the Stability of Phycobilisome," Haiyang Yu Huzhao.20(1) : 28-33 ; 1989.

ពាក្យដេញដោល

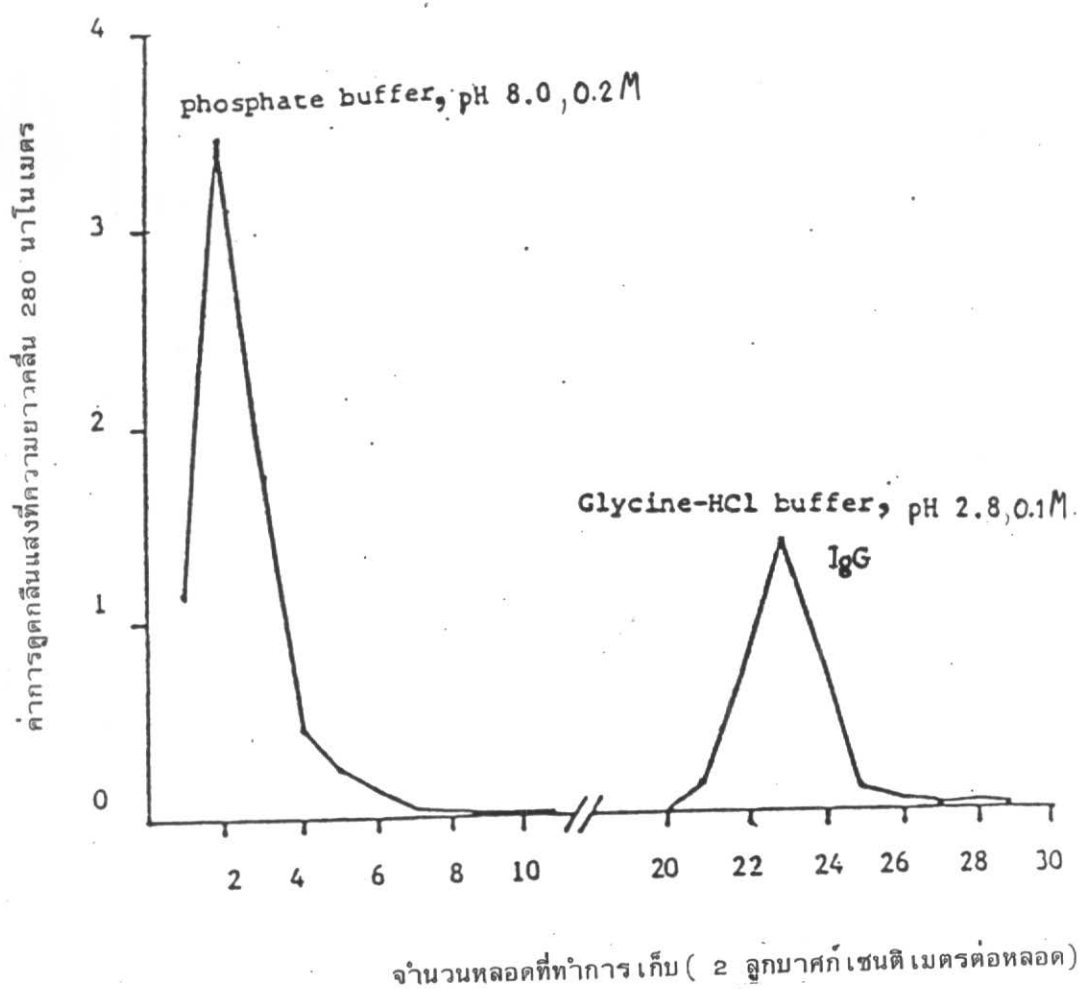
ภาคผนวก ก.



