



พลาสมาไวเทลโลเจินและการพัฒนารังไข่ของปลากระรัง
Plasma Vitellogenin and Ovarian Development of Grouper
(*Epinephelus malabaricus*)

เจนจิตต์ คงกำเนิด

Jenjit Kongkunnerd

วิทยานิพนธ์วิทยาศาตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Biological Sciences
Prince of Songkla University

2538

๙

| | |
|---------|---------------------|
| เลขหมู่ | OL 628.645 743 8526 |
| Bib Key | 8526 |

๑. 2

ชื่อวิทยานิพนธ์ พลาสมาไมโครโวลต์จิ้นและการพัฒนาฟองไข่ของปลากระชัง
ผู้เขียน เจนจิตต์ คงกำเนิด
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ

.....*สมิทธิ์*.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุกการพันธ์)

.....*สมิทธิ์*.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุกการพันธ์)

.....*อุบล*.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา จุติดำรงคันธ์)

.....*อุบล*.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา จุติดำรงคันธ์)

.....*นงพร*.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โควัฒนะ)

.....*สมหมาย*.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมหมาย เข็มวารีนี้จจะ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....*ไพรัตน์*.....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์ชีวภาพและการพัฒนาไร้งไข่ของปลากระรัง
ผู้เขียน นางสาวเจนจิตต์ คงกำเนิด
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

การพัฒนาของไข่จากช่วงไข่อ่อนจนเป็นไข่สุก เกิดควบคู่กับการสะสมโปรตีนโพลีคซึ่ง เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการพัฒนาของคัพภะและตัวอ่อนของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ไวเทลโลจีนินเป็นสารตั้งต้นของโปรตีนโพลีค ถูกสังเคราะห์ในตับภายใต้อิทธิพลของระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในกระแสเลือด แล้วถูกส่งผ่านกระแสเลือดไปยังรังไข่ เพื่อถูกรับและเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนโพลีคในไข่ที่กำลังเติบโต

เมื่อฉีดปลากระรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล (2.5 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง กระตุ้นให้ปลามีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน การฉีดปลาด้วย ^{32}P -orthophosphate หรือ ^3H -leucine ภายหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล 2 ครั้ง พบ ^{32}P -phosphate หรือ ^3H -leucine ติดตามอยู่ในไวเทลโลจีนินสังเคราะห์ใหม่ แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีนที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ สามารถทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150 ซึ่งแยกไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ได้คิดเป็น 20.0-25.3% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น จากค่าปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ ^{32}P และ ^3H แยกไวเทลโลจีนินได้บริสุทธิ์ขึ้น 2.2 และ 2.8 เท่า ตามลำดับ ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นคอเลสเตอรอล 1.3% และไตรกลีเซอไรด์ 2.0% มีกลูโคสและแมนโนส 20.7 และ 8.1 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน ตามลำดับ กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ไม่แตกต่างจากไวเทลโลจีนินของปลาเมดากา ปลาทอง และ ปลาเรนโบว์

เทร่าท์ ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าไวเทลโลจีนินของปลากะรังเป็นพอสโฟไกลโคลิโพรตีน ซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายกับไวเทลโลจีนินของปลากระดูกแข็งอื่น ๆ

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้จากการฉีดกระต่ายขาวด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ แอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนใน Ouchterlony double immunodiffusion กับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ พลาสมา สารสกัดตับ และสารสกัดรังไข่ของปลากะรังเพศเมีย รวมทั้งพลาสมาของปลากะเลเพศเมียชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ปลากะพงขาว ปลากะพงแดง ปลากะบอก และปลาเห็ดโคน แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังเพศผู้ พลาสมา และสารสกัดเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลากะรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ และพลาสมาของปลาน้ำจืดเพศเมียบางชนิด

เมื่อวัดระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังเพศเมียในรอบปี โดยวิธี rocket immunoelectrophoresis พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินกับระยะพัฒนาการของรังไข่ กล่าวคือระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาจะเริ่มเพิ่มขึ้นช้า ๆ ค่อยๆกับการเจริญของไข่อ่อน โดยเพิ่มสูงสุดก่อนไข่สุกและลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงไข่สุกและหลังการวางไข่ นอกจากนี้ ไม่พบไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังเพศผู้หรือปลากะรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ แต่เริ่มพบไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่มีน้ำหนักตั้งแต่ 2 กิโลกรัม ขึ้นไป

Thesis Title Plasma vitellogenin and ovarian develop-
 ment of grouper (*Epinephelus malabaricus*)
Author Miss Jenjit Kongkumnerd
Major Program Biological Sciences
Academic Year 1995

Abstract

Maturation of egg from oogonia to ovum occurs with deposition of yolk protein, an energy source for the development of embryo and larvae in vertebrates. Vitellogenin is known to be a precursor of egg yolk substances. It is synthesized in liver under influence of plasma estradiol hormone. After being transported via blood, it is uptaken and proteolytically cleaved to form the yolk proteins in growing oocytes.

Intraperitoneal injection of 17β -estradiol (2.5 mg per kg body weight) every 3 days for 3 times induced vitellogenin synthesis in juvenile grouper. Injection of juvenile fish with ^{32}P -carrier free orthophosphate or ^3H -leucine following preinjection twice with estradiol caused an incorporation of ^{32}P -phosphate or ^3H -leucine into newly synthesized vitellogenin, indicating that it was phosphoprotein. Vitellogenin was purified from plasma by column chromatography on DEAE-Sephacel and on Sephadex G-150. The amount of purified vitellogenin was 20.0-25.3% of plasma protein. Its radioactive purity was 2.2 and 2.8 folds for ^{32}P and ^3H , respectively. The purified vitello-

genin was to contain lipid with 1.3% cholesterol and 2.0% triglycerides, 20.7 μg glucose/mg protein and 8.1 μg mannose/mg protein; amino acid analysis showed a profile comparable to that found for vitellogenins isolated from the medaka, goldfish, and rainbow trout. The study showed grouper vitellogenin to be a phosphoglycolipoprotein similar in composition to those from other teleosts.

Antibody to the purified vitellogenin was successfully produced in albino rabbits. The antiserum showed precipitation in Ouchterlony double immunodiffusion test with the purified vitellogenin, plasma, liver extract and ovarian extract of female grouper. It also cross reacted with plasma of female marine fish such as giant seaperch, red snapper, mullet and sand whiting. The antiserum did not show any cross reactivity with either plasma of male grouper or plasma and any tissue extract of juvenile grouper including plasma of some freshwater females.

Plasma vitellogenin level, determined by rocket immunoelectrophoresis, correlated with ovarian development of female grouper. Gradual increase of vitellogenin level in plasma occurred with growing of oocytes. The vitellogenin level reached maximal just prior to oval maturation and decreased rapidly during maturation of ovum and after spawning. In addition, vitellogenin in plasma of both male and juvenile groupers was not detectable. It was detected in plasma of female groupers weighed at least 2 kg or more.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทการพันธ์ุ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ุ กรรมการที่ปรึกษาร่วม พร้อมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมหมาย เขียววาริสีจะ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำเพื่อแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน นักวิชาการประมง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือให้การศึกษาค้นคว้าวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วง และขอบคุณ International Foundation for Science คณะวิทยาศาสตร์และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

เจนจิตต์ คงกำเนิด

สารบัญ

| | หน้า |
|----------------------------|------|
| บทคัดย่อ | (1) |
| Abstract | (3) |
| กิตติกรรมประกาศ | (5) |
| สารบัญ | (6) |
| รายการตาราง | (7) |
| รายการรูป | (8) |
| ตัวย่อและสัญลักษณ์ | (10) |
| 1. บทนำ | 1 |
| บทนำต้นเรื่อง | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 3 |
| วัตถุประสงค์ | 27 |
| 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ | 28 |
| วัสดุ | 28 |
| อุปกรณ์ | 30 |
| วิธีการ | 30 |
| 3. ผลการทดลอง | 42 |
| 4. วิจารณ์ | 83 |
| 5. สรุป | 97 |
| เอกสารอ้างอิง | 100 |
| ประวัติผู้เขียน | 117 |

รายการตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลโลจีนินในปลาชนิดต่าง ๆ และในกบ | 18 |
| 2 | องค์ประกอบไขมันของไวเทลโลจีนินในปลาชนิดต่าง ๆ และในกบ | 19 |
| 3 | ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออกอลต่อความเข้มข้นของโปรตีนและไวเทลโลจีนินในปลาสมมา | 44 |
| 4 | ปริมาณคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในปลาสมมา | 45 |
| 5 | การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากปลาสมมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออกอลและ ^3H -Leucine | 47 |
| 6 | การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากปลาสมมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออกอลและ ^{32}P -Orthophosphate | 51 |
| 7 | การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากปลาสมมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออกอล | 54 |
| 8 | องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ | 57 |
| 9 | องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตและไขมันของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ | 60 |
| 10 | ปริมาณโปรตีนในซีรัมกระต่ายที่ฉีดไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ | 61 |
| 11 | การแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจากซีรัมกระต่าย | 64 |
| 12 | ปริมาณไวเทลโลจีนินในปลาสมมาของปลากระริงเพศเมียที่มีค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ต่าง ๆ | 72 |
| 13 | ปริมาณไวเทลโลจีนินในปลาสมมาของปลากระริงที่มีน้ำหนักต่าง ๆ | 82 |

รายการรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 1 | กระบวนการสังเคราะห์และสะสมไวเทลโลจีนิน | 15 |
| 2 | การทำรีเอกเกิต อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิสของพลาสมา ปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล | 43 |
| 3 | การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลาที่ฉีด ฮอร์โมนเอสตราไดออล และ ^3H -Leucine ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel | 48 |
| 4 | การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel (รูปที่ 3) ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 | 49 |
| 5 | การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลาที่ฉีด ฮอร์โมนเอสตราไดออลและ ^{32}P -Orthophosphate ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel | 52 |
| 6 | การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel (รูปที่ 5) ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 | 53 |
| 7 | แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพของพลาสมาโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150 | 56 |
| 8 | กราฟมาตรฐานของกลูโคสและแมนโนส | 59 |
| 9 | การทำ Double immunodiffusion ของไวเทลโลจีนิน บริสุทธิ์กับซีรัมกระต่าย | 62 |

รายการรูป (ต่อ)

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 10 | การทำ Double immunodiffusion ของพลาสมาและสารสกัดเนื้อเยื่อของปลากะรังเพศเมียและปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ | 65 |
| 11 | การทำ Double immunodiffusion ของพลาสมาปลาเจริญพันธุ์ชนิดต่าง ๆ | 67 |
| 12 | การทำรีอกเกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิสของไวเทลโลเจนินมาตรฐาน | 68 |
| 13 | กราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของจรวดกับปริมาณไวเทลโลเจนิน | 69 |
| 14 | การทำรีอกเกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิสของพลาสมาปลากะรังเพศเมียที่มีค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ต่าง ๆ | 71 |
| 15 | ปริมาณพลาสมาไวเทลโลเจนินและค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมียในรอบปี | 73 |
| 16 | พัฒนาการของไข่ระยะต่าง ๆ | 75 |
| 17 | พัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ | 77 |
| 18 | จำนวนของไข่อ่อนและไข่แก่ในรอบปี | 79 |
| 19 | ปริมาณพลาสมาไวเทลโลเจนินของปลากะรังที่มีน้ำหนักต่าง ๆ | 81 |

ตัวย่อและสัญลักษณ์

| | | |
|------------------------|---|---|
| กก. | = | กิโลกรัม |
| °ซ | = | องศาเซลเซียส (Celsius) |
| ซม. | = | เซนติเมตร |
| มก. | = | มิลลิกรัม |
| มล. | = | มิลลิลิตร |
| BSA | = | bovine serum albumin |
| cpm | = | count per minute |
| DEAE-Sephacel | = | diethylaminoethyl-Sephacel |
| EDTA | = | ethylenediaminetetraacetic acid |
| g | = | acceleration (cm/sec ²) |
| GSI | = | gonadosomatic index |
| kg | = | kilogram |
| l | = | litre |
| M | = | molar |
| mA | = | milliampere |
| mCi | = | milliCurie |
| mg | = | milligram |
| min | = | minute |
| ml | = | millilitre |
| mM | = | millimolar |
| Nondenaturing -PAGE | = | nondenaturing-polyacrylamide gel electrophoresis |

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

| | | |
|---------------|---|--|
| O.D. | = | optical density |
| PBS | = | 5 mM phosphate buffer, pH 7.5-0.85% NaCl |
| PMSF | = | phenylmethanesulphonyl fluoride |
| ppm | = | part per million |
| PPO | = | 2,5-diphenyloxazole |
| ppt | = | part per thousand |
| POPOP | = | 1,4 bis [2-(5-phenyloxazolyl)]benzene |
| R_f | = | relative mobility |
| RIE | = | rocket immunoelectrophoresis |
| SDS | = | sodium dodecyl sulfate |
| TEMED | = | N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine |
| Tris | = | tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| α | = | alpha |
| β | = | beta |
| μg | = | microgram |
| μl | = | microlitre |
| μm | = | micrometre |
| μM | = | micromolar |

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในวงจรชีวิตของปลา ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังประเภทวางไข่ (oviparous vertebrate) การสืบพันธุ์ของปลาเพศเมียจะต้องมีไข่แก่เต็ม ที่พร้อมที่จะตกไข่และวางไข่ การสร้างไข่นับเป็นกระบวนการสำคัญเพื่อการ ดำรงเผ่าพันธุ์ของปลาชนิดต่างๆ และเพื่อเพิ่มปริมาณในปลาชนิดที่มีความสำคัญ ทางเศรษฐกิจการค้า

ปัจจุบัน การศึกษาระบบสืบพันธุ์ของปลาเริ่มมีมากขึ้น การศึกษา สภาวะความพร้อมของระบบสืบพันธุ์ในปลา ทำโดยตรวจสอบการเจริญพันธุ์ของ ไข่ที่ภายนอกโดยผ่านช่องเปิดของอวัยวะเพศ (genital pore) (Kuo, *et al.*, 1974) อีกลักษณะหนึ่งคือการศึกษาพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่ เพื่อให้ ทราบระยะการเจริญพันธุ์ของไข่ และสามารถนำความรู้ไปใช้แยกระยะพัฒนา การเจริญพันธุ์ของไข่ในปลาชนิดอื่นได้

ในช่วงพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่ ไข่ของปลาชนิดต่าง ๆ จะมี ขนาดเพิ่มขึ้นจาก 1% ถึง 20% ของน้ำหนักปลาหรือมากกว่า สืบเนื่องมาจาก ไข่มีการเก็บสะสมอาหารไว้ในรูปของโปรตีนโยลด์ (yolk protein) เพื่อ เป็นอาหารของตัวอ่อน (embryo) และตัวอ่อน (larvae) การพัฒนาระยะ แรกของตัวอ่อนปลาหลายชนิดใช้เวลาค่อนข้างนาน บางชนิดใช้เวลาหลาย สัปดาห์จึงเริ่มกินอาหารที่ได้จากภายนอก การสะสมของโปรตีนโยลด์ในไข่จึง เป็นสิ่งจำเป็นมาก ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของตัวอ่อนและอัตราการรอด ของลูกปลาวัยอ่อน

การสังเคราะห์และสะสมโปรตีนโยลด์ เรียกว่ากระบวนการไวเทลโลเจนีซิส (vitellogenesis) ซึ่งเชื่อว่าเกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ไข่ โดยทั่วไปการสังเคราะห์โปรตีนโยลด์ภายในเซลล์ไข่เกิดก่อนการสะสม

โปรตีนซึ่งได้จากโปรตีนตั้งต้น (precursor) ที่มาจากภายนอกเซลล์ไข่ หรือ อาจตามเกี่ยวต่อเนื่องกัน ภายใต้อิทธิพลการควบคุมของฮอร์โมนจากไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ต่อมใต้สมอง (pituitary gland) และจากฟอลลิเคิล (follicle) ที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งจะสังเคราะห์และหลั่งสเตอรอยด์ ฮอร์โมน (steroid hormone) โปรตีนโยล์คในไข่ได้มาจากโปรตีนตั้งต้นที่สำคัญคือไวเทลโลจีนิน (vitellogenin) ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยตับ เมื่อมีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol) ในเลือดสูง จากนั้นถูกส่งผ่านกระแสเลือดไปยังรังไข่ที่กำลังพัฒนา หลังจากไข่รับเอาไวเทลโลจีนินเข้าไปในเซลล์แล้ว โมเลกุลไวเทลโลจีนินจะถูกตัดแต่งกลายเป็นส่วนประกอบหลักของโปรตีนโยล์ค 2 ส่วน ได้แก่ ลิพอไวเทลลิน (lipovitellin) และฟอสไวทิน (phosvitin) ในปลาเพศผู้และปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ไม่พบไวเทลโลจีนินในกระแสเลือด แต่การฉีดปลาเหล่านี้ด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออลสามารถกระตุ้นให้ตับสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้ นอกจากนี้ระดับไวเทลโลจีนินในเลือดของปลาจะเปลี่ยนแปลงตามระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่

ปลากะรังหรือปลาเก๋า เป็นปลาที่มีรสชาติดี ราคาแพง นิยมบริโภคทั้งในและนอกประเทศ จึงเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก และได้รับการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวางในประเทศไทย นอกเหนือจากผลงานวิจัยด้านชีววิทยาของปลากะรังแล้ว ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับชีวเคมีการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมีย ซึ่งได้แก่ไวเทลโลจีนิน โปรตีนโยล์คและพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่และรังไข่ในปลาชนิดนี้ เมื่อไม่นานมานี้ ไพบูลย์ บุญลิขิตานนท์ (2537) ได้ทำการแยกและศึกษาคุณสมบัติบางประการของไวเทลโลจีนินในปลากะรัง แต่ยังไม่ได้ศึกษาพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับไวเทลโลจีนินอย่างมาก งานวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพลาสมาไวเทลโลจีนินกับการพัฒนาของรังไข่ปลากะรังเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ครบถ้วนสมบูรณ์ เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมียและเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 ชื่อวิทยาศาสตร์ของปลากะรัง

ปลากะรังปากแม่น้ำ หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า ปลาเก๋า เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เลี้ยงง่าย โตเร็ว เป็นปลาที่นิยมบริโภคกันทั่วไป ปลากะรังชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้มีชื่อเรียกว่า ปลากะรังดอกดำ ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Epinephelus malabaricus* มีชื่อสามัญว่า grouper เป็นปลาขนาดกลาง รูปร่างยาวแบนข้างเล็กน้อย ลำตัวกลม กระดูกหน้าอกเป็นหยักละเอียดทางด้านบน ส่วนด้านล่างหักมุมเป็นหยักหนามขนาดใหญ่ 2-3 อัน ฟันบนขากรรไกรล่างมี 2 แถว ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 11 อัน ก้านครีบอ่อน 15-16 อัน ครีบต่าง ๆ กลมมน ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน มีแถบสีน้ำตาลเข้มไม่ชัดเจนพาดขวาง ลำตัว 5-6 แถบ มีจุดสีเหลือง หรือสีส้มเล็ก ๆ ประอยู่ตลอดตัว ก้องและใต้คางไม่มีจุดสี (ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และ ดุสิต ตันวิไล, 2530)

ปลากะรังจัดอยู่ในตระกูล serranidae ปลาในตระกูลนี้แพร่กระจายอยู่ในบริเวณแถบทะเลลึกไปจนถึงชายฝั่งทะเลและปากแม่น้ำ จากการศึกษายพบปลากะรังที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในน่านน้ำเขตอินโดแปซิฟิก (Indopacific) มีจำนวนถึง 11 สกุล และมีจำนวนประมาณ 110 ชนิด ปลากะรังที่พบในเขตน่านน้ำไทยมีประมาณ 40 ชนิด ที่พบในเขตภาคใต้มีทั้งหมด 18 ชนิด (ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และ ดุสิต ตันวิไล, 2530)

ปลากะรังชอบอาศัยอยู่ตามพื้นทะเล แนวโขดหิน และปะการัง ตามชายฝั่งหรือเกาะแก่งต่าง ๆ ปลากะรังหลายชนิดพบแพร่กระจายอยู่ตามพื้นทะเลทั่วไป ตั้งแต่หน้าตื้นจนถึงระดับน้ำลึกถึง 500 เมตร ลูกปลากะรังขนาดตั้งแต่ 1.5-7 เซนติเมตร พบในบริเวณชายฝั่ง แม่น้ำลำคลองและอ่าวในระดับลึก 1-2 เมตร ซึ่งมีความเค็มของน้ำ 15-30 ส่วนพัน (ppt) ในฝั่งทะเลอ่าวไทย ส่วนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน พบในระดับความเค็มของน้ำทะเลปกติไม่เกิน 35 ส่วนพัน

แหล่งวางไข่ของปลากะรังเป็นแหล่งที่อยู่ในทะเลลึกและอาจมีความเค็มสูงมาก ในบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทย จะพบปลาไข่ไข่แก่ และวางไข่

ในช่วงฤดูมรสุม หลังจากนั้นไข่จะถูกพัฒนาเข้าสู่ชายฝั่งและฟักออกเป็นตัว แล้วมาเจริญเติบโตบริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งจนมีขนาด 1-2 เซนติเมตร ปลากระริงที่นำมาเลี้ยงในกระชังสามารถเจริญเติบโตจนมีไข่และวางไข่ได้เมื่ออายุประมาณ 2 ปี หรือมีน้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม ในช่วงแรกของการเจริญพันธุ์ของปลากระริงพบว่าเมื่อปลาที่มีน้ำหนักในช่วง 2-5 กิโลกรัมจะเป็นเพศเมีย เมื่อปลาเจริญเติบโตจนมีน้ำหนักประมาณ 7 กิโลกรัม ขึ้นไปจะเริ่มเปลี่ยนเป็นเพศผู้ ซึ่งเป็นลักษณะการสืบพันธุ์แบบกระเทย (hermaphroditism) ปลากระริงในธรรมชาติที่อาศัยอยู่ในเขตชายฝั่งทะเลของอ่าวไทย จะวางไข่ผสมพันธุ์ไปละครั้งตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนจนถึงเดือนมีนาคม (ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และดุสิต ตันวิไล, 2530)

1.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลาเพศเมีย

การสืบพันธุ์ของปลามีหลายแบบแตกต่างกัน ทั้งแบบแยกเพศ ไม่แยกเพศ และแบบพาร์ธีโนจีนีซิส (parthenogenesis) ซึ่งมีผลทำให้อวัยวะสืบพันธุ์มีความแตกต่างกันไป แต่ลักษณะพื้นฐานเช่นเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) เซลล์ต่างๆ ที่ประกอบเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เหล่านั้นก็ยังคงคล้ายคลึงกันและทำหน้าที่สำคัญคือสร้างเชื้อสืบพันธุ์ (gamete) (Nagahama, 1983)

1.2.1 ลักษณะของรังไข่

รังไข่ (ovary) ของปลากระดูกแข็ง เจริญมาจากเซลล์ส่วนผิวของผนังช่องท้อง (peritoneal wall) เจริญหนาเป็นสันตามยาวเรียกว่าคอร์เท็กซ์ (cortex) รังไข่ของปลามีลักษณะเป็นพู 2 พู ทอดยาวไปตามความยาวของช่องท้องโดยมีเยื่อยึดติดกับผนังช่องท้อง พูทั้งสองเชื่อมต่อกันที่ปลายด้านหนึ่งติดต่อกับท่อนำไข่ (oviduct) และเมื่อเกิดการวางไข่ (spawning) ไข่จะเคลื่อนผ่านท่อนำไข่ออกสู่ช่องเปิดภายนอก รังไข่ของปลาเกือบทุกชนิดมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ผนังรังไข่ด้านนอกมีชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) หุ้มไว้โดยรอบ เรียกว่าทูนิกา อัลบูจิเนีย (tunica albuginea)

ภายในรังไข่มีชั้นเยอร์มินัล อีพิทีเลียม (germinal epithelium) บ่อยๆโดยรอบ มีลักษณะเป็นหลืบยื่นออกจากผนังมาสู่กึ่งกลางรังไข่ เรียกหลืบเหล่านี้ว่า โอวิเจอร์ส โฟลด์ (ovigerous fold) ภายในหลืบนี้มีเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น (primordial germ cell) ซึ่งจะเจริญเป็นโอโอโกเนีย (oogonia) ต่อไป และเมื่อขบวนการสร้างไข่เริ่มเกิดขึ้น เซลล์ของเยอร์มินัล อีพิทีเลียม จะเจริญมาล้อมรอบโอโอโกเนีย กลายเป็นโครงสร้างของฟอลลิเคิล

1.2.2 การสังเคราะห์และพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่

(Oogenesis and oocyte development)

ไข่ปลา มีลักษณะแตกต่างกันทั้งขนาด รูปร่างและสี แต่ลักษณะภายในไข่มีส่วนประกอบหลักแบบเดียวกัน คือประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ นิวเคลียส (nucleus) ไซโทพลาซึม (cytoplasm) และเปลือกไข่ (chorion) ซึ่งทำหน้าที่หุ้มไข่ไม่ให้เป็นอันตราย ไซโทพลาซึมแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่จะแบ่งเซลล์เจริญไปเป็นคัพภะ อีกส่วนคือโปรตีนโยล์คซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดคือ ลิโพไวเทลลินและฟอสไวทิน โปรตีนโยล์คทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับพัฒนาการของคัพภะและตัวอ่อน โปรตีนโยล์คในไข่ได้มาจากไวเทลโลจีนินในเลือดซึ่งถูกสังเคราะห์โดยตับเมื่อมีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดสูง

Wallace and Selman (1981) ได้อธิบายถึงพัฒนาการเจริญพันธุ์ของโอโอไซท์ (oocyte) ของปลา ซึ่งกลไกพัฒนาการเจริญพันธุ์ของโอโอไซท์มีลักษณะคล้ายคลึงกันในปลาทุกชนิด ดังนี้

1.2.2.1 การพัฒนาของโอโอไซท์ขั้นแรก

(Primary growth of oocyte)

ก. ระยะโอโอโกเนีย (Oogonia stage)

โอโอโกเนีย ซึ่งเจริญมาจากเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น มีขนาดเล็ก รูปร่างกลม มีอัตราส่วนระหว่างนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมสูง โดยทั่วไปจะอยู่รวมเป็นกลุ่ม โอโอโกเนียเพิ่มจำนวนมากขึ้นโดยการ

แบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) การเพิ่มจำนวนของโอโอโกเนียจะพบเป็นพีค (peak) สูงตามฤดูกาลของวงจรการสืบพันธุ์ในรอบปี (annual reproductive cycle) ของปลา โดยทั่วไปโอโอโกเนียจะมีอยู่ในรังไข่ตลอดชีวิตของปลาเพศเมีย

ข. ระยะโครมาติน นิวเคลียส (Chromatin nucleolus stage)

เป็นการเจริญระยะแรกของโอโอไซท์ โอโอโกเนียกลายเป็นไพรมารี โอโอไซท์ (primary oocyte) เมื่อนิวเคลียสมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะดิพลอทีน (diplotene) ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ระยะที่ 1 (meiosis I) ระยะนี้โอโอไซท์มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วยชั้นบาง ๆ ของไซโทพลาซึม

ค. ระยะเพอรินิวเคลียส (Perinucleolus stage)

โอโอไซท์ระยะนี้ มีอัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมลดลงมาก โอโอไซท์ที่มีปริมาตรเพิ่มขึ้นเกือบ 100 เท่า นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีนิวเคลียส (nucleoli) หลายอัน ขนาดและรูปร่างของนิวเคลียสแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา

ตามสมมติฐานเชื่อว่า การพัฒนาของโอโอไซท์ในขั้นแรกนี้ไม่ได้ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองหรือสเตอรอยด์ ฮอร์โมนในปลา *Leptocottus armatus* พบระดับ 17 β -เอสตราไดออลในพลาสมาต่ำ ในขณะที่โอโอไซท์กำลังพัฒนาอยู่ในขั้นแรก (de Vlaming, 1974) ในตอนปลายของการพัฒนาขั้นนี้ โอโอไซท์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นจาก 10-20 μ m เป็น 100-200 μ m อย่างไรก็ตาม ในรังไข่ที่มีเฉพาะโอโอไซท์ระยะนี้ มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ (gonadosomatic index, GSI) ต่ำ คือน้อยกว่า 2% ซึ่งเป็นระยะไข่อ่อน

ในตอนปลายของการพัฒนาโอโอไซท์ขั้นแรก จะมีชั้นเซลล์ของฟอลลิเคิลเข้ามาล้อมรอบโอโอไซท์ ขั้นตอนนี้เริ่มจากเซอร์มิแนล อีพิทีเลียม เจริญมาล้อมรอบโอโอไซท์ เรียกชั้นเซลล์นี้ว่าฟอลลิเคิล ฟอลลิเคิล

จะค่อย ๆ เจริญแบ่งเป็น 3 ชั้น ชั้นนอกสุดเรียกธีคา เซลล์ (theca cell) ถัดเข้ามาคือชั้นแกรนูโลซา เซลล์ (granulosa cell) ระหว่างชั้นธีคา และแกรนูโลซามีเบสเมมเบร่า เมมเบร่า (basement membrane) กั้นกลาง (Guraya, 1979) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งมีหน้าที่โดยตรงต่อกระบวนการสังเคราะห์และสะสมโวลด์ (Goetz, 1983)

1.2.2.2 การพัฒนาของโอโอไซท์ที่ขึ้นสอง

(Secondary growth of oocyte)

การพัฒนาของโอโอไซท์ในระยะนี้ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) โอโอไซท์ในระยะนี้มีการเพิ่มขนาด โดยการสะสมโปรตีนโวลด์ภายในเซลล์ ในขณะที่เดียวกันชั้นเซลล์ของฟอลลิเคิลมีการพัฒนามากขึ้นคือ มีชั้น โซนา เรดิเอตา (zona radiata) หรือ โซนา เพลลูซิดา (zona pellucida) ถูกสร้างขึ้นระหว่างชั้นแกรนูโลซา เซลล์กับโอโอไซท์ นอกจากนี้ฟอลลิเคิล มีท่อเล็ก ๆ ทอดผ่านโซนา เรดิเอตาไปสู่ไซโทพลาซึมของโอโอไซท์ ซึ่งคาดว่าจะเส้นทางผ่านของสารอาหารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ และมีการสร้างเปลือกไข่ หรือไวเทลลิน เมมเบร่า (vitellin membrane) ของฟอลลิเคิลด้วย

การสังเคราะห์และสะสมโวลด์ แบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

ก. ระยะโวลด์ เวซิเคิล (Yolk vesicle stage)

