แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสของปลากัดบางชนิดในประเทศไทย

α -L-fucosidases of some species of fighting fish (*Betta* sp.) in Thailand

ธัญพร อักษรกิ่ง (Thanyaphon Auksornking)* ดร.สัมภาษณ์ คุณสุข (Dr.Sumpars Khunsook)**

บทคัดย่อ

การศึกษาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสของปลากัดบางชนิดในประเทศไทยจากตัวอย่างปลากัดเพศผู้จำนวน 3 ชนิด คือ ปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*) ปลากัดป่าภาคอีสาน (*Betta smaragdina*) และปลากัดป่ามหาชัย (*Betta mahachaiensis*) นำไปตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford และเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลการศึกษาพบว่าปลากัดทั้ง 3 ชนิดมีแบบแผนโปรตีนที่แตกต่างกัน เมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยเทคนิค Western blot พบว่า ปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) ปรากฏทั้งหมด 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 52.08 และ 34.63 kDa ปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) ปรากฏทั้งหมด 3 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 50.76, 44.99 และ 38.17 kDa ปลากัดป่ามหาชัยมหาชัย (*B. mahachaiensis*) ปรากฏทั้งหมด 6 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 48.21, 43.51, 36.94, 26.03, 21.52 และ 9.36 kDa ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดทั้ง 3 ชนิดมีขนาดใกล้เคียงกัน คุณสมบัตินี้ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลในด้านการศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุล การจำแนกสายพันธุ์ การพัฒนาสายพันธุ์ และการรักษาโรคของปลากัด

ABSTRACT

Fighting fish liver α-L-fucosidases of some species in genus *Betta* including Siamese fighting fish (*Betta splendens*), Emerald betta (*Betta smaragdina*) and Mahachai betta (*Betta mahachaiensis*) in Thailand were characterized. The liver proteins were extracted from nine male of each species, determined by Bradford method and separated by SDS-PAGE. The results indicated the different liver protein profiles of the three species. The results of Western blot showed two bands of Siamese fighting fish (*B. splendens*) liver a-L-fucosidases (52.08 and 34.63 kDa), three bands of Emerald betta (*B. smaragdina*) (50.76, 44.99 and 38.17 kDa) and six bands of Mahachai betta (*B. mahachaiensis*) (48.21, 43.51, 36.94, 26.03, 21.52 and 9.36 kDa). It showed α-L-fucosidases of the three fighting fish were hardly different. The present study could be useful data in the way of molecular evolution, classify, breeding, conservation and treatment.

คำสำคัญ: แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ปลากัด

Keywords: α-L-fucosidase, Fighting fish

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาสำหรับครู คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

***อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

ปลากัด (Fighting fish) เป็นสัตว์น้ำประจำชาติ และเป็นมรดกทางวัฒนธรรมของชาติ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562) ที่สะท้อนวิถีชีวิต สังคมและวัฒนธรรมไทยตั้งแต่สมัยสุโขทัย การกัดปลาเป็นเกมการพนันที่นิยมในชาวไทย เนื่องจากปลากัดมีความอดทนในการต่อสู้ ลีลาการต่อสู้เต็มไปด้วยชั้นเชิงและศิลปะ และมีความสวยงาม (สุจินต์, อรุณี, 2554) ปลากัดมีความสวยงามจนนำไปสู่การค้าเชิงพาณิชและก่อให้เกิดมูลค่าทางเศรษฐกิจมหาศาล ซึ่งสามารถส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศกว่า 95 ประเทศ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562) เช่น อเมริกา เยอรมัน สวีเดน ช่วงที่ขายดีที่สุดคือ ช่วงฤดูหนาวของยุโรปและอเมริกา (อรุณี, 2559) ปริมาณส่งออกระหว่างปี 2556 -2560 ประมาณ 20.85 ล้านตัว/ปี มูลค่าไม่ต่ำกว่า 115.45 ล้านบาท/ปี (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562) ล่าสุดปริมาณการส่งออกสูงสุดที่ท่าอากาศยานสุวรรณภูมิประจำปี 2560 เป็นจำนวน 23,214,012 ตัว มูลค่า 130,325,586.73 บาท (ด่านตรวจสัตว์น้ำท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ, 2560) ซึ่งลูกค้าจากแถบอเมริกาและยุโรปนิยมซื้อปลากัดเพราะมีความสวยงามและดูแลง่าย (อรุณี, 2559) นอกจากนี้ปลากัดยังสามารถอยู่ได้ในแหล่งน้ำที่มีออกซิเจนต่ำโดยการเอาอากาศมาเก็บไว้ใช้โดยตรงในโพรงใกล้กับช่องเหงือกที่เรียกว่า แลบบีรินซ์ ออแกน (Labyrinth organ) ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษ (อดิสรณ์ และคณะ, 2552) ปลากัดป่าแบ่งได้ 2 กลุ่ม (สุจินต์, อรุณี, 2554) กลุ่มแรกเป็นกลุ่มก่อหวอด (Bubble nester) เช่น ปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens* Regan, 1910) ปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina* Landiges, 1972) ปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis* Ladiges, 1975) ปลากัดป่าทางตะวันออกของไทย (*B. siamorientalis*) และปลากัดป่ามหาชัย (*B. mahachiensis*) (ชานนทร์, 2556) กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มอมไข่ (Mouth Brooder) เช่น ปลากัดอมไข่ภาคตะวันออก (*B. prima* Kottelat, 1994) ปลากัดอมไข่กระบี่ (*B. simplex* Kottelat, 1994) ปลากัดน้ำแดงหรือปลากัดช้าง (*B. pi* Tan, 1998) ปลากัดอมไข่ภาคใต้ (*B. ferox* Schindler & Schmidt 2006) ปลากัดอมไข่ภาคใต้ (*B. apollon* Schindler & Schmidt 2006) และปลากัดอมไข่ภาคใต้ (*B. pallida* Schindler & Schmidt 2004) เดิมปลากัดป่าอาศัยอยู่ตามแหล่งธรรมชาติตามรูปูนา ตามขอบหนอง ชายบึง ริมคู และรางน้ำแต่ในปัจจุบันมีการก่อสร้างและใช้สารเคมีทำให้สิ่งแวดล้อมถูกทำลายทำให้ปลากัดป่าสูญหายไปได้

การศึกษาพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสีของปลากัดพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีน ซึ่งมียีน 3 ชนิด ที่ควบคุมสีดำ มียีน 3 ชนิดที่ควบคุมสีแดง มียีน 3 ชนิดที่ควบคุมสีวาว เมื่อนำมาผสมกัน จะได้ปลากัดที่มีลักษณะสีต่างกันถึง 26,000 รูปแบบ ลักษณะหางคู่จะถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (ยนต์, 2548) การสร้างสีของปลากัดถูกควบคุมด้วยยีนที่สร้างเมลานิน (Wallbrunn, 1957) สีแดงในผิวหนังของปลากัดเกิดขึ้นจากแคโรทีนอยด์ (Clotfelter et al., 2007) มีการศึกษาซาร์โคปลาสมิกโปรตีน (Sarcoplasmic protein) ของปลากัดไทยโดยวิธีไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิง (Isoelectric focusing, IEF) (Gideon, 1997) มีการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลากัด (*Betta spp.*) ในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD-PCR (ชวิน, อุทัยรัตน์, 2548) มีการศึกษาแคริโอไทป์ของปลากัดภาคใต้ที่พบในประเทศไทย (รตพล, อภินันท์, 2555) มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในปลากัดป่าภาคกลาง เพื่อทดสอบปลากัดป่าภาคใต้ และภาคอีสาน (วิศรุต, 2557) สำหรับปลากัดป่าพบว่ายังไม่มีข้อมูลพื้นฐานทางด้านแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α-L-fucosidase) เป็นเอนไซม์ตัดน้ำตาลแอล-ฟูโคสที่อยู่ปลายสุดของสารชีวโมเลกุล (Aguilera et al., 2017) เป็น exoglycosidase ที่สามารถไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นฟูคอยแดน (Fucoidan) จากธรรมชาติ สู่กากน้ำตาลฟูโคส (Natalia et al., 2015) เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ (Moreti et al., 2013) สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาด้วยกระบวนการทรานไกลโคซิเลชันด้วยแอลกอฮอล์ (Dong et al., 2017) สามารถเร่งปฏิกิริยา transfucosylation ของแลคโตส (Zeuner et al., 2018) เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันการปฏิสัมพันธ์ระหว่างปรสิตกับโฮสต์ (Moreti et al., 2013) ในมนุษย์ยีน (FUC A1) ที่มีความบกพร่องหรือความผิดปกติทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมที่

หายากซึ่งเกิดจากยีนด้อย จนเกิดการสะสมของสารในไลโซโซม (lysosomal storage disorder หรือ LSD) ที่ผิดปกติ เนื่องจากขาดแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส เรียกโรคนี้ว่า ฟูโคซิโคซิส จะพบว่าในปัสสาวะจะมีโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ไม่ถูกตัดน้ำตาลฟูโคสออกและมีการสะสมของโอลิโกแซ็กคาไรด์ มิวโคโพลีแซ็กคาไรด์ และไกลโคลิพิดในเนื้อเยื่อมากเกินไป (Ng et al., 1976) มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีสัณฐานวิทยาที่นำไปสู่ความสามารถในการปฏิสนธิได้ของตัวอสุจิในขั้นตอนของการเจริญเติบโตของตัวอสุจิ (Aguilera et al., 2017) แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสพบในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายตั้งแต่เชื้อแบคทีเรีย (Zeuner et al., 2018) เชื้อรา (Shvetsova et al., 2017) สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น หอยแมลงภู่น้ำจืด (Venugopal et al., 2017) ทางเดินอาหารของหอยทาก (Perrella et al., 2015) ในเซลล์อสุจิแมลงวันทองเมดิเตอร์เรเนียน (Intra et al., 2011) ทางเดินอาหารของเห็บ (Moreti et al., 2013) บนผิวเซลล์อสุจิของแมลงหวี่ (Intra et al., 2015) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Khunsook et al., 2003) และน้ำเลี้ยงอสุจิของมนุษย์ (Khunsook et al., 2002) ในท่อนำไข่ของสุกร (Romero-Aguirregomezcorta et al., 2015) ในท่อเก็บอสุจิของวัว (Aguilera et al., 2017) แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำอสุจิของมนุษย์พบว่าขนาดเท่ากับ 56 kDa (Khunsook et al., 2002) ในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของมนุษย์พบว่าขนาดเท่ากับ 51 kDa (Khunsook et al., 2003) ในตับสุกรพบว่ามีขนาดเท่ากับ 52.11 kDa (กรกมล, สัมภาษณ์, 2553) ในน้ำอสุจิของกระบือปลักมีขนาดเท่ากับ 252 kDa (สัมภาษณ์ และคณะ, 2548) ในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมีขนาดเท่ากับ 70, 67, 57, 48 และ 24 kDa (สราวุธ, 2549) ในทางเดินอาหารของหอยทาก (*Biomphalaria glabrata*) พบว่ามีขนาดเท่ากับ 141 kDa (Natalia et al., 2015) ซึ่งขนาดที่แตกต่างกัน

ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งการศึกษาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดบางชนิดในประเทศไทยโดยใช้ปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) ปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) และปลากัดป่ามหาชัย (*B. mahachaiensis*) เนื่องจากอยู่ในภูมิศาสตร์ที่ใกล้เคียงกันและมีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับต้นของปลาสวยงาม ดังนั้นจึงทำการศึกษาโดยตรวจหาปริมาณโปรตีนและเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีน ตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเพื่อเป็นฐานข้อมูลในการใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุล การจำแนกสายพันธุ์ การพัฒนาสายพันธุ์ และการรักษาโรคของปลากัด

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีนและเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในตับของปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) ปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) และปลากัดป่ามหาชัย (*B. mahachaiensis*) ด้วยเทคนิค Bradford และ Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
2. เพื่อตรวจสอบและเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) ปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) และปลากัดป่ามหาชัย (*B. mahachaiensis*) ด้วยเทคนิค Western blot

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ซื้อปลากัดป่าตัวผู้ 3 ชนิดจากแหล่งขายปลากัดป่าที่จับมาจากธรรมชาติ ขนาดลำตัวยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร โดยคำนวณหาขนาดตัวอย่างด้วยวิธี Sample Size for Estimation Mean (precision estimation) และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในตับปลากัดที่ต้องการจากการทำ pilot strategy ได้จำนวนตัวอย่างชนิดละ 9 ตัว แล้วนำมาพักไว้ 7 วัน เพื่อลดความเครียด

การสกัดโปรตีนจากตับปลากัดป่า

นำปลากัดป่า 3 ชนิด มาทำให้ตายทันทีโดยการนำไปแช่ในน้ำแข็ง โดยใช้วิธีผ่าตัดแบบ Non Survival Surgery โดยใช้กรรไกรผ่าตัดตัดบริเวณท้องไปยังหัวแล้วใช้ปากคีบหนีบเอาส่วนที่เป็นตับซึ่งอยู่บริเวณถุงน้ำดีของปลากัดออกมาเก็บไว้ในหลอดเก็บเนื้อเยื่อที่มี PBS (phosphate buffered saline) พีเอช 7.4 แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเพื่อรอชั่งน้ำหนัก หลังจากชั่งน้ำหนักแล้วนำไปผสมกับ PBS ในอัตราส่วน 1 g ต่อบัฟเฟอร์ 2 ml และใส่โปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ (Protease inhibitor) ในอัตราส่วน 1 µl ต่อบัฟเฟอร์ 100 µl แล้วนำไปบดในโกร่งให้ละเอียดโดยวางโกร่งบนน้ำแข็ง เมื่อบดละเอียดแล้วใช้ไมโครปิเปตขนาด 1,000 µl ดูดเอาตัวอย่างใส่ในหลอดแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g หรือ 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนซึ่งเป็นโปรตีนใส่ในหลอด จากนั้นเก็บส่วนใสที่เป็นโปรตีนไว้ที่ -20 °C

การสกัดและแยกโปรตีนจากตับด้วยวิธี Triton X-114 phase separation

นำโปรตีนจากตับปลากัดที่ได้จากการสกัดมาใส่ Triton X-114 stock 11% (v/v) โดยให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2% Triton X-114 จากนั้นไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 75 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C ในระหว่างนั้นนำมา vortex ทุก 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จะได้ส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่ตกตะกอนให้นำส่วนที่ตกตะกอนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไว้ใช้สกัดเอ็นไซม์ที่ยังเหลืออยู่ สำหรับส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน ให้นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ส่วนของ aqueous phase ซึ่งจะอยู่ชั้นบน และส่วนของ detergent phase อยู่ชั้นล่าง ดูดแยกส่วนของชั้น aqueous phase ซึ่งเป็นส่วนที่มี แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส และส่วนของ detergent phase ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน

นำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการทำ 2% Triton X-114 phase separation เพื่อแยกโปรตีนที่ละลายน้ำได้ออกมา และทำให้เข้มข้นโดยนำไปใส่ในหลอด Centrifugal concentrators รุ่น Vivaspin 6, 10 kDa MWCO ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นานเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายโปรตีนที่เหลืออยู่ในหลอดด้านบน ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปใช้ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่สกัดด้วยวิธี Bradford โดยนำสารละลายโปรตีนจากตับของ *B. Splendens*, *B. smaragdina* และ *B. mahachaiensis* ที่ได้จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน ปิเปตลงในหลอดในอัตราส่วน (v/v) 1:200 จากนั้นเติมสารละลายแบรดฟอร์ด 1,000 µl นำไป vortex ให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากกราฟของมาตรฐานของ Bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0 - 100 µg/ml

การศึกษาแบบแผนโปรตีนในตับปลากัดป่า 3 ชนิดด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำสารละลายโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนและการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนมาแยกขนาดโปรตีนในตับปลากัดโดยนำมาผสมกับ 2X sample buffer ซึ่งประกอบด้วย SDS, 1.5 M Tris - HCl, 100% glycerol, bromophenol blue และ B-mercaptoethanol ให้ได้ปริมาณโปรตีน 15 µg แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ºC นาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที แล้วนำสารสะลายโปรตีนที่ได้ไปใส่ในช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง และแยกโปรตีนในตับปลากัดภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 60 V นาน 25 นาที ในพอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ในชั้น stacking gel เข้มข้น 4% และใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 V นาน 50 นาที ในชั้น separating gel เข้มข้น 10% ที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN TETRA SYSTEM บริษัท BIO RAD โดยใช้ 1x Running buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris bass, Glycine, SDS และ DI water เป็นตัวกลางนำกระแสไฟฟ้า แล้วนำแผ่น เจลออกมาย้อมสี Coomassie brilliant blue R-250 นาน 2 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่า (innova 4230 refrigerated incubator shaker) ล้างสีด้วย Destain solution 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 15 นาที นำไปตากให้แห้ง ในอุณหภูมิห้อง เพื่อหาแบบแผนของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดป่า 3 ชนิดด้วยเทคนิค Western blot

นำสารละลายโปรตีนที่ได้จากการเพิ่มความเข้มข้นมาผสมกับ 2X sample buffer ซึ่งเป็น research reagent ของบริษัท Boster Biological Technology Co.,Ltd ในอัตราส่วน (v/v) 1:1 ปริมาณโปรตีนในตับ *B. splendens* เท่ากับ 36.95 µg *B. smaragdina* เท่ากับ 19.29 µg และ *B. mahachaiensis* เท่ากับ 23.59 µg นำสารละลายโปรตีนไปแยกขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังที่อธิบายไปข้างต้น โดยย้ายโปรตีนจากแผ่นพอลิอะคริลาไมด์เจลไปยังแผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ด้วยวิธีแบบกึ่งแห้ง (semi-dry) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 150 mA นาน 80 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาบล็อกด้วย 2% advance ECL blocking solution นาน 1 ชั่วโมง นำไปล้างด้วย Super Tris-bufferd saline (STBST) ซึ่งประกอบด้วย 20 mM Tris base, 0.8% (w/v) NaCl และ 0.1% (v/v) Tween-20 นาน 10 นาที นำไปบ่มด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ (goat anti human liver α-L-fucosidase polyclonal antibody) ในอัตราส่วน 1:50,000 ใน 2% advance ECL blocking solution นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 1% STBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 15, 5, 5 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (rabbit anti goat HRP conjugated) ในอัตราส่วน 1:250,000 ใน 2% advance ECL blocking solution นาน 45 นาที แล้วล้างด้วย 1% STBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 15, 5, 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำไปตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ด้วย Amersham™ ECL™ select Western blotting detection reagent ใส่ลงไปในแผ่นเมมเบรน ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วซับออกจากแผ่นเมมเบรน ใช้แผ่นพลาสติกปิดทับแผ่นเมนเบรน และนำแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์ทาบลงไปบนแผ่นเมมเบรนนาน 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วย developer นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 1 นาที ล้างด้วย fixer นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 1 นาที นำแผ่นฟิล์มที่มีแถบสีดำปรากฏขึ้นไปหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ด้วยโปรแกรม UVITEC Cambridge

ผลการวิจัย

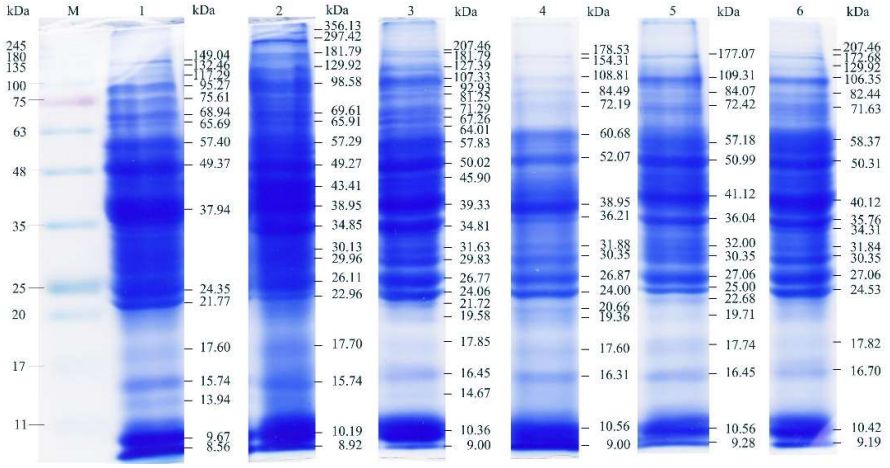
การศึกษาแบบแผนโปรตีนในตับปลากัดป่า 3 ชนิด ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนในตับปลากัดป่า 3 ชนิด ที่ได้จากการสกัดและการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนใช้ปริมาณโปรตีน 15 µg ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue-250 แบบแผนโปรตีนหลังจากการสกัดของ *B. splendens* มี 17 แถบ *B. smaragdina* มี 20 แถบ และ *B. mahachaiensis* มี 25 แถบ จากการเพิ่ม

