สถาบันราชานุกูลมีความยินดีเผยแพร่ข้อมูล องค์ความรู้ นี้แก่ผู้สนใจ
การนำข้อมูลจากเว็บไซต์นี้ไปใช้เพื่อการศึกษา วิจัย
หรือเผยแพร่ต่อเพียงบางส่วน หรือทั้งหมด
กรุณาอ้างอิง “ ชื่อเจ้าของผลงาน” เป็นแหล่งที่มาของข้อมูล

บทความวิจัย

การใช้สารสกัดเซริซิน (sericin) ทดแทนการใช้ซีรัมของตัวอ่อนในลูกวัว ในการเพาะเลี้ยงโครโมโซม มนุษย์

Using of Sericin as fetal bovine serum substitution in human chromosome culture

ภิริญา สมิตร

ศรัณย์พร สัจจะบันดาลใจ

อิศรา รังรงทอง

สุภาวดี ดีการกระทำ

ณศิกาณ ม่วงกล่อม

ธันยภัทร วณิชชานนท์

วีรยุทธ ประพันธ์พจน์

ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล

กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข

ปีงบประมาณ 2553

Using of Sericin as fetal bovine serum substitution in human chromosome culture

Piriya Smith, B.Sc.

Saranporn Satjabandanjai, B.Sc.

Isara Rangrongthong

Supawadee Deekankratham

Nasikan Mounglom

Thanyapat Wanitchanon, M.Sc.

Verayuth Praphanphoj,M.D.Ph.D.

Sericin is a protein that found in cocoons, as glue that enveloped the fibroin fiber to form a cocoon. In this study, sericin was extracted from fresh cocoons of silkworm (*Bombyx mori* L.), Nang-Noi-Sisaket variety, by boiling in 1.2% citric acid solution. Micro biuret protein assay and SDS-PAGE were used to determine the quantity and pattern of the extracted sericin. The results showed that the molecular weight of sericin ranges from 25 to 211 kDa. Different concentrations of sericin extraction were used in white blood cells (WBC) culture to compare its efficiency as a substitution to fetal bovine serum (FBS). We found that WBC culture in 10% FBS yielded the highest number of the total cell count and mitotic index, followed by 5% FBS, FBS:sericin and 10% sericin, respectively.

This research concluded that sericin extracted can be used in WBC culture, but can not substitute FBS. Since we use only one sericin concentration (8 mg/ml) in this study, future study should be done to explore the optimal concentration of sericin in WBC culture.

Keywords: sericin, fetal bovine serum, human chromosome

การใช้สารสกัดเซริซิน (sericin) ทดแทนการใช้ซีรัมของตัวอ่อนในลูกวัวในการเพาะเลี้ยงโครโมโซมมนุษย์

*ภิริญา สมิตร วท.บ. **

*ศรัณย์พร สัจจะบันดาลใจ***

*อิศรา รังรงทอง **

*สุภาวดี ดีการกระทำ****

*ณศิกาณ ม่วงกล่อม**

*ธันยภัทร วณิชชานนท์ วท.ม.**

*วีรยุทธ ประพันธ์พจน์ พ.บ.*****

เซริซิน(sericin) เป็นโปรตีนที่พบได้จากรังไหม ซึ่งทำหน้าที่เป็นกาวห่อหุ้มเส้นใยไฟโบรอิน(fibroin) ให้คงสภาพรังไหมไว้ได้ ในการศึกษานี้ทำการสกัดเซริซินจากรังไหมสดของหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ โดยการต้มด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 1.2% แล้วนำสารสกัดเซริซินไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและแบบแผนโปรตีนโดยใช้วิธี Micro-biuret และวิธี SDS-PAGE ตามลำดับพบว่าเซริซินมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25-211 kDa นอกจากนั้น เมื่อนำสารสกัดเซริซินมาเปรียบเทียบกับการใช้ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัวเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อวิเคราะห์โครโมโซมมนุษย์ จำนวน 30 ตัวอย่างเลือด พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงใน ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว 10% มีจำนวนเซลล์ และค่า Mitotic Index มากที่สุด รองลงมาคือ ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว 5%, FBS:Sericin และ Sericin 10% ตามลำดับ

การวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดเซริซินอาจใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้แต่ไม่สามารถใช้ทดแทน FBS ได้ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงด้วยเซริซินได้จำนวนเซลล์ และค่า Mitotic index น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงด้วย FBS ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ถือเป็นการวิจัยเบื้องต้น เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของเซริซินเพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้น (8 mg/ml) ในอนาคตอาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความเข้มข้นของเซริซินที่เหมาะสมในการใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวต่อไป

คำสำคัญ เซริซิน ซีรัม การเพาะเลี้ยงโครโมโซมมนุษย์

* นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล

** นักเทคนิคการแพทย์ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล

*** เจ้าพนักงานเทคนิคการแพทย์ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล

**** นายแพทย์เชี่ยวชาญ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล

บทนำ

โครโมโซม (chromosome) เป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการแสดงออกของสิ่งมีชีวิตในรูปแบบที่แตกต่างกัน มีผลต่อการเจริญพัฒนา และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การศึกษาโครโมโซมโดยทั่วไปเป็นการศึกษารายละเอียดของโครโมโซมแต่ละแท่งจากจำนวนโครโมโซมทั้งหมดภายในเซลล์ (chromosome complement) โดยศึกษาทั้งจำนวนรูปร่างของโครโมโซม เทคนิคที่นิยมใช้ในการเตรียมโครโมโซมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด ทีลิมโฟไซท์ เพราะเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว และให้ผลที่ดี คือได้จำนวนเซลล์ในระยะที่ต้องการศึกษาค่อนข้างมาก อาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวประกอบด้วย Roswell park memorial institute 1640 (RPMI 1640) ซีรัม (Fetal bovine serum) สาร phytohaemagglutinin (PHA) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (mitogen) และยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)[1]

ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum) คือส่วนของพลาสมาที่ได้จากการตกตะกอนของเลือด โดยจะมีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองแยกชั้นกับตะกอนเลือดอย่างเห็นได้ชัด ในปัจจุบันมีการนำซีรัมมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กันอย่างแพร่หลายเพราะมีส่วนประกอบที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

เซริซิน(sericin) เป็นโปรตีนที่พบได้ในรังไหม โดยทำหน้าที่เป็นกาวเคลือบเส้นไหมให้คงสภาพรังไหมไว้ได้โดยพบว่าเซริซินมีคุณสมบัติบางประการที่ช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ โดยสามารถผลิตได้เอง และหาซื้อได้ในประเทศไทย

อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครโมโซมนั้นจำเป็นต้องใช้ซีรัมซึ่งมีราคาแพงมาก ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาสารสกัดเซริซิน (sericin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้ในรังไหมมาใช้เป็นสารทดแทนซีรัม เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายลง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลการลดปริมาณการใช้ซีรัม(FBS) โดยการใช้สารสกัดเซริซิน(Sericin) ทดแทนในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อการวิเคราะห์โครโมโซม

2. เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังการลดปริมาณการใช้ซีรัม(FBS)โดยการใช้สารสกัดเซริซิน(Sericin) ทดแทนในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว
3. เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเมทาเฟสเซลล์กับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ที่เกิดจากการลดปริมาณการใช้ซีรัม(FBS)โดยการใช้สารสกัดเซริซิน(Sericin) ทดแทนในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

ขอบเขตการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

ใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจโรคตามปกติของอาสาสมัครเท่านั้น ซึ่งจะใช้ในปริมาณไม่เกิน 4 มิลลิลิตร จึงมิได้มีผลกระทบต่อปริมาณตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจโรคตามปกติของอาสาสมัคร

1. ใช้รังไหมดิบจากหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถขอนแก่น ในการสกัดเซริซิน
2. ศึกษาคุณสมบัติของเซริซินที่ได้จากรังไหมดิบสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษและยูบี 1 ที่ได้จากการเตรียมในรูปแบบผงจากการประยุกต์วิธีการของ Nosan และ Tasaku (อ้างอิงใน Tsubouchi *et al*., 2004)
3. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดมนุษย์จำนวน 30 ตัวอย่าง

นับจำนวนเซลล์ด้วย haemacytometer และคำนวนค่า mitotic index ของแต่ละชุดการทดสอบ แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS 16.0

วัสดุและวิธีการ

1. การสกัดและการเตรียมผงเซริซิน

ทำการสกัดและเตรียมผงเซริซินโดยประยุกต์จากวิธีการของ Nosan และ Tasaku [2] โดยนำรังไหมดิบสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษปริมาณ 10 กรัม ต้มด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 1.2%

2. การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนเซริซินที่สกัดได้ด้วยวิธี Sodium Dodedyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำผงเซริซินที่ได้จากข้อ 1 มาเตรียมเป็นสารละลายเซริซินพร้อมใช้ที่มีความเข้มข้น 0.8% และมีค่า pH เท่ากับ 7 แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับโปตีนมาตรฐาน โดยใช้วิธี Micro-Biuret วิธีการคือ นำโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ทราบปริมาณโปรตีนที่แน่นอน ได้แก่ 0, 0.25, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 และ 60.0 ไมโครกรัม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับชุดตรวจวัดโปรตีน ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เป็นเวลา 20-30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้เขียนกราฟและคำนวณสมการเส้นตรง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปแทนค่าในสมการที่ได้จากการวัดค่าของโปรตีนมาตรฐาน เมื่อทราบปริมาณเซริซินในสารละลาย 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ที่มีความเข้มข้นของ Acrylamide 30% โดยใช้ resolving gel ความเข้มข้น 12% และ stacking gel ความเข้มข้น 4% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ จาก power supply ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีโปรตีนมาตรฐาน Brood-way Prestained Protein Marker เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R250 ความเข้มข้น 1% ข้ามคืน แล้วล้างสีออกด้วย Destaining solution ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลที่ได้ไปถ่ายภาพเจลเพื่อนำมาวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของแบบแผนโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Photocap Mw

3. การทดสอบเซริซินทดแทนการใช้ซีรัมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่เติม fetal bovine serum กับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เซริซินทดแทน ซึ่งแบ่งการทดสอบออกเป็น 4 ชุดการทดสอบ

ชุดที่ 1 เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหาร PRMI 1640 ที่มี fetal bovine serum 10%

ชุดที่ 2 เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหาร PRMI 1640 ที่มี fetal bovine serum 5%

ชุดที่ 3 เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหาร RPMI 1640 ที่มี fetal bovine serum 5% ต่อเซริซิน 5% ในอัตราส่วน 1:1

ชุดที่ 4 เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหาร RPMI 1640 ที่มีเซริซิน 10%

จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ซึ่งทำการทดสอบในตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

4. การตรวจนับเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดเซริซินเปรียบเทียบกับชีรัม

ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด โดยใช้ Haemacytometer พร้อมทั้งทำการเตรียมสไลด์สำหรับตรวจนับเมทาเฟสเซลล์ โดยทำการเจือจางตะกอนเซลล์ในสารละลาย fixative ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หยดเซลล์ 2 หยด ต่อ 1 สไลด์ นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นทำการย้อมสีสไลด์ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบจี (G-banding) โดยใช้สี Giemsa strain ความเข้มข้น 10% และคำนวณ mitotic index โดยทำการนับทั้งหมด 10 field เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ต่อ 1 treatment ของแต่ละตัวอย่าง

ผลการศึกษา

1. ผลการเตรียมผงโปรตีน

จากการต้มรังไหมดิบที่ได้จากหนอนไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 10 กรัม ด้วย 1.2% กรดซิตริก หลังจากตกตะกอนและทำให้เป็นผง พบว่าได้ผงโปรตีนเฉลี่ย 1.71 กรัม

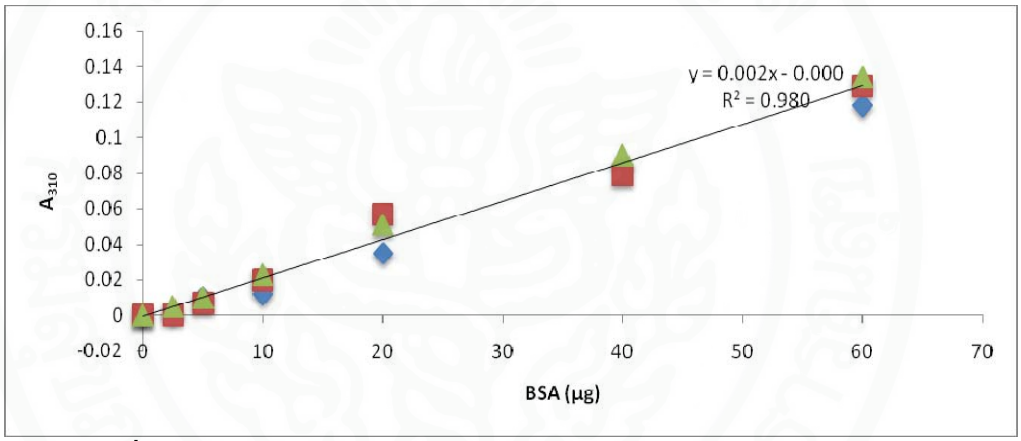
ภาพที่ 1 ลักษณะเซริซินผงจากรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