การพัฒนาของโอโอไซท์ในระยะนี้ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน และเริ่มมีการสร้างโวลด์ขึ้นภายในเซลล์ของโอโอไซท์ (endogenous vitellogenesis) โวลด์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในระยะแรกมีลักษณะ เป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) หรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เรียกว่า โวลด์ เวซิเคิล (yolk vesicle) ซึ่งเริ่มปรากฏบริเวณใกล้ริมขอบเซลล์ก่อน แล้วจึงกระจายไปทั่วไซโทพลาซึม

ของโอโอไซท์ โยล์ค เวซิเคิลจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ และในที่สุดเมื่อโอโอไซท์เจริญเต็มที่ โยล์คเหล่านี้ไปรวมอยู่บริเวณขอบของโอโอไซท์ เรียกว่า คอร์ทิคัล แอลวีโอล (cortical alveoli) ซึ่งมีบทบาทในการผสมของเชื้อตัวผู้กับไข่ ในตอนเริ่มต้นของการสังเคราะห์โยล์คภายในโอโอไซท์ โชนา เรดิเอตา ยังไม่เจริญเต็มที่ เมื่อการสร้างโยล์คระยะนี้สิ้นสุดลง โชนา เรดิเอตา จึงเจริญเต็มที่โดยมีลักษณะคล้ายเช่นเดียวกับช็อคาและแกรนูลโซลา ซึ่งเจริญเต็มที่ และเริ่มตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินโดยสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนเพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์โยล์คระยะที่สองต่อไป

ข. ระยะโยล์ค แกรนูล (Yolk granule stage)

การพัฒนาของโอโอไซท์ระยะนี้ จะสะสมโปรตีนที่สังเคราะห์จากภายนอกเซลล์โอโอไซท์ (exogenous vitellogenesis) เซลล์ตับถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนเพศเมียชื่อ 17β -เอสตราไดโอดอล ในกระแสเลือดให้สังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของโปรตีนโยล์ค ไวเทลโลจีนินถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นโอโอไซท์ที่กำลังเจริญเติบโต จะรับ (uptake) ไวเทลโลจีนินแล้วเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนโยล์ค สะสมอยู่ในโอโอไซท์ การรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่โอโอไซท์ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน โยล์คที่รับมาจากภายนอกโอโอไซท์เรียกว่า โยล์ค แกรนูล (yolk granule) เมื่อถึงปลายระยะการสะสมโยล์ค จะเห็นโยล์ค แกรนูล จำนวนมาก และบางส่วนรวมตัวเชื่อมต่อกัน มีขนาดใหญ่ขึ้น ในปลาบางชนิดเมื่อโอโอไซท์เจริญเต็มที่ โยล์ค แกรนูลจะรวมตัวกันทำให้ไข่มีลักษณะใสขึ้น (Goetz, 1983)

ส่วนประกอบอีกชนิดหนึ่งของโยล์คคือ หยดน้ำมัน (oil droplet) หรือเวคิวโอลไขมัน (fat vacuole) ที่สังเคราะห์ขึ้นภายในโอโอไซท์ โดยเริ่มปรากฏขึ้นรอบๆ นิวเคลียส แล้วค่อยๆ กระจายออกสู่ภายนอก การสังเคราะห์หยดน้ำมันนี้ในปลาบางชนิดพบว่าสังเคราะห์พร้อม ๆ กับ โยล์ค เวซิเคิล แต่ในบางชนิดพบว่าสังเคราะห์ขึ้นภายหลังการสังเคราะห์โยล์ค แกรนูล (Goetz, 1983)

โอโอไซท์ที่สิ้นสุดการสะสมโพลด์แล้ว จะอยู่ใน
ระยะพักรอการกระตุ้นจากฮอว์โมนเพื่อให้เกิดการเจริญขึ้นสุดท้ายและเกิดการ
ตกไข่ (ovulation)

1.2.2.3 การพัฒนาขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์

(Final maturation of oocyte)

เมื่อโอโอไซท์สิ้นสุดการสะสมโพลด์ จะมีการแบ่ง
เซลล์ แบบไมโอซิสขั้นที่ 1 ในระยะนี้โอโอไซท์จะมีนิวเคลียสหรือเรียกว่า
เยอร์มินัล เวซิเคิล (germinal vesicle) ขนาดใหญ่อยู่กึ่งกลางเซลล์หรือ
อยู่กึ่งกลางระหว่างจุดศูนย์กลางกับขอบเซลล์ เยอร์มินัล เวซิเคิล มองไม่เห็น
ด้วยตาเปล่า ต้องตรึงด้วยน้ำยาบางชนิดให้ไซโทพลาซึมใสก่อน ในระยะนี้
ช่องไมโครไพล์ (micropyle) เกิดขึ้นทางแอนิมัล โพล (animal pole)
ขณะที่เยอร์มินัล เวซิเคิล ค่อย ๆ เคลื่อนที่ไปทางแอนิมัล โพล และในที่สุด
ผนังของนิวเคลียสจะสลายไป เนื่องจากสิ้นสุดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะ
ที่ 1 เรียกระยะนี้ว่าการสลายของเยอร์มินัล เวซิเคิล (germinal vesicle
breakdown) เป็นการสิ้นสุดการเจริญขึ้นสุดท้ายของโอโอไซท์ ซึ่งได้กลายเป็นไข่สุก (ovum) สมบูรณ์ (Crain and Harvey, 1984) เมื่อสภาพแวดล้อมทางฮอว์โมนเหมาะสมไข่สุกจะถูกปล่อยออกจากฟอลลิเคิล เรียกว่า เกิด
การตกไข่

การพัฒนาของโอโอไซท์ขั้นสุดท้ายนี้ เป็นระยะไข่
แก่ (maturation stage) ซึ่งเสร็จสมบูรณ์ภายในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและอุณหภูมิ ปริมาตรของไข่ในปลาน้ำจืดทั่วไป
จะไม่เพิ่มขึ้น แต่ในปลาบางชนิดในระยะไข่แก่นี้ โอโอไซท์มีการดูดซึมน้ำ
(hydration) เข้าสู่เซลล์ Fulton (1898) วัดขนาดของไข่ซึ่งพัฒนาใน
ระยะไข่แก่ของปลากะเล 24 ชนิด พบว่าโอโอไซท์ที่มีปริมาตรเพิ่มขึ้นประมาณ
3-4 เท่า พบว่าไข่มีการดูดซึมน้ำเข้าไปขณะเมื่อทดลองฉีดฮอว์โมนกระตุ้นให้
ไข่ปลาสุก (Watanabe and Kuo, 1986) และในกรณีที่ไข่สุกเองตามธรรมชาติ (Crain, 1982) กระบวนการดูดซึมน้ำนี้ทำให้ปริมาณแคลเซียมไอออน
(Ca^{2+}) เพิ่มขึ้นด้วย ผลของการดูดซึมน้ำของไข่ในระยะไข่แก่ทำให้ปลาชีก

เตี๋ยวญี่ปุ่นหรือปลาเพลาน์เดอร์ดญี่ปุ่น (Japanese flounder) มีน้ำหนักตัวปลาเพิ่มขึ้น 8-10% ขณะที่โอโอไซท์ที่อยู่ในช่วงการพัฒนาขั้นสุดท้าย และปลาอายุญี่ปุ่น (Japanese ayu) มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 2-3% เมื่อไข่มีระยะพัฒนาการเดียวกันนี้ (Hirose, *et al.*, 1974)

ขนาดของไข่แก่ แตกต่างกันไปในปลาชนิดต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น ปลาเพชทะเล (sea perch, *Cymatogaster aggregata*) ไข่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 0.3 มิลลิเมตร (Eigenmann, 1892) ส่วนไข่ของปลาดุกทะเล (marine catfish) มีขนาดใหญ่ถึง 30 มิลลิเมตร (Gudger, 1918) การที่ไข่ปลา มีขนาดต่างกันมากเช่นนี้ น่าจะเนื่องมาจากการเก็บสะสมโปรตีนโพลีคปริมาตรต่างกัน หรือมีการดูดซึมน้ำของไข่

1.2.3 การตกไข่

เมื่อสิ้นสุดการพัฒนาขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ โอโอไซท์ก็กลายเป็นไข่สุกอย่างสมบูรณ์ พร้อมทั้งจะปฏิสนธิกับเชื้อตัวผู้ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะเกิดการตกไข่ขึ้นโดยอาศัย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรก ขึ้นของฟอลลิเคิลแยกตัวออกจากไข่ ขั้นตอนที่สองฟอลลิเคิลเกิดการบีบตัวทำให้ไข่หลุดออกจากฟอลลิเคิล ภายหลังจากตกไข่ยังคงมีไข่อยู่ในรังไข่ช่วงเวลาสั้นๆ และคงสภาพอยู่ได้ แต่ถ้าไข่ที่ตกแล้วค้างอยู่ในท้องตัวปลานานเกินไปก็จะทำให้ไข่เสีย (over-ripe)

1.2.4 โอโอไซท์ที่เสื่อมสลาย (Atretic oocyte)

โอโอไซท์ที่กำลังพัฒนานั้น บางเซลล์อาจไม่สามารถพัฒนาจนถึงขั้นตกไข่ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม โอโอไซท์นั้นจะสลายตัวไป (atresia) ในรังไข่ที่กำลังพัฒนามีโอโอไซท์จำนวนเล็กน้อยที่ไม่แข็งแรงสมบูรณ์และสลายตัวไปเป็นปกติธรรมดาที่พบในปลาทั่วไป กระบวนการสลายตัวของโอโอไซท์เหล่านี้ถูกเซลล์ของฟอลลิเคิลและอีคา เซลล์ ทำลายโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เหลือเพียงเศษของเซลล์อยู่ในฟอลลิเคิล เมื่อสิ้นสุดฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ ทั้งฟอลลิเคิลที่ว่างเปล่าและโอโอไซท์ที่เหลืออยู่ก็จะสลายตัว เพื่อเริ่มต้นการเจริญของรังไข่ในฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ต่อไป

1.2.5 ชนิดของรังไข่

ภายในรังไข่ของปลาแต่ละชนิด มีโอโอไซท์ระยะต่าง ๆ แตกต่างกันไป เนื่องจากลักษณะการพัฒนาของรังไข่โดยพื้นฐานที่แตกต่างกัน ชนิดของรังไข่แบ่งได้เป็น 3 ชนิด (Wallace and Selman, 1981) ดังนี้

1.2.5.1 รังไข่แบบซิงโครนัส (Synchronous ovary)

เป็นรังไข่ที่มีโอโอไซท์ที่อยู่ในระยะเดียวกันทั้งหมด พบในปลาซลมอน (salmon) และปลาปากกลม (lamprey) ปลาประเภทนี้จะวางไข่พร้อมกันทั้งหมดในหนึ่งครั้ง หรือวางไข่เพียงครั้งเดียวในชีวิต

1.2.5.2 รังไข่แบบอะซิงโครนัส (Asynchronous ovary)

พบโอโอไซท์ทุกระยะ อยู่ภายในรังไข่ในเวลาเดียวกัน เป็นปลาที่วางไข่ได้ตลอดปี ได้แก่ปลาแฮร์ริง (herring) ปลาคาร์พ (carp) ปลาเฟลันเดอร์

1.2.5.3 รังไข่แบบกรุปซิงโครนัส (Group synchronous ovary)

พบในปลาทั่วไป ภายในรังไข่พบโอโอไซท์หลายระยะปะปนกัน โดยพบโอโอไซท์ที่พัฒนาขึ้นแรกได้ตลอดปี ในปีหนึ่ง ๆ มีโอโอไซท์กลุ่มหนึ่งที่มีพัฒนาการเจริญพันธุ์จนถึงระยะไข่สุก

1.3 ฮอร์โมนที่ควบคุมพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่

ฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของรังไข่ คือ โภนาโดโทรปิน เอสโตรเจนและโปรเจสติน (progestin) โภนาโดโทรปินเป็นฮอร์โมนสร้างจากต่อมใต้สมอง มีบทบาทต่อการสืบพันธุ์ของปลามาก ทั้งในขั้นตอนการสังเคราะห์และสะสมไวเทลโลเจนิน การเจริญสูงสุดท้ายของโอโอไซท์ การตกไข่และการวางไข่ Fostier, et al. (1983) พบว่าปลาเทราท์ (trout) ที่ยังไม่เจริญพันธุ์และปลาเพศเมียที่กำลังเจริญพันธุ์ มีระดับโภนาโดโทรปินต่ำ แต่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยขณะที่มีการสะสมโปรตีนโยลค์ในรังไข่ และเพิ่มขึ้นมากในระยะที่โอโอไซท์พัฒนาสูงสุดท้ายและมีการตกไข่ หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง

ในบางครั้งปลาเทราท์ที่มีการตกไข่แล้ว และยังมีไข่ค้างอยู่ในช่องท้องก็ยังมีระดับโกนาโดโทรปินสูงอยู่เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ระดับโกนาโดโทรปินที่สูงมีผลสำคัญในการรักษาสภาพของไข่ที่ตกแล้วในช่องท้อง

เอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน เช่น $17\alpha, 20\beta$ -ไดไฮดรอกซี-4-เพรกเนน-3-โอน ($17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one) เป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์จากรังไข่ การสังเคราะห์สเตอรอยด์ในรังไข่เป็นผลมาจากการกระตุ้นของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมอง ภายในรังไข่มีการสังเคราะห์สเตอรอยด์ที่ชั้นเซลล์ของฟอลลิเคิล ซึ่งได้แก่แกรนูโลซา เซลล์และที่ ซีคา เซลล์ชนิดพิเศษ (special theca cell) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (Fostier, *et al.*, 1983) ในการสังเคราะห์ 17β -เอสตราไดออล ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สามารถกระตุ้นโอโอโกเนียเพิ่มจำนวนมากขึ้น (Olivereau and Olivereau, 1979) และทำหน้าที่ในการควบคุมการสังเคราะห์และสะสมโปรตีนโยล์คในโอโอไซท์ พบระดับของ 17β -เอสตราไดออลในปลาเทราท์สูงขึ้นเล็กน้อยในระหว่างที่มีการสะสมโยล์คในโอโอไซท์ (Ng and Idler, 1983) การสร้างโยล์ค เวซิเคิล ภายในโอโอไซท์ถูกกระตุ้นโดยเอสตราไดออล เอสโตรน (estrone) หรือเอสตริออล (estriol) ส่วนระยะการรับโยล์ค แกรนูล จากภายนอกนั้น 17β -เอสตราไดออล มีบทบาทในการกระตุ้นให้ตับสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน แล้วปล่อยออกสู่กระแสเลือด จากนั้นโอโอไซท์รับไวเทลโลจีนิน แล้วเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนโยล์คภายในโอโอไซท์ การรับไวเทลโลจีนินจากกระแสเลือด อยู่ภายใต้การควบคุมของโกนาโดโทรปิน (Fostier, *et al.*, 1983) เมื่อการสะสมโยล์คสิ้นสุดลง ระดับของเอสตราไดออลในเลือดจะลดลงทันที Nagahama (1983) ได้สรุปว่า การสังเคราะห์ 17β -เอสตราไดออลน่าจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของซีคาและแกรนูโลซา โดยซีคาทำหน้าที่สร้างสารเริ่มต้น ซึ่งอาจเป็นเทสโทสเตอโรน (testosterone) แล้วส่งไปยังแกรนูโลซา เพื่อถูกเปลี่ยนไปเป็น 17β -เอสตราไดออล กระบวนการเหล่านี้อยู่ภายใต้การควบคุมของโกนาโดโทรปิน

ในการเจริญพันธุ์สุดท้ายของไข่ อยู่ภายใต้การควบคุมของโกนาโดโทรปิน ซึ่งมีผลทางตรงต่อไข่ โกนาโดโทรปินกระตุ้นให้ฟอลลิเคิลสังเคราะห์สเตอรอยด์ โดยขึ้นที่ค่าทำหน้าที่สังเคราะห์สารเริ่มต้นซึ่งอาจเป็น 17 β -ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (17 β -hydroxyprogesterone) แล้วส่งไปยังแกรนูโลซา เพื่อเปลี่ยนไปเป็น 17 α -ไฮดรอกซี-20 β -ไดไฮโดรโปรเจสเตอโรน (17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone) ควบคุมการเจริญพันธุ์สุดท้ายของไข่ต่อไป (Nagahama, 1983) ในขณะที่ 17 α , 20 β -ไดไฮดรอกซี-4-เพรกเนน-3-โอน มีระดับสูงขึ้นทันทีในระยะการพัฒนารูปร่างสุดท้ายของโอโอไซต์ แล้วลดลงอย่างรวดเร็วหลังการตกไข่ แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนนี้มีบทบาทต่อการพัฒนาของโอโอไซต์ขั้นสุดท้าย (Nagahama and Adachi, 1985) ในส่วนที่เกี่ยวกับการตกไข่ถูกกระตุ้นโดยโปรเจสทิน Goetz (1983) พบว่าการฉีด 17 α -ไฮดรอกซี-20 β -ไดไฮโดรโปรเจสเตอโรนช่วยกระตุ้นการเจริญพันธุ์สุดท้ายของไข่โดยทำให้เกิดการตกไข่

ภายหลังการตกไข่พบว่าฮีตา เซลล์ ชนิดพิเศษ ยังทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สเตอรอยด์คือโปรเจสเตอโรนและเทสโทสเตอโรน ฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้ อาจมีส่วนในการรักษาสภาพของไข่ หรืออาจมีอิทธิพลต่อการวางไข่ (Nagahama, 1983)

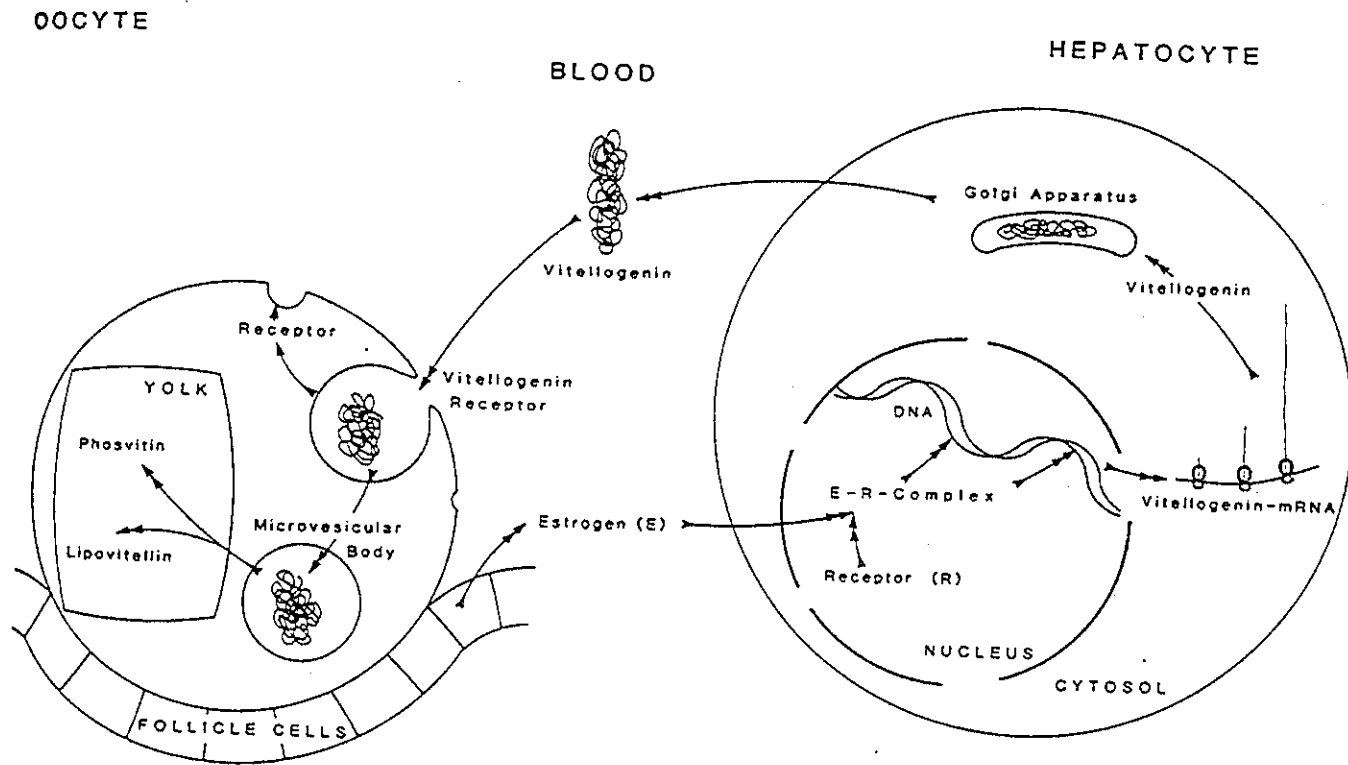
1.4 กระบวนการสังเคราะห์และสะสมไวเทลโลจีนิน

การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเกิดขึ้นในตับของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและถูกเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน (Peterson and Common, 1972; Wahli, *et al.*, 1981) ฟอลลิเคิลในรังไข่ของปลาเพศเมียตอบสนองต่อระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่เพิ่มขึ้น โดยสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน แล้วปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด เอสโตรเจนจะถูกลำเลียงสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายคือ เซลล์เฮปาโทไซต์ (hepatocyte) ของตับโดยเข้าไปจับแบบจำเพาะกับตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ในเซลล์โอโอไซต์ กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ซึ่งไปกระตุ้นให้ยีน (gene) ไวเทลโลจีนินทำการสังเคราะห์โปรตีนไวเทลโลจีนิน (Wahli, *et al.*, 1981) แล้วปล่อย

ออกสู่กระแสเลือดไปสู่โอโอไซท์ที่กำลังเจริญเติบโต ไวเทลโลจีนินจับกับตัวรับ (receptor) ที่บริเวณผิวเซลล์ของโอโอไซท์ที่กำลังเจริญเติบโตอย่างจำเพาะ เข้าสู่โอโอไซท์โดยกระบวนการดูดกลืนของเหลว (pinocytosis) ในการรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่รังไข่ของกบ พบว่าเนื้อเยื่อรังไข่ของกบสามารถรับไวเทลโลจีนินได้เร็วกว่าซีรัมโปรตีนอื่นในอัตรา 5 หรือ 6 เท่า (Wallace, *et al.*, 1972) แสดงว่าตัวรับที่จำเพาะของไวเทลโลจีนินอาจอยู่ที่ผิวนอกของไข่ที่กำลังเจริญเติบโต Wiley and Dumont (1978) และ Follett and Redshaw (1968) ได้แสดงผลของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินว่า มีความจำเพาะต่อการรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่ไข่ของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ซึ่งคล้ายกับของปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) (Tyler, *et al.*, 1990) ในระหว่างการรับไวเทลโลจีนิน เข้าสู่เซลล์ผ่านกระบวนการดูดกลืนของเหลว ไวเทลโลจีนิน ซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์สายยาวจะถูกตัดแบบจำเพาะหลายตำแหน่ง ทำให้ได้ส่วนประกอบ 2 ส่วนเกิดขึ้น คือลิโพไวเทลลินและฟอสไวทิน โปรตีนทั้งสองส่วนนี้ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หลายสาย (Mc Collum, *et al.*, 1986)

กลไกของกระบวนการสังเคราะห์และสะสมไวเทลโลจีนิน ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1

มีการศึกษาจำนวนมาก ที่ทำการกระตุ้นให้ปลาชนิดต่าง ๆ สังเคราะห์ไวเทลโลจีนินด้วยฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดออล เพื่อศึกษาคุณสมบัติของไวเทลโลจีนินในปลาแต่ละชนิด การใช้แอนโดรเจน (androgen) ในปริมาณสูงก็สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินในปลา *Gobius niger* (Le Menn, 1979) และในปลาทอง (goldfish) (Hori, *et al.*, 1979) ได้ ทั้งนี้เพราะแอนโดรเจนมีผลต่อการทำงานของตัวรับเอสโตรเจนด้วย นอกจากนี้ได้มีการทดลองใช้สเตอรอยด์ ฮอร์โมนชนิดอื่น เช่น เทสโทสเตอโรน โปรเจสเตอโรน คอร์ติซอล (cortisol) และเด็กซาเมธาโซน (dexamethasone) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน แต่ไม่ได้ผลจากการศึกษาเหล่านี้แสดงว่า เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้ดีที่สุด



รูปที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์และสะสมไวเทลโลจีนิน
(Mommsen and Walsh, 1988)

Benfey, *et al.* (1989) ทดลองฉีดปลาโคโฮ แซลมอน (coho salmon) ด้วย 17 β -เอสตราไดออล 1 มก./กก. น้ำหนักปลา ทุกสัปดาห์ พบว่าปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลาเพิ่มขึ้นดังนี้

| <u>หลังฉีดฮอร์โมน</u> | <u>ไวเทลโลจีนิน (มก./มล.)</u> |
|-----------------------|-------------------------------|
| 1 สัปดาห์ | 23.8 |
| 2 สัปดาห์ | 108.0 |
| 3 สัปดาห์ | 216.6 |

Ding, *et al.* (1989) ทำการฉีดปลาทองเพคซู่ด้วย 17 β -เอสตราไดออลที่ 2 ระดับความเข้มข้น คือ 0.5 มก./กก. น้ำหนักปลา ในวันที่ 1, 2 และ 3 อีกระดับหนึ่ง คือ 4 มก./กก. น้ำหนักปลา ในวันที่ 0, 4, 7 และ 13 พบว่าการใช้เอสตราไดออล 0.5 มก./กก. ไม่ทำให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินอย่างเห็นได้ชัด แต่ระดับ 4 มก./กก. สามารถกระตุ้นให้ปลาสร้างไวเทลโลจีนินได้ในวันที่ 2 และพบพีคของไวเทลโลจีนินในวันที่ 8 และ 15 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนในพลาสมาเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของปลาชุดควบคุม 90% ของโปรตีนทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นในพลาสมาคือไวเทลโลจีนิน (Clemens, *et al.*, 1975)

1.5 พลาสมาไวเทลโลจีนิน (Plasma vitellogenin)

1.5.1 คุณสมบัติของไวเทลโลจีนิน

ไวเทลโลจีนินเป็นฟอสโฟลิพโกลิโคโปรตีน (phospholipoglycoprotein) ที่มีไขมัน คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และฟอสเฟต (phosphate) เป็นองค์ประกอบ ไวเทลโลจีนินยังมีคุณสมบัติของการจับกับไอออนสูง (strong ion-binding property) ซึ่งอาจเป็นตัวช่วยเสริมแร่ธาตุให้โอโอไซท์ (Hara, 1976) ในช่วง 10 กว่าปี ที่ผ่านมาได้มีการแยกและศึกษาคุณสมบัติไวเทลโลจีนินในปลาชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีความแตกต่าง

กันหลากหลายเช่นน้ำหนักโมเลกุล ปริมาณฟอสเฟต ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต ที่เป็นองค์ประกอบ และหน่วยย่อยของโมเลกุล เป็นต้น

การหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจีนิในปลาหลายชนิดโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) (Emmersen and Petersen, 1976; Hara and Hirai, 1978; Campbell and Idler, 1980) และโดยวิธี โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ (non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis) (Hori, *et al.*, 1979; de Vlaming, *et al.*, 1980; Campbell and Idler, 1980) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 326,000-600,000 ดัลตัน หน่วยย่อยของไวเทลโลจีนิที่แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แบบแปลงสภาพ (denaturing polyacrylamide gel electrophoresis) มีน้ำหนักโมเลกุล 140,000-220,000 ดัลตัน (Hara and Hirai, 1978; Hori, *et al.*, 1979)

การศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในไวเทลโลจีนิ ของปลาหลายชนิด เช่นปลาเรนโบว์เทราท์ (Hara and Hirai, 1978) ปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) และ ปลาเมดากา (medaka) (Hamazaki, *et al.*, 1987) พบกรดอะมิโนอะลานีน (alanine) กลูตามีน (glutamine) และ ลูซีน (leucine) มาก แต่ไวเทลโลจีนิของปลาทองและปลาเมดากา มีเซรีน (serine) ปริมาณน้อยกว่าไวเทลโลจีนิของกบมาก (Redshaw and Follet, 1971) ดังแสดงในตารางที่ 1

ไวเทลโลจีนิของปลา มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบอยู่จำนวนหนึ่ง ในปลาเพศเมียมีโปรตีนที่จับอยู่กับฟอสฟอรัส (phosphorus) เป็นองค์ประกอบอยู่ 20-100 ไมโครกรัม/มล.พลาสมา ส่วนในปลาเพศผู้มีน้อยกว่า (5 ไมโครกรัม/มล.พลาสมา) (Crak and Harvey, 1984) การที่ไวเทลโลจีนิมีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบอยู่มากนี้ อาจทำให้โมเลกุลของไวเทลโลจีนิมีคุณสมบัติของการจับกับไอออนสูง ไวเทลโลจีนิในปลาทั่วไปสามารถจับกับไอออนต่างๆเช่นแคลเซียม แมกเนเซียม และเหล็กได้ดี (Hara,

ตารางที่ 1 องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลโลเจนนินในปลาชนิดต่าง ๆ
และในกบ (Hamazaki, *et al.*, 1987; Redshaw and
Follet, 1971)

| กรดอะมิโน | โมล % ของกรดอะมิโนทั้งหมด | | | |
|---------------|---------------------------|-----------|--------|-------------------|
| | กบ | ปลาเมดากา | ปลาทอง | ปลาเรนโบว์ เทราท์ |
| Asparagine | 8.4 | 8.0 | 6.5 | 8.5 |
| Threonine | 5.5 | 4.7 | 5.5 | 5.0 |
| Serine | 11.7 | 10.3 | 6.9 | 7.6 |
| Glutamine | 13.2 | 10.6 | 11.9 | 11.6 |
| Proline | 4.8 | 4.2 | 5.5 | 5.3 |
| Glycine | 5.1 | 4.4 | 4.6 | 4.3 |
| Alanine | 8.5 | 10.4 | 12.8 | 11.8 |
| Valine | 4.6 | 6.8 | 6.9 | 7.2 |
| Methionine | 2.3 | 2.4 | 2.0 | 2.6 |
| Isoleucine | 3.6 | 5.7 | 6.6 | 5.5 |
| Leucine | 8.1 | 9.7 | 10.8 | 9.6 |
| Tyrosine | 3.0 | 3.6 | 2.6 | 3.0 |
| Phenylalanine | 3.6 | 3.4 | 2.9 | 4.1 |
| Histidine | 2.9 | 2.4 | 2.3 | 2.1 |
| Lysine | 7.9 | 7.6 | 7.0 | 7.2 |
| Arginine | 5.3 | 5.0 | 4.9 | 4.6 |