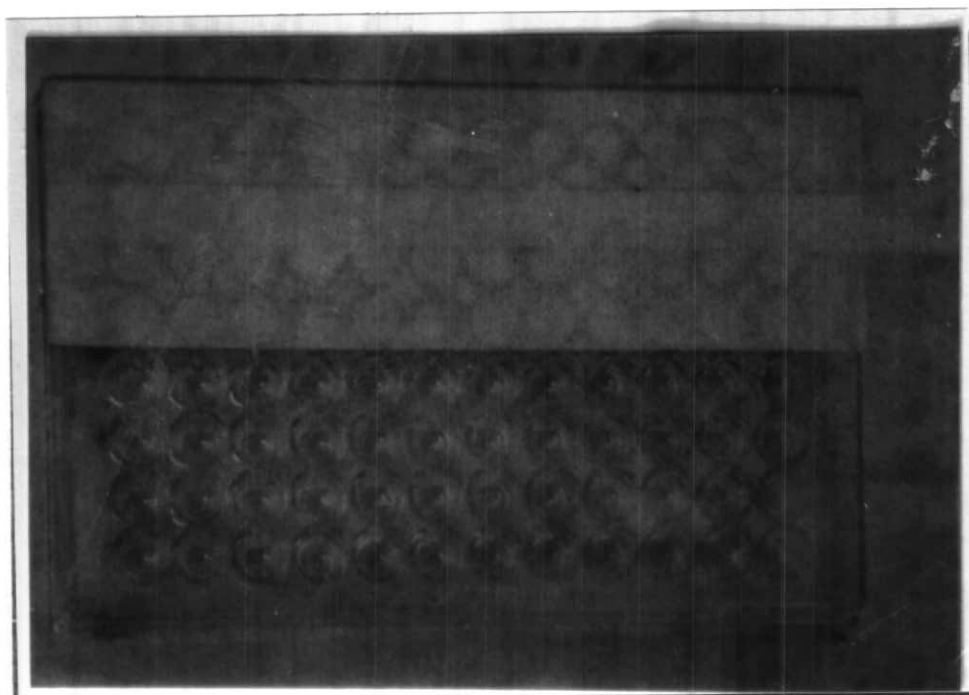
ภาพประกอบ 30 สำหรับทะเลสกล กราซีลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี



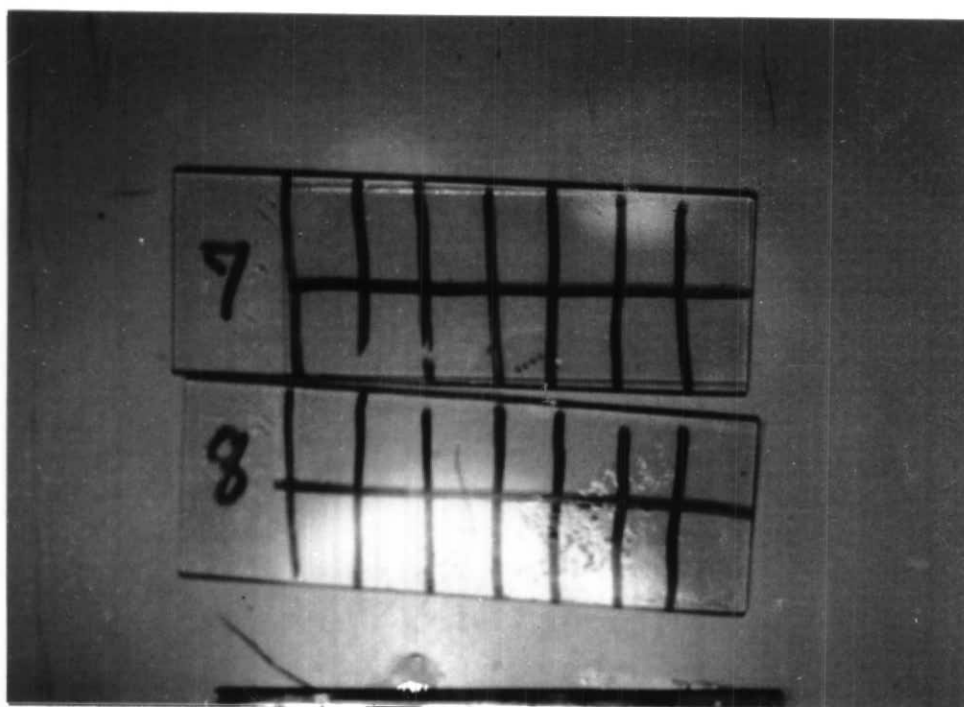
ภาพประกอบ 31 เชื้อ *E. histolytica* สายพันธุ์ HM-I:Imss ในอาหารเหลว ผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (กำลังขยาย 20 เท่า)



ภาพประกอบ 32 กราฟการแยก MAb IgG ของหนู mouse ด้วยคอลัมน์เซฟฟาโรส โปรตีน เอ



ภาพประกอบ 33 ถาดที่ทำการทดสอบ ELISA ที่ปรากฏสีเหลืองของปฏิกิริยาของแอนไชม์กับ
MAb IgG ที่แยกได้



ภาพประกอบ 34 กระจุกลไลด์ที่มีการตรึงเซลล์เชื้อ *E. histolytica* สายพันธุ์
HM-1:IMSS

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.490	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.772	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	1000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. Acrylamide : Bis-acrylamide (30 : 0.8 %)