ความเข้มข้นของโปรตีน *B. splendens* มี 19 แถบ *B. smaragdina* มี 18 แถบ และ *B. mahachaiensis* มี 19 แถบ รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบบแผนโปรตีนในตับปลากัดป่า 3 ชนิด ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

แถบที่	แบบแผนโปรตีนในตับปลากัดป่า 3 ชนิด (kDa)					
	***B. splendens* จากการสกัด**	***B. smaragdina* จากการสกัด**	***B. mahachaiensis* จากการสกัด**	***B. splendens* จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน**	***B. smaragdina* จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน**	***B. mahachaiensis* จากจากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน**
1	149.04	356.13	207.46	178.53	177.07	207.46
2	132.46	297.42	181.79	154.31	109.31	172.68
3	117.29	181.79	127.39	108.81	84.07	129.92
4	95.27	129.92	107.33	84.49	72.42	106.35
5	75.61	98.58	92.93	72.19	57.18	82.44
6	68.94	69.61	81.25	60.68	50.99	71.63
7	65.69	65.91	71.29	52.07	41.12	58.37
8	57.40	57.29	67.26	38.95	36.04	50.31
9	49.37	49.27	64.01	36.21	32.00	40.12
10	37.94	43.41	57.83	31.88	30.35	35.76
11	24.35	38.95	50.02	30.35	27.06	34.31
12	21.77	34.85	45.90	26.87	25.00	31.84
13	17.60	30.13	39.33	24.00	22.68	30.35
14	15.74	29.96	34.81	20.66	19.71	27.06
15	13.94	26.11	31.63	19.36	17.74	24.53
16	9.67	22.96	29.83	17.60	16.45	17.82
17	8.56	17.70	26.77	16.31	10.56	16.70
18		15.74	24.06	10.56	9.28	10.42
19		10.19	21.72	9.00		9.19
20		8.92	19.58			
21			17.85			
22			16.45			
23			14.67			
24			10.36			
25			9.00			



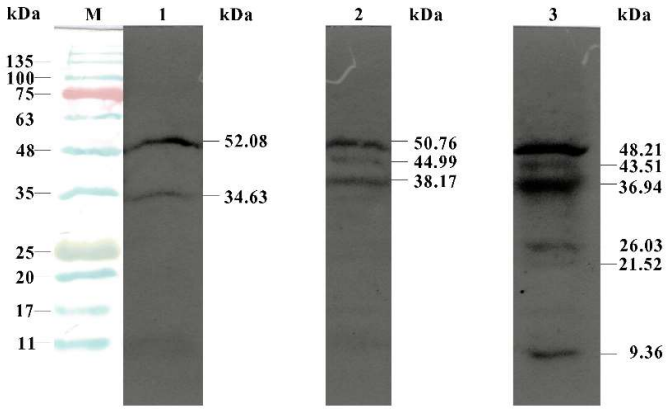
ภาพที่ 1 แบบแผนโปรตีนในตับปลากัดป่า 3 ชนิด ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (M: Markers, 1: โปรตีนในตับ *B. splendens* จากการสกัดปริมาณ 15 µg, 2: โปรตีนในตับ *B. smaragdina* จากการสกัดปริมาณ 15 µg, 3: โปรตีนในตับ *B. mahachaiensis* จากการสกัดปริมาณ 15 µg, 4: โปรตีนในตับ *B. splendens* จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนปริมาณ 15 µg, 5: โปรตีนในตับ *B. smaragdina* จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนปริมาณ 15 µg, 6: โปรตีนในตับ *B. mahachaiensis* จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนปริมาณ 15 µg

การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดป่า 3 ชนิด ด้วยเทคนิค Western blot

จากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดป่า 3 ชนิด คือ ปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) ปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) และปลากัดป่ามหาชัย (*B. mahachaiensis*) รายละเอียดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดป่า 3 ชนิด

แถบที่	น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดป่า 3 ชนิด (kDa)		
	B. splendens	***B. smaragdina***	***B. mahachaiensis***
1	52.08	50.76	48.21
2	34.63	44.99	43.51
3		38.17	36.94
4			26.03
5			21.52
6			9.36