1976; Hara and Hirai, 1978) จึงอาจทำหน้าที่เป็นตัวนำแร่ธาตุต่าง ๆ เข้าไปในโอโอไซท์ด้วย สามารถใช้การแข่งขันระหว่างไวเทลโลจีนินกับสารคีเลติง (chelating substance) เพื่อใช้แยกไวเทลโลจีนินออกจากโปรตีนชนิดอื่น ๆ ได้ (Ng and Idler, 1983) อย่างไรก็ตามในไวเทลโลจีนินของปลามีฟอสเฟตประกอบอยู่น้อยกว่าของสัตว์ชนิดอื่น เช่น ไวเทลโลจีนินของกบมีฟอสเฟต 1.35% ส่วนของไก่มีฟอสเฟตถึง 3.4% แต่ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ มีฟอสเฟตเพียง 0.6% (Campbell and Idler, 1980), 0.8% ในปลาเมเดกา (Hamazaki, *et al.*, 1987) และ 0.7% ในปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980)

แม้ว่าไวเทลโลจีนินของปลา มีองค์ประกอบฟอสเฟตน้อยกว่าของสัตว์ชนิดอื่น แต่กลับมีปริมาณไขมันเป็นองค์ประกอบสูงประมาณ 2 เท่าของกบ ตารางที่ 2 แสดงปริมาณไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไวเทลโลจีนินของ

ตารางที่ 2 องค์ประกอบไขมันของไวเทลโลจีนินในปลาชนิดต่างๆ และในกบ

| ชนิดสัตว์ | % ของไขมัน | ที่มา |
|------------------------------|------------|----------------------------|
| ปลาทอง | 21 | Hori, <i>et al.</i> (1979) |
| ปลาเรนโบว์เทราท์ | 21 | Wiegand and Idler (1982) |
| | 18 | Norberg and Haux (1985) |
| ปลาเทราท์ทะเล (sea trout) | 19 | Norberg and Haux (1985) |
| ปลาดอกพิช (dog fish) | 18 | Craik (1978) |
| กบ | 12.3 | Redshaw and Follett (1971) |

ปลาชนิดต่างๆ และของกบ ไวเทลโลจีนิของปลามือองค์ประกอบไขมันประมาณ 20% ของน้ำหนัก ไวเทลโลจีนิของปลาแต่ละชนิดมีปริมาณไขมันแตกต่างกัน ตามลักษณะการดำเนินชีวิตและการกินอาหาร ไขมันที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ เป็นโพลาร์ ลิพิด (polar lipid) ซึ่งกลายไปเป็นองค์ประกอบของลิโปไว เทลลินในโปรตีนโฮสต์ ไวเทลโลจีนิของปลาเรนโบว์ เทราท์ มีโพลาร์ ลิพิด อยู่ถึง 82% ของไขมัน หรือ 820 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน และมีไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) 60 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน (Wiegand and Idler, 1982) ส่วน Riazzi and Fremont (1988) พบว่าไวเทลโลจีนิของปลาชนิดเดียวกันนี้มีฟอสโฟลิพิด (phospholipid) 70% ไตรกลีเซอไรด์ 14% และคอเลสเตอรอล (cholesterol) 16% ของปริมาณไขมันทั้งหมด Silversand and Haux (1991) หาปริมาณไขมันในไวเทลโลจีนิของปลา 3 ชนิดคือ ปลาคอด (cod) ปลาเทอร์บีอท (turbot) และ ปลาจูล์ฟ ฟิช (wolf fish) พบว่าไวเทลโลจีนิของปลาดังกล่าวมีไขมัน 16-18% ของน้ำหนักแห้ง เป็นฟอสโฟลิพิด 70% และไขมันที่เป็นกลาง (neutral lipid) 15-20% ของปริมาณไขมันทั้งหมด นอกจากนี้พบว่า 50% ของกรดไขมันในไขมันทั้งหมดเป็นชนิดไม่อิ่มตัว

นอกจากนี้ยังพบคาร์โบไฮเดรต ในไวเทลโลจีนิของปลาชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ (species) ในระดับ 17-140 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน บางชนิดประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส (mannose) และกลูโคส (glucose) (Covens, et al., 1987; Hamazaki, et al., 1987)

ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537) ได้แยกและศึกษาคุณสมบัติของไวเทลโลจีนิในปลากะรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์โดยฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตรา ไดออล แล้วแยกไวเทลโลจีนิจากพลาสมาปลาโดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) 2 ชนิดคือ คอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150 สามารถแยกพีคโปรตีนไวเทลโลจีนิได้จากการติดตามสารกัมมันตรังสี (radioactive substance) ^{32}P -orthophos-

phate และ ^3H -leucine ที่ฉีดเข้าไปในปลาหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17β -เอสตราไดออล เพื่อติดฉลาก (label) ไวเทลโลจีนิที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ จากการทำโพสโธครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพของไวเทลโลจีนิในปลากระชังที่แยกได้มีลักษณะเป็นโปรตีน 3 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 525,000, 350,000 และ 260,000 ดัลตัน และย้อมติดสีซูดาน แบล็ค บี (Sudan black B) และ periodic acid Schiff's แสดงว่า มีไขมันและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังพบว่า มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบอยู่ 6.8 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน (0.68%)

1.5.2 การวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิ

มีการนำเทคนิคหลายอย่างมาใช้ในการวัดระดับปริมาณของไวเทลโลจีนิในเลือดปลา ดังนี้

1.5.2.1 การวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิโดยทางอ้อม

เป็นการวัดปริมาณของแคลเซียมไอออน หรือปริมาณโปรตีนที่จับอยู่กับฟอสฟอรัส (protein phosphorus) ในเลือด โดยใช้ค่าปริมาณแคลเซียมหรือปริมาณโปรตีน ฟอสฟอรัส เป็นบรรทัดฐานบ่งบอกปริมาณของไวเทลโลจีนิในพลาสมาของปลาชนิดต่าง ๆ (Emmersen and Petersen, 1976; Craik, 1982; Whitehead, *et al.*, 1978; Elliot, *et al.*, 1979; Bailey, 1957; Nath and Sundararaj, 1981; Bjornsson and Haux, 1985; Pereira, *et al.*, 1992)

1.5.2.2 การวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิโดยตรง

เป็นการพัฒนาเทคนิคตรวจสอบทางอิมมูน (immune) มาใช้ในการวัดระดับไวเทลโลจีนิในพลาสมาของปลา ซึ่งได้นำเทคนิคดังต่อไปนี้

- radial immunoelectrophoresis

(Hara, 1978; Sullivan, *et al.*, 1991)

- immunoagglutination (Le Bail and

Breton, 1981)

- Rocket immunoelectrophoresis (เรียก
เกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิส) (Maitre, *et al.*, 1985; Giorgi,
1982; Mackay and Lazier, 1993)

- Radioimmunoassay (Idler, *et al.*,
1979; So, *et al.*, 1985; Sumpter, 1985; Copeland, *et al.*,
1986; Norberg and Haux, 1988; Benfey, *et al.*, 1989; Tyler
and Sumpter, 1990)

- Enzyme-linked immunosorbent assay
(ELISA) (Olin and Von der Decken, 1987; Pacoli, *et al.*,
1990; Kishida, *et al.*, 1992)

เทคนิคต่างๆ ที่ใช้วัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิค ต่างมีข้อได้
เปรียบเสียเปรียบ การใช้วิธีการวัดทางอ้อม เช่น วัดฟอสฟอรัสที่ไม่เสถียรต่อ
ด่าง (alkali-labile phosphorus) หรือฟอสโฟโปรตีน (phospho-
protein) ในพลาสมาเป็นกรณีหนึ่งของระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิคนั้น อาจได้
ค่าที่ไม่ถูกต้อง เพราะในเลือดปลาอาจมีโปรตีนที่จับกับฟอสเฟต แต่ไม่ได้เป็น
องค์ประกอบของไวเทลโลจีนิค (Campbell and Idler, 1980) การวัด
ปริมาณไวเทลโลจีนิคทางตรงด้วยวิธีร็อกเก็ต อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิส มีความ
จำเพาะสูง ความไวของการวัดอยู่ในระดับไมโครกรัม แต่อาจจะต่ำกว่าวิธี
homologous radioimmunoassay ซึ่งนับว่ามีความจำเพาะ ความไวใน
การวัด (ระดับนาโนกรัม) และความถูกต้องสูงกว่าวิธีอื่น ๆ แต่มีข้อเสียคือ
ต้องระวังในการใช้สารกัมมันตรังสี นอกจากนี้การติดตามไวเทลโลจีนิคหรือ
โปรตีนโพลีคของปลาบางชนิดด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นตัวตามรอย (tracer)
ทำได้ยากและไม่เสถียร (unstable) (Sumpter, 1985) เมื่อไม่นานมานี้
ได้มีการพัฒนาเทคนิค ELISA มาใช้วัดระดับไวเทลโลจีนิค ข้อดีของวิธีนี้คือไม่
ต้องใช้สารกัมมันตรังสี และยังมีข้อดีอื่น ๆ ใกล้เคียงกับวิธี radioimmuno-
assay แต่มีข้อเสียคือเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิธีนี้มีราคาแพง

จากรายงานการวัดระดับไวเทลโลจิ้นในพลาสมาของปลาชั้น Whitehead, *et al.* (1978) วัดระดับไวเทลโลจิ้นโดยวัดหาปริมาณฟอสโฟโปรตีนหรือโปรตีน ฟอสฟอรัสในซีรัมปลาเรนโบว์ เทราท์ พบว่าสามารถแยกเพศของปลาก่อนวางไข่ 4-5 เดือน และปลาเพศผู้ที่มีระดับฟอสโฟโปรตีนต่ำกว่าปลาเพศเมีย La Bail and Breton (1981) ใช้วิธี immunoagglutination โดยให้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้น ในการแยกเพศปลาชนิดเดียวกันนี้ได้ในระยะก่อนวางไข่ 8-9 เดือน และสามารถใช้นัยกปลาซลมอนในระยะของการสะสมโปรตีนโอล์คได้

Emmersen and Petersen (1976) วัดระดับไวเทลโลจิ้นโดยวัดหาปริมาณฟอสฟอรัสที่ไม่เสถียรต่อค่า พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง 5-180 ไมโครกรัม/มล. ในปลาเฟลันเดอร์ และ 0-1.1 มก./มล. ในปลาดุก (catfish) (Nath and Sundararaj, 1981)

Sullivan, *et al.* (1991) ใช้วิธี single radial immunodiffusion วัดระดับไวเทลโลจิ้นในพลาสมาในช่วง 4.5-180 ไมโครกรัม/มล. ในรอบปีการสืบพันธุ์ของปลา striped bass และตรวจไม่พบไวเทลโลจิ้นในพลาสมาปลาเพศเมียในช่วงหลังฤดูวางไข่ และในพลาสมาปลาเพศผู้

Ding, *et al.* (1989) วัดระดับไวเทลโลจิ้นในปลาเทราท์ โดยวิธีร็อกเก็ต อิมมูโนอิเล็กโตรฟอรีซิส พบว่าพลาสมาของปลาเพศผู้มีระดับไวเทลโลจิ้นต่ำมากและไม่พบไวเทลโลจิ้นในอวัยวะอื่น เช่นม้ามและกล้ามเนื้อ ส่วน Mackay and Lazier (1993) วัดระดับของไวเทลโลจิ้นในพลาสมาปลาเรนโบว์ เทราท์ โดยมีความไวของการวัดในระดับ 5 ไมโครกรัม/มล.

radioimmunoassay เป็นวิธีที่มีความไวในการวัดสูงกว่าวิธีร็อกเก็ต อิมมูโนอิเล็กโตรฟอรีซิส ได้ถูกนำมาใช้วัดระดับไวเทลโลจิ้นในพลาสมาของปลาแอตแลนติก แซลมอน (Atlantic salmon) ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน โดยใช้โปรตีนโอล์คที่แยกจากรังไข่เป็นแอน

ติเจน (antigen) เพื่อสังเคราะห์แอนติบอดี (antibody) และใช้เป็นสารมาตรฐานที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ^{131}I ได้ผลดังนี้ (Idler, *et al.*, 1979)

| ชนิด ของปลา | ไอเทลโลจีนิน (ไมโครกรัม/มล.) |
|-----------------|---------------------------------|
| Chinook salmon | 9.10 ± 0.77 |
| Chum salmon | 0.36 ± 10.77 |
| Coho salmon | 9.46 ± 12.83 |
| Pink salmon | 0.17 ± 0.17 |
| Sockeye salmon | 0.06 ± 0.08 |
| Rainbow trout | 129.44 ± 169.0 |
| Cutthroat trout | 1.96 ± 1.77 |

ต่อมา So, *et al.* (1985) ใช้ไอเทลโลจีนินที่แยกจากพลาสมาของปลาแอตแลนติก แซลมอน เพื่อพัฒนาวิธี homologous radio-immunoassay ซึ่งทำให้มีความจำเพาะ ความไวในการวัดและได้ค่าที่ถูกต้องสูงขึ้น Benfey, *et al.* (1989) ใช้วิธีเดียวกันวัดระดับไอเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาแซลมอนในระยะตกไข่หรือใกล้ตกไข่ ได้ผลดังนี้

| ระยะเวลาก่อนวางไข่ (เดือน) | ไอเทลโลจีนิน (ไมโครกรัม/มล.) |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1-2 | 6,016 ± 846 |
| 3-4 | 3,868 ± 146 |
| 4 | 1,385 ± 55 |
| 4-5 | 907 ± 58 |
| 14 | 5 ± 2 |

ส่วนการวัดระดับไวเทลโลจันินโดยวิธี ELISA เพิ่งมีการนำมาใช้ในช่วงเวลาไม่นานนัก แต่ก็ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงใกล้เคียงกับวิธี radioimmunoassay Pacoli, *et al.* (1990) วัดระดับการเปลี่ยนแปลงของไวเทลโลจันิน ในรอบปีการสืบพันธุ์ของปลาตุ๊กอัฟริกัน (African catfish) พบว่าระดับไวเทลโลจันินในพลาสมาเพิ่มขึ้นจนถึงพีคสูงสุด 30.2 มก./มล. ก่อนวางไข่ประมาณ 1 เดือน แล้วลดลงเหลือ 3.8 มก./มล. หลังจากวางไข่แล้ว

1.5.3 ระดับพลาสมาไวเทลโลจันินกับการพัฒนาของรังไข่

เป็นการยากที่จะเปรียบเทียบระดับไวเทลโลจันิน ที่ได้จากวิธีการวัดที่ต่างกัน แต่สามารถนำรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงระดับไวเทลโลจันิน ในเวลาต่างๆ ตลอดวงจรการสืบพันธุ์ (reproductive cycle) มาเปรียบเทียบกันได้ So, *et al.* (1985) วัดระดับของไวเทลโลจันินได้ต่ำถึง 12.5 นาโนกรัม/มล. ในปลาแอตแลนติก แซลมอนวัยรุ่นที่ยังไม่เจริญพันธุ์ ในปลาเพศเมียมีระดับไวเทลโลจันินในพลาสมาเพิ่มขึ้นจาก 0.12 มก./มล. ในช่วง 9 เดือน ก่อนวางไข่ จนถึงระดับ 21.6 มก./มล. ในช่วงระยะ 1 เดือน ก่อนวางไข่ ซึ่งคล้ายกับปลาเรนโบว์ เทราท์ (Idler and Campbell, 1980; Sumpter, 1985) และปลา pike (Goedmakers and Verboom, 1974) ในทำนองเดียวกัน ระดับพลาสมาไวเทลโลจันินปลาคอด เพิ่มขึ้นจาก 0.12 มก./มล. จนถึง 5.98 มก./มล. ในระยะ 4 เดือน ซึ่งเป็นช่วงที่ค่า GSI เพิ่มขึ้นจาก 0.8% เป็น 2.6% และโอโอไซท์ที่อยู่ในระยะสังเคราะห์โปรตีนโยลล์ภายใน และเริ่มสะสมไวเทลโลจันินจากภายนอกเซลล์ (Plack, *et al.*, 1971) นอกจากนี้พบว่าระดับพลาสมาไวเทลโลจันินยังเพิ่มควบคู่กับการเพิ่มของค่า GSI ยกเว้นในระยะ 1 เดือนก่อนวางไข่ ระดับไวเทลโลจันินเริ่มลดลงเรื่อยๆ ขณะที่ค่า GSI ยังคงเพิ่มสูงขึ้น อาจเป็นเพราะในระยะนี้การสังเคราะห์ไวเทลโลจันินในตับลดลง ปริมาณไวเทลโลจันินที่ถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือดจึงลดลงด้วยหรืออีกประการหนึ่งอาจเป็นเพราะฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมีระดับสูงขึ้นในระยะการพัฒนารังไข่สุดท้ายของโอโอไซท์ก่อนการตกไข่ ทำให้อัตราการรับไวเทลโลจันินเข้าสู่โอโอไซท์เพิ่มสูงขึ้น

ในปลาที่วางไข่ปีละครั้ง พบว่าระดับความเข้มข้นของไวเทลโลจินิกในพลาสมามีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

- แบบที่ 1 ไวเทลโลจินิกมีระดับเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดก่อนฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ หรือก่อนที่รังไข่จะมีขนาดใหญ่ที่สุด (GSI มีค่าสูงสุด) เพียง 1-2 เดือน หลังจากนั้นระดับไวเทลโลจินิกค่อย ๆ ลดลงก่อนวางไข่ และลดลงอย่างรวดเร็วหลังปลาวางไข่แล้ว เช่น ในปลาแอตแลนติก แฮลมอน ปลาเรนโบว์ เทราท์ และปลาดุกอัฟริกัน (MacKenzie, *et al.*, 1989)

- แบบที่ 2 ระดับไวเทลโลจินิกในพลาสมาค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงขีดสูงสุดก่อนการวางไข่เพียงไม่กี่วัน เป็นแบบที่พบในปลาดุกอัฟริกัน (Pacoli, *et al.*, 1990) ปลาเฟลันเดอร์ยุโรป (European flounder) (Petersen and Emmersen, 1977) ระดับพลาสมาไวเทลโลจินิกในปลาดุกอัฟริกันเริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 4 เดือนก่อนวางไข่ จนถึงระดับสูงสุดของขีด 2-3 วันก่อนวางไข่ ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 6 เท่าของระดับปกติ หลังจากปลาวางไข่ระดับไวเทลโลจินิกลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ยังคงตรวจพบไวเทลโลจินิกในพลาสมาตลอดช่วงระยะเวลาหลังวางไข่ไปแล้ว

Methven, *et al.* (1992) ศึกษาระดับไวเทลโลจินิกในรอบปีการสืบพันธุ์ในพลาสมาของปลาแอตแลนติก ฮาลิบัต (Atlantic halibut) พบว่าในช่วงฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ซึ่งเป็นเวลา 6 เดือน ปรากฏขีดของไวเทลโลจินิก 3 ขีด มีระดับไวเทลโลจินิกสูงสุด 36.5, 47.2 และ 56.0 มก./มล. ตามลำดับ การที่ระดับไวเทลโลจินิกมีค่ากว้างขึ้นลงเป็น 3 ขีดตลอดในฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ เป็นเพราะปลาฮาลิบัต เป็นปลาที่วางไข่เป็นชุด (batch spawner) สามารถตกไข่หลายชุดในช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์ครั้งหนึ่ง ซึ่งมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงระดับของไวเทลโลจินิกในรอบปี คล้ายคลึงกับของปลาทอง ปลาบราวน์ บูลเฮด (brown bullhead) และปลาคิลลิฟิช (killifish) (Kagawa, *et al.*, 1983; Burke, *et al.*, 1984; Kobayashi, *et al.*, 1988; Greeley, *et al.*, 1988) การที่ระดับพลาสมาไวเทลโลจินิกมีหลายขีดแสดงถึงพัฒนาการของไข่แต่ละชุด ไข่ชุดหนึ่ง

กำลังพัฒนาอยู่ในระยะสะสมโปรตีนโยล์ค ในขณะที่ไข่ชุดอื่นอยู่ในระยะพัฒนาขั้นสูงสุดท้ายและการที่ค่าสูงสุดของแต่ละฟีด มีระดับสูงขึ้นเรื่อย ๆ อาจเป็นเพราะไข่ที่กำลังสะสมโยล์คมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ ดังนั้นความสามารถในการรับไวเทลโลจีนินจากกระแสเลือดเข้าไปสู่ไข่จึงน้อยลงทำให้มีระดับไวเทลโลจีนินในเลือดสูงขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนเอสตราไดโอดต่อการสังเคราะห์พลาสมาไวเทลโลจีนินในปลากระรัง
2. เพื่อทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลากระรังและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์
3. เพื่อศึกษาพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่และรังไข่ปลากระรัง
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพลาสมาไวเทลโลจีนินกับการพัฒนาของรังไข่ปลากระรัง
5. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพลาสมาไวเทลโลจีนินกับน้ำหนักรังไข่ปลากระรัง

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

ปลาตัวอย่าง

ปลาที่ใช้ในการศึกษา คือปลากะรังปากแม่น้ำ (grouper) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Epinephelus malabaricus* เป็นปลาที่มีขนาดลำตัวยาว 25-30 เซนติเมตร น้ำหนัก 1-3 กิโลกรัม อายุ 1-3 ปี เลี้ยงในกระชัง ที่เกาะหนู จ.สงขลา ปลาเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มชีววิทยาการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ.สงขลา กรมประมง

ปลากะเลอื่น ๆ ที่ใช้คือ ปลากะพงขาว (giant seaperch, *Lates calcarifer*) ปลากะพงแดง (red snapper, *Lutjanus malabaricus*) ปลากระบอก (mullet, *Liza subviridis*) และปลาเท็ดโคน (sand whiting, *Sillago sihama*)

ปลาน้ำจืดที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ปลาสาวย (striped catfish, *Pangasius sutchi*) ปลานิล (tilapia, *Oreochromis niloticus*) ปลาช่อน (striped snake-head fish, *Channa striatus*) ปลาตะเพียน (common silver barb, *Puntius gonionotus*) และปลาดุกอุย (walking catfish, *Clarias macrocephalus*)

กระต่าย

กระต่ายที่ใช้เลี้ยงเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาวเพศผู้ ตาแดง 2 ตัว น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในหน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซึ่งจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

จากบริษัท Ajax chemicals ได้แก่ Citric acid

จากบริษัท Amersham ได้แก่ L-[4,5 ³H] Leucine, และ [³²P] Carrier-free orthophosphate

จากบริษัท Difco Laboratories ได้แก่ Freund's adjuvant complete, Freund's adjuvant incomplete และ Heparin

จากบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A. ได้แก่ Sodium metabisulphite, Ammonium persulphate, Glycerol และ Trichloroacetic acid

จากบริษัท Fluka ได้แก่ Ammonium sulphate, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ethylenediaminetetraacetic acid และ Glycine

จากบริษัท Hopkin & Williams ได้แก่ Toluene และ Xylene

จากบริษัท Merck ได้แก่ Acetic acid, Acrylamide, Bromophenol blue, Bisacrylamide (N,N' Methylene diacrylamide), Disodium hydrogenphosphate, Folin-Ciocalteus phenol reagent, Hydrogen peroxide, β -Mercaptoethanol, Sodium dihydrogenphosphate และ N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

จากบริษัท Sigma ได้แก่ Bovine serum albumin, DEAE-Sephacel, Agarose, 2,5-Diphenyloxazole, Sephadex G-150, 1,4 Bis [2-(5-phenyloxazolyl)]benzene, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Triton X-100 และ Triton X-114

และจากบริษัท Serva ได้แก่ 17 β -Estradiol

อุปกรณ์

Deep-freeze refrigerator ของ Scientemp., Centrifuge ของ Beckman รุ่น TJ-b, Refrigerated super speed centrifuge ของ Beckman รุ่น JA-20, Serofuge centrifuge ของ Clay Adam, UV-Vis spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น 160A, Liquid scintillation counter ของ Beckman, Micropipette ของ Finn, Slab gel electrophoresis apparatus ของ Hoefer Scientific Instruments, Automatic fraction collector ของ Gilson รุ่น 202, Microtube pump MP-3 ของ Eylea, Laboratory Oven รุ่น LR 270 ของ The Grieve corporation, Vortex ของ Scientific Industries, เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น P 1210 ของ Mettler, เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น H-10 ของ Mettler และ pH meter รุ่น PHM b1 ของ Radiometer Copenhagen, Picotag work station ของ Waters Co. Ltd. และ Beckman's system 6300 amino acid analyser

วิธีการ

2.1 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1951) นำสารตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% CuSO_4 อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมสารละลายฟอลิน-ฟีนอล (Folin-phenol reagent, Folin : น้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1) 0.3 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณ

หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน ที่มีโบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

หาปริมาณโปรตีนของสารละลายที่เก็บจากคอลัมน์ โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

2.2 การหาปริมาณกัมมันตภาพรังสี

หาปริมาณกัมมันตภาพรังสีของสารตัวอย่าง ปริมาตร 5-50 ไมโครลิตร ในสารผสมแสงวับ (scintillation cocktail) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.3% PPO, 0.02% POPOP และ 25% Triton X-114 ในไซลีน (xylene) โดยใช้เครื่อง liquid scintillation counter ตามวิธีของ Anderson and Maclure (1973)

2.3 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสารตัวอย่าง ตามวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริก (phenol-sulphuric acid) ของ Dubois, *et al.* (1956) โดยนำสารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 5% ฟีนอล 0.3 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 484 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสารตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานที่มีกลูโคส หรือ แมนโนสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน

2.4 การหาปริมาณคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์

หาปริมาณคอเลสเทอรอลของสารตัวอย่างโดยเอนไซม์ cholesterol oxidase และเอนไซม์ peroxidase ตามวิธีการของบริษัทแรพพอก จำกัด (ประเทศไทย) ดังนี้ นำสารตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร เติมสารผสมปฏิกิริยาที่เตรียมใหม่ 2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ cholesterol oxidase, peroxidase, 4-aminoantipyrine และฟีนอล ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

(phosphate buffer) pH 7.0 คนให้เข้ากัน อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณคอเลสเทอรอลโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของคอเลสเทอรอล ซึ่งทำในทำนองเดียวกัน

หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์โดยวิธี glycerol-3-phosphate oxidase ตามวิธีของบริษัท Medical Marketing Service GMBH (ประเทศเยอรมันนี) ดังนี้ ใช้สารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เติมสารผสมปฏิกิริยา (1,500 U/l glycerol-3-phosphate oxidase, 150 U/ml lipase, 500 U/l peroxidase, 400 U/l glycerol kinase, 1 mM ATP, 0.5 mM 4-aminoantipyrine, 6 mM 4-chlorophenol, และ 5 mM $MgCl_2$ ใน PIPES buffer, pH 7.5) 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของไตรกลีเซอไรด์ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

2.5 การหาค่าประกอบกรดอะมิโน

หาค่าประกอบกรดอะมิโนของไวเทลโลเจนนินบริสุทธิ์ ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) โดย 6 M HCl ที่ 110°C นาน 20 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง picotag work station (Waters Co. Ltd.) หลังการไฮโดรไลซ์ ทำให้สารตัวอย่างแห้ง แล้วละลายในบัฟเฟอร์เจือจางตัวอย่าง Na-S (Na-S sample dilution buffer ของบริษัท Beckman) แล้ววิเคราะห์ต่อด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Beckman's system 6300 amino acid analyser)

ในการวิเคราะห์หากกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) ทำการไฮโดรไลซ์สารตัวอย่างด้วย 4 M methanesulphonic acid 20 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ที่ 110°C นาน 20 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ต่อด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน สำหรับการวิเคราะห์หากกรดอะมิโนซีสเต

อื่น (cysteine) ออกซิไดซ์ (oxidise) สารตัวอย่างก่อนการไฮโดรไลซ์ ด้วยกรดเปอร์ฟอร์มิก (performic acid) โดยการผสมกับ 99% กรดเปอร์ฟอร์มิกและ 35% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) (อัตราส่วน 19 : 1) ที่ 22°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรดเปอร์ฟอร์มิก 10 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 22°C นาน 30 นาที ก่อนทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ แล้วไฮโดรไลซ์ต่อด้วย 6 M HCl และทำการวิเคราะห์ต่อตามวิธีการข้างบน

2.6 การทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)

2.6.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล

โพลีอะคริลาไมด์ เจล ที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 x 12 เซนติเมตรหนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วย เจล 2 ส่วน คือเจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร เตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

| | Stacking gel | | Separating gel | |
|--------------------------------------|--------------|------------|----------------|--|
| | 3%(5 ml) | 4%(3 ml) | 10%(3 ml) | |
| 30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide | 0.50 ml | 0.40 ml | 1.00 ml | |
| 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 | 0.63 ml | - | - | |
| 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 | - | 1.50 ml | 1.50 ml | |
| 10% Ammonium persulphate | 50 μ l | 30 μ l | 30 μ l | |
| TEMED | 5 μ l | 3 μ l | 3 μ l | |
| น้ำกลั่น | 3.82 ml | 1.07 ml | 0.47 ml | |

2.6.2 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

ผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% glycerol, 8 mM EDTA และ 0.4% โบรโมเฟีนอล บลู (bromophenol blue) ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะ เตรียมโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีเดียวกัน

2.6.3 การทำอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (จากข้อ 2.6.2) ใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ที่ 20 mA นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมเฟีนอล บลู เคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 0.5 เซนติเมตร ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.6.4 การย้อมสีโปรตีน

ย้อมสีโปรตีนในเจลแผ่นด้วย สีคูมาซี บลู (Coomassie brilliant blue R-250) แช่เจลในสารละลาย 0.02% คูมาซี บลู- 50% เมทานอล (methanol)-7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 50% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วยสารละลาย 5% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

2.7 การเตรียมพลาสมา

2.7.1 การฉีดปลาด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล

ฉีดกระตุ้นให้ปลากะรังสังเคราะห์ไวเทลโลเจนนินด้วย 17 β -เอสตราไดออล ผสมฮอร์โมน 300 ไมโครลิตร ซึ่งละลายอยู่ใน 95% เอทานอลกับน้ำเกลือ (0.85% NaCl) 700 ไมโครลิตร จนเข้ากันดี แล้วนำไปฉีดปลา (น้ำหนักประมาณ 1.5 กิโลกรัม) บริเวณกล้ามเนื้อเหนือเส้นข้างตัว โดยใช้ฮอร์โมน 2.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทำการฉีดทุก 3 วัน

จำนวน 2 ครั้ง เก็บเลือดทุกครั้งก่อนฉีดปลาแต่ละครั้ง เพื่อนำไปวัดหาปริมาณ ไวเทลโลจีนิในพลาสมา