Acrylamide	30.0	กรัม
Bis-acrylamide	0.8	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	100.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร

เขย่าให้ละลาย กรองเอาตะกอนออกและเก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
สารละลายนี้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน

3. 1.5 โมลาร์ บัฟเฟอร์ Tris HCl pH 8.9

Tris	30.330	กรัม
น้ำกลั่น	180.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปรับ pH ด้วย 6 โมลาร์ HCl ให้ได้ pH 8.9		
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. 0.5 โมลาร์ บัฟเฟอร์ Tris HCl pH 6.8

Tris	6.055	กรัม
น้ำกลั่น	85.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปรับ pH ด้วย 6 โมลาร์ HCl ให้ได้ pH 6.8		
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	100.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

5. สารละลาย N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED) เข้มข้นร้อยละ 10

TEMED	2.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร
เติมน้ำกลั่น	18.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

6. สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ เข้มข้นร้อยละ 10 (เตรียมเมื่อต้องการใช้)

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0.100	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

7. สารละลายย เอสดีเอส (sodium dodecyl sulfate, SDS)

เอสดีเอส	0.100	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

8. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis buffer) pH 8.3

Tris	1.212	กรัม
Glycine	5.704	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร	200.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

9. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอสดีเอส อิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS Electrophoresis buffer) pH 8.3

Tris	1.212	กรัม
Glycine	5.704	กรัม
เอสดีเอส	0.200	ลูกบาศก์เซนติเมตร
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร	200.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

10. Coomassie Brilliant Blue R. Stain

Coomassie Brilliant Blue	0.400	กรัม
Glacial acetic acid	14.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร
Methanol	9.300	ลูกบาศก์เซนติเมตร
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

11. แคมเบิลบัฟเฟอร์ สำหรับ พอลิอะคริลาไมด์ เจล

Glycerol	1.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร
0.5 โมลาร์ Tris-HCl pH 6.8	1.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร
Bromphenol blue	0.001	กรัม

12. แคมเบิลบัฟเฟอร์ สำหรับ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์ เจล

Glycerol	2.500	ลูกบาศก์เซนติเมตร
0.5 โมลาร์ Tris-HCl pH 6.8	0.500	ลูกบาศก์เซนติเมตร
SDS	0.250	กรัม
2-mercaptoethanol	1.250	ลูกบาศก์เซนติเมตร
Bromphenol blue	0.001	กรัม

13. อาหารเลี้ยงไฮบริโดมา (Media for hybridoma)

13.1 อาหารเลี้ยงสูตร RPMI 1V

RPMI 1640 (GIBCO laboratories)	10.400	กรัม
--------------------------------	--------	------

D-glucose	3.600 กรัม
L-glutamine	0.2923 กรัม
sodium pyruvate	1.1005 กรัม
NaHCO ₃	2.0160 กรัม
HEPES	5.9525 กรัม
(N-2-hydroxy-ethylpiperazine- N-2-ethanol sulphonic acid)	

จากนั้นเติมสารละลาย penicillin G , streptomycin และ kanamycin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20,000 หน่วย, 200 มิลลิกรัม และ 200 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 3 ครั้ง (triple distilled water) จนได้สารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรอง (millipore membrane filtration) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ทุกอย่างทำในสภาวะปลอดเชื้อ

13.2 อาหารเลี้ยงที่ใช้เลี้ยงเซลล์

นำอาหารสูตร RPMI IV 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาเติม FBS (fetal bovine serum, Flow laboratories) 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติม hypoxanthine ที่เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (Sigma) 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ใช้ hypoxanthine (Sigma) 68 มิลลิกรัม ละลายน้ำกลั่น 3 ครั้ง 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ 50 องศาเซลเซียส และกรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร) ทำในสภาวะปลอดเชื้อ

14. สารที่ใช้และวิธีทดสอบ IFA (Indirect fluorescent antibody test)

14.1 สารละลาย PBS (phosphate buffered saline) 0.01 โมลาร์ pH 7.2

NaCl	8.500	กรัม
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.206	กรัม
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.234	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปรับให้ได้ pH 7.2 ด้วยสารละลาย NaOH 1 โมลาร์		

14.2 สารละลาย PBS เข้มข้น 10 เท่า pH 7.4

NaCl	8.000	กรัม
KCl	2.000	กรัม
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	10.600	กรัม
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2.500	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.000	ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปรับให้ได้ pH 7.4 ด้วยสารละลาย NaOH 1 โมลาร์		