ภาพที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดป่า 3 ชนิด ด้วยเทคนิค Western blot (M: Markers, 1: *B. splendens* (36.95 µg), 2: *B. smaragdina* (19.29 µg), 3: *B. mahachaiensis* (23.59 µg)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ใช้ปลากัดป่า 3 ชนิด คือ *B. splendens, B. smaragdina* และ *B. mahachaiensis* นำตับมาสกัดเพื่อศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Goat anti human liver α-L-fucosidase polyclonal antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และ Rabbit anti goat horseradish peroxidase conjugated (HRP) เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิเมื่อเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนและน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับปลากัดป่าพบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับ *B. splendens* มีขนาดใกล้เคียงกับแถบโปรตีนจากตับ *B. splendens* จากการสกัดแถบที่ 9 และ 10 แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับ *B. smaragdina* มีขนาดใกล้เคียงกับแถบโปรตีนจากตับ *B. smaragdina* จากการสกัดแถบที่ 9, 10 และ 11 แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับ *B. mahachaiensis* มีขนาดใกล้เคียงกับแถบโปรตีนจากตับ *B. mahachaiensis* จากการสกัดแถบที่ 11, 12, 14, 17, 19 และ 25 แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับ *B. splendens* มีขนาดใกล้เคียงกับแถบโปรตีนจากตับ *B. splendens* จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนแถบที่ 7 และ 9 แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับ *B. smaragdina* มีขนาดใกล้เคียงกับแถบโปรตีนจากตับ *B. smaragdina* จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนแถบที่ 6, 7 และ 8 แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับ *B. mahachaiensis* มีขนาดใกล้เคียงกับแถบโปรตีนจากตับ *B. mahachaiensis* จากการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนแถบที่ 8, 9, 10, 14, 15 และ 19 เมื่อเปรียบเทียบแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดป่าทั้ง 3 ชนิด แถบที่ 1 มีขนาดใกล้เคียงกัน คือ 52.08, 50.76 และ 48.21 kDa ตามลำดับ และ *B. splendens* แถบที่ 2 *B. smaragdina* แถบที่ 3 *B. mahachaiensis* แถบที่ 3 มีขนาดใกล้เคียงกัน คือ 34.63, 38.17 และ 36.94 kDa ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสปลากัดป่าทั้ง 3 ชนิดที่มีขนาดใกล้เคียงกันแสดงถึงความสัมพันธ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้มีความคล้ายคลึงกันและมีการอนุรักษ์ไว้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ชวิน และคณะ (2548) พบว่า *B. splendens* และ *B. smaragdina* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม งานวิจัยของ Sriwattanarothai et al. (2010) พบว่า *B. splendens*, *B. smaragdina* และ *B. mahachaiensis* มีสายวิวัฒนาการร่วมกัน นอกจากนี้การเกิดแถบแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสหลายแถบอาจเป็นผลมาจากการทำงานของเอ็นไซม์โปรตีเอส (Protease) หรือแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสอาจมีหลายไอโซฟอร์ม (Isoform) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Khunsook et al. (2002) พบว่า แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบริสุทธิ์ของน้ำอสุจิคือ sialoglycoprotein มีไอโซฟอร์มหลายชนิดระหว่างค่า pI 5-7 ไอโซฟอร์มที่เป็นกรดระหว่างค่าพีเอช 5-6 มีความ

เกี่ยวเนื่องทางเคมีกับไอโซฟอร์มที่เป็นกลางมากขึ้นโดยการตกค้างของกรดไซอะลิก นอกจากนี้พบว่า Goat anti human liver α-L-fucosidase polyclonal antibody สามารถจดจำเอนไซม์นี้จากตับปลากัดป่าทั้ง 3 ชนิดได้เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Johnson et al. (1991) พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมักจะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน และสามารถถูกจดจำได้โดยแอนติบอดีชนิดเดียวกัน งานวิจัยของ กรกมล และคณะ (2553) พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับสุกรถูกจดจำได้ด้วยแอนติบอดีที่ผลิตจากแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับมนุษย์ เมื่อเปรียบเทียบขนาดแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสของปลากัดป่ากับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นได้แก่ งานวิจัยของ Alhadeff et al. (1975) พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับมนุษย์มีขนาดประมาณ 50 kDa งานวิจัยของ กรกมล และคณะ (2553) พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากตับสุกรมีขนาดเท่ากับ 52.11 kDa พบว่าขนาดของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับของปลากัดป่ามีขนาดใกล้เคียงกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น มากกว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเช่น หอยแมลงภู่น้ำจืดมีขนาดเท่ากับ 56 kDa (Venugopal et al., 2017) หอยทากมีขนาดเท่ากับ 141 kDa (Perrella et al., 2015) แมลงวันทองเมดิเตอร์เรเนียนมีขนาดเท่ากับ 56.1 kDa (Intra et al., 2011) เห็บมีขนาดเท่ากับ 140 หรือ 150 kDa (Moreti et al., 2013) ขนาดของเอนไซม์นี้เกิดจากยีนที่ควบคุมการสร้างแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสถูกอนุรักษ์ (conserved) ไว้ทำให้สามารถนำมาวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ได้เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Intra et al. (2011) พบว่า ในการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) กรดอะมิโน 75% ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในแมลงวันทอง (*Drosophila melanogaster*) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสของสายพันธุ์แมลงหวี่ (drosophilid species) มีบทบาทในการปฏิสนธิได้ของตัวอสุจิในขั้นตอนของการเจริญเติบโตของตัวอสุจิ (Aguilera et al., 2017) เมื่อทดลองเติมเอนไซม์นี้ในอาหารที่ใช้ในการปฏิสนธิเทียมของเซลล์อสุจิและเซลล์ไข่ของหมู พบว่าเซลล์อสุจิสามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (zona pellucida) และแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ได้เพิ่มขึ้น (Romero-Aguirregomezcorta et al., 2015) ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนาสายพันธ์ปลากัด นอกจากนี้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสยังมีความสำคัญในการกระตุ้นการสลายน้ำตาลฟูโคสจากปลายสุดของสารชีวโมเลกุล และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ (Russell et al., 1998) การถ่ายโอนสัญญาณ (Moloney et al., 2000) การยึดเกาะของเชื้อโรค (Hooper et al., 2001) การรั่วซึมออกนอกหลอดเลือดดำ (extravasation) ของเม็ดเลือดขาว (leukocytes) (Lowe, 2002) การพัฒนาการของตัวอ่อน (Haltiwanger et al., 2004) การตอบสนองภูมิคุ้มกัน (Ali et al., 2008) กระบวนการทางพยาธิวิทยา เช่น โรคหลอดเลือดและมะเร็ง (Becker et al., 2003) ดังนั้นการศึกษาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดป่าในประเทศไทยน่าจะเป็นประโยชน์ทางด้านการศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุล การจำแนกสายพันธุ์ การพัฒนาสายพันธุ์ และการรักษาโรคของปลากัด