2.7.2 การฉีดปลาด้วย ^3H -Leucine และ ^{32}P -Orthophosphate

หลังการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลครั้งที่ 2 เรียบร้อยแล้ว 3 วัน นำ ^3H -leucine 0.3 mCi และ/หรือ ^{32}P -carrier free orthophosphate 0.4 mCi ซึ่งผสมกับ PBS, pH 7.5 (5 mM phosphate buffer, pH 7.5-0.85% NaCl) จนมีปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ไปฉีดปลาที่บริเวณกล้ามเนื้อเหนือเส้นข้างตัว จากนั้นเก็บเลือดจากบริเวณเหงือกของปลาหลังการฉีดสารกัมมันตรังสี 24 ชั่วโมง นำไปเตรียมพลาสมา (ตามข้อ 2.7.3)

2.7.3 การเตรียมพลาสมาจากปลา

ทำให้ปลาสลบในน้ำที่ผสมด้วยควินาดีน (quinadine) เข้มข้น 5-10 ppm เจาะเลือดจากเส้นเลือดใหญ่บริเวณเหงือก โดยใช้เฮพาริน (heparin) เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำเลือดไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว $1,250 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ผสมพลาสมากับ 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) แล้วเก็บไว้ที่ -20°C

2.8 การทำให้ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จากพลาสมา

ทำให้ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ จากพลาสมาของปลาที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลและ ^3H -leucine หรือ ^{32}P -orthophosphate ตามวิธีของไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537) ดังนี้

2.8.1 คอลัมน์ DEAE-Sephacel

หลังการเตรียม DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ (2.6 X 15 เซนติเมตร มีปริมาตรของเรซินในคอลัมน์เป็น 80 มิลลิลิตร) เรียบร้อยแล้วล้างคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วย 0.2 M sodium citrate-0.2% Triton X-100 แล้วปรับให้คอลัมน์สมดุล (equilibrate) ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (Wallace, 1965)

เติมพลาสมาที่ได้จากการฉีดฮอร์โมนและสารกัมมันตรังสี 6 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาตลอดละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (O.D.₂₈₀) ล้างคอลัมน์จนมีค่า O.D.₂₈₀ เป็นศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มความเข้มข้นแบบต่อเนื่องจาก 0-0.35 M (250 มิลลิลิตร + 250 มิลลิลิตร) ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ด้วยอัตราไหลและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม

วัดค่า O.D.₂₈₀ และปริมาณกัมมันตภาพรังสีของสารละลายแต่ละหลอด รวมสารละลายหลอดที่มีปริมาณกัมมันตภาพรังสีสูงของพีคสุดท้าย (พีค D4) เข้าด้วยกัน ทำให้สารละลายรวมเข้มข้นในถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) โดยให้ CM-cellulose ครอบรอบถุงไดอะไลซิส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนปริมาตรของสารละลายในถุงเหลือเพียงเล็กน้อย ทำการแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150

2.8.2 คอลัมน์ Sephadex G-150

ล้างและปรับคอลัมน์ Sephadex G-150 (1.1 X 75 เซนติเมตร) ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 72 มิลลิลิตร ให้สมดุลด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ไดอะไลซิส (dialyse) สารละลายเข้มข้นของพีค D4 ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel (จากข้อ 2.8.1) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4°C จากนั้นผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-150 ปรับให้มีอัตราไหล 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายตลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า O.D.₂₈₀ และหาปริมาณกัมมันตภาพรังสี รวมสารละลายหลอดที่มีปริมาณกัมมันตภาพรังสีสูงของพีคแรก (พีค S1) ซึ่งเป็นไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose ทำนองเดียวกับข้อ 2.8.1

2.9 การเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

2.9.1 การเตรียมซีรัมกระต่าย

นำไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ซึ่งเตรียมได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 (ข้อ 2.8.2) ไปฉีดกระต่ายขาว ตาแดง บริเวณใต้ผิวหนัง 4-5 จุด ดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 ฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร 2 สัปดาห์ถัดมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 สัปดาห์ต่อมาฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม

ก่อนการฉีดไวเทลโลจีนินแต่ละครั้ง และหลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดบริเวณหู ตั้งให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิ 4°C นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 X g ที่ 4°C นาน 15 นาที เก็บซีรัม (serum) ไว้ที่ -20°C เพื่อให้ทดสอบแอนติบอดี

2.9.2 การแยกแอนติบอดี

เก็บเลือดจากกระต่ายจำนวนมาก หลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ นำไปเตรียมซีรัม แล้วแยกแอนติบอดีจากซีรัมโปรตีนอื่นตามวิธีของ Warden and Giese (1984) โดยการตกตะกอนโปรตีนจากซีรัมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) ที่ความอิ่มตัว 50% หนึ่งคืน จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 22,600 X g นาน 30 นาที ที่ 4°C ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 แล้วไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน 1 คืน นำสารละลายที่ได้ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.6 X 12.5 เซนติเมตร) ที่ปรับให้สมดุลก่อนด้วย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร รวมสารละลายของพีคแรกซึ่งเป็นแอนติบอดี (Warden and Giese, 1984) เข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose แล้วทดสอบการเป็นแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินโดยวิธี double immunodiffusion ตามวิธีในข้อ 2.9.3

2.9.3 การทำ Double immunodiffusion

ทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ด้วยวิธี double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1956) ดังนี้
 เทก 0.3% อะกาโรส (agarose) ใน 0.85% NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ (slide) ทิ้งให้อะกาโรสแห้งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่ 80°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเท 1.5% อะกาโรส ใน 0.85% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์แผ่นเดิม ทิ้งให้เย็น เจาะอะกาโรสให้เป็น หลุม เติมแอนติบอดีหรือซีรัมของกระต่ายที่ได้รับการฉีดแอนติเจน (เช่นฉีดไว เทลโลจันนิน ครบ 6 สัปดาห์) ในหลุมกลาง หลุมข้างรอบๆ เติมแอนติเจนหรือ สารตัวอย่างอื่น ๆ แล้วเก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นที่ 4°C ค้างคืน ถ้ามีปฏิกิริยา ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเกิดขึ้น จะเห็นแถบการตกตะกอน (precipitin band) ของแอนติเจนและแอนติบอดีระหว่างหลุมที่ใส่แอนติบอดีหรือซีรัม กับหลุมที่ใส่แอนติเจน เพื่อให้เห็นแถบการตกตะกอนนี้ชัดเจน แช่สไลด์ในน้ำ เกลือ 48 ชั่วโมง โดยการเปลี่ยนน้ำเกลือบ่อย ๆ แล้วย้อมสไลด์ด้วยสีคумаซี บลู (0.02% คумаซี บลู-50% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม) นาน 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 5% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม

2.9.4 การทดสอบการมีแอนติบอดี

ทดสอบการมีแอนติบอดีในซีรัมกระต่าย ที่ได้รับการฉีดไว เทลโลจันนิน ด้วยวิธี double immunodiffusion ตามวิธีข้อ 2.9.3 ถ้ามีแอนติบอดีในซีรัมกระต่าย จะเห็นแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมกับหลุมที่ใส่ไว เทลโลจันนิน ซึ่งย้อมติดสีคумаซี บลู ชุดควบคุมของการทดลองได้จากการ ใช้ซีรัมของกระต่ายก่อนการฉีดไว เทลโลจันนินแทน

2.10 การทำรีดอกเกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอรีซิส

(Rocket immunoelectrophoresis)

ทำรีดอกเกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอรีซิสโดยดัดแปลงวิธีของ Yano (1987)

2.10.1 การเตรียมอะกาโรส เจล

นำ 1% อะกาโรส ใน 0.85% NaCl ซึ่งทำให้หลอมเหลวที่ 80°C ไปผสมกับแอนติบอดี 2% แล้วเทลงบนแผ่นแก้ว ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เจาะหลุมใส่สารตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

2.10.2 การเตรียมสารตัวอย่างและไวเทลโลจีนินมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ซึ่งใช้เป็นไวเทลโลจีนินมาตรฐาน โดยการผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4 mM EDTA และ 0.2% โบรโมฟินอล บลู) ในอัตราส่วน 1 : 1

2.10.3 การทำอิเล็กโตรฟอรีซิส

หยอดสารตัวอย่างลงในหลุมใส่ตัวอย่าง หลุมละ 5 ไมโครลิตร และหยอดไวเทลโลจีนินมาตรฐาน ในแต่ละหลุมให้มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กัน ใช้ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโตรฟอรีซิส จากนั้นเปิดกระแสไฟแรงที่ 50 โวลต์ หลังจากครบ 12 ชั่วโมง ปิดไฟ แล้วนำแผ่นอะกาโรสแช่ในสีย้อม 0.02% คูมาซี บลู นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 5% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบการตกตะกอนของโปรตีนชัดเจน

2.11 การหาปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลาในรอบปี

ปลาที่ใช้ในการศึกษาเป็นปลากะรังเพศเมีย ซึ่งเลี้ยงไว้ในกระชังที่เกาะหนู จังหวัดสงขลา มีอายุประมาณ 3-5 ปี มีน้ำหนักประมาณ 3-6 กิโลกรัม ทำการสุ่มปลาตัวอย่างดังกล่าวทุกเดือน เดือนละ 3 ตัว จนครบ 1 ปี ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2536 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2537 ในแต่ละครั้งนำปลาตัวอย่างมาชั่งน้ำหนักและเก็บเลือดบริเวณเส้นเลือดใหญ่ที่เหงือก แล้วนำเลือดไปเซนต์ริฟัจที่ 1, 250 x g นาน 15 นาที ที่ 4°C เก็บพลาสมาที่ -40°C จากนั้นจึงนำพลาสมาปลาทั้งหมด ไปวิเคราะห์หาปริมาณไวเทลโลจีนินในแต่ละพลาสมาตัวอย่าง โดยวิธีรีอกเกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอรีซิสตามข้อ 2.10

2.12 การหาค่าดัชนีการสืบพันธุ์

หาค่าดัชนีการสืบพันธุ์ของปลากระรังเพศเมีย ที่สุ่มตัวอย่างจากข้อ

2.11 ตามวิธีของ Hoar (1969) ได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ค่าดัชนีการสืบพันธุ์} = \frac{\text{น้ำหนักของรังไข่ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวปลา (กรัม)}} \times 100$$

2.13 การศึกษาพัฒนาการของรังไข่ปลากระรังในรอบปี

ศึกษาพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ โดยศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อภายในรังไข่ด้วยวิธีเนื้อเยื่อวิทยา (histology) ทำโดยเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟฟิน (paraffin) ตัดแปลงวิธีของ Humason (1979) นำรังไข่สดของปลาแช่ในน้ำยา Bouin fixative นาน 24 ชั่วโมง แล้วตัดรังไข่เป็นชิ้นตามขวางหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร นำไปผ่านชั้นตอนต่าง ๆ ตามลำดับ ดังนี้

- | | |
|---|-------------|
| 1. แอลกอฮอล์ 70% | 24 ชั่วโมง |
| 2. แอลกอฮอล์ 90% | 6 ชั่วโมง |
| 3. แอลกอฮอล์ 95% ครั้งที่ 1 | 4 ชั่วโมง |
| 4. แอลกอฮอล์ 95% ครั้งที่ 2 | ค้างคืน |
| 5. แอลกอฮอล์ 95% + แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (1:1) | 2 ชั่วโมง |
| 6. แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ | 2 ชั่วโมง |
| 7. แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ + ไซลีน (1:1) | 1 ชั่วโมง |
| 8. ไซลีน ครั้งที่ 1 | 1 ชั่วโมง |
| 9. ไซลีน ครั้งที่ 2 | 0.5 ชั่วโมง |
| 10. พาราฟฟิน ครั้งที่ 1 | 0.5 ชั่วโมง |
| 11. พาราฟฟิน ครั้งที่ 2 | 1 ชั่วโมง |

หลังจากนั้นนำชิ้นรังไข่ไปฝัง (embed) ในพาราฟฟิน แล้วตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนา 4-8 ไมครอน วางบน

แผ่นสไลด์ นำไปอุ่นที่ 60°C แล้วย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin ตามวิธีของ Humason (1979) ทำเป็นสไลด์ถาวรเพื่อนำไปศึกษาเนื้อเยื่อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แยกระยะพัฒนาการของไข่ที่ปรากฏอยู่ภายในรังไข่นั้น และระยะพัฒนาการของรังไข่ตามวิธีของ Yamamoto (1956) และ Groman (1982)

2.14 การหาปริมาณไวเทลโลจีนิในพลาสมาของปลาที่มีน้ำหนักต่าง ๆ

ทำการเก็บเลือดปลากระมังที่มีน้ำหนักตั้งแต่ 0.5-12 กิโลกรัม น้ำหนักละ 2-3 ตัว ในเดือนกันยายน 2536 ซึ่งเป็นฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ นำเลือดของปลาแต่ละตัวไปเซนต์ริฟิวจ์เพื่อเตรียมพลาสมา ตามวิธีการในข้อ 2.7.3 แล้วนำพลาสมาเหล่านี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไวเทลโลจีนิโดยวิธีร็อกเก็ต อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิส

2.15 การเตรียมสารสกัดจากเนื้อเยื่อของปลา

2.15.1 สารสกัดรังไข่

นำรังไข่ปลาหนัก 5 กรัม บดละเอียดใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านผ้าก๊อชหนา 8 ชั้น นำสารละลายใส่ไปเซนต์ริฟิวจ์ที่ 22,600 X g ที่ 4°C นาน 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดรังไข่ไว้ที่ -70°C

2.15.2 สารสกัดจากตับ หัวใจและกล้ามเนื้อ

นำเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ประมาณ 5 กรัม บดละเอียดใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 1 คืนที่ 4°C แล้วกรองผ่านผ้าก๊อช นำสารละลายใส่ไปเซนต์ริฟิวจ์ที่ 22,600 X g ที่ 4°C นาน 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดเนื้อเยื่อไว้ที่ -70°C

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล

จากการฉีดปลากระชังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (ขนาด 1-1.5 กิโลกรัม) ด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล ในปริมาณ 2.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาก่อนและหลังการฉีดฮอร์โมนแต่ละครั้ง พบว่าพลาสมาของปลาก่อนฉีดฮอร์โมนมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 49.6 ± 0.6 มก./มล. แล้วเพิ่มขึ้นเป็น 116.7 ± 5.2 , 170.0 ± 3.6 และ 200.2 ± 2.9 มก./มล. หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ไม่พบปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาก่อนฉีดฮอร์โมน ไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1, 2 และ 3 มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 55.0 ± 1.3 , 106.4 ± 1.2 และ 115.2 ± 1.5 มก./มล. ตามลำดับ ในขณะที่พลาสมาของปลาชุดควบคุมซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างคงที่และไม่พบไวเทลโลจีนินในพลาสมาตลอดการฉีดน้ำเกลือทั้ง 3 ครั้ง (รูปที่ 2 และ ตารางที่ 3)

การฉีดปลาด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล จำนวน 2 ครั้ง มีผลทำให้ปริมาณคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาเพิ่มขึ้นเช่นกัน คือมีปริมาณคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาก่อนการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล เป็น 26.1 ± 2.6 และ 21.8 ± 10.8 ไมโครกรัม/มล. โปรตีนตามลำดับ และมีปริมาณในพลาสมาหลังฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล เป็น 34.9 ± 3.1 และ 73.9 ± 2.4 ไมโครกรัม/มล. โปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 2 การทำรีอกเกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิสของพลาสมาปลาที่ฉีด
ฮอร์โมนเอสตราไดออล

หลุมที่ 1 พลาสมาปลาก่อนฉีดฮอร์โมน

หลุมที่ 2 พลาสมาปลาหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1

หลุมที่ 3 พลาสมาปลาหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2

หลุมที่ 4 พลาสมาปลาหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 3

ปริมาณพลาสมาในแต่ละหลุมเท่ากัน หลุมละ 0.5 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดโอดลต่อความเข้มข้นของโปรตีน
และไวเทลโลเจนนินในปลาสม

| | โปรตีน (มก./มล.) | ไวเทลโลเจนนิน (มก./มล.) |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------------|
| ปลาที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85 % | | |
| ก่อนฉีด | 44.2 ± 1.0 | 0 |
| หลังการฉีดครั้งที่ 1 | 45.2 ± 2.8 | 0 |
| หลังการฉีดครั้งที่ 2 | 46.4 ± 1.0 | 0 |
| หลังการฉีดครั้งที่ 3 | 43.5 ± 1.1 | 0 |
| ปลาที่ฉีดฮอร์โมน 17β-เอสตราไดโอดล | | |
| ก่อนฉีด | 49.6 ± 0.6 | 0 |
| หลังการฉีดครั้งที่ 1 | 116.7 ± 5.2 | 55.0 ± 1.3 |
| หลังการฉีดครั้งที่ 2 | 170.0 ± 3.6 | 106.4 ± 1.2 |
| หลังการฉีดครั้งที่ 3 | 200.2 ± 2.9 | 115.2 ± 1.5 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

ตารางที่ 4 ปริมาณคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา

| | คอเลสเตอรอล | ไตรกลีเซอไรด์ |
|---|------------------------|---------------|
| | (ไมโครกรัม/มก. โปรตีน) | |
| พลาสมาก่อนฉีด 17β- เอสตราไดออล | 26.1 ± 2.6 | 21.8 ± 10.8 |
| พลาสมาหลังฉีด 17β- เอสตราไดออล 2 ครั้ง | 34.9 ± 3.1 | 73.9 ± 2.4 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

3.2 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

3.2.1 จากพลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลและ

^3H -Leucine

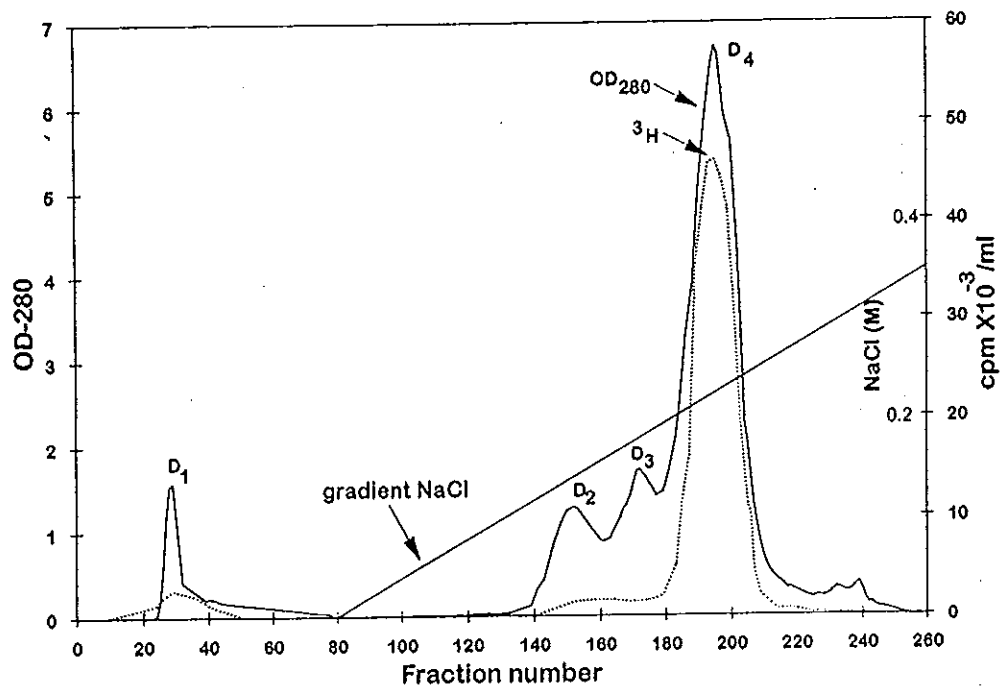
ผลจากการฉีดกระตุ้นปลากระชังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ มีน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล ในปริมาณ 2.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จำนวน 2 ครั้ง ตามด้วยการฉีด ^3H -leucine 0.3 mCi เพื่อให้เข้าไปติดฉลากไวเทลโลจีนินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ ปรากฏว่ามีปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ ^3H อยู่ในพลาสมา 1,608 cpm/มก. โพรตีน (ตารางที่ 5) เมื่อแยกพลาสมา 7 มิลลิลิตร ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์จะหลุดออกมาเป็นพีคแรก (D1) ซึ่งพบสารกัมมันตรังสีในพีคนี้น้อยมาก (รูปที่ 3) เมื่อชะคอลัมน์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ที่เพิ่มความเข้มข้นแบบต่อเนื่อง 0-0.35 M จะมีโปรตีนถูกชะออกมา 3 พีค คือ พีค D2, D3 และ D4 พีคสุดท้าย (D4) ซึ่งถูกชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.25 M เป็นพีคที่มีปริมาณโปรตีนและกัมมันตภาพรังสีมากที่สุดคือ 510 มิลลิกรัมและ 1,237,000 cpm ตามลำดับ คิดเป็นโปรตีน 46.7% และ ^3H 70.5% ของพลาสมาเริ่มต้น (ตารางที่ 5 และรูปที่ 3)

เมื่อนำสารละลายรวมจากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel ทำให้เข้มข้น แล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 จะได้โปรตีนออกมา 3 พีค พีคแรก (S1) มีปริมาณโปรตีนและมีกัมมันตภาพรังสีของ ^3H ปริมาณมาก คือมีโปรตีน 218 มิลลิกรัม และ ^3H 982,000 cpm คิดเป็น 20.0% และ 56.0% ของสารเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 5) พีคที่ 2 (S2) และ 3 (S3) มีปริมาณโปรตีนอยู่น้อยมากและไม่มีปริมาณกัมมันตภาพรังสี ดังแสดงในรูปที่ 4 ไวเทลโลจีนินในพีค S1 ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์ของค่ากัมมันตภาพรังสีของ ^3H เพิ่มขึ้น 2.8 เท่าของพลาสมาเริ่มต้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลและ ^3H -Leucine

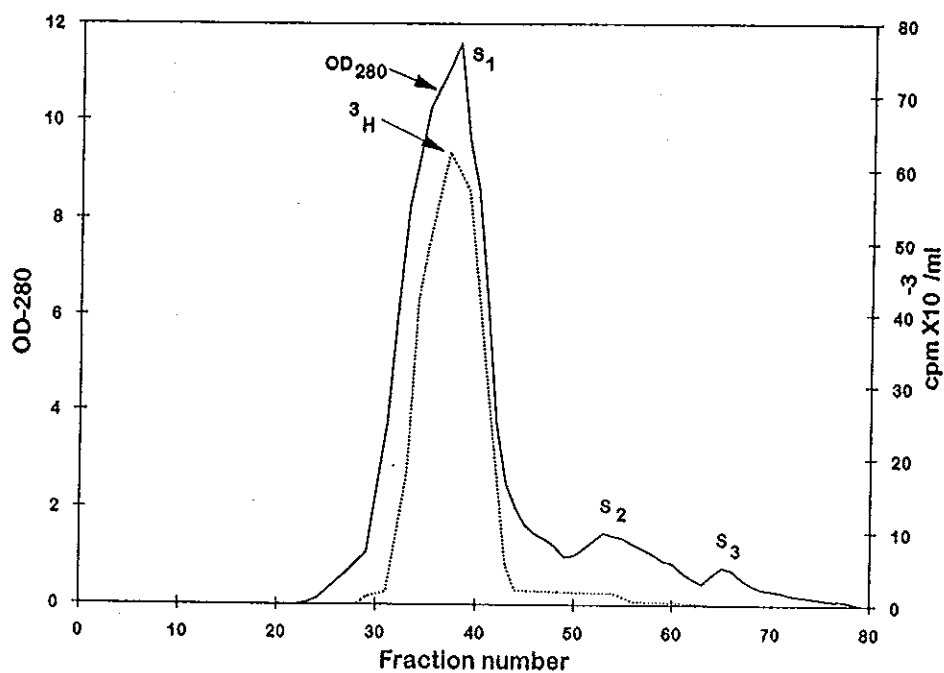
| | โปรตีน | | ^3H | | | |
|------------------------------------|--------|-------|---------------------|--------|-------|---------------------|
| | มก. | % | cpmX10 ³ | cpm/mg | % | ความบริสุทธิ์(เท่า) |
| พลาสมา | 1,091 | 100.0 | 1,754 | 1,608 | 100.0 | 1.0 |
| คอลัมน์ DEAE- Sephacel (พีค D4) | 510 | 46.7 | 1,237 | 2,425 | 70.5 | 1.5 |
| คอลัมน์ Sephadex G-150 (พีค S1) | 218 | 20.0 | 982 | 4,504 | 56.0 | 2.8 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง



รูปที่ 3 การทำให้ไวเทลโลจีนีนบริสุทธิ์จากพลาสมาปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล และ ^3H -Leucine ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

แยกไวเทลโลจีนีนจากพลาสมา 7 มล. โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.6 X 18 ซม.) ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF จน O.D.₂₈₀ เป็นศูนย์ แล้วชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่อเนื่องจาก 0-0.35 M (250 มล.+ 250 มล.) ด้วยอัตราไหล 15 มล./ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มล.



รูปที่ 4 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel (รูปที่ 3) ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150

แยกพีค D4 2.5 มล. (255 ไมโครกรัม) จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel รูปที่ 3 ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 (1.2 X 80 ซม.) แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 5 มล./ชั่วโมง จน O.D.₂₈₀ เป็นศูนย์ เก็บสารละลายหลอดละ 1 มล.

3.2.2 จากพลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลและ ^{32}P -Orthophosphate

ในการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมา 22 มิลลิลิตร ของปลาที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล และ ^{32}P -orthophosphate 0.4 mCi ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่า โปรตีนและสารกัมมันตรังสี ^{32}P ถูกชะออกมามีแบบแผนเกี่ยวกับการแยกในข้อ 3.2.1 ซึ่งจะได้โปรตีนพีค D4 มีปริมาณโปรตีน 2,398 มิลลิกรัม และกัมมันตภาพรังสี ^{32}P 54,528,000 cpm คิดเป็นโปรตีน 72.2% และ ^{32}P 92.9% ของพลาสมาเริ่มต้น (ตารางที่ 6 และรูปที่ 5) เมื่อนำสารละลายรวมจากพีค D4 นี้ไปทำให้เข้มข้น ไดเออไลซ์ และแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 (รูปที่ 6) จะได้โปรตีนพีค S1 ซึ่งมีโปรตีน 723 มิลลิกรัม และ ^{32}P 28,533,000 cpm คิดเป็นโปรตีน 21.8% และ ^{32}P 48.6% ของสารเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 6 ไวเทลโลจีนินในพีค S1 ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์ของค่ากัมมันตภาพรังสีของ ^{32}P เพิ่มขึ้นจาก 17,676 cpm/มก. โปรตีน เป็น 22,742 และ 39,488 cpm/มก. โปรตีน ตามลำดับ หรือคิดเป็น 1.3 และ 2.2 เท่าของพลาสมาเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

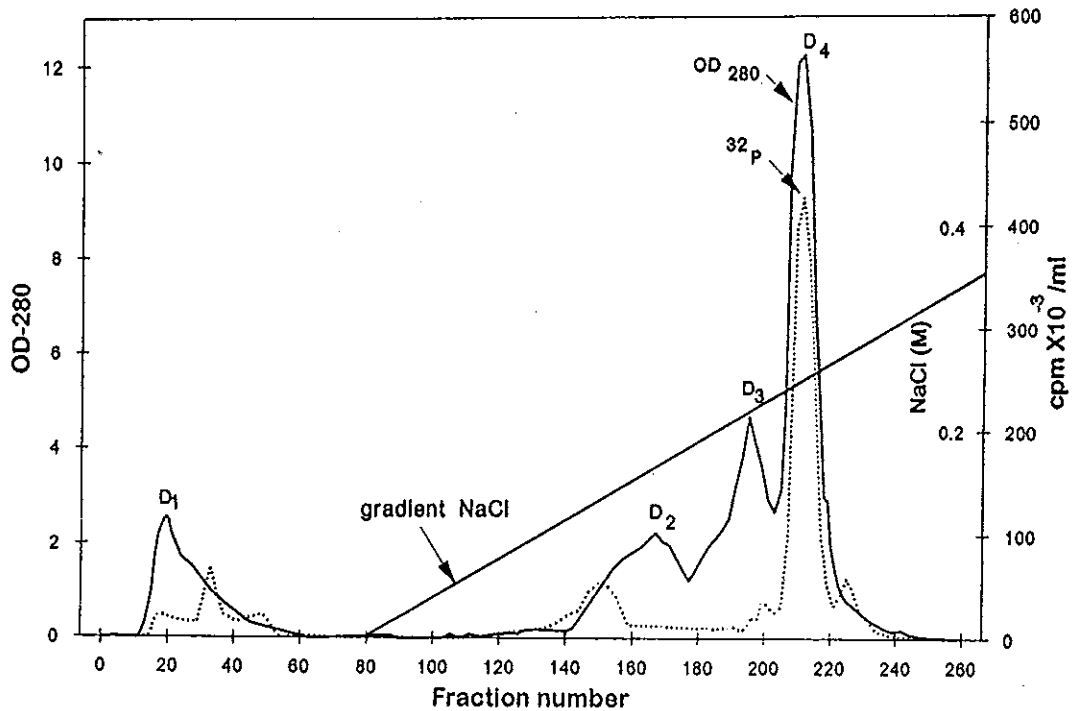
3.2.3 จากพลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล

พลาสมา (1,016 มิลลิกรัม) ของปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดออล 2 ครั้ง แต่ไม่ฉีดสารกัมมันตรังสี เมื่อผ่านการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-150 จะมีแบบแผนการชะของโปรตีนจากคอลัมน์ทั้งสองในทำนองเกี่ยวกับการแยกในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 จากการแยกโดยสองคอลัมน์นี้ตามลำดับ คงเหลือโปรตีน 620 และ 257 มิลลิกรัม ตามลำดับ คิดเป็น 61.0% และ 25.3% ของพลาสมาเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 การทำให้ไวเทลโลจีนีนบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลและ ^{32}P -Orthophosphate

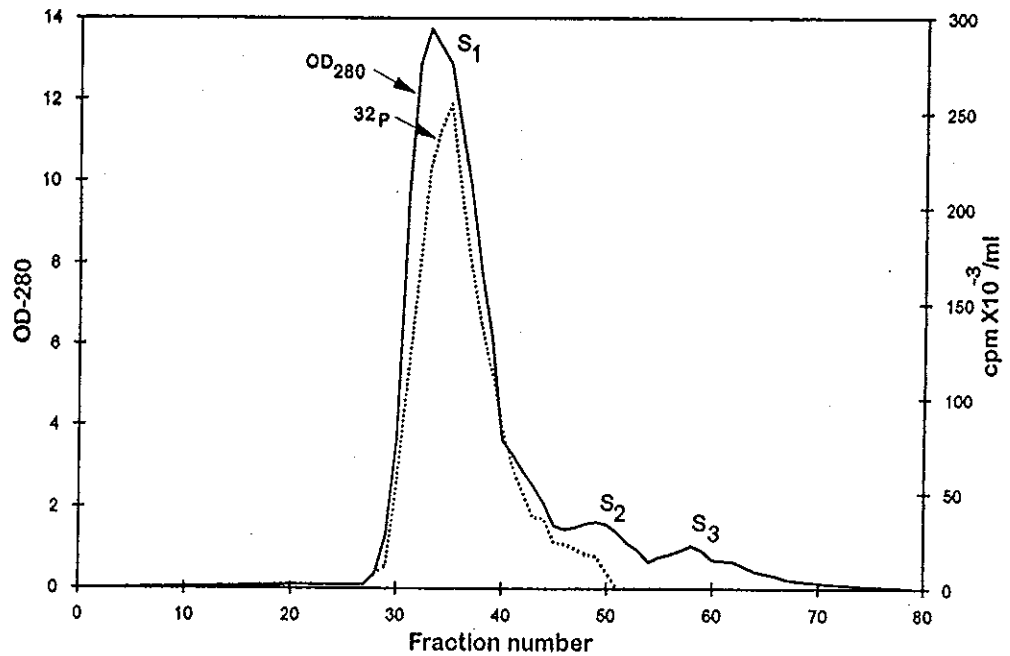
| | โปรตีน | | ^{32}P | | | |
|------------------------------------|--------|-------|---------------------|--------|-------|---------------------|
| | มก. | % | cpmX10 ³ | cpm/mg | % | ความบริสุทธิ์(เท่า) |
| พลาสมา | 3,322 | 100.0 | 58,723 | 17,677 | 100.0 | 1.0 |
| คอลัมน์ DEAE- Sephacel (พีค D4) | 2,398 | 72.2 | 54,528 | 22,739 | 92.9 | 1.3 |
| คอลัมน์ Sephadex G-150 (พีค S1) | 723 | 21.8 | 28,533 | 39,465 | 48.6 | 2.2 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง



รูปที่ 5 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตรา ไดออกและ ^{32}P -Orthophosphate ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

แยกไวเทลโลจีนินจากพลาสมา 22 มล. โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (4.0 X 18 ซม.) ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF จน O.D._{280} เป็นศูนย์ แล้วชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่อเนื่องจาก 0-0.35 M (750 มล.+ 750 มล.) ด้วยอัตราไหล 30 มล./ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มล.