14.3 สารละลาย PBST pH 7.4

ใช้สารละลาย PBS จากข้อ 12.2 จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่น 90 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติม 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของ Tween 20 (Sigma)

14.4 สารละลาย Propyl gallate

N-propyl gallate 0.05 กรัม

Glycerol 1.00 ลูกบาศก์เซนติเมตร

นำมามอนในอ่างน้ำเดือด พร้อมทั้งเติม 0.001 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 2 โมลาร์ (เก็บในที่มืด และเตรียมเมื่อจะใช้)

14.5 Fluorescein labeled immunoglobulin conjugates (IFA)

ใช้ Fluorescein-labeled rabbit anti-mouse immunoglobulin (DAKOPATTS) ทำการเจือจาง 1 ต่อ 20 ด้วย สารละลาย PBST ในที่มืด

นำแผ่นสไลด์ที่มีเชื้อ *E. histolytica* ที่ถูกตรึงกับสไลด์แล้ว มาหยด MAb IgG จำนวน 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครึ่งละ 5 นาที (ในที่เขย่า) จากนั้นทำให้แห้ง แล้วเติม Fluorescein labeled immunoglobulin conjugates ลงไปจำนวน 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วล้างอีกครั้งด้วย PBST 3 ครั้ง ครึ่งละ 5 นาที ทำให้แห้งแล้วไปตรวจหาเซลล์ด้วยกล้อง Fluoro-microscopy ที่ให้แสง UV

15. วิธีการทดสอบ Direct fluorescent antibody test

นำแผ่นสไลด์ที่มีเชื้อ *E. histolytica* ที่ถูกตรึงกับสไลด์แล้ว มาหยดสารควบคุมที่เตรียมได้ จำนวน 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ครึ่งละ 5 นาที (ในที่เขย่า) ทำให้แห้งแล้วไปตรวจหาเซลล์ด้วยกล้อง Fluoro-microscopy ที่ให้แสง UV

16. สารที่ใช้สำหรับทดสอบ ELISA

16.1 เคลือบหลุมในถาดหลุมขนาด 96 หลุมต่อถาด ด้วยเชื้อ *E. histolytica* Hm-1 เป็นแอนติเจนเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 0.01 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน

16.2 ทำการล้างถาดหลุมด้วย PBST 4 ครั้ง ครึ่งละ 3 นาที

16.3 ทำการล้อมกรอบ (Blocking) ด้วยนมผงนร่องมันเนยเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ละลายด้วย PBS pH 7.4 ใส่หลุมละ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

16.4 ทำการล้างถาด 2 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 14.2

16.5 เติมสาร MAb IgG ที่เจือจางตามต้องการ โดยทำการเติมลงไปหลุมละ 0.1 ลูกบาศก์-เซนติเมตร ทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

16.6 ทำการล้างภาด 2 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกันข้อ 14.2

16.7 เติมสารควบคุมของ alkaline phosphatase-labeled anti-mouse-IgG ที่เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย PBST ที่มี Bovine serum albumin (BSA) เข้มข้นร้อยละ 5 ใส่หลุมละ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

16.8 ทำการล้างภาด 2 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกันข้อ 14.2

16.9 เติม p-nitrophenyl phosphate diethanolamine (p-nitrophenyl phosphate 1 มิลลิกรัม ในสารละลาย diethanolamine buffer pH 9.8 1 ลูกบาศก์-เซนติเมตร) เป็น substrate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30-60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร เติม สารละลาย NaOH เข้มข้น 3 โมลาร์ หลุมละ 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา (Wonsit, 1990)

17. สารละลาย diethanolamine buffer pH 9.8

diethanolamine	9.70	ลูกบาศก์เซนติเมตร
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.01	กรัม
NaN ₃	0.02	กรัม
เติมน้ำกลั่น	100.00	ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปรับให้ pH เท่ากับ 9.8 เก็บในที่มืด ที่ 4 องศาเซลเซียส		

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ ว่าที่ร้อยตรี สมชัย ชื้อสกุล อวเกียรติ

เกิดวันที่ 22 เดือนมีนาคม พุทธศักราช 2507

สถานที่เกิด โรงพยาบาลราชวิถี จังหวัดกรุงเทพฯ

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษาที่จบ
มัธยมศึกษาปีที่ 6	โรงเรียนวัดนายโรง	พ.ศ. 2526
ค.บ. (เคมี)	วิทยาลัยครุจันทรเกษม	พ.ศ. 2530
วท.ม. (เคมีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร	พ.ศ. 2534