2.การหาปริมาณโปรตีนและแบบแผนโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนจากสารละลายเซริซินด้วยวิธี Micro-Biuret โดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ของโปรตีนที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว คือ Bovine serum albumin

ตารางที่ 1 ค่า A_{310} ที่ปริมาณโปรตีนของ BSA ที่ทราบปริมาณที่แน่ชัดแล้ว

ปริมาณโปรตีน BSA(µg)	0	0.25	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0
A_{310}ครั้งที่ 1	0	0.001	0.010	0.012	0.035	0.084	0.118
A_{310}ครั้งที่ 2	0	0.001	0.007	0.020	0.057	0.079	0.038
A_{310}ครั้งที่ 3	0	0.005	0.010	0.023	0.051	0.090	0.041
A_{310} เฉลี่ย	0	0.0023	0.0090	0.0183	0.0476	0.083	0.1270

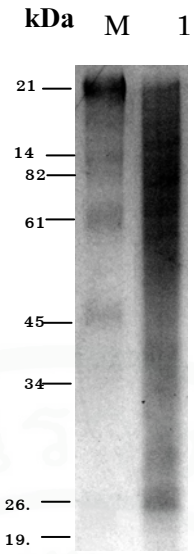


ภาพที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Bovine serum albumin ปริมาณต่างๆ (µg) และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 nm

สมการเส้นตรงที่คำนวณได้คือ y = 0.002x - 0.000 ดังนั้นจึงแทนค่า y จากสมการด้วยค่า A_{310} เฉลี่ยของโปรตีนเซริซินแล้วจะได้ค่าปริมาณโปรตีนต่อ 10 ไมโครลิตร ดังตาราง

ตารางที่ 2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 nm (A_{310}) และปริมาณโปรตีนของเซริซินที่ได้จากรังไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

วัดครั้งที่	ค่าดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน(µg)
A_{310}ครั้งที่ 1	0.039	20.55
A_{310}ครั้งที่ 2	0.038	17.85
A_{310}ครั้งที่ 3	0.031	13.54
เฉลี่ย	0.036	17.31

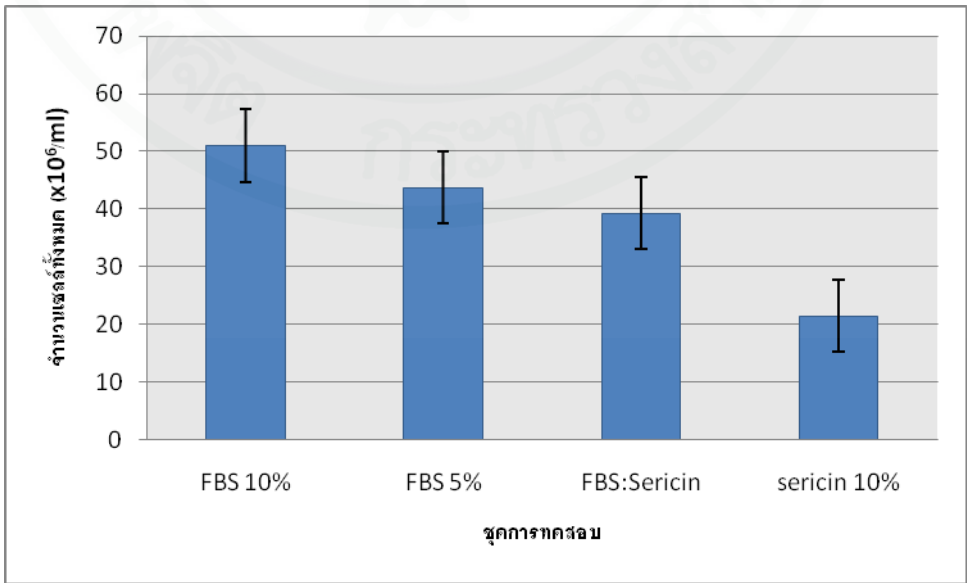


ภาพที่ 3 แบบแผนโปรตีนเซริซินจากการทำ SDS-PAGE

จากภาพที่ 3 M คือ โปรตีนมาตรฐาน และ 1 คือเซริซินจากสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่สกัดด้วยกรดซิตริก ซึ่งจากการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนด้วยโปรแกรม Photocap Mw พบว่าเซริซินมีมวลโมเลกุลระหว่าง 25-211 kDa