รูปที่ 6 การทำให้ไวเทคโวจีนินบริสุทธิ์จากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel (รูปที่ 5) ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150

แยกพีค D4 2.5 มล. (240 ไมโครกรัม) จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel รูปที่ 5 ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 (1.2 X 80 ซม.) แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 5 มล./ชั่วโมง จน O.D.₂₈₀ เป็นศูนย์ เก็บสารละลายหลอดละ 1 มล.

ตารางที่ 7 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลาที่ฉีด
ฮอร์โมนเอสตราไดออล

| | โปรตีน | |
|---------------------------------|--------|-------|
| | มก. | % |
| พลาสมา | 1,016 | 100.0 |
| คอลัมน์ DEAE-Sephacel (พีค D4) | 620 | 61.0 |
| คอลัมน์ Sephadex G-150 (พีค S1) | 257 | 25.3 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

3.2.4 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ

จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ เพื่อติดตามความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีนินหลังผ่านวิธีการแยกแต่ละขั้นตอน จะเห็นได้ว่าพลาสมาของปลาก่อนทำให้บริสุทธิ์มีแถบโปรตีนหลายแถบ ส่วนโปรตีนพีค D4 ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel มีจำนวนแถบโปรตีนลดลง และเมื่อทำให้บริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 พีค S1 จะมีโปรตีนเหลือเพียง 3 แถบ คือแถบ I, II และ III (รูปที่ 7 แถวที่ 4) เช่นเดียวกับผลการทดลองที่รายงานโดยไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537) ซึ่งสรุปไว้ว่า พีค S1 เป็นไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสามแถบ ไม่ใช้การปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่น

แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพของการแยกทั้ง 3 ขั้นตอน (3.2.1, 3.2.2 และ 3.2.3) มีลักษณะเหมือนกัน

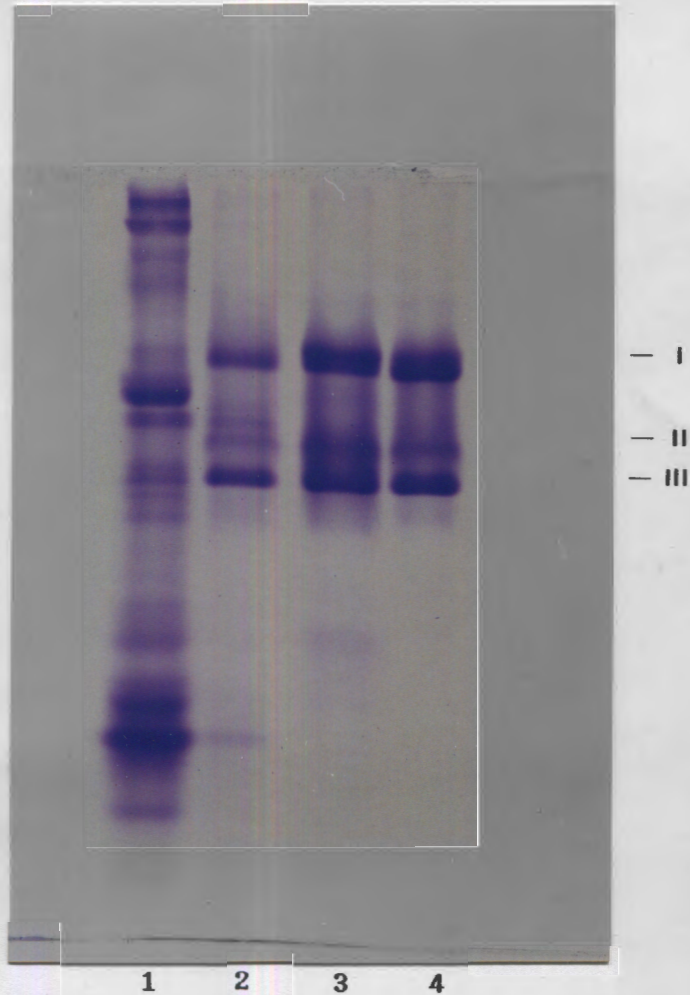
3.3 คุณสมบัติของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

3.3.1 แบบแผนโปรตีน

จากการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ซึ่งได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 แล้วย้อมด้วยสีค้อมาซี บลู พบว่า ไวเทลโลจีนินของปลากะรังย้อมติดสีค้อมาซี บลู 3 แถบ แสดงให้เห็นว่า ไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีนถึง 3 รูปแบบ (form) คือ แถบ I, II และ III (รูปที่ 7 แถวที่ 4)

3.3.2 องค์ประกอบกรดอะมิโน

จากการศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโน ของไวเทลโลจีนินในปลากะรัง พบว่ามีกรดอะมิโนกลูตามีน อะลานีน และลูซีนอยู่เป็นจำนวนมาก มีเซรีนค่อนข้างน้อยกว่าไวเทลโลจีนินของปลาชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่



รูปที่ 7 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพของพลาสมาโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150

| | |
|----------|---|
| แถวที่ 1 | พลาสมาของปลา ก่อนฉีดฮอร์โมน |
| แถวที่ 2 | พลาสมาของปลา ที่ฉีดฮอร์โมน |
| แถวที่ 3 | พีค D4 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel |
| แถวที่ 4 | พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150 ซึ่งเป็น ไวเทลโลจันินบริสุทธิ์ |

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 ไมโครกรัม

ตารางที่ 8 องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลโลเจนนับวิธีสกัด

| กรดอะมิโน | โพล % |
|---------------|-------|
| Asparagine | 6.5 |
| Threonine | 4.7 |
| Serine | 5.5 |
| Glutamine | 12.0 |
| Proline | 4.0 |
| Glycine | 5.5 |
| Alanine | 10.2 |
| Valine | 7.6 |
| Methionine | 2.0 |
| Isoleucine | 6.5 |
| Leucine | 10.3 |
| Tyrosine | 2.6 |
| Phenylalanine | 2.8 |
| Histidine | 2.4 |
| Lysine | 7.0 |
| Arginine | 5.5 |
| Cysteine | 0.8 |
| Tryptophan | 7.9 |

3.3.3 องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรต

ในการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์โดยวิธีฟินอล-กรดซัลฟูริก ซึ่งใช้กลูโคสและแมนโนสเป็นสารมาตรฐาน พบว่าไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์มีค่าเฉลี่ยของกลูโคสเป็น 20.7 ± 1.3 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน และมีค่าเฉลี่ยของแมนโนสเป็น 8.1 ± 0.1 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน ซึ่งได้จากการหาปริมาณในไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 3 การทดลอง (ตารางที่ 9) และจากกราฟมาตรฐาน รูปที่ 8

3.3.4 องค์ประกอบไขมัน

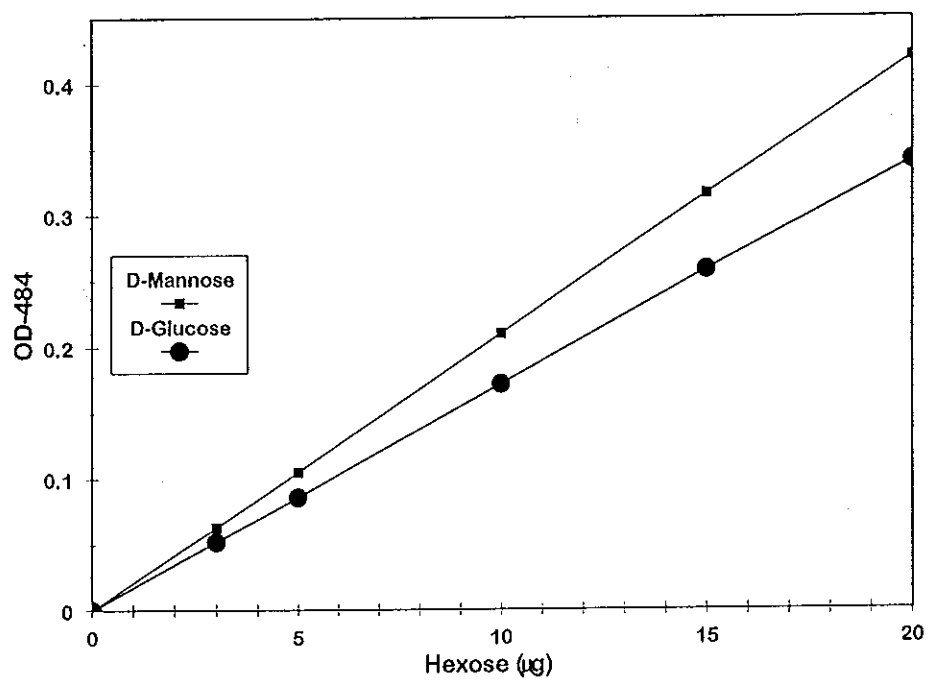
จากตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์มีไขมันเป็นองค์ประกอบคือมีปริมาณคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ 13.0 ± 6.1 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน ($1.3 \pm 0.6\%$) และ 20.6 ± 10.3 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน ($2.0 \pm 1.0\%$) ตามลำดับ

3.4 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

จากการฉีดกระต่ายด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 3 ครั้ง เพื่อกระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรัมเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีดไวเทลโลจีนิน คือเพิ่มขึ้นจาก 50.9 มก./มล. เป็น 58.5, 80.8 และ 92.1 มก./มล. หลังการฉีดครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

3.4.1 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

เมื่อนำซีรัมกระต่ายที่ผ่านการฉีดด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ มาทดสอบการมีแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์โดยวิธี double immunodiffusion พบว่ามีแถบการตกตะกอนเกิดขึ้นระหว่างไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์กับแอนติบอดีในซีรัมของกระต่ายหลังการฉีดกระตุ้นทั้ง 3 ครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 9 ซีรัมกระต่ายหลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (b) จะเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่จางกว่าการฉีด 2 ครั้งหลังมาก การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนของซีรัมหลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 (c) และ 3 (d) ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ไม่พบแอนติบอดี



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของกลูโคสและแมนโนส

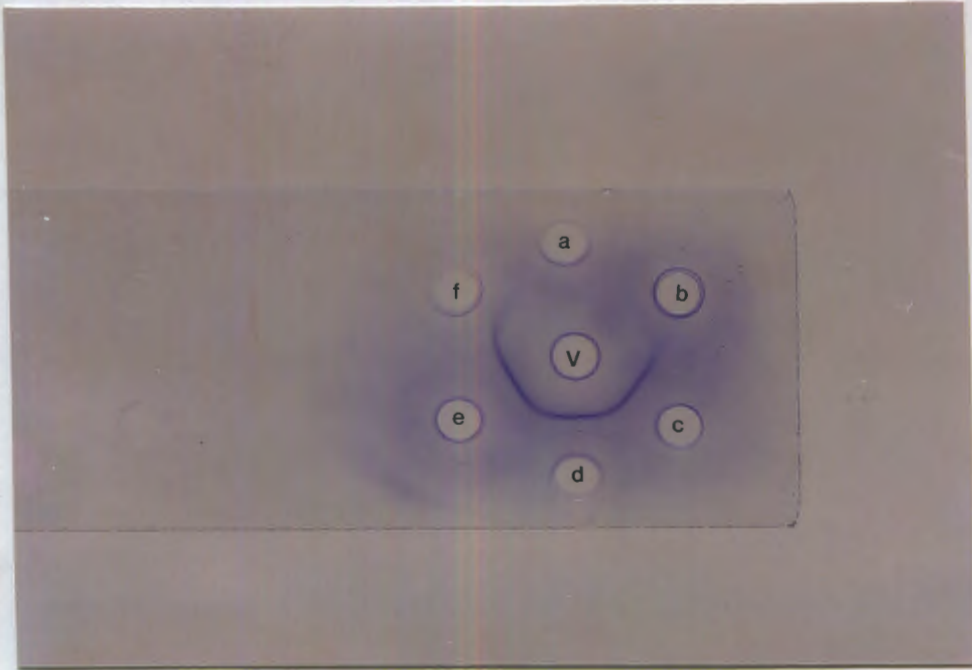
ตารางที่ 9 องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตและไขมันของไวเทลโลจลินนบริสุทท์

| | ปริมาณ (ไมโครกรัม/มก. โปรตีน) |
|---------------|----------------------------------|
| คาร์โบไฮเดรต | |
| กลูโคส | 20.7 ± 1.3 |
| แมนโนส | 8.1 ± 0.1 |
| ไขมัน | |
| คอเลสเทอรอล | 13.0 ± 6.1 |
| ไตรกลีเซอไรด์ | 20.6 ± 10.3 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

ตารางที่ 10 ปริมาณโปรตีนในซีรัมกระต่ายที่ฉีดไวเทรลโกลจินีนบริสุทธิ์

| | โปรตีน (มก./มล. ซีรัม) |
|-------------------------------|---------------------------|
| ซีรัมก่อนฉีดกระตุ้น | 50.9 |
| ซีรัมหลังฉีดกระตุ้นครั้งที่ 1 | 58.5 |
| ซีรัมหลังฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 | 80.8 |
| ซีรัมหลังฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 | 92.1 |



รูปที่ 9 การทำ Double immunodiffusion ของไวเทลโลเจนิน
บริสุทท์กับซีรัมกระต่าย

- V ไวเทลโลเจนินบริสุทท์ (หลุมกลาง)
- a ซีรัมกระต่ายก่อนฉีดไวเทลโลเจนิน
- b ซีรัมกระต่ายหลังฉีดไวเทลโลเจนินครั้งที่ 1
- c ซีรัมกระต่ายหลังฉีดไวเทลโลเจนินครั้งที่ 2
- d ซีรัมกระต่ายหลังฉีดไวเทลโลเจนินครั้งที่ 3
- e แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน
- f แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินที่เจือจาง 1 : 10 เท่า
- ปริมาตรซีรัมและแอนติบอดี หลุมละ 10 ไมโครลิตร

ต่อไวเทลโลจลินินในซีรัมกระต่ายก่อนการฉีดไวเทลโลจลินิน (a) แอนติบอดีที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและแยกต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ตามวิธีการข้อ 2.9.2 เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลจลินินบริสุทธิ์ได้ดีเช่นเดียวกับซีรัมกระต่ายก่อนทำการแยก (รูปที่ 9, e) ขึ้นตอนต่าง ๆ ของการแยกแอนติบอดีได้แสดงไว้ในตารางที่ 11 ซึ่งแยกได้แอนติบอดี 142.1 มิลลิกรัม คิดเป็น 6.8% ของซีรัมโปรตีนทั้งหมด

3.4.2 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมา

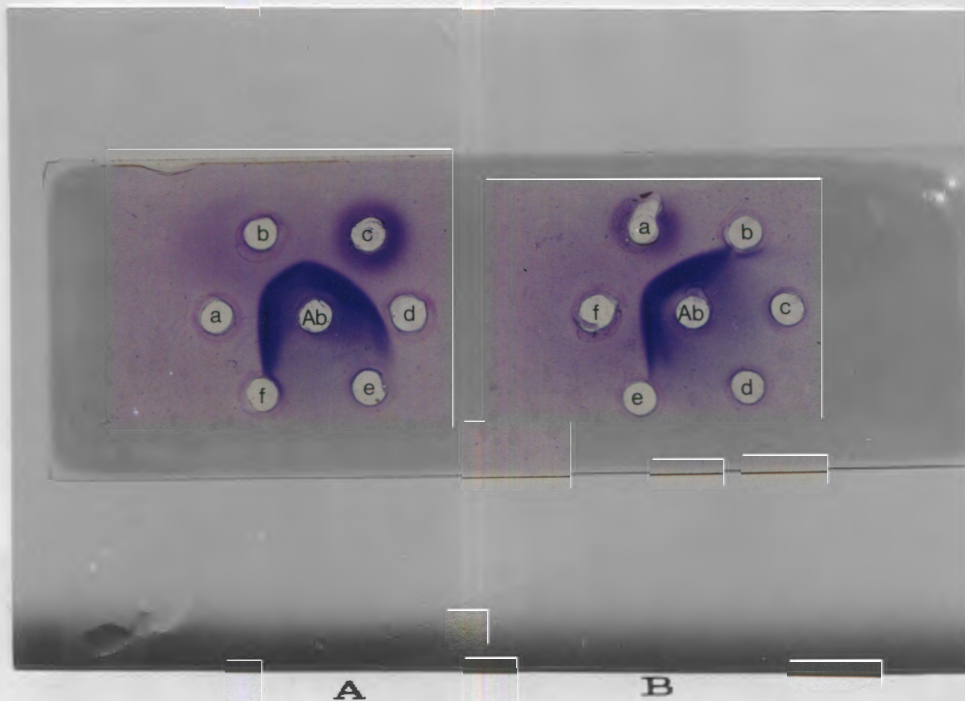
เมื่อทดสอบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจลินินกับพลาสมาของปลากระรังเพศเมียและปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ ปลาทั้งสองชนิดนี้ไม่ผ่านการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล รูปที่ 10 แสดงให้เห็นว่าพลาสมาของปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์ (A, b) เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับแอนติบอดีได้เช่นเดียวกับกับไวเทลโลจลินินบริสุทธิ์ (A, a) แอนติบอดีไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (B, b) แต่จะเกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ซึ่งได้รับการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล 3 ครั้ง (B, a) ชุดควบคุมของการทดลองใช้ซีรัมของกระต่ายที่เก็บก่อนฉีดไวเทลโลจลินิน และไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาต่างๆ เหล่านี้ ผลการทดลองของชุดควบคุมไม่ได้แสดงไว้ ณ ที่นี้

3.4.3 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับสารสกัดเนื้อเยื่อ

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจลินินที่แยกได้จากซีรัมของกระต่าย เมื่อนำมาทดสอบปฏิกิริยาการตกตะกอน กับสารสกัดจากเนื้อเยื่อของปลากระรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ (รูปที่ 10) ปรากฏว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับสารสกัดจากรังไข่ (A, c) และสารสกัดตับ (A, d) แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับสารสกัดจากหัวใจ (A, e) และกล้ามเนื้อ (A, f) ส่วนในปลากระรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์นั้น แอนติบอดีต่อไวเทลโลจลินินไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับสารสกัดจากเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งได้แก่ รังไข่ (B, c) ตับ (B, d) และหัวใจ (B, e) ดังแสดงในรูปที่ 10B แต่สารสกัดจากตับ (B, f) ของปลากระรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ซึ่งผ่านการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล 3 ครั้ง เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้

ตารางที่ 11 การแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจินิกจากซีรัมกระต่าย

| | ปริมาตร (มล.) | โปรตีนทั้งหมด (มก.) | ผลที่ได้ (%) |
|---|------------------|------------------------|-----------------|
| ซีรัม | 22.8 | 2,100.0 | 100.0 |
| ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 50% | 18.4 | 657.4 | 31.3 |
| คอลัมน์ DEAE-Sephacel, ทำ ให้ชุ่มชื้นด้วย CM-cellulose | 18.2 | 142.1 | 6.8 |



รูปที่ 10 การทำ Double immunodiffusion ของพลาสมาและสารสกัดเนื้อเยื่อของปลากระพงเทศเม็กซิกันและปลากุ้งไม่เจริญพันธุ์

Ab แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน (หลุมกลาง)

A ปลาเทศเม็กซิกันที่เจริญพันธุ์

a ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์

b พลาสมา

c สารสกัดรังไข่

d สารสกัดตับ

e สารสกัดหัวใจ

f สารสกัดกล้ามเนื้อ

B ปลากุ้งไม่เจริญพันธุ์

a พลาสมาของปลากุ้งที่ฉีดฮอร์โมน

b พลาสมา

c สารสกัดรังไข่

d สารสกัดตับ

e สารสกัดหัวใจ

f สารสกัดตับของปลากุ้งที่ฉีดฮอร์โมน

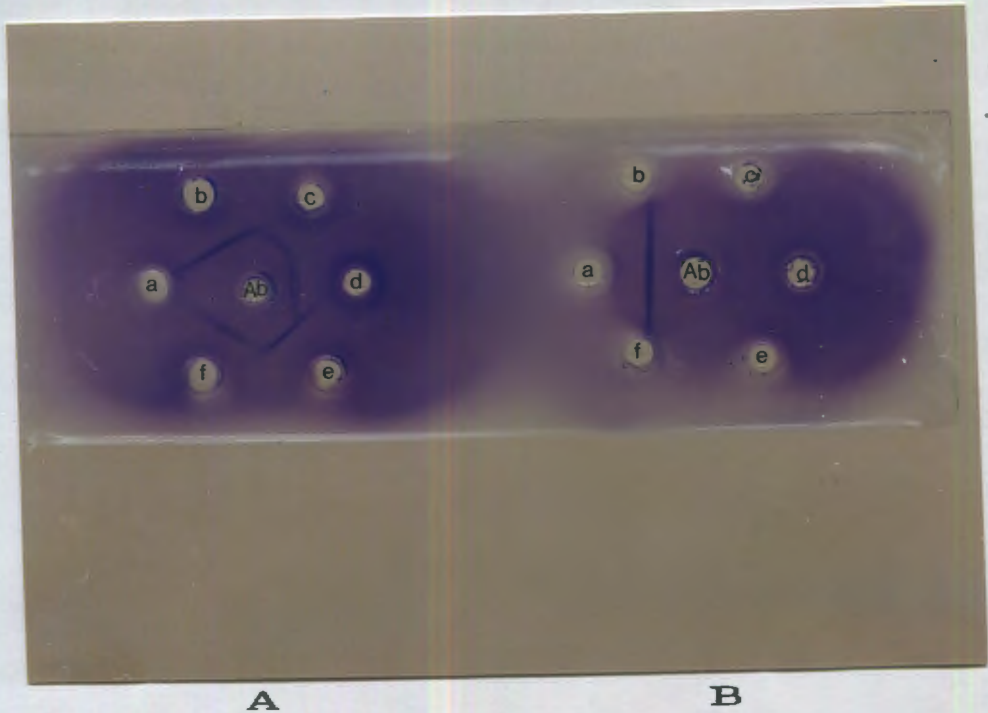
ปริมาณตัวอย่าง หลุมละ 10 ไมโครลิตร

3.4.4 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาเจริญพันธุ์ชนิดต่าง ๆ

จากรูปที่ 11 เป็นผลของการทดสอบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนีนกับพลาสมาของปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์ชนิดต่าง ๆ พบว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาทะเลซึ่งได้แก่ปลากะพงขาว (A,c) ปลากะพงแดง (A,d) และปลากระบอก (A,e) และปลาเท็ดโคน (A,f) แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลากะรังเพศผู้ (A,a) รวมทั้งพลาสมาของปลาน้ำจืดเพศเมีย เช่น ปลาช่อน (B,b) ปลาดุกอุย (B,c) ปลาสร้อย (B,d) ปลาตะเพียน (B,e) และปลานิล (B,f) ชุดควบคุมของการทดลองเป็นไวเทลโลจีนีนบริสุทธิ์ (B,a) และพลาสมาของปลากะรังเพศเมีย (A,b)

3.5 การวัดปริมาณไวเทลโลจีนีน

หาปริมาณไวเทลโลจีนีนในพลาสมาปลาตัวอย่างได้ โดยใช้วิธีรีดอกเกิดอิมมูโนอิเล็กโตรฟอรีซิส โดยคำนวณปริมาณไวเทลโลจีนีนจากกราฟมาตรฐานซึ่งได้จากการทำอิเล็กโตรฟอรีซิสของไวเทลโลจีนีนบริสุทธิ์ที่ทราบปริมาณแน่ชัด (รูปที่ 12 หลุมที่ 1-6) จากความสูงของจรวดนำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของจรวดกับปริมาณไวเทลโลจีนีนที่ใช้ ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 13 จากนั้นคำนวณปริมาณไวเทลโลจีนีนในพลาสมาของปลาตัวอย่างได้จากความสูงของจรวดของพลาสมาตัวอย่างนั้น ๆ



รูปที่ 11 การทำ Double immunodiffusion ของพลาสมาปลาเจริญพันธุ์ชนิดต่าง ๆ
Ab แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน (หลุมกลาง)

A ปลาทะเลเทศเม็ส

a ปลากะรังเทศผู้

b ปลากะรัง

c ปลากะพงขาว

d ปลากะพงแดง

e ปลากระบอก

f ปลาเห็ดโคน

B ปลาน้ำจืดเทศเม็ส

a ไวเทลโลเจนินบริสุทธ์ (กะรัง)

b ปลาช่อน

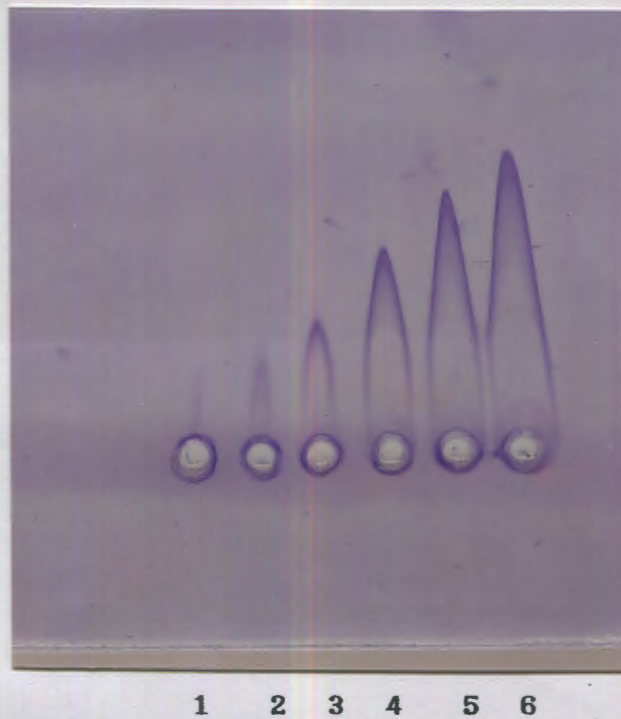
c ปลาดุกอุย

d ปลาสร้อย

e ปลาตะเพียน

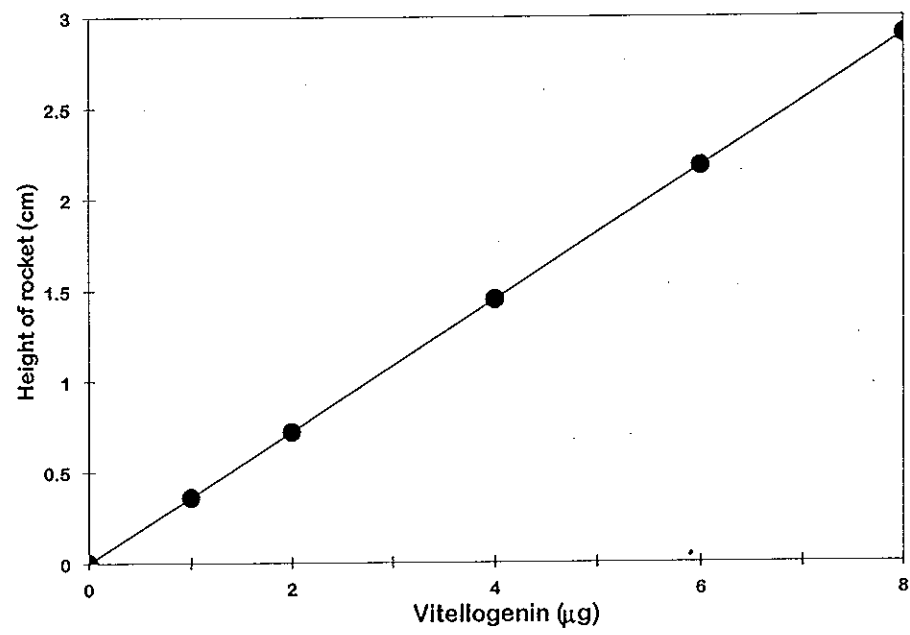
f ปลานิล

ปริมาณพลาสมา หลุมละ 10 ไมโครลิตร



รูปที่ 12 การทำรีอกเก็ต อิมมูโนอิลีกโตรฟอร์ซิสของไวเทลโลจีนิน
มาตรฐาน

หลุมที่ 1-6 ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ที่มีปริมาณโปรตีน 0.5,
1, 2, 4, 6 และ 8 ไมโครกรัม ตามลำดับ