ทุนการศึกษา ได้รับสนับสนุนทุนการศึกษาและการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการพัฒนา
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (กพวท.) เป็นเวลา 2 ปี (มี.ย. 2531-มี.ย. 2533)

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 1090 ถนนประชาชื่น แขวงบางซื่อ
เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

ผลงานที่ลงตีพิมพ์ในระหว่างศึกษา

2535 "The effect of buffer system on the electroendosmosis value
of the agarose gel" First Asia-Pacific Conference on Algal
Biotechnology, 29-31 January, 1992, University of Malaya,
Kuala Lumpur, Malaysia

2534 "ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อความเสถียรของอาร์-ไฟโคอิทธิทริน และอาร์-ไฟโค
ไซยานินที่สกัดจากสาหร่ายสกุลโพลีคาร์เวอร์โนซา" วทท. ครั้งที่ 17 24-26
ตุลาคม 2534 ที่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น

- 2533 "การแยกอาร์-ไฟโคอีริทริน จากสาหร่ายสกุลโพลีคาร์เวอร์โนซา ในจังหวัดปัตตานี"
วทท. ครั้งที่ 16 25-27 ตุลาคม 2533 รร.เซ็นทรัลพลาซา ลาดพร้าว, กรุงเทพฯ
- 2532 "การกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ออกจากสาหร่ายสกุลโพลีคาร์เวอร์โนซา ชางกีไอย์ โดยการ
แช่น้ำจืดในช่วงเวลาต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ" วทท. 15 18-20 ตุลาคม 2532
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่

การศึกษาสมบัติและการประยุกต์ใช้สารอาร์-ไพโคอิทธิทรินที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล
สกุลกราซิลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี

บทคัดย่อ
ของ
สมชัย อวเกียรติ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ
พฤษภาคม 2535

อาร์-ไฟโคอิริทริน เป็นรงควัตถุในสาหร่ายสีแดง ที่เป็นตัวส่งถ่ายพลังงานแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยร่วมกับอาร์-ไฟโคไซยานิน แอลโลไฟโคไซยานิน และคลอโรฟิล เอ เนื่องจากสารอาร์-ไฟโคอิริทรินนี้มีสมบัติในการเป็นสารฟลูออเรสเซนต์จึงได้มีการนำสารนี้มาใช้ในการเป็นสารเรืองแสงในการตรวจสอบทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดสารอาร์-ไฟโคอิริทรินจากสาหร่ายสกุลกราซิลาเรีย จากจังหวัดปัตตานี โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 30-50 ของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว ที่ 0 องศาเซลเซียส ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0 แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ดีไอเออี-เซลลูโลส เพื่อให้บริสุทธิ์ขึ้น ได้อาร์-ไฟโคอิริทรินที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร มีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตรเท่ากับ 6.7 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธิ์เพียงพอ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 240,000 ดาลตัน และสามารถนำสารอาร์-ไฟโคอิริทรินที่แยกได้นี้ไปทำการควบคุมกับ MAb IgG ของหนู mouse ต่อเชื้อ *E. histolytica* ด้วยการใช้สาร SPDP โดยสารควบคุมที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจทาง immunofluorescent ต่อเชื้อ *E. histolytica* ด้วยเทคนิค direct immunofluorescent antibody test ได้เป็นอย่างดี

A STUDY ON THE PROPERTIES AND APPLICATION OF R-PHYCOERYTHRIN
EXTRACTED FROM *GRACILARIA* SPP. FROM CHANGWAT PATTANI.

AN ABSTRACT

BY

SOMCHAI AWAKAIRT

Presented in partial fulfillment of the requirements for
the Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University

May 1992

The R-phycoerythrin is a pigment found in red algae. Its function involves the major pathway for the transfer of trapped light energy to R-phycocyanin, allophycocyanin and chlorophyll a. The R-phycoerythrin possesses high fluorescence which can be used as marker in fluoro-immunoassay. This report presented the method of isolation of R-phycoerythrin from a red algae, *Gracilaria spp.* in Changwat Pattani. The extraction was made by 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, followed by 30-50 % final concentration of ammonium sulfate saturation at 0 °C precipitation. Thus precipitate was further purified by DEAE-cellulose (DE-52) column chromatography. The purified R-phycoerythrin obtained showed the maximum absorption at 565 nm and the maximum emission at 615 nm with the ratio of 565 to 280 nm as 6.7 and molecular weight as 240,000 daltons. The purified R-phycoerythrin was conjugated with MAblgG (mouse) to *E. histolytica* by using bifunctional compound SPDP. The conjugated product can be used in direct immunofluorescent antibody assay by labelling the *E. histolytica* cells.