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับปลากัดในครั้งต่อไปควรศึกษาปริมาณสารยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์โปรตีนเอสในปริมาณที่เหมาะสม และควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับจำนวนไอโซฟอร์ม (Isoform)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณนางสาวกมลชนก แผ้วพลสงที่ให้คำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่อนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัยและสนับสนุนการทำวิจัยมาโดยตลอด

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. คณะรัฐมนตรีไฟเขียวให้ปลากัดเป็นสัตว์น้ำประจำชาติ [ออนไลน์] 2562 [6 กุมภาพันธ์ 2562]. จาก https://www.moac.go.th/news-preview-411991791085

กรกมล นพมงคล และสัมภาษณ คุณสุข. ลักษณะเฉพาะของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในตับสุกร *Sus domesticus* characterization of pig *sus domesticus* liver α-l-fucosidase. ใน: การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 11; 12 กุมภาพันธ์ 2553; มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2553. หน้า 767-774.

ชวิน ตันพิทยคุปต และอุทัยรัตน์ ณ นคร. ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลากัด *Betta spp*. ในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD-PCR. [วิทยานิพนธ์ปริญญาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมหาบัณฑิต สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2548.

ชานนทร์ โควสุภัทร. ปลากัดป่ากลุ่มก่อหวอดของประเทศไทย. ว. Aquariumbiz 2556; 3(31): 102-121.

ด่านตรวจสัตว์น้ำท่าอากาศสุวรรณภูมิ. สถิติการนำเข้าส่งออกและนำผ่านสัตว์น้ำทางท่าอากาศยานสุวรรณภูมิประจำปี 2560. [เอกสารอัดสำเนา]. กรุงเทพฯ: ท่าอากาศสุวรรณภูมิ; 2560.

ยนต์ มุสิก. การพัฒนาสายพันธุ์ปลากัด. สารานุกรรมไทยสำหรับเยาวชน. กรุงเทพมหานคร; 2548. เล่ม 30.

รตพล วัฒนศิริเสรีกุล และอภินันท์ สุวรรณรักษ์. แคริโอไทป์ของปลากัดภาคใต้ *Betta imbellis* perciformes, osphronemidae ที่พบในประเทศไทย. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 2555; 6(2): 35.

วิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์. การพัฒนาเครื่องหมายไมโทครแซทเทลไลท์ในปลากัดป่าภาคกลาง *Betta splendens,* osphronemidae, perciformes และการทดสอบข้ามชนิด [วิทยานิพนธ์ปริญญาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2557.

อดิสรณ์ มนต์วิเศษ, บัลลลังก์ เนื่องแสง, น้ำค้าง ศรีวัฒนาโรทัย และภิญโญ พานิชพันธ์. ปลากัดไทยนักสู้ผู้สง่างามแห่งลุ่มน้ำจืด. ว. วิทยาศาสตร์ 2552; 63(3): 65-69.

อรุณี รอดลอย. เยาวชนไทยกับการขายปลากัดออนไลน์สร้างรายได้ยามว่างจากการเรียน. ว. การประมง 2559; 69(5): 467-471.

สัมภาษณ์ คุณสุข, โสพิศ วงศ์คำ และสุพรรณ ฟูเจริญ. การตรวจหาและศึกษาคุณสมบัติของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำอสุจิของกระบือปลัก. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย; 2548.

สราวุธ แก้วศรี. ลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2549.

สุจินต์ หนูขวัญ และอรุณี รอดลอย มาตรฐานปลากัดสวยงามในประเทศไทย. นนทบุรี: คุณาไทย; 2554.