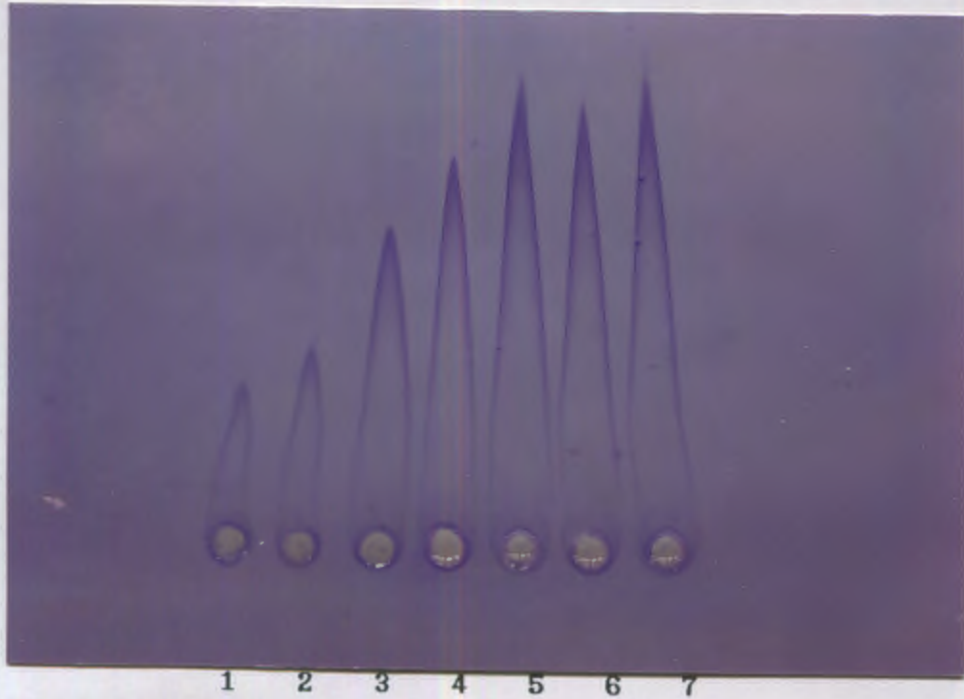
รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของจรวด
กับปริมาณไวเทลโลเจินิน

3.6 ปริมาณพลาสติกมาไวเทลโลจีนินของปลากระรังเพศเมียที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ต่าง ๆ

จากการหาปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกมาของปลากระรังเพศเมียที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้วิธีร็อกเก็ต อิมมูโนอิลีกโตรฟลูออริส พบว่าปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกมาที่มีความสัมพันธ์กับค่าดัชนีการสืบพันธุ์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงต้น คือพลาสติกมาของปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์เพิ่มจาก 1.5% เป็น 4.3% จะมีปริมาณไวเทลโลจีนินเพิ่มจาก 1.5 มก./มล. เป็น 14.3 มก./มล. ปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์เท่ากับ 1.5% มีปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกมาต่ำสุด ปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์เท่ากับ 5.0% มีระดับพลาสติกมาไวเทลโลจีนินสูงสุด (16.1 มก./มล.) เมื่อค่าดัชนีการสืบพันธุ์เพิ่มขึ้นเป็น 6.0% และ 10.6% ปริมาณพลาสติกมาไวเทลโลจีนินกลับลดลงเหลือ 15.1 และ 12.2 มก./มล. ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 14 และ ตารางที่ 12

3.7 ปริมาณพลาสติกมาไวเทลโลจีนินของปลากระรังเพศเมียในรอบปี

ผลการวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกมาของปลากระรังเพศเมียที่สุ่มตัวอย่างทุกเดือน เดือนละ 3 ตัว ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2536 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2537 หนึ่งปี พบว่าในปลายฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ คือในเดือนกุมภาพันธ์ 2536 ปริมาณพลาสติกมาไวเทลโลจีนินจะค่อย ๆ ลดลงจาก 2.5 มก./มล. จนถึงต่ำสุด 1.4 มก./มล. ในเดือนมีนาคม และมีระดับค่อนข้างคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงเดือนกรกฎาคม จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน และเพิ่มอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูงสุดในเดือนธันวาคม (16.1 มก./มล.) แล้วลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าเหลือ 4.5 มก./มล. ในเดือนกุมภาพันธ์ของปีถัดไป (รูปที่ 15)



รูปที่ 14 การทำรีเอกต์ อิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิสของพลาสมา
 พลากระวังเพศเมียที่มีค่า दरชนีการสืบพันธุ์ต่าง ๆ

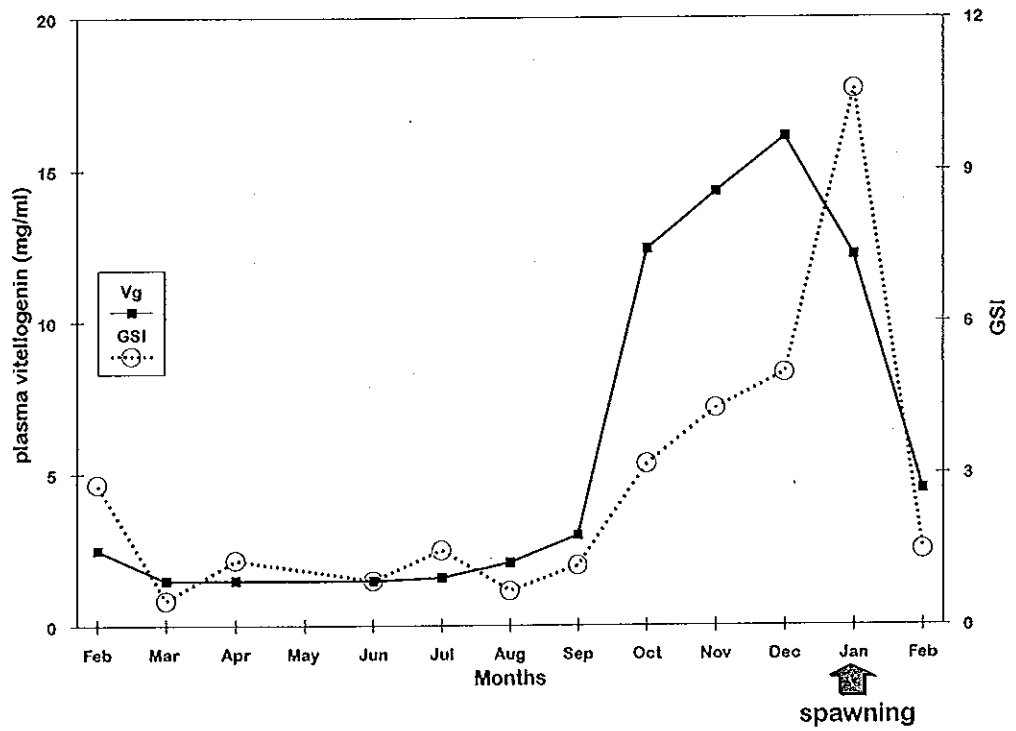
| | |
|-----------|--|
| หลุมที่ 1 | พลาสมาปลาที่มีค่า दरชนีการสืบพันธุ์ 1.5% |
| หลุมที่ 2 | พลาสมาปลาที่มีค่า दरชนีการสืบพันธุ์ 2% |
| หลุมที่ 3 | พลาสมาปลาที่มีค่า दरชนีการสืบพันธุ์ 3% |
| หลุมที่ 4 | พลาสมาปลาที่มีค่า दरชนีการสืบพันธุ์ 4% |
| หลุมที่ 5 | พลาสมาปลาที่มีค่า दरชนีการสืบพันธุ์ 5% |
| หลุมที่ 6 | พลาสมาปลาที่มีค่า दरชนีการสืบพันธุ์ 6% |
| หลุมที่ 7 | พลาสมาปลาที่มีค่า दरชนีการสืบพันธุ์ 10% |

ปริมาตรพลาสมาในแต่ละหลุมเท่ากัน หลุมละ 0.5 ไมโครลิตร

ตารางที่ 12 ปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกของปลากะรังเพศเมียที่มี
ค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ต่าง ๆ

| ค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ (%) | ไวเทลโลจีนิน (มก./มล. พลาสติก) |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 10.6 | 12.2 |
| 6.0 | 15.1 |
| 5.0 | 16.1 |
| 4.3 | 14.3 |
| 3.1 | 9.0 |
| 2.0 | 2.7 |
| 1.5 | 1.5 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ซึ่งได้จากการทดลอง 2-3 ครั้ง



รูปที่ 15 ปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินและค่าดัชนีการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมียในรอบปี

Vg = พลาสมาไวเทลโลจีนิน

GSI = ค่าดัชนีการสืบพันธุ์

3.8 ค่าธรรมเนียมการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมียในรอบปี

จากการหาค่าธรรมเนียมการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมียในรอบปีซึ่งเป็นปลาตัวอย่างชุดเดียวกับของข้อ 3.7 พบว่าค่าธรรมเนียมการสืบพันธุ์ของปลาในปลายฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ คือเดือนมีนาคม จะมีค่าต่ำสุด (0.5%) จากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่จนถึงเดือนสิงหาคม แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในเดือนกันยายน และเพิ่มอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูงสุดในเดือนมกราคม (10.6%) หลังการวางไข่จะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าเหลือ 1.5% ใน เดือนกุมภาพันธ์ 2537 (รูปที่ 15)

3.9 การพัฒนารังไข่ของปลากะรังเพศเมียในรอบปี

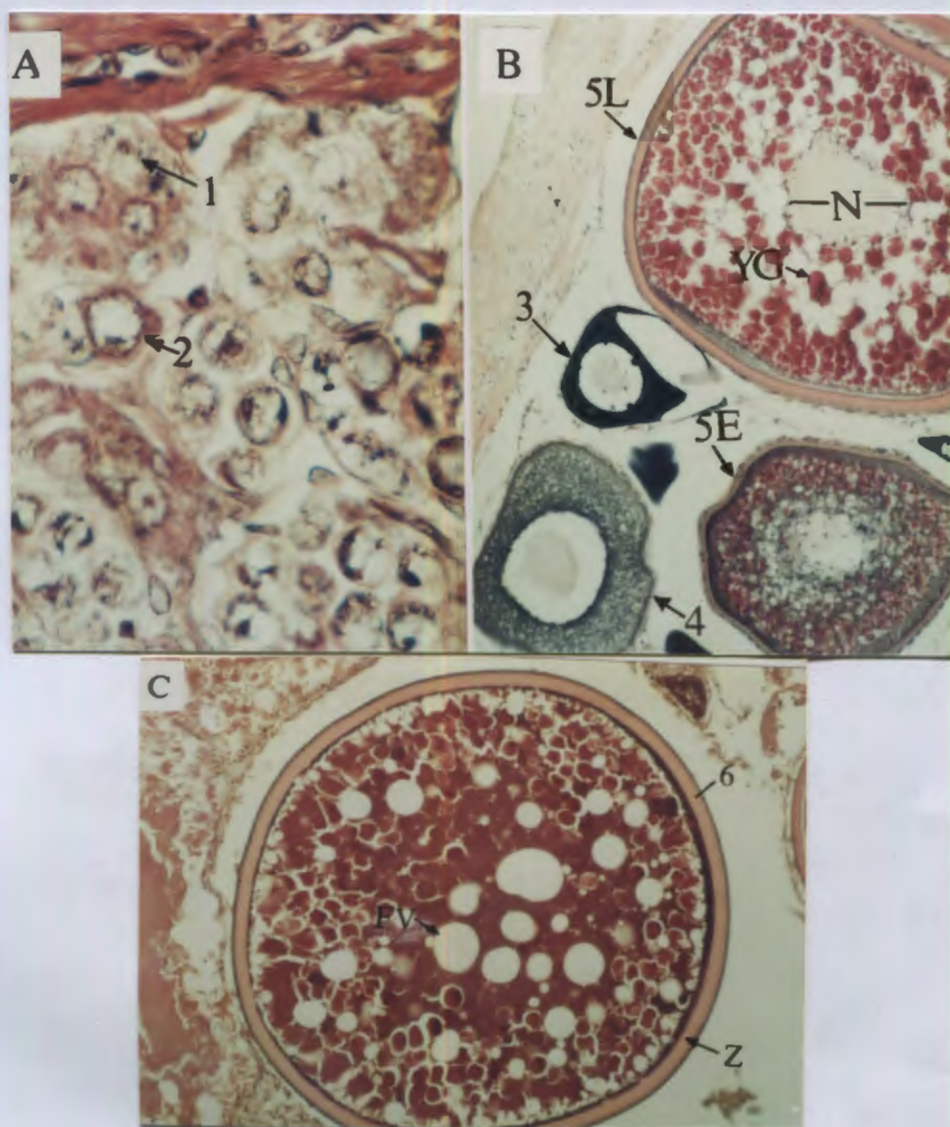
3.9.1 พัฒนาการของไข่ปลากะรัง

จากการศึกษาพัฒนาการของไข่ของปลากะรังโดยวิธีเนื้อเยื่อวิทยา ได้แบ่งพัฒนาการของไข่ปลากะรังจากช่วงไข่อ่อนจนถึงไข่สุก ออกเป็น 6 ระยะ โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของขนาด ลักษณะ และชนิดขององค์ประกอบที่อยู่ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของไข่ ดังนี้

1. ไข่ระยะที่ 1 มีขนาดเล็กที่สุด มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 μm อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า oogonia nest ล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เต็มเซลล์ ไซโทพลาซึมบางมากเป็นเส้นสีชมพูจาง ๆ ล้อมรอบนิวเคลียส (รูปที่ 16A, 1)

2. ไข่ระยะที่ 2 มีขนาดเล็กมาก เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-10 μm ไซโทพลาซึมล้อมติดสีน้ำเงิน ล้อมรอบนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ภายในนิวเคลียสมีโครมาติน-นิวคลีโอไลกระจายอยู่ (รูปที่ 16A, 2)

3. ไข่ระยะที่ 3 ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลาง 10-56 μm ไซโทพลาซึมมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียสขนาดใหญ่ติดสีอ่อน ภายในมีสายโครมาติน (chromatin-threads) จำนวนมากและมีนิวคลีโอไลล้อมติดสีน้ำเงินเข้มจำนวนหนึ่ง กระจายอยู่ริมด้านในของผนังนิวเคลียส เมื่อไข่เจริญขึ้นจะสังเกตเห็นชั้นบาง ๆ ของฟอลลิเคิล (follicular layer) ล้อมรอบเซลล์ไข่ (รูป 16B, 3)



รูปที่ 16 พัฒนาการของไข่ระยะต่าง ๆ

1-6 เป็นไข่ระยะที่ 1 ถึง ระยะที่ 6 ตามลำดับ

YG = yolk granule; FV = fat vacuole;

Z = zona radiata; N = nucleus;

5E = ไข่ระยะที่ 5 ที่มีการพัฒนาช่วงต้น

5L = ไข่ระยะที่ 5 ที่มีการพัฒนาช่วงปลาย

4. ไข่ระยะที่ 4 มีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลาง 80-93 μm เป็นระยะที่เริ่มมีโพล์ เวชิตีล อยู่ในไซโทพลาซึม โดยจะมีขนาดและจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อไข่เจริญขึ้น ไซโทพลาซึมล้อมติดสีน้ำเงินจางลงเล็กน้อย สังเกตเห็นชั้นของพอลลิเคิลหนาขึ้น (รูปที่ 16B, 4)

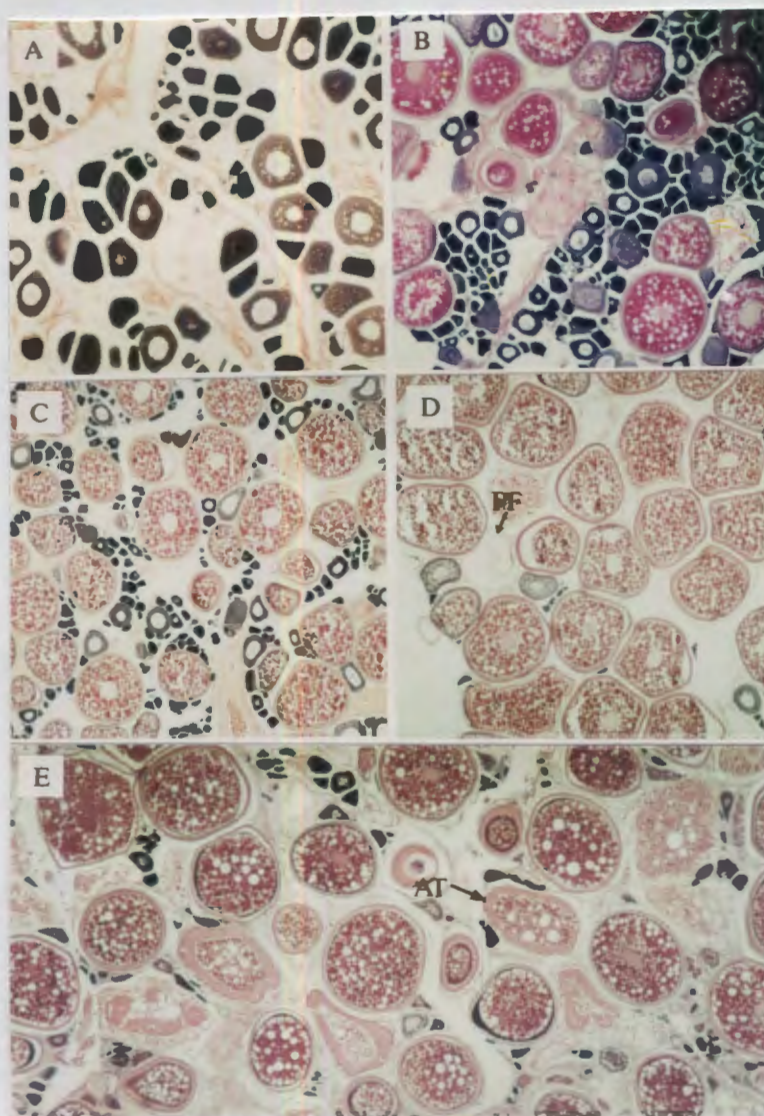
5. ไข่ระยะที่ 5 มีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลาง 140-290 μm เป็นระยะเริ่มต้นที่มีการสะสมโพล์ โดยจะเริ่มมีโพล์ แกรนูล เป็นเม็ดกลมสีส้มแดงกระจายอยู่ในไซโทพลาซึมชั้นนอกพร้อมกับโพล์ เวชิตีล จะมีขนาดและจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อไข่เจริญขึ้น พร้อมทั้งมีการสร้างเวคิวโอล บรรจุไขมันขึ้นมาด้วย (รูปที่ 16B, 5E) ในปลายระยะนี้ไข่มีการสะสมโพล์มากขึ้น เห็นโพล์ แกรนูล และเวคิวโอลบรรจุไขมัน กระจายอยู่เต็มไซโทพลาซึม ส่วนนิวเคลียสติดสีอ่อนและมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับขนาดของไข่ เมมเบรนของนิวเคลียส (nuclear membrane) จะสลายไป ชั้นของพอลลิเคิลมีการพัฒนาดีและหนาขึ้น สามารถสังเกตเห็นชั้นของโซนา เรดิเอตาอยู่ระหว่างขอบของไซโทพลาซึมกับชั้นของพอลลิเคิลได้ชัดเจน (รูปที่ 16B, 5L)

6. ไข่ระยะที่ 6 ไข่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 283-330 μm เป็นระยะที่ไข่สุกเต็มที่ โพล์ แกรนูลจะรวมตัวกันติดสีแดงขนาดใหญ่ ปลายระยะนี้นิวเคลียสจะค่อย ๆ หายไป เมื่อไข่สุกเต็มที่จะไม่มีการนิวเคลียส (รูปที่ 16C, 6)

3.9.2 พัฒนาการของรังไข่ปลากระรัง

ปลากระรังจะวางไข่ ในช่วงระหว่างเดือนกันยายน ถึงเดือนมีนาคมของปีถัดไป ปลาแต่ละตัววางไข่หลายครั้งในช่วงฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ดังกล่าว ดังนั้นภายในรังไข่ของปลากระรังตัวหนึ่ง ๆ จึงพบไข่หลายระยะอยู่ในรังไข่เดียวกัน ได้แบ่งพัฒนาการของรังไข่ปลากระรังจากช่วงไข่อ่อนจนถึงการวางไข่ เป็น 5 ระยะ ดังนี้

1. รังไข่ระยะพัก (Resting ovary) พบในปลาที่วางไข่แล้ว ไข่เกือบทั้งหมดภายในรังไข่จะเป็นไข่ระยะที่ 3 พบไข่ระยะที่ 4 บ้าง และอาจมีไข่ที่เสื่อมสลายด้วย (รูปที่ 17A)



รูปที่ 17 พัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ

A รังไข่ระยะพัก

B รังไข่ระยะพัฒนา

C รังไข่ระยะสุก

D รังไข่ระยะวางไข่

E รังไข่หลังการวางไข่ใหม่ ๆ

AT = atretic oocyte

PF = post-ovulatory follicle

2. รังไข่ระยะพัฒนา (Developing ovary) เป็นระยะที่ไข่ภายในรังไข่นั้นมีการเจริญและพัฒนามากขึ้น พบไข่ในระยะที่ 3, 4 และ 5 อาจพบไข่ที่สลายแล้วเล็กน้อย (รูปที่ 17B)

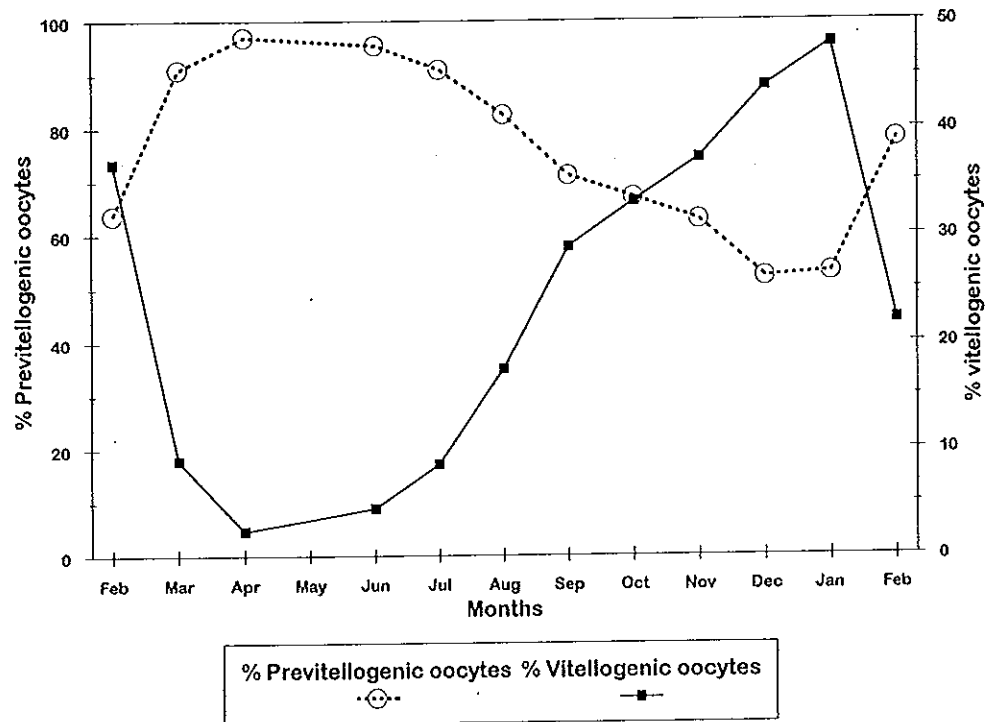
3. รังไข่ระยะสุก (Ripe ovary) ภายในรังไข่จะมีไข่ระยะที่ 6 ซึ่งเป็นไข่สุกจำนวนมาก และยังคงพบไข่ระยะที่ 3, 4 และ 5 ด้วย (รูปที่ 17C)

4. รังไข่ระยะวางไข่ (Spawning ovary) ลักษณะภายในรังไข่เหมือนกับของรังไข่ระยะสุก แต่พบฟอลลิเคิลหลังการตกไข่ (post-ovulatory follicle) ด้วย (รูปที่ 17D)

5. รังไข่หลังการวางไข่ใหม่ ๆ (Recently spawned ovary) ลักษณะภายในรังไข่คล้ายกับรังไข่ระยะวางไข่ แต่มีไข่ที่กำลังสลายตัวอยู่มาก (รูปที่ 17E)

3.9.3 พัฒนาการการเจริญพันธุ์ของปลาในรอบปี

จากการศึกษาการตัดเนื้อเยื่อรังไข่ของปลากะรังตัวอย่างชุดเดียวกับที่ใช้วัดปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินในรอบปีด้วยนั้น พบว่า ภายในรังไข่ของปลาตัวหนึ่ง ๆ มีการพัฒนาของไข่อยู่เกือบทุกระยะ แต่เปอร์เซ็นต์ของไข่แต่ละระยะต่างกันไปในรอบปี กล่าวคือในช่วงปลายฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ในเดือนมีนาคม 2536 ภายในรังไข่มีไข่อ่อนซึ่งเป็นไข่ระยะที่ 3 อยู่เฉลี่ยสูงถึง 91% ของจำนวนไข่ทั้งหมด และมีไข่ระยะที่ 4 อยู่ 9% แต่ไม่พบไข่ระยะที่ 5 และไข่ระยะที่ 6 ซึ่งเป็นไข่สุก หลังจากนั้นปริมาณไข่อ่อนระยะที่ 3 จะค่อย ๆ ลดลง ตามลำดับในแต่ละเดือน จนมีปริมาณน้อยที่สุดคือ 50% ในเดือนธันวาคม ในขณะที่เดียวกันไข่สุกระยะที่ 6 มีปริมาณสูงขึ้นจากเดือนสิงหาคมจนถึงเดือนมกราคม ซึ่งมีปริมาณสูงสุด 43% แล้วค่อย ๆ ลดต่ำลงในเดือนถัดไป ส่วนไข่ระยะที่ 4 และ 5 มีปริมาณเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มขึ้นและลดลงเป็นระยะตลอดปี ดังแสดงผลในรูปที่ 18



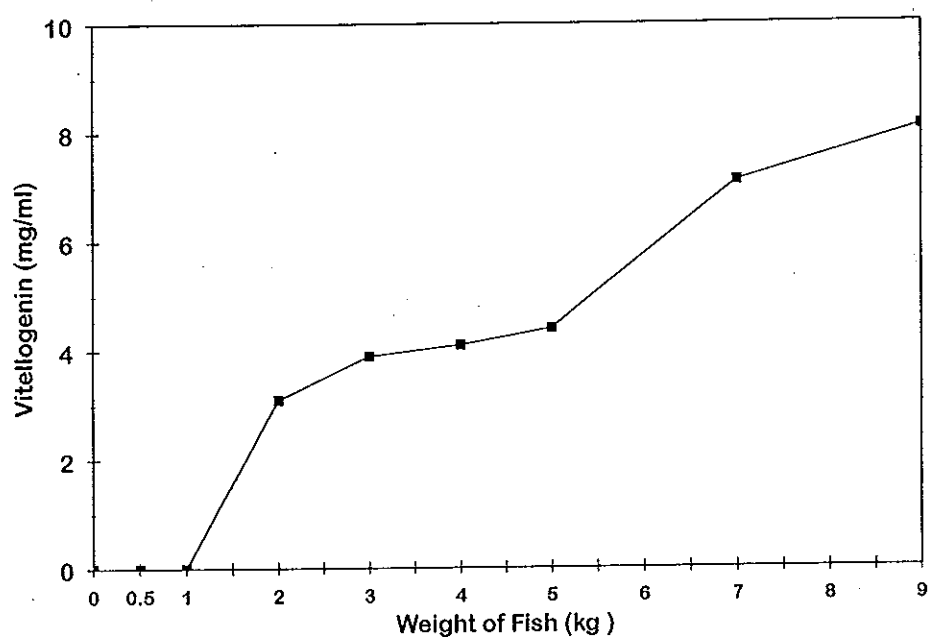
รูปที่ 18 จำนวนของไข่อ่อนและไข่แก่ในรอบปี

Previtellogenic oocyte คือไข่อ่อนระยะที่ 1-3

Vitellogenic oocyte คือไข่แก่ระยะที่ 4-6

3.10 ปริมาณพลาสติกมาไวเทลโลจีนินของปลากระรังที่มีขนาดต่าง ๆ

เมื่อทำการวัดระดับปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกของปลากระรังเพศเมียที่มีน้ำหนักต่าง ๆ กัน ปรากฏว่าปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกมีค่าสูงขึ้นตามน้ำหนักของปลาที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 19 ไม่พบไวเทลโลจีนินในพลาสติกของปลากระรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ซึ่งมีน้ำหนักตั้งแต่ 0.5 ถึง 1 กิโลกรัม เมื่อปลามีน้ำหนักมากขึ้นเริ่มมีการเจริญพันธุ์ พบระดับปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกเพิ่มขึ้นด้วย ปลาหนัก 2 กิโลกรัมมีปริมาณพลาสติกมาไวเทลโลจีนินเฉลี่ย 2.8 ± 0.3 มก./มล. ปลาที่หนัก 3 ถึง 5 กิโลกรัม มีปริมาณพลาสติกมาไวเทลโลจีนินใกล้เคียงกัน และเพิ่มขึ้นเมื่อปลามีขนาดเพิ่มขึ้นจนถึงปลาที่มีขนาด 9 กิโลกรัม มีปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกเฉลี่ย 6.1 ± 2.0 มก./มล. ไม่พบไวเทลโลจีนินในพลาสติกของปลาเพศผู้ (ตารางที่ 13)



รูปที่ 19 ปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลากะรัง
ที่มีน้ำหนักต่าง ๆ

ตารางที่ 13 ปริมาณไนเตรดไนโตรเจนในพลาสมาของปลากะรังที่มีน้ำหนักต่าง ๆ

| น้ำหนักปลา (กิโลกรัม) | ไนเตรดไนโตรเจน (มก./มล. พลาสมา) |
|--------------------------|------------------------------------|
| ปลาเพศเมีย | |
| 0.5 | 0 |
| 1 | 0 |
| 2 | 2.8 \pm 0.3 |
| 3 | 3.5 \pm 0.4 |
| 4 | 3.3 \pm 0.8 |
| 5 | 3.6 \pm 0.8 |
| 7 | 5.5 \pm 1.6 |
| 9 | 6.1 \pm 2.0 |
| ปลาเพศผู้ | |
| 9 | 0 |
| 12 | 0 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