3. ผลการทดสอบเซริซินทดแทนการใช้ซีรัมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

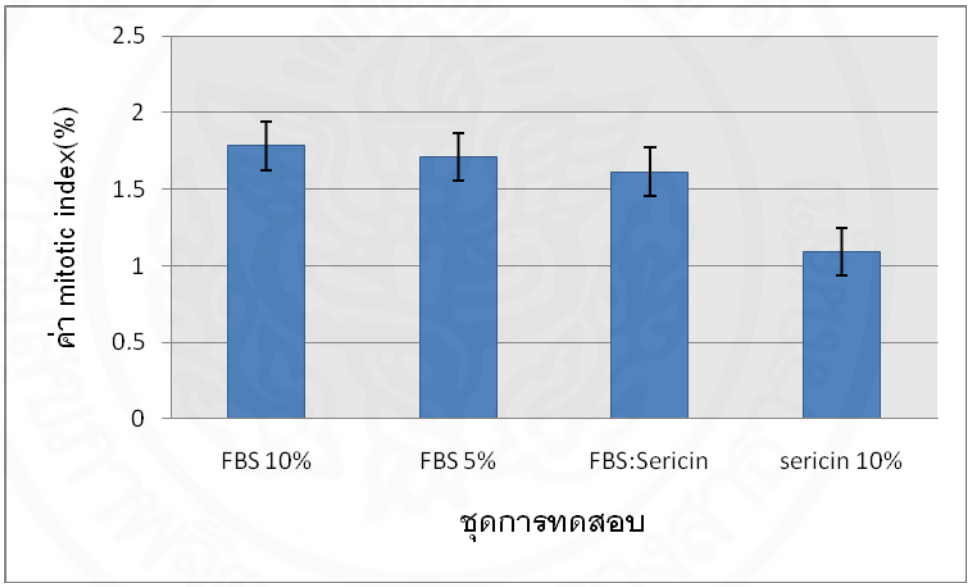
จากการทดสอบพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงใน FBS 10% มีจำนวนเซลล์ และค่า Mitotic Index มากที่สุด รองลงมาคือ FBS 5%, FBS:Sericin และ Sericin 10% ตามลำดับดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กราฟเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS

และเซริซินแต่ละชุดการทดสอบ

จากการทดสอบเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS และเซริซินแต่ละชุดการทดสอบด้วย One-way ANOVA (ภาคผนวก) พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS 10%, FBS 5%, FBS:Sericin และ Sericin 10% มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่า LSD พบว่าชุดการทดสอบมีความแตกต่างกันทุกคู่ ยกเว้นชุดการทดสอบ FBS 5% และ FBS:Sericin มีจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซริซินสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวได้โดยไม่มีผลกระทบต่อจำนวนเซลล์



ภาพที่ 5 กราฟแสดงค่า mitotic index เปรียบเทียบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS และเซริซินแต่ละชุดการทดสอบ

จากการทดสอบค่า Mitotic index เปรียบเทียบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS และเซริซินแต่ละชุดการทดสอบด้วย One-way ANOVA (ภาคผนวก) พบว่าค่า mitotic index ที่ได้จากแต่ละชุดการทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่า LSD พบว่าชุดการทดสอบ FBS 10%, FBS 5% และ FBS:Sericin ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่ ชุดการทดสอบ Sericin 10% มีความแตกต่างกันกับ

ทุกชุดการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ ($p<0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า sericin ไม่เกี่ยวข้องกับค่า mitotic index ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวิจัยทดสอบสารสกัดเซริซินทดแทนการใช้ซีรัม โดยเริ่มศึกษาจากการสกัดเซริซินจากรังไหมดิบที่ได้จากหนอนไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษจำนวน 10 กรัม ด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 1.2% เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการสกัดแล้วได้เซริซิน 1.75 กรัม คิดเป็นร้อยละ 17.5 ของน้ำหนักรังไหมดิบทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่ทำการสกัดเซริซินโดยใช้กรดซิตริกความเข้มข้น 1.2% ได้ผงโปรตีนร้อยละ 17.3 ของน้ำหนักรังไหมดิบทั้งหมด[3]

การวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนโดยใช้ microbiuret test และทดสอบแบบแผนโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วนำผลมาวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนด้วยโปรแกรม Photocap Mw พบว่าปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจนร่วมกับแบบต่อเนื่อง โดยเซริซินมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 25-211 kDa ซึ่งจากการศึกษาของ Takasu และคณะ[4] พบว่าเซริซินที่สกัดจากส่วนหน้า ส่วนกลาง และส่วนท้ายของต่อมไหมส่วนกลาง โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ให้รูปแบบของแบบแผนโปรตีนที่ต่างกันทั้งสามส่วน เช่นเดียวกันกับ Wu และคณะ[5] พบว่าโปรตีนเซริซินมีขนาดตั้งแต่ 10-310 kDa ในขณะเดียวกันวิธีการสกัดและสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสกัดก็ส่งผลให้ขนาดของโปรตีนเซริซินมีรูปแบบที่หลากหลายได้เช่นกัน นอกจากนี้ Kurioka และคณะ[6] ทำการศึกษาลักษณะของโปรตีนเซริซินที่ได้จากการเตรียมด้วยกรดซิตริก เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยสารอัลคาไลน์ และการสกัดด้วยการต้มในน้ำกลั่น พบว่า การสกัดด้วยกรดซิตริกทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นฟิล์มบางขนาด 10-100 μm ในขณะที่การสกัดจากสารอัลคาไลน์และการสกัดด้วยการต้มในน้ำกลั่น เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นฟิล์มบางขนาดใหญ่ (<500 μm)

การทดสอบสารสกัดเซริซินมาทดสอบทดแทนซีรัมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อการวิเคราะห์โครโมโซมมนุษย์จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงใน FBS 10% มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด และค่า Mitotic Index มากที่สุด รองลงมาคือ FBS 5%, FBS:Sericin และ Sericin 10% ตามลำดับ การทดสอบเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ทั้งหมด และค่า Mitotic index ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS และเซริซินแต่ละชุดการทดสอบด้วย One-way ANOVA พบว่าจำนวนเซลล์ทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ แต่ค่า Mitotic index ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ และเมื่อเปรียบเทียบค่า LSD พบว่า

จำนวนเซลล์ทั้งหมดของทุกชุดการทดสอบมีความแตกต่างกันทุกคู่ ยกเว้นชุดการทดสอบ FBS 5% และ FBS:Sericin มีจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และค่า LSD ของชุดการทดสอบค่า Mitotic index พบว่าชุดการทดสอบ FBS 10%, FBS 5% และ FBS:Sericin ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่ชุดการทดสอบ Sericin 10% มีความแตกต่างกันกับทุกชุดการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ ($p<0.05$)

การวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดเซริซินสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้แต่ไม่สามารถใช้ทดแทน FBS ได้ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงด้วยเซริซินได้จำนวนเซลล์ และค่า Mitotic index น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงด้วย FBS ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ถือเป็นการวิจัยเบื้องต้น เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของเซริซินเพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้น (8 mg/ml) ในอนาคตอาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความเข้มข้นของเซริซินที่เหมาะสมในการใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. อมรา คัมภิรานนท์. พันธุศาสตร์ของเซลล์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2540.
2. Tsubouchi K, Igarashi Y, Tasaku Y, Yamada H. Sericin enhances attachment of culture human skin fibroblasts. Biochemistry 2004; 69: 403-05.
3.วุทิวัชฒ์ จิตจักร. การใช้ประโยชน์จากเซริซินที่สกัดจากน้ำทิ้งกาวไหม.ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.
4. Takasu Y, Yamada H, Tsubouchi K. Isolation of Three Main Sericin Components from the Cocoon of the Silkworm, *Bombyx mori*. Bioscience Biotechnology Biochemistry 2002; 66: 2715-18.
5. Wu J, Wang Z, Xu S. Preparation and Characterization of Sericin powder extracted from silk industry wastewater. Food Chemistry 2006; 103: 1255-62.
6. Kurioka A, Kurioka F, Yamazaki M. Characterization of Sericin Powder Prepared from Citric Acid-degraded Sericin Polypeptides of the Silkworm, *Bombyx Mori*. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 2004; 68: 2715-18.