Aguilera AC, Boschin V, Robina, I., Elias-Rodriguez P, Sosa, MA. Epididymal α-L-fucosidase and its possible role in remodeling the surface of bull spermatozoa. Int J Theriogenology 2017; 104: 134-141.

Alhadeff JA, Miller AL, Wenaas H, Vedvick T, O'Brien JS. Human liver α-Lfucosidase: Purification, characterization and immunochemical studies. Int J The Journal of Biological Chemistry 1975; 18(250): 7106-7113.

Ali S, Jenkins Y, Kirkley M, Dagkalis A, Manivannan A, Crane IJ, Kirby JA. Leukocyte extravasation: an immunoregulatory role for alpha-Lfucosidase. Int J Journal of Immunology 2008; 181: 2407-2413.

Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. Int J Glycobiology 2003; 13: 41-53.

Clotfelter ED, Ardia DR, McGraw KG. Red fish, blue fish: trade-offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. Int J Behavioral Ecology 2007; 18(6): 1139-1145.

Dong S, Chang Y, Shen J, Xue C, Chen F. Purification expression and characterization of a novel α-L-fucosidase from a marine bacteria *Wenyingzhuangia fucanilytica*. Int J Protein Expression and Purification 2017; 129: 9-17.

Gideon K, Eric Y, Tit M, Violet P. Genetic variation in different varieties of Siamese fighting fish using isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. Int J Aquaculture International 1997; 5: 537-549.

Haltiwanger RS, Lowe, JB. Role of glycosylation in development. Int J Annual Reviews of Biochemistry 2004; 73: 491-537.

Hooper LV, Gordon, JI. Glycans as legislators of host–microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. Int J Glycobiology 2001; 11: 1-10

Intra J, Concetta V, Daniela DC, Perotti ME, Pasini ME. Drosophila sperm surface alpha-L-fucosidase interacts with the egg coats through its core fucose residues. Int J Insect Biochemistry and Molecular Biology 2105; 63: 133-143.

Intra J, Perotti ME, Pasini, ME. Cloning sequence identification and expression profile analysis of α-L-fucosidase gene from the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. Int J Journal of Insect Physiology 2011; 57: 452-461.

Johnson SW, Alhadeff JA. Mammalian α-L-fucosidases. Int J Comparative Biochemistry and Physiology 1991; 99B: 479-488.

Khunsook S, Alhadeff JA, Bean BS. Purification and characterization of human seminal plasma α-L-fucosidase. Int J Molecular human reproduction 2002; 8: 221-227.

Khunsook S, Bean BS, McGowan SR, Alhadeff JA. Purification and Characterization of Plasma Membrane-associated Human Sperm α-L-Fucosidase. Int J Biology of reproduction 2003; 68:709-716.

Lowe JB. Glycosylation in the control of selectin counter–receptor structure and function. Int J Immunology Reviews 2002; 186: 19-36.

Moloney DJ, Shair LH, Lu FM, Xia J, Locke R, Matta KL, Haltiwanger, RS. Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. Int J of Biological Chemistry 2000; 27: 9604–9611.

Moreti R, Perrella NN, Lopes AR. Carbohydrate digestion in ticks and a digestive α-L-fucosidase. Int J Journal of Insect Physiology 2013; 59: 1069-1075.

Ng WG, Donnell GN, Koch R, Bergren WR. Biochemical and genetic studies of plasma and leukocyte alpha-l-fucosidase. Int J Am. J. Hum. Genet 1976; 28: 42–50.

Perrella NN, Cantinha RS, Nakano E, Lopes AR. Characterization of α-L-fucosidase and other digestive hydrolases from *Biomphalaria glabrata*. Int J Acta Tropica 2015; 141: 118-127.

Romero-Aguirregomezcorta J, Matas C and Coy P. α-L-fucosidase enhances capacitation-associated events in porcine spermatozoa. Int J The Veterinary Journal 2015; 203: 109-114.

Russell L, Waring P, Beaver JP. Increased cell surface exposure of fucose residue is a late event in apoptosis. Int J Biochemical Biophysical Research Communication 1998; 250: 449–453.

Shvetsova SV, Shabalin KA, Bobrov KS, Ivanen DR, Ustyuzhanina NE, Krylov VB et al. Characterization of a new α -L-fucosidase isolated from *Fusarium proliferatum* LE1 that is regioselective to α-(1→4)-L-fucosidic linkage in the hydrolysis of α-L-fucobiosides. Int J Biochimie 2017; 132: 54-65.

Sriwattanarothai N, Steinke D, Ruenwongsa P, Hanner R, Panijpan B. molecular and morphological evidence supports the species status of the mahachai fighter *Betta* sp. mahachai and reveals new species of *Betta* from Thailand. Int J Fish Biology 2010; 77: 414–424.

Venugopal A, Kumar CS, Kumar NS, Swamy MJ. Kinetic and biophysical characterization of a lysosomal α-L-fucosidase from the fresh water mussel, *Lamellidens corrianus*. Int J International Journal of Biological Macromolecules 2017; 104: 432-441.

Wallbrunn HM. Genetics of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. Int J Genetics 1957; 43(3): 281–289

Zeuner B, Muschiol J, Holck J, Lezyk M, Gedde MR, Jers C et al. Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29 α-L-Fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. Int J New BIOTECHNOLOGY 2018; 41: 34-45.