4. วิจารณ์

4.1 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล

จากการฉีดปลากระมังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ขนาด 1-1.5 กิโลกรัม ด้วยฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดออลในปริมาณ 2.5 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม แล้ววัดระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมา โดยวิธีร็อกเก็ต อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิส พบว่าฮอร์โมนจะกระตุ้นให้ปลาสังเคราะห์พลาสมาไวเทลโลจีนิน คือมีปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาเป็น 55.0 ± 1.3 มก./มล. หลังจากฉีดปลาครั้งแรกได้ 3 วัน ในขณะที่ไม่พบไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาก่อนฉีดฮอร์โมน ระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้น 1.9 เท่า หลังการฉีดครั้งที่ 2 และเพิ่มขึ้น 2.1 เท่า หลังการฉีดครั้งที่ 3 เมื่อเทียบกับระดับหลังการฉีดครั้งแรก (ตารางที่ 3) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับแบบแผนของพลาสมาโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งไพบูลย์ บุญลิขิตานนท์ (2537) พบแถบโปรตีนของไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลากระมังย้อมติดสีคูมาซี บลู เข้มเพิ่มขึ้น ตามจำนวนครั้งของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล จากการวัดระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาเพศผู้และปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ไม่พบไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาเหล่านี้ในปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) ปลาเรนโบว์ เทราท์ (Van Boheman, *et al.*, 1981) ปลานิล (Chan, *et al.*, 1991) และสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Wallace, 1978) แต่เมื่อฉีดปลาเหล่านี้ด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าปลาเหล่านี้สังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน โดยตรวจพบปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาได้ นอกจากนี้ฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดออลยังกระตุ้นให้ปลา striped bass สังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเพิ่มขึ้น (Kishida, *et al.*, 1992) ในตารางที่ 3 ยังพบระดับโปรตีนในพลาสมาปลากระมังเพิ่มขึ้น 2.4, 3.4 และ 4.0 เท่า หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อการเพิ่ม

ระดับโปรตีนและไวเทลโลเจนินในพลาสมาพบในทำนองเดียวกันกับการศึกษาในปลาแอทแลนติก แซลมอน (*Salmo salar*) (So, et al., 1985) ซึ่งทำการฉีดปลาด้วยฮอร์โมน 5 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 5 วัน พบระดับพลาสมาโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 9 หลังการฉีด และจากการฉีดปลาเรนโบว์ เทราท์ ด้วยฮอร์โมนที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบระดับพลาสมาโปรตีนเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า ภายใน 6 วัน (Campbell and Idler, 1980) ผลเหล่านี้บ่งชี้ว่าฮอร์โมนเอสตราไดออลเป็นตัวกระตุ้นให้ปลาสังเคราะห์พลาสมาโปรตีนและไวเทลโลเจนินเพิ่มขึ้น (Wangh, 1982)

นอกเหนือจากการสังเคราะห์โปรตีน ยังพบระดับของคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาของปลากะรังที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล เพิ่มขึ้น 1.3 และ 3.4 เท่า ตามลำดับ หลังการฉีดปลาด้วยฮอร์โมน 2 ครั้ง เมื่อเทียบกับระดับในพลาสมา ก่อนฉีดฮอร์โมน (ตารางที่ 4) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากฮอร์โมนเอสตราไดออลกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์หรือหลั่งคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ออกสู่เลือดมากขึ้น

4.2 การทำให้ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์

การติดฉลากไวเทลโลเจนิน ด้วยสารกัมมันตรังสี ^{32}P -orthophosphate และ ^3H -leucine ถูกใช้เป็นตัวจำแนกไวเทลโลเจนินในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในปลาเรนโบว์ เทราท์ (Norberg and Haux, 1985) ปลานิล (Chan, et al., 1991) และปลาทอง (de Vlaming, et al., 1980) มีหลายวิธีการซึ่งใช้ในการทำให้ไวเทลโลเจนินของปลาบริสุทธิ์ ที่พบมากได้แก่ขั้นตอนการตกตะกอน ตามด้วยโครมาโตกราฟีแบบเจล ฟิลเตรชัน และ/หรือแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange) (Hara and Hirai, 1978; Chan, et al., 1991; Idler, et al., 1979; Nath and Sundararaj, 1981) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธีการคล้ายกันนี้ในการทำให้ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ ซึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดออล ควบคู่กับ ^{32}P -carrier free

orthophosphate หรือ ^3H -leucine แล้วใช้ ^{32}P และ ^3H เป็นตัว
 จำแนกไวเทลโลจีนิหรือฟอสโฟโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ ในการทำให้
 ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จากพลาสมาปลาดังกล่าว โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel
 พบว่าโปรตีนที่ติดฉลากโดย ^{32}P หรือ ^3H ถูกชะออกมาในพีค D4 ด้วยเกลือ
 โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.25 M ซึ่งแยกโปรตีนพีค D4 ได้คิดเป็น
 46.7-72.2% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น และจากค่ากัมมันตภาพรังสีของ
 ^{32}P และ ^3H โปรตีนบริสุทธิ์ชั้น 1.3 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ คิดเป็น
 ปริมาณโปรตีนที่ติดฉลาก ^{32}P 92.9% และโปรตีนที่ติดฉลาก ^3H 70.5% ของ
 พลาสมาเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ 6) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผล
 ของไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537)

เมื่อนำโปรตีนที่ติดฉลาก ^{32}P หรือ ^3H ในพีค D4 จากคอลัมน์ DEAE-
 Sephacel ไปทำให้เข้มข้นมากขึ้น แล้วนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex
 G-150 พบโปรตีนพีค S1 เพียงพีคเดียว ที่มีกัมมันตภาพรังสีของทั้ง ^{32}P และ
 ^3H เมื่อนำโปรตีนพีค S1 นี้ไปทำโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบ
 ไม่แปลงสภาพ พบเฉพาะโปรตีน 3 แถบ (I, II, III) ที่ย้ายติดสีขึ้นมาสี บลู
 (รูปที่ 7 แถวที่ 4) ผลที่ได้เป็นเช่นเดียวกับของไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537)
 ที่รายงานว่า การแยกพีค D4 โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 จะได้ไวเทลโล
 จีนิบริสุทธิ์ ประกอบด้วยโปรตีน 3 แถบ ซึ่งไม่สามารถแยกโปรตีนทั้ง 3 แถบ
 ของไวเทลโลจีนิออกจากกันได้ โดยโครมาโตกราฟีแบบเจล ฟิลเตรชัน ทั้ง
 ชนิด Sephadex G-150 หรือเจลชนิดอื่น ๆ (de Vlaming, *et al.*,
 1980; Emmersen and Petersen, 1976; Idler, *et al.*, 1979)
 ด้วยเหตุนี้ Utarabhand and Bunlipatanon (1995) ได้สรุปว่าโปรตีนที่
 ติดฉลาก ^{32}P หรือ ^3H ในพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150 เป็น
 ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ ด้วยเหตุผลต่อไปนี้ ประการแรก โปรตีนในพีค S1 นี้
 เป็นฟอสโฟโปรตีนชนิดเดียวที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ ภายใต้การกระตุ้นโดยฮอร์
 โมเนเอสตราไดออล เหมือนกับของปลาเฟลันเดอร์ (Korsgaard, *et al.*,
 1976) และในกบ *Xenopus laevis* (Wallace and Jared, 1968)

ไวเทลโลจีนิของปลากระดูกแข็งหลายชนิด หรือของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่วางไข่ รวมทั้งของปลากะรังจะมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ (ไพบูลย์ บุญลิขิตานนท์, 2537; Emmersen and Petersen, 1976; Wallace, 1978) การเติม ^{32}P -orthophosphate (^{32}P incorporation) จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ที่จำเพาะของการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิในปลานิล (Chan, *et al.*, 1991) ปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Norberg and Haux, 1985) และ ในกบ (Wiley, *et al.*, 1979) ประการที่สอง แบบแผนการแยกฟอสโฟโปรตีนที่ติดฉลากด้วย ^{32}P หรือ ^3H (โปรตีนพีค D4) ของปลากะรัง โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ จะคล้ายกับการแยกไวเทลโลจีนิจากปลาชนิดอื่น กล่าวคือ โปรตีนพีค D4 ของปลากะรังถูกชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.25 M ในขณะที่ถูกชะออกมาด้วยเกลือที่ความเข้มข้น 0.2 M จากปลาเรนโบว์เทราท์ (Norberg and Haux, 1985) ที่ 0.22 M จากปลานิล (Chan, *et al.*, 1991) และจากปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) ประการที่สาม การสังเคราะห์ของฟอสโฟโปรตีนที่ติดฉลากโดย ^{32}P ถูกกระตุ้นได้ในปลากะรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ โดยฮอร์โมนเอสตราไดออล (รูปที่ 2; ไพบูลย์ บุญลิขิตานนท์, 2537) ประการสุดท้าย โปรตีนในพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150 ประกอบด้วยโปรตีน 3 แถบ ในโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ไพบูลย์ บุญลิขิตานนท์ (2537) พบว่าโปรตีนทั้ง 3 แถบนี้ติดฉลากได้ทั้ง ^{32}P และ ^3H ซึ่งมีอัตราส่วนปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ $^{32}\text{P} : ^3\text{H}$ เท่า ๆ กัน คือ 2.75 สำหรับแถบ I, II และ 2.80 สำหรับแถบ III ไม่พบโปรตีนที่ไม่ติดฉลากกัมมันตรังสีแถบอื่น ๆ จึงสรุปได้ว่าโปรตีนทั้ง 3 แถบ เป็นไวเทลโลจีนิ เหมือนกับไวเทลโลจีนิที่พบในปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) ในการศึกษาครั้งนี้ จึงกล่าวได้ว่าการแยกพีค D4 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 จะได้ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ที่มี ^{32}P หรือ ^3H ติดฉลากอยู่ ปริมาณไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ที่แยกได้คิดเป็น

20.0-25.3% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น และจากค่ากัมมันตภาพรังสีของ ^{32}P และ ^3H พบว่าแยกไวเทลโลจีนินได้บริสุทธิ์ขึ้น 2.2 และ 2.8 เท่า ตามลำดับ คิดเป็น ^{32}P 48.6% และ ^3H 56.0% ของพลาสมาเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ 6)

การติดตามความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีนิน ในขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ไม่สามารถทำได้ โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบมี เอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) หรือแบบแปลงสภาพ เพราะ ไวเทลโลจีนินของปลากะรังประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์จำนวนมาก (ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, 2537) ทำให้ยากในการวิเคราะห์แถบโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาในปลาแอกแลนติค แซลมอน (So, *et al.*, 1985) และปลาเรนโบว์ เทราท์ (Wiley, *et al.*, 1979) ที่พบว่าไม่สามารถใช้โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบมี เอสดีเอส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีนินได้ เพราะประกอบด้วยจำนวนแถบโปรตีนมากมาย ทำให้ยากในการบอกถึงความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีนินได้

4.3 คุณสมบัติของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

4.3.1 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ

จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ พบว่าไวเทลโลจีนินประกอบด้วยโปรตีน 3 แถบ ซึ่งย้ายติดสีคูมาซี บลู ในรายงานของไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537) พบไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แถบนี้ ติดฉาก ^{32}P และ ^3H ด้วยอัตราส่วน $^{32}\text{P} : ^3\text{H}$ เท่ากันหรือใกล้เคียงกันมาก คือมีค่า 2.75 สำหรับ แถบ I, II และ 2.80 สำหรับแถบ III จากการหาค่าหน้าหมอกโมเลกุลโดยวัดอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ของไวเทลโลจีนินแต่ละแถบในการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ ที่มีความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ เจล ต่าง ๆ กัน แล้วนำค่าการเคลื่อนที่

สัมพันธ์มาคำนวณหาหน้าหนักโมเลกุล (Rodbard, 1976; Ferguson, 1964) Utarabhand and Bunlipatanon (1995) พบไวเทลโลจีนิน แถบ I มีหน้าหนักโมเลกุลหน่วยย่อย 525,000 ดัลตัน ซึ่งมากกว่าแถบ III (260,000 ดัลตัน) 2 เท่า และแถบ II มีหน้าหนักโมเลกุลหน่วยย่อย 350,000 ดัลตัน จากวิธีการนี้ยังพบว่า ไวเทลโลจีนินแถบ II และ III มีความหนาแน่นของประจุที่ผิวเท่ากันแต่น้อยกว่าของแถบ I 2 เท่า ผลการทดลองนี้คล้ายกับ ไวเทลโลจีนินของปลาทองซึ่งมีโปรตีน 3 แถบเช่นกันและมีหน้าหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยเป็น 380,000, 330,000 และ 230,000 ดัลตัน ไวเทลโลจีนินของปลาทองแถบ I มีความหนาแน่นของประจุที่ผิวมากเป็น 2 เท่า ของแถบ II และ III ซึ่งมีประจุหนาแน่นเท่ากัน (de Vlaming, *et al.*, 1980) จึงสรุปได้ว่าไวเทลโลจีนินของปลากะรังแถบ I เป็นไดเมอร์ (dimer) เพราะมีทั้งหน้าหนักโมเลกุลหน่วยย่อยและความหนาแน่นของประจุที่ผิวมาก เป็น 2 เท่าของแถบ III ซึ่งเป็นโมนอเมอร์ (monomer) ในขณะที่ไวเทลโลจีนินแถบ II ไม่ทราบชัด เนื่องจากแถบ II มีความหนาแน่นของประจุที่ผิวเท่ากับแถบ III แต่มีหน้าหนักโมเลกุลมากกว่าแถบ II จึงอาจเป็นไวเทลโลจีนินรูปแบบหนึ่งที่มีจำนวนน้อย (minor form) หรือเป็นไวเทลโลจีนินแถบ III ที่จับอยู่กับ (conjugate) พลาสมาโปรตีนอื่นที่ไม่มีประจุ (Utarabhand and Bunlipatanon, 1995)

4.3.2 องค์ประกอบทางเคมี

เป็นที่ทราบกันดีว่า ไวเทลโลจีนินของปลากะรังหรือของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังประเภทวางไข่ เป็นโปรตีนที่มีไขมัน คาร์โบไฮเดรตและฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ หรือก็คือเป็นฟอสโฟไกลโคลิพิดโปรตีน จากการศึกษานี้ของไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537) โปรตีนทั้ง 3 แถบของไวเทลโลจีนินของปลากะรัง ย้อมติดส่วนคาร์โบไฮเดรตด้วยสีพีเอเอส (PAS, periodic acid Schiff's reagent) (Zacharius, *et al.*, 1969) และย้อมติดส่วนไขมันด้วย สีซูดาน แบล็ค บี (Prat, *et al.*, 1969) ยังพบไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ที่ประกอบด้วยฟอสเฟต 6.80 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน ซึ่งสอดคล้อง

คล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อฉีด ^{32}P -orthophosphate ในปลา
 กะรังหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดโอลลจึงพบกัมมันตรังสีของ ^{32}P
 ติดจลาจในไวเทลโลเจนนินที่สังเคราะห์ใหม่ เหมือนกับของปลานิลและปลาทอง
 (Chan, *et al.*, 1991; de Vlaming, *et al.*, 1980) บ่งชี้ว่า
 ไวเทลโลเจนนินของปลากะรังมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ หรือเป็นฟอสโฟโปรตีน
 ดังเช่นไวเทลโลเจนนินของปลาไหลญี่ปุ่น (Japanese eel) ที่มีฟอสเฟต 7.1
 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน (Hara, *et al.*, 1980) ปลาทอง (7.0 ไมโคร
 กรัม ฟอสเฟต/มก.โปรตีน) (de Vlaming, *et al.*, 1980) และของ
 ปลาเรนโบว์ เทราท์ ที่มีฟอสเฟต 6.0 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน (Campbell
 and Idler, 1980)

เมื่อทำการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในไวเทลโลเจนนิน พบว่ามี
 น้ำตาลกลูโคสและแมนโนส 20.7 ± 1.3 และ 8.1 ± 0.1 ไมโครกรัม/มก.
 โปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในไวเทลโลเจนนินของ
 ปลาชนิดต่าง ๆ แตกต่างกันไปในสปีชีส์ต่าง ๆ ดังเช่น ไวเทลโลเจนนินของปลา
 เมดากามีคาร์โบไฮเดรต 132 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน (Hamazaki, *et al.*, 1987) ส่วนไวเทลโลเจนนินของปลาstickle black
 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 17.3-37.4 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน และประกอบ
 ด้วยน้ำตาลแมนโนส และกลูโคสเป็นจำนวนมาก (Covens, *et al.*, 1987)

นอกจากนี้ยังพบคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ ในไวเทล
 โลเจนนินของปลากะรัง ซึ่งมีค่า 13.0 ± 6.1 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน (1.3
 $\pm 0.6\%$) และ 20.6 ± 10.3 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน ($2.0 \pm 1.0\%$)
 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) แสดงว่าไวเทลโลเจนนินของปลากะรังมีไขมันเป็นองค์
 ประกอบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Norberg and Haux (1985) ที่พบ
 ไวเทลโลเจนนินของปลาเรนโบว์ เทราท์ (*Salmo gairdneri*) มีไขมันเป็น
 องค์ประกอบถึง 18% และมี 11% ฟอสโฟลิพิด, 4% ไตรกลีเซอไรด์ และ 2%
 คอเลสเทอรอล ในขณะที่ปลาเทราท์ทะเล (*Salmo trutta*) มีไขมัน 19%,
 13.9% ฟอสโฟลิพิด, 2.7% ไตรกลีเซอไรด์ และ 2.0% คอเลสเทอรอล

ส่วน Silversand and Haux (1991) พบปริมาณไขมันในไวเทลโลจีนิคของปลาหลายชนิด เช่น ปลาเรนโบว์ เทราท์ ปลาคอด ปลาเทอร์บ็อกและปลาวูล์ฟฟิช มีไขมันประมาณ 16-18% ของน้ำหนักแห้ง โดยประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดและไขมันที่เป็นกลาง ประมาณ 70% และ 16-18% ของไขมันทั้งหมดตามลำดับ

ไวเทลโลจีนิคของปลากะรังประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ และมีปริมาณคล้ายกับไวเทลโลจีนิคที่เตรียมได้จาก ปลาเมดากา (Hamazaki, *et al.*, 1987) ปลาเรนโบว์ เทราท์ (Hara and Hirai, 1978) และปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) (ตารางที่ 8) จะพบกลูตามีน อะลานีน และลูซีน อยู่เป็นจำนวนมาก แต่พบเซรีนค่อนข้างน้อยกว่าของปลาชนิดอื่น ๆ

จากผลการศึกษาเหล่านี้ สรุปได้ว่า ไวเทลโลจีนิคของปลากะรังมีองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ คล้ายกับของปลากะตุกแข็งสปีชีส์อื่น และเป็นฟอสโฟไกลโคลิโปโปรตีน

4.4 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิค

4.4.1 การสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิคของปลากะรัง

เมื่อนำไวเทลโลจีนิคของปลากะรัง ไปฉีดกระต่ายตัวละ 0.5 มิลลิกรัม จำนวน 3 ครั้ง สามารถกระตุ้นให้กระต่ายเริ่มสร้างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิคที่ฉีดได้ดีหลังการฉีดครั้งที่ 2 และ 3 (รูปที่ 9 หลุม c และ d) หลังการฉีดครั้งแรก กระต่ายสร้างแอนติบอดีไม่มากนัก จึงมีแถบการตกตะกอนกับไวเทลโลจีนิคจางมาก (รูปที่ 9 หลุม b) ในขณะที่ไม่พบแอนติบอดีในซีรัมก่อนการฉีด (รูปที่ 9 หลุม a) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณซีรัมโปรตีนที่พบเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการฉีดครั้งแรก แต่จะเพิ่มขึ้น 1.6 และ 1.8 เท่า หลังการฉีดครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) แสดงให้เห็นว่ากระต่ายมีการสังเคราะห์ซีรัมโปรตีนเพิ่มขึ้นจากการฉีดไวเทลโลจีนิค การสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิคของปลาเทราท์ทะเลจุด (spotted seatrout) พบได้เช่นกัน (Copeland and Thomas, 1988)

เมื่อทำการแยกแอนติบอดีจากซีรัมของกระต่าย โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50% และนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าโปรตีนที่หลุดออกมาในพีคแรกก่อนการชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลจิ้นินได้ เช่นเดียวกับซีรัมกระต่ายก่อนทำการแยก (รูปที่ 9 หลุม e) บ่งชี้ว่าโปรตีนพีคแรกที่ไม่จับกับเรซินนี้เป็นแอนติบอดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Warden and Giese (1984) ที่พบ IgG หลุดออกมาจากคอลัมน์ DEAE-cellulose โดยไม่จับกับเรซิน จากการแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้นินของปลากระริงจากซีรัมกระต่าย แยกแอนติบอดีได้ 142.1 มิลลิกรัม คิดเป็น 6.8% ของโปรตีนทั้งหมดในซีรัมกระต่าย (ตารางที่ 11)

4.4.2 ความจำเพาะต่อพลาสมาไวเทลโลจิ้นินและเนื้อเยื่อของปลากระริง

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้นินปลากระริง เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมา สารสกัดตับ และสารสกัดรังไข่ของปลากระริงเพศเมีย แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารสกัดหัวใจหรือสารสกัดกล้ามเนื้อของปลาดังกล่าว (รูปที่ 10A) รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลากระริงเพศผู้ (รูปที่ 11A) พลาสมาและสารสกัดเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลากระริงที่ยังไม่เจริญพันธุ์ แต่เกิดปฏิกิริยากับสารสกัดตับและพลาสมาของปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ซึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอสตราไดออล (รูปที่ 10B) แสดงว่าไวเทลโลจิ้นินของปลากระริงเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในปลาเพศเมีย มีความเกี่ยวข้องกันหรืออาจมีโครงสร้างที่คล้ายกันกับโปรตีนในสารสกัดตับ และโปรตีนโพลีคลอเนลในสารสกัดรังไข่ ในทำนองเดียวกันแอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้นินของปลาไหลญี่ปุ่นเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาเพศเมียและสารสกัดไข่ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลาเพศผู้ (Hara, *et al.*, 1980) แอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้นินของปลาแอกแลนติก แซลมอน เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนได้ทั้งกับพลาสมา สารสกัดตับและสารสกัดรังไข่ (So, *et al.*, 1985) นอกจากนี้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้นินของปลาเมดากาเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับ

สารสกัดตับ (Hamazaki, *et al.*, 1987) หรือกับสารสกัดรังไข่ (Hara, *et al.*, 1983) การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินกับโปรตีนโพลีคพบได้จากการทดลองในปลาเรนโบว์ เทราท์ (Campbell and Idler, 1980; Hara and Hirai, 1978) และปลาเทราท์ทะเลจุด (Copeland and Thomas, 1988) ผลการทดลองเหล่านี้ แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องระหว่างไวเทลโลจีนินในพลาสมา สารสกัดจากตับ และโปรตีนโพลีคในสารสกัดจากไข่หรือจากรังไข่ ซึ่งสนับสนุนคำกล่าวที่ว่า ไวเทลโลจีนินถูกสังเคราะห์จากตับ ส่งออกไปตามกระแสเลือดและไปสะสมเป็นโปรตีนโพลีคในไข่

4.4.3 ความจำเพาะต่อพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลาชนิดอื่น ๆ

ในการทดสอบความจำเพาะ ของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน ปลากระริง กับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาทะเล และปลาน้ำจืดเพศเมียหลายชนิด พบว่าแอนติบอดีนี้เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาทะเลได้ ได้แก่ ปลากระพงขาว ปลากระพงแดง ปลากระบอก และปลาเห็ดโคน แต่ลักษณะแถบการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับพลาสมาของปลากระบอกแตกต่างจากของปลาชนิดอื่น ๆ แสดงถึงลักษณะโครงสร้างบางส่วนของแอนติเจน (ไวเทลโลจีนิน) ของปลากระบอกที่ต่างไปจากของปลาอื่น ๆ เหล่านี้ ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินปลากระริงต่อพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลาทะเลชนิดอื่น ๆ ที่มีตระกูล (family) ใกล้เคียงกัน ไม่พบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินปลากระริงกับพลาสมาของปลาน้ำจืดที่ใช้ศึกษา เช่น ปลาช่อน ปลาดุกอุย ปลาสร้อย ปลาตะเพียน และปลานิล ในทำนองเดียวกัน แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาแอทแลนติก แซลมอน เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาชนิดเดียวกัน แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาวินเทอร์ เพลาน์ เดอร์ (winter flounder) ปลาเรนโบว์ เทราท์ และปลาทอง (So, *et al.*, 1985) Redshaw and Follet (1976) พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของนกไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินของปลา สัตว์ครึ่ง

บกดรีงน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ในไฟลัม (phylum) เดียวกัน ผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนของสัตว์ชนิดเดียวกัน โดยไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับโปรตีนของสัตว์ต่างชนิด

4.5 พลาสมาไวเทลโลจีนิน

4.5.1 การวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิน

การวัดระดับปริมาณไวเทลโลจีนิน ในพลาสมาของปลาหลายชนิด เช่นปลานิล (Chan, *et al.*, 1991) ปลาแอกแลนติก แชลมอน (So, *et al.*, 1985; Idler, *et al.*, 1979) ปลาเรนโบว์ เทราก์ (Norberg and Haux, 1988; Copeland, *et al.*, 1986) ปลาเทราก์ทะเลจุด (Copeland and Thomas, 1988) หรือในสัตว์อื่น เช่น ไก่ (Redshaw and Follett, 1976) และเต่า (*Chrysemys picta*) (Gapp, *et al.*, 1979) นิยมใช้วิธี radioimmunoassay ที่มี ^{125}I เป็นตัวตามรอย เพราะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ทำการวิเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้ในระดับนาโนกรัม อาศัยการติดฉลากไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ด้วย ^{125}I -iodide ที่กรดอะมิโนเซรีน แต่เทคนิคนี้มักประสบปัญหา เพราะการติดฉลากไวเทลโลจีนิน ด้วย ^{125}I ไม่ประสบผลสำเร็จในปลาหลายชนิด สำหรับไวเทลโลจีนินของปลากะรังมีเซรีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เกิดการเติม ^{125}I ปริมาณน้อยกว่าในไวเทลโลจีนินของปลาชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 8) จึงคาดว่า การติดฉลากไวเทลโลจีนินปลากะรังโดย ^{125}I ค่อนข้างทำได้ยาก เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกันมันตรังสี การวัดระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลาตัวอย่างต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงใช้วิธีรื้อกเกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิส ซึ่งวัดไวเทลโลจีนินได้ในระดับไม่น้อยกว่า 1 ไมโครกรัม (รูปที่ 13 และตารางที่ 12) และยังเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่จะบอกความแตกต่างของระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินในปลากะรังที่มีการพัฒนาของรังไข่ระยะต่างๆ ได้

4.5.2 ความสัมพันธ์กับค่าครรชี่การสืบพันธุ์และการพัฒนาไข่

ในการศึกษาพัฒนาการของไข่และรังไข่ของปลากะรังเพศเมียในรอบปีโดยวิธีเนื้อเยื่อวิทยา ระยะพัฒนาการของไข่และรังไข่ของปลากะรังมีแบบแผนคล้ายคลึงกับของปลา *Pagrus major* (Matsuyama, et al ., 1991) ปลาเฟลันเดอร์ (Yamamoto, 1956) . และของปลา striped bass (Groman, 1982) กล่าวคือสามารถแบ่งระยะพัฒนาการของไข่ออกเป็น 6 ระยะ ไข่ระยะ 1-3 เป็นไข่อ่อนซึ่งยังไม่มี การสะสมโปรตีนโยล์ค (previtellogenic oocyte) ระยะ 4-5 เป็นไข่ที่มีการสะสมโปรตีนโยล์ค (vitellogenic oocyte) และพัฒนามากขึ้นจนเป็นไข่ระยะ 6 ซึ่งเป็นไข่อ่อนที่สุด พัฒนาการของรังไข่แบ่งได้เป็น 5 ระยะ คือรังไข่ระยะพัก รังไข่ระยะพัฒนา รังไข่ระยะสุก รังไข่ระยะวางไข่ และรังไข่หลังการวางไข่ใหม่ๆ เนื่องจากปลากะรังแต่ละตัวมีการวางไข่หลายครั้งในฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ ช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนมีนาคมของอีกปี จึงพบไข่หลายระยะอยู่ในรังไข่เดียวกันตลอดช่วงการพัฒนาของรังไข่ ค่าครรชี่การสืบพันธุ์ของปลา บ่งบอกถึงระยะพัฒนาการของรังไข่ ปลาที่มีค่าครรชี่การสืบพันธุ์ต่ำแสดงถึงรังไข่ที่มีการพัฒนาน้อย ปลาที่มีค่าครรชี่การสืบพันธุ์เพิ่มมากขึ้นแสดงถึงการเจริญพันธุ์ของรังไข่มากขึ้นด้วย

จากการวัดระดับปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนิน ของปลากะรังเพศเมียที่มีค่าครรชี่การสืบพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินมีค่าต่ำสุด ในปลาที่มีค่าครรชี่การสืบพันธุ์เท่ากับ 1.5% (1.5 มก./มล.พลาสมา) และมีค่าเพิ่มขึ้นควบคู่กับค่าครรชี่การสืบพันธุ์ที่เพิ่มมากขึ้น จนมีค่าสูงสุดในปลาที่มีค่าครรชี่การสืบพันธุ์เท่ากับ 5.0% (16.1 มก./มล. พลาสมา) กลับมีค่าลดลง (12.2 มก./มล.พลาสมา) ในขณะที่ค่าครรชี่การสืบพันธุ์ยังเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดเป็น 10.6% (ตารางที่ 12) ผลเช่นเดียวกันนี้พบได้ในปลาแอนแลนติค แชลมอน (So, et al., 1985)

จากการศึกษาค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ของปลากะรังตลอดปี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2536 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2537 พบค่านีสูงในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคมของปีถัดไป และมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม หลังช่วงนี้ปลาจะเริ่มวางไข่ผสมพันธุ์ ในขณะที่เกี่ยวกับพบระยะพัฒนาการของไข่สอดคล้องกับค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ ในช่วงเดือนที่มีค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ต่ำพบไข่อ่อน (ระยะ 3-4) เป็นจำนวนมาก เมื่อค่าดรรชนีการสืบพันธุ์เพิ่มมากขึ้นจนถึงจุดสูงสุดจะพบไข่เกือบทั้งหมดเป็นไข่แก่ (ระยะ 5) หรือไข่สุก (ระยะ 6) ในทำนองเดียวกันระดับไวเทลโลจันินในพลาสมาจะเพิ่มขึ้นช้า ๆ ควบคู่กับค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ที่เพิ่มสูงขึ้น หรือพัฒนาการของไข่ที่เจริญมากขึ้น พบระดับพลาสมาไวเทลโลจันินมีค่าสูงสุดในเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นเวลาหนึ่งเดือนก่อนไข่สุกเต็มที่ และลดลงในช่วงไข่สุกเต็มที่กับหลังการวางไข่ แบบแผนระดับพลาสมาไวเทลโลจันินกับระยะพัฒนาการของรังไข่เช่นนี้ พบได้เช่นกัน ในปลาแอทแลนติก แชลมอน (*So, et al., 1985*) ที่พบระดับไวเทลโลจันินในพลาสมาเพิ่มขึ้นควบคู่กับค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อปลาที่มีค่าดรรชนีการสืบพันธุ์เป็น 6.0% ซึ่งเป็นระยะเวลาก่อนวางไข่หนึ่งเดือน จากนั้นปริมาณพลาสมาไวเทลโลจันินมีค่าลดลงช้า ๆ ก่อนการวางไข่ และลดลงอย่างรวดเร็วหลังการวางไข่ การศึกษาในปลา channel catfish (*Pacoli, et al., 1990; Cecily, et al., 1980*) ปลาเรนโบว์เทราท์ (*Copeland, et al., 1986; Whitehead, et al., 1983; Tyler, et al., 1990; Riazi and Fremont, 1988*) และในปลาแชลมอน (*Oncorhynchus keta*) (*Ueda, et al., 1984*) ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน จากผลงานเหล่านี้และระดับไวเทลโลจันินที่เพิ่มสูงสุดก่อนช่วงไข่สุกในปลากะรัง สอดคล้องกับข้อสรุปของรายงานต่าง ๆ ที่ว่าไวเทลโลจันินในเลือดเป็นสารตั้งต้นของโปรตีนโยลด์ ระดับพลาสมาไวเทลโลจันินเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในช่วงที่ไข่มีการสะสมโปรตีนโยลด์ เมื่อไข่สุกจึงพบระดับพลาสมาไวเทลโลจันินลดลง เพราะในช่วงไข่สุกไม่มีการสะสมโปรตีนโยลด์อีกต่อไป การสังเคราะห์ไวเทลโลจันินและหลังออกสู่กระแสเลือดจึงลดลง

จากความสัมพันธ์ที่ได้นี้ ระดับไวเทลโลจันินในพลาสมาจึงน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดี สำหรับบอกระยะพัฒนาการของรังไข่ในช่วงฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ เพื่อจะได้เตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลาให้พร้อมสำหรับการผสมพันธุ์ในบ่อเพาะหรือการผสมพันธุ์ที่ยอมรับต่อไป

4.5.3 ความสัมพันธ์กับขนาดของปลา

ปลากะรังเป็นปลากะเลขนาดเล็กกลางที่เปลี่ยนเพศได้ ปลาที่หนักน้อยกว่า 2 กิโลกรัม ยังไม่เจริญพันธุ์ ไม่พบรังไข่หรืออวัยวะ (testes) ในปลาเหล่านี้ ปลากะรังเริ่มเจริญพันธุ์เมื่อมีน้ำหนักตั้งแต่ 2 กิโลกรัม ขึ้นไป และพบเป็นเพศเมีย เมื่อมีขนาดหนักกว่า 7 กิโลกรัม จะพบปลาส่วนใหญ่เป็นเพศผู้

จากการวัดระดับไวเทลโลจันินในพลาสมาของปลากะรัง 3 กลุ่มคือ ปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (ขนาด 0.5-1 กิโลกรัม) ปลาเพศเมีย และปลาเพศผู้ โดยเก็บตัวอย่างเลือดในเดือนธันวาคมซึ่งเป็นช่วงฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ ไม่พบไวเทลโลจันินในพลาสมาของปลาเพศผู้และปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ พบไวเทลโลจันินเฉพาะในพลาสมาของปลาเพศเมียที่มีน้ำหนัก 2 กิโลกรัม ขึ้นไป ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักของปลาเพศเมียที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 13) ผลการศึกษาเช่นเดียวกันนี้พบได้ในปลาไหลญี่ปุ่น (Hara, *et al.*, 1980) ปลานิล (Chan, *et al.*, 1991) ปลาเรนโบว์ เทราท์ (Van Boheman, *et al.*, 1981; Hara and Hirai, 1978) ปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) ปลาเมดากา (Hara, *et al.*, 1983) และในกบ *Xenopus* (Wallace, 1978) แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจันินเป็นพลาสมาโปรตีนที่พบจำเพาะในปลาหรือสัตว์เพศเมียเท่านั้น

5. สรุป

จากการศึกษาพลาสมาไวเทลโลจีนิน และการพัฒนารังไข่ของปลา
กะรัง สามารถสรุปพอสังเขปได้ดังนี้

1. การฉีดฮอร์โมน 17β -เอสตราไดออลในปริมาณ 2.5 มิลลิกรัม
ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง ทำให้ปลากะรัง
สังเคราะห์พลาสมาโปรตีนและไวเทลโลจีนินเพิ่มขึ้น รวมทั้งพบระดับคอเลส
เทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาเพิ่มขึ้นด้วย

2. การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรังที่ยัง
ไม่เจริญพันธุ์ ซึ่งได้รับการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลและ ^{32}P -orthophos-
phate หรือ ^3H -leucine โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์
Sephadex G-150 แยกได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ คิดเป็น 20.0-25.3%
ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น จากค่ากัมมันตภาพรังสีของ ^{32}P และ ^3H พบว่า
แยกไวเทลโลจีนินได้บริสุทธิ์ขึ้น 2.2 และ 2.8 เท่า ตามลำดับ คิดเป็น ^{32}P
48.6% และ ^3H 56.0% ของสารเริ่มต้น

3. ไวเทลโลจีนินของปลากะรังปรากฏโปรตีน 3 แฉก (I, II,
III) ในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งเป็น
dimer (แฉก I) monomer (แฉก III) และ minor form (แฉก II)

4. ไวเทลโลจีนินของปลากะรังมีองค์ประกอบทางเคมี คล้ายกับ
ไวเทลโลจีนินของปลาชนิดอื่น ๆ คือมีกลูโคส และแมนโนส 20.7 และ 8.1
ไมโครกรัม/มก.โปรตีน ตามลำดับ มีไขมันคือ คอเลสเทอรอล 1.3% และ
ไตรกลีเซอไรด์ 2.0% และมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบเพราะติดฉลากได้ด้วย
 ^{32}P -orthophosphate รวมทั้งมีชนิดและจำนวนกรดอะมิโนไม่แตกต่างจาก
ไวเทลโลจีนินของปลาอื่น ๆ ยกเว้นมีเซรีนค่อนข้างน้อยกว่า

5. การฉีดไวเทรลโลจีนิครั้งละ 0.5 มิลลิกรัม สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อไวเทรลโลจีนิได้ ซึ่งเมื่อนำซีรัมไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel จะแยกแอนติบอดีต่อไวเทรลโลจีนิออกมาในพีคแรกไม่จับกับเรซิน ได้ 142.1 มิลลิกรัม คิดเป็น 6.8% ของซีรัมโปรตีนเริ่มต้น

6. แอนติบอดีต่อไวเทรลโลจีนิ เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนใน Ouchterlony double immunodiffusion กับพลาสมา สารสกัดตับ และ สารสกัดรังไข่ของปลากะรังเพศเมีย แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลากะรังเพศผู้ พลาสมาและสารสกัดเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลากะรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์

7. แอนติบอดีต่อไวเทรลโลจีนิปลากะรัง เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลากะรังเพศเมีย ได้แก่ ปลากะพงขาว ปลากะพงแดง ปลากะบอกและปลาเห็ดโคน แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาน้ำจืดเพศเมีย เช่น ปลานิล ปลาสวาย ปลาดุกก้อย ปลาดูเพียน และ ปลาช่อน

8. การพัฒนาของไข่ปลากะรัง แบ่งได้เป็น 6 ระยะ คือไข่ระยะ 1-3 เป็นไข่อ่อนที่ยังไม่มีการสะสมโปรตีนโพลีค ระยะ 4-5 เป็นไข่ที่มีการสะสมโปรตีนโพลีคและพัฒนามากขึ้นจนเป็นไข่สุกระยะ 6 การพัฒนาของรังไข่ แบ่งเป็น 5 ระยะ คือรังไข่ระยะพัก, รังไข่ระยะพัฒนา, รังไข่ระยะสุก, รังไข่ระยะวางไข่ และ รังไข่หลังการวางไข่ใหม่ ๆ ปลากะรังวางไข่หลายครั้งในช่วงเดือนกันยายนถึงมีนาคมของปีถัดไป จึงพบไข่หลายระยะอยู่ในรังไข่เดียวกัน

9. ความไวของการวัดปริมาณไวเทรลโลจีนิในพลาสมา โดยวิธีรีอกเกิด อิมมูโนอิเล็กโตรฟอริซิส อยู่ในระดับไม่น้อยกว่า 1 ไมโครกรัม

10. ปริมาณพลาสมาไวเทรลโลจีนิ ของปลากะรังเพศเมียในรอบปีแปรผันสัมพันธ์กับค่าดัชนีการสืบพันธุ์และระยะพัฒนาการของรังไข่ ในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนกรกฎาคม ระดับไวเทรลโลจีนิในพลาสมาและค่าดัชนีการ

สปีพันธุ์มีค่าต่ำและค่อนข้างคงที่ ไซ้ที่พบส่วนใหญ่เป็นไซ้อ่อน ในเดือนสิงหาคม ถึงเดือนกันยายน ระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินและค่าครรช้การสปีพันธุ์มีค่า เริ่มเพิ่มขึ้น ควบคู่กับการพัฒนาของไซ้ในช่วงสะสมโปรตีนโยลด์ จากนั้นระดับ พลาสมาไวเทลโลจีนินเพิ่มอย่างรวดเร็วและมีค่าสูงสุดในเดือนธันวาคม ซึ่ง เป็นเวลา 1 เดือนก่อนไซ้สุก แล้วมีระดับลดลงในช่วงไซ้สุกและหลังการวาง ไซ้ ในขณะที่ค่าครรช้การสปีพันธุ์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในเดือนมกราคม ซึ่งเป็น ระยะไซ้สุก และลดลงอย่างรวดเร็วหลังการวางไซ้

11. ไม่พบไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากระริงเพศผู้ และปลาที่ ยังไม่เจริญพันธุ์ แต่จะเริ่มพบไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลาเพศเมียที่มีน้ำหนัก 2 กิโลกรัม ขึ้นไป แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจีนินเป็นพลาสมาโปรตีนที่พบ เฉพาะในปลากระริงเพศเมีย

เอกสารอ้างอิง

- ไพบุลย์ บุญลิปตานนท์. 2537. ไวเทลอิลจีนินของปลากระรัง : การแยกและคุณสมบัติ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 104 หน้า.
- ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และดุสิต ต้นวิไล. 2530. ชนิดของปลากระรังที่พบในน่านน้ำไทย ระหว่างปี 2524-2530 รายงานผลการประชุมทบทวนผลงานวิจัยการเพาะเลี้ยงปลากระรัง ณ สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ วันที่ 23-25 กุมภาพันธ์ 2530 หน้า 17-40.
- Anderson, L. E. and Maclure, W. O. 1973. An improve scintillation cocktail of high-solubilizing power. Anal. Biochem. 51 : 173-179.
- Bailey, R.E. 1957. The effect of estradiol on serum calcium, phosphorus and protein of goldfish. J.Exp. Zool. 136 : 455-469.
- Benfey, T.J., Donaldson, E.M. and Owen, T.G. 1989. An homologous radioimmunoassay for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, with general applicability to other pacific salmonids. Gen. Comp. Endocrinol. 75 : 78-82.
- Bjornsson, B.T. and Haux, C. 1985. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate in plasma of 17β -oestradiol treated rainbow trout. J. Comp. Physiol. 155B : 347-352.

- Burke, M.G., Leatherland, J.F. and Sumpter, J.P. 1984. Seasonal changes in serum testosterone, 11-keto-testosterone and 17β -estradiols levels in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. Can. J. Zool. 62 : 1195-1199.
- Campbell, C.M. and Idler, D.R. 1980. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fraction. Biol. Reprod. 22 : 605-617.
- Cecily, Q.P., Grizzle, J.M. and Bradley, J.T. 1980. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 90 : 353-367.
- Chan, S.L., Tan, C.H., Pang, M.K. and Lam, T. J. 1991. Vitellogenin purification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (*Oreochromis nilotica*) J. Exp. Zool. 257 : 96-109.
- Clemens, M.J., Lofthouse, R. and Tata, J.R. 1975. Sequential changes in the protein synthetic activity of male *Xenopus laevis* liver following induction of egg-yolk proteins by estradiol- 17β . J. Biol. Chem. 250 : 2213-2218.
- Copeland, P.A. and Thomas, P. 1988. The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by

- homologous radioimmuno assay. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B : 17-23.
- Copeland, P.A., Sumpter, J.P., Walker, T.K. and Croft, M. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 83 : 487-493.
- Covens, M., Covens, L., Ollevier, F. and De Loof, A. 1987. A comparative study of some properties of vitellogenin (Vg) and yolk proteins in a number of freshwater and marine teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B : 75-80.
- Craik, J.C.A. 1978. The effect of oestrogen treatment on certain plasma constituents associated with vitellogenesis in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 35 : 445-454.
- Craik, J.C.A. 1982. Levels of phosphoprotein in the eggs and ovaries of some fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B : 507-510.
- Craik, J.C.A. and Harvey, S.M. 1984. Biochemical changes occurring during final maturation of eggs of some marine and freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 24 : 599-610.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121 : 404-427.

- de Vlaming, V.L. 1974. Environment and endocrine control of teleost reproduction. In Control of Sex in Fishes. (Schreck, C.B., ed.), pp. 13-83, Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg.
- de Vlaming, V. L., Wiley, H.S., Delahunty, G. and Wallace, R.A. 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin : induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. Comp. Biochem. Physiol. 67B : 613-628.
- Ding, J.L., Hee, P.L. and Lam, T.J. 1989. Two forms of vitellogenin in the plasma and gonads of male *Oreochromis aureus*. Comp. Biochem. Physiol. 93B: 363-370.
- Dubois, M., Gills, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 : 350-356.
- Eigenmann, C.H. 1892. *Cymatogaster aggregatus* Gibbons : A contribution to the ontogeny of viviparous fishes. Bull. U. S. Fish Comm. 12 : 401-408.
- Elliot, J.A.K., Bromage, N.R. and Whitehead, C. 1979. Effects of oestradiol-17 β on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout. J. Endocrinol. 83 : 54-55.
- Emmersen, B.K. and Petersen, I.M. 1976. Natural occurrence and experimental induction by estradiol-17 β of lipophosphoprotein (vitellogenin) in

- flounder (*Platichthys flesus* L.). Comp. Biochem. Physiol. 54B : 443-446.
- Ferguson, R.A. 1964. Starch-gel electrophoresis-Application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. Metabolism 13 : 985-1002.
- Follett, B.K. and Redshaw, M.R. 1968. The effects of oestrogen and gonadotrophin on lipid and protein metabolism in *Xenopus laevis* Daudin. J. Endocrinol. 40 : 439-456.
- Fostier, A., Jalabert, B., Billard, T., Breton, B. and Zohar, Y. 1983. The gonadal steroids. In Fish Physiology (Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M., eds.), Vol IX, pp. 277-372, Academic Press Inc., New York.
- Fulton, T.W. 1898. On the growth and maturation of the ovarian eggs of teleostean fishes. Fish. Bd. Scotland 16th Ann. Rep. Part 3 : 83-134.
- Gapp, D.A., Ho, S.M. and Collard, I.P. 1979. Plasma levels of vitellogenin in *Chrysemys picta* during the annual gonadal cycle : Measurement by specific radioimmunoassay. Endocrinology 104 : 784-790.
- Giorgi, F. 1982. Variations in the vitellogenin titre during the reproductive cycle of *Rana esculenta* L. Comp. Biochem. Physiol. 72B : 501-506.
- Goedmakers, A. and Verboom, B.L. 1974. Studies on the maturation and fecundity of the pike, *Esox lucius* Linnaeus. Aquaculture 4 : 3-12.

- Goetz, F.W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In Fish Physiology (Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M., eds.), Vol. IX, pp. 117-170, Academic Press Inc., New York.
- Greeley, M.S.Jr., MacGregor III, R. and Marion, K.R. 1988. Variation in plasma oestrogens and androgens during the seasonal and semilunar spawning cycles of female gulf killifish, *Fundulus grandis* (Baird and Girard). J. Fish Biol. 33 : 419-429.
- Groman, D.B. 1982. Histology of the Striped bass. pp. 53-58, Bethesda, Maryland.
- Gudger, E.W. 1918. Oral gestration in the gaff-topsail catfish, *Felichthys felis*. Carnegie Inst. Wash. Publ. 252 : 25-52.
- Guraya, S.S. 1979. Recent advances in the morphology, cytochemistry and function of Balbiani's vitellin body in animal oocytes. Int. Rev. Cytol. 59: 249-321.
- Hamazaki, T. S., Iuchi, I. and Yamagami, K. 1987. Purification and identification of vitellogenin and its immunohistochemical : detection in growing oocytes of the teleost *Oryzid latipes*. J. Exp. Zool. 242 : 333-341.
- Hara, A. 1976. Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 59B : 339-343.

- Hara, A. 1978. Studies on female-specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts : immunochemical, physiochemical and structural studies. Mem. Fac. Fish Hokkaido Univ. 34 : 1-59.
- Hara, A. and Hirai, H. 1978. Comparative studies on immunological properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 59B : 339-343.
- Hara, A., Takano, K. and Hirai, H. 1983. Immunochemical identification of female-specific serum protein, vitellogenin in medaka, *Oryzias latipes* (teleosts). Comp. Biochem. Physiol. 76A : 135-141.
- Hara, A, Yamauchi, H. and Hirai, H. 1980. Studies on female specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). Comp. Biochem. Physiol. 65B : 315-320.
- Hirose, K., Hirono, T. and Ishida, R. 1974. Effect of salmon gonadotropin on ovulation in the ayu, *Plecoglossus altivelis*, with special reference to water balance. Comp. Biochem. Physiol. 47A : 283-289.
- Hoar, W.S. 1969. Reproduction. In Fish Physiology. (Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds.), Vol III, pp. 1-72, Academic Press Inc., New York.

- Hori, S.H., Kodama, T. and Tanahashi, K. 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 37 : 306-320.
- Humason, G.L. 1979. *Animal tissue techniques*. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 661p.
- Idler, D.R. and Campbell, C.M. 1980. Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 41 : 384-391.
- Idler, D.R., Hwang, S.J. and Crim, L. W. 1979. Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *J. Fish. Res. Board Can.* 26 : 574-578.
- Kagawa, H., Young, G. and Nagahama, Y. 1983. Change in plasma steroid hormone levels during gonadal maturation in female goldfish, *Carassius auratus*. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 49 : 1783-1787.
- Kishida, M., Anderson, T.R. and Specker, J. 1992. Induction by β -estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): characterization and quantification in plasma and mucus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88 : 29-39.
- Kobayashi, M., Aida, K. and Hanyu, I. 1988. Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69 : 301-307.

- Korsgaard, B., Emmersen, B.K. and Petersen, I.M. 1976. Natural occurrence and experimental induction by oestradiol-17 β of a lipophosphoprotein in flounder (*Platichthys desus* L.). Comp. Biochem. Physiol. 54B : 443-446.
- Kuo, C.M., Nash, C.E. and Shehadeh, Z.H. 1974. A procedure guide to induce spawning of grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture 3 : 1-14.
- Le Bail, P.Y. and Breton, B. 1981. Rapid determination of the sex of prepuberal salmonid fish by a technique of immunoagglutination. Aquaculture 22 : 367-375.
- Le Menn, F. 1979. Induction de vitellogenine par 1'os-
etradiol et par des androgenes chez un teleosteen
marine: *Gobius niger* L.C.R. Acad. Sc. Paris. Ser.
D. 289 : 413-416.
- Lowry, P.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall,
R.J. 1951. Protein measurement with the folin
phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Mackay, M.E. and Lazier, C.B. 1993. Estrogen respon-
siveness of vitellogenin gene expression in rain
bow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kept at different
temperature. Gen.Comp. Endocrinol. 89 : 255-266.
- MacKenzie, D.S., Thomas, P. and Farmar, S.M. 1989. Sea-
sonal changes in thyroid and reproductive steroid
hormones in female channel catfish (*Ictalurus
punctatus*) in pond culture. Aquaculture 78:63-80.

- Maitre, J.L., Le Guellec, C., Derrien, S., Tenniswood, M. and Valotaire, Y. 1985. Measurement of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis: Application to the kinetic analysis of estrogen stimulation in the male. *Canad. J. Biochem.* 63 : 982-987.
- Matsuyama, M., Nagahama, Y. and Matsuura, T. 1991. Observations on ovarian follicle ultrastructure in the marine teleost, *Pagrus major*, during vitellogenesis and oocyte maturation. *Aquaculture* 92 : 67-82.
- Mc Collum, K., Gregory, D., Williams, B. and Taborsky, G. 1986. Phosvitin isolation from fish eggs : Methodological improvements including "specific" phosvitin precipitation with ferric ion. *Comp. Biochem. Physiol.* 84B : 151-157.
- Methven, D.A., Crim, L.W., Norberg, B., Brown, J.A., Goff, G.P. and Huse, I. 1992. Seasonal reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49 : 754-759.
- Mommsen, T.P. and Walsh, P.J. 1988. Vitellogenin and oocyte assembly. In *Fish Physiology*, (Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds.), Vol. XI, part A, pp. 348-406, Academic Press Inc., New York.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonad. In *Fish Physiology* (Hoar, W.S., Randall,

- D. J. and Donaldson, E.M., eds.), Vol IX, part A, pp. 223-275, Academic Press Inc., New York.
- Nagahama, Y. and Adachi, S. 1985. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Onchorhynchus rhodorus*). *Develop. Biol.* 109 : 428-435.
- Nath, P. and Sundararaj, B.J. 1981. Isolation and identification of female-specific serum lipophosphoprotein (vitellogenin) in the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* 43 : 184-190.
- Ng, T.B. and Idler, D.R. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In *Fish Physiology* (Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, M., eds.), Vol. IX, part A, pp. 373-404, Academic Press Inc., New York.
- Norberg, B. and Haux, C. 1985. Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species: rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B : 869-876.
- Norberg, B. and Haux, C. 1988. A homologous radioimmunoassay for sea trout (*Salmo trutta*) vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.* 5 : 59-68.
- Olin, T. and Von der Decken, A. 1987. Estrogen treatment and its implication on vitellogenin and myosin synthesis in salmon (*Salmo salar*). *Physiol. Zool.* 60 : 346-451.

- Olivereau, M. and Olivereau, J. 1979. Effect of estradiol-17 β on the cytology of the liver, gonads and pituitary and on plasma electrolytes in the female freshwater eel. *Cell Tissue Res.* 199 : 431 - 454.
- Ouchterlony, O. 1956. Antigen-antibody reactions in gel. V types of reactions in co-ordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbial. Scand.* 32 : 231 -240.
- Pacoli, C. Q., Grizzle, J. M. and Bradley, J.T. 1990. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 90 : 353-367.
- Pereira, J.J., Ziskowski, J., Kuropat, C., Luedke, D. and Gould, E. 1992. Vitellogenin in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from Long Island Sound and Boston Harbor. *Estuaries.* 15 : 289-297.
- Petersen, I.M. and Emmersen, B.K. 1977. Changes in serum glucose and lipids, and liver glycogen and phosphorylase during vitellogenesis in nature in the flounder (*Platichthys flesus*, L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 58B : 167-171.
- Peterson, A.J. and Common, T.H. 1972. Estrone and estradiol concentrations in peripheral plasma laying hens as determined by radioimmunoassay. *Can. J. Zool.* 50 : 395-404.
- Plack, P.A., Pritchard, D.J. and Fraser, N.W. 1971. Egg proteins in cod serum. *Biochem. J.* 121 : 847-856.

- Prat, J. P., Lamy, J. N. and Weill, J. D. 1969. Coloration des³ lipoproteins apres electrophorese en gel de polyacrylamide. Bull, Soc. Chim. Biol. 51: 1367.
- Redshaw, M.R. and Follett, B.K, 1971. The crystalline yolk-platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian, *Xenopus laevis*. Biochem. J. 124 : 759-766.
- Redshaw, M. R. and Follett, B. K. 1976. Physiology of egg yolk production by the fowl: The measurement of circulating levels of vitellogenin employing a specific radioimmunoassay. Comp. Biochem. Physiol. 55A : 399-405.
- Riazi, A. and Fremont, L. 1988. Serum vitellogenin and yolk proteolipid complex composition in relation to ovarian growth in rainbow trout *Salmo gairdneri* (Rich). Comp. Biochem. Physiol. 89B : 525-529.
- Rodbard, D. 1976. Estimation of molecular weight by gel filtration and gel electrophoresis I. Mathematical principles. In Method of Protein separation. (Catsimpoolas, N., ed.), Vol 2, pp. 145-179, Plenum Press, New York.
- Silversand, C. and Haux, C. 1991. Isolation and characterization of the lipid composition of vitellogenin from four teleosts. Proceedings of the IV International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish (Scott, C.A.P., Sumpter, J.P.,

- Kime, D.E. and Rolfe, M.S., eds.), 7-12 July 1991, pp. 326-345, Sheffield, U.K.
- So, Y.P., Idler, D. R. and Hwang, S.J. 1985. Plasma vitellogenin in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* Ouananiche) : Isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B : 63-71.
- Sullivan, C.V., Tao, Y., Hodson, R.G., Hara, A., Bennett, R.O. and Wood III, L.C. 1991. Vitellogenin and vitellogenesis in striped bass (*Morone saxatilis*) broodstock. In Proceedings on the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. (Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E. and Rolfe, M.S., eds.), pp. 315-317, Fishsymp. 91, Sheffield.
- Sumpter, J.P. 1985. The purification, radioimmunoassay and plasma levels of vitellogenin from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. In Current Trends in Comparative Endocrinology (Lofts, B. and Holmes, W. N., eds.), vol. 1, pp. 355-357, Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. 1990. The development of a radioimmunoassay for carp *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.* 8 : 129-140.

- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. and Bromage, N.R. 1990. An in vitro culture system for studying vitellogenin uptake into ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Ext. Zool. 255 : 216-231.
- Ueda, H., Hiroi, O., Hara, A., Yamauchi, K. and Nagahama, Y. 1984. Changes in serum concentrations of steroid hormones, thyroxine and vitellogenin during spawning migration of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Gen. Comp. Endocrinol. 53 : 203-211.
- Utarabhand, P. and Bunlipatanon, P. 1995. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*) : Isolation and properties. Comp. Biochem. Physiol. (in submission).
- Van Boheman, C.G., Lambert, J.G.D. and Peutz, J. 1981. Annual cycles in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol. 44 : 94-107.
- Wahli, W., Dawid, J.B., Ryffel, G.U. and Weber, R. 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. Science 212 : 298-304.
- Wallace, R.A. 1965. Resolution and isolation of avian and amphibian yolk granule protein using TEAE-Cellulose. Anal. Biochem. 11 : 297-311.
- Wallace, R. A. 1978. Oocyte growth in non-mammalian vertebrate. In The Vertebrate Ovary : Comparative Biology and Evolution (Jones, R.E., ed.), pp.469-502, Plenum, New York.

- Wallace, R.A. and Jared, D.W. 1968. Studies on amphibian yolk III. Serum phosphoprotein synthesis by vitellogenic females and estrogen-treated males of *Xenopus laevis*. Can. J. Biochem. Physiol. 46: 953-959.
- Wallace, R.A. and Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Am. Zool. 21 : 325-343.
- Wallace, R.A., Nickol, J.M., Ho, T. and Jared D.W. 1972. Studies on amphibian yolk. The relative roles of autogenous and heterogenous processes during yolk protein assembly by isolated oocytes. Dev. Biol. 29 : 255-272.
- Wangh, L.J. 1982. Glucocorticoids act together with estrogens and thyroid hormones in regulating the synthesis and secretion of *Xenopus* vitellogenin, serum albumin and fibrinogen. Dev. Biol. 89 : 294-298.
- Warden, B.A. and Giese, R.W. 1984. Soluble antibody affinity chromatography techniques investigated with ultratrace ¹²⁵I-thyroxin. J. Chrom. 314 : 295-302.
- Watanabe, W.O. and Kuo, C.M. 1986. Water and ion balance in hydration oocytes of the grey mullet, *Mugil cephalus* (L.), during hormone-induced final maturation. J. Fish Biol. 28 : 425-437.
- Whitehead, C., Bromage, N.R. and Breton, B. 1983. Changes in serum levels of gonadotropin, oestra-

- diol 17 β and vitellogenin during the first and subsequent reproductive cycles of female rainbow trout. *Aquaculture* 34 : 317-325.
- Whitehead, C., Bromage, N.R. and Forster, J.R.M. 1978. Seasonal changes in reproductive function of the rainbow trout. *J. Fish Biol.* 12 : 601-608.
- Wiegand, M.D. and Idler, D.R. 1982. Synthesis of lipids by the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovary in vitro. *Can. J. Zool.* 60 : 2683-2693.
- Wiley, H.S. and Dumont, J.N. 1978. Stimulation of vitellogenin uptake in stage IV *Xenopus* oocytes by treatment with chorionic gonadotropin in vitro. *Biol. Reprod.* 17 : 762-771.
- Wiley, H.S., Opresko, L. and Wallace, R.A. 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. *Anal. Biochem.* 97 : 145-152.
- Yamamoto, K. 1956. Studied on the formation of fish eggs I. Annual cycle in the development of ovarian eggs in the flounder, *Liopsetta obscura*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.* 12 : 362-373.
- Yano, I. 1987. Effect of 17 α -hydroxy progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 61 : 49-57.
- Zacharius, R.M., Zell, I. L., Merrison, J. H. and Nordlock, J.J. 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 30 : 148-152.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวเจนจิตต์ คงท่าเน็ด

วัน เดือน ปีเกิด 23 พฤศจิกายน 2506

วุฒิการศึกษา

| <u>วุฒิ</u> | <u>ชื่อสถาบัน</u> | <u>ปีที่สำเร็จการศึกษา</u> |
|---------------|-------------------|----------------------------|
| วท.บ. (ประมง) | ม.เกษตรศาสตร์ | 2529 |

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน (ถ้ามี)

นักวิชาการประมง 4

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ. สงขลา

ต. เขารูปช้าง อ. เมือง จ. สงขลา