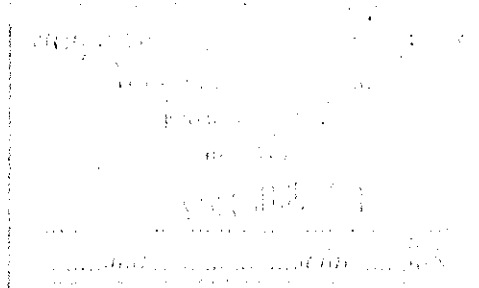




ไวเทลโลจีนินของปลากระวัง : การแยกและคุณสมบัติ  
Vitellogenin of Grouper (*Epinephelus malabaricus*) :  
Isolation and Properties

ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์  
Paiboon Bunlipatanon



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

2537

เลขที่ AL 678.564 493 053 011  
Bib Key 54 453

0111

ชื่อวิทยานิพนธ์ : ไรเทคโนโลยีใหม่ของปลากระชัง : การแยกและคุณสมบัติ  
ผู้เขียน : ไพบูลย์ บุญเลิศานนท์  
สาขาวิชา : วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

---

คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ

.....*Mr. Dr. P. P. P.*.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุการพันธ์)

.....*Mr. Dr. P. P. P.*.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุการพันธ์)

.....*Mr. Dr. P. P. P.*.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โควัฒนะ)

.....*Mr. Dr. P. P. P.*.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โควัฒนะ)

.....*Mr. Dr. P. P. P.*.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์)

.....*Mr. Dr. P. P. P.*.....กรรมการ  
(ดร.วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....*Mr. Dr. P. P. P.*.....

(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์      ไวเทลโลจีนินของปลากระวัง : การแยกและคุณสมบัติ  
ผู้เขียน                นายไพบุลย์ บุญลิปตานนท์  
สาขาวิชา              วิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
ปีการศึกษา             2537

### บทคัดย่อ

โปรตีนโยลด์เป็นแหล่งพลังงาน สำหรับการพัฒนาของคัพภะและตัวอ่อนของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ไวเทลโลจีนินเป็นสารตั้งต้นของโปรตีนโยลด์ถูกสังเคราะห์โดยตับเมื่อมีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในกระแสเลือดสูง แล้วถูกส่งผ่านกระแสเลือดไปยังรังไข่เพื่อเปลี่ยนเป็นโปรตีนโยลด์ ซึ่งประกอบด้วยลิโปไวเทลลินและฟอสไวทิน

การฉีดปลากระวังด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล (3 มก./น้ำหนักปลา 1 กก.) ทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน ในการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลาที่ได้ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล,  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate และ  $^3\text{H}$ -leucine ก่อนแล้ว โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150 แยกไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ได้ 368.5 มก. คิดเป็น 19.2 % ของพลาสมาเริ่มต้น จากปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  แยกไวเทลโลจีนินได้บริสุทธิ์ขึ้น 2.5 และ 3.1 เท่า ตามลำดับ ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีน 3 แถบ (I, II และ III) ในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 470,000, 335,000 และ 290,000 ตัดต้นตามลำดับ ไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แถบ มี  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ติดฉลากอยู่ที่ด้วยอัตราส่วน  $^{32}\text{P} : ^3\text{H}$  มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 2.75 สำหรับแถบ I และ II และ 2.86 สำหรับแถบ III สามารถแยกแถบ I & II ออกจากแถบ III ได้

โดยวิธีพรีพาราทิง เจล อิเล็กโตรพอริซิส แถบทั้ง 3 ย้อมติดสีคูมาซี บลู พี เอเอสและชุดาน แบล็ค บี ไวเทลโลจีนินบริสุทท์มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ 6.8 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าไวเทลโลจีนินของปลากระรังเป็นฟอสโฟไกลโคลิโปโปรตีน

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้จากการฉีดกระต่ายขาวด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทท์ แอนติบอดีนี้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนใน Ouchterlony double immunodiffusion กับไวเทลโลจีนินบริสุทท์ พลาสมาปลาเพศเมียและสารสกัดจากรังไข่ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาปลาเพศผู้ของปลากระรัง ระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาหาได้โดยวิธีร็อกเก็ต อิมมูโน อิเล็กโตรพอริซิส ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ของปลากระรังเพศเมีย

Thesis Title            Vitellogenin of grouper (*Epinephelus  
malabaricus*) : Isolation and  
properties

Author                    Mr.Paiboon Bunlipatanon

Major Program            Biological Sciences

Academic Year            1994

### **Abstract**

Yolk protein is 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, and transported to ovaries. After endocytosis, vitellogenin is proteolytically cleaved to form yolk proteins, lipovitellin and phosvitin.

Intraperitoneal injection of 17  $\beta$ -estradiol (3 mg/kg body weight) every 3 days for 3 times induced vitellogenin synthesis in grouper. Vitellogenin was purified from plasma of grouper preinjected with estradiol,  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate and  $^3\text{H}$ -leucine by column chromatography on DEAE-Sephacel and on Sephadex G-150. The amount of purified vitellogenin was 368.5 mg protein or 19.2 % of plasma protein. Its radioactive specificity increased 2.5 and 3.1 folds for  $^{32}\text{P}$  and  $^3\text{H}$ , respectively. The purified

vitellogenin showed 3 protein bands (I, II and III) in nondenaturing-polyacrylamide gel electrophoresis with  $M_r$  of 470,000, 335,000 and 290,000 daltons, respectively. All of them had radioactivity of  $^{32}\text{P}$  and  $^3\text{H}$  with similar ratio of  $^{32}\text{P} : ^3\text{H}$  — 2.75 (band I), 2.75 (band II) and 2.86 (band III). Band I & II could be separated from band III by preparative gel electrophoresis. These three bands were positively stained with Coomassie brilliant blue, periodic acid Schiff's and sudan black B. The purified vitellogenin contained phosphate 6.8  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein. These results indicated that it was a phosphoglycolipoprotein.

Antibody to the purified vitellogenin was successfully produced in albino rabbits. The antiserum showed precipitation in Ouchterlony double immunodiffusion test with the purified vitellogenin, female plasma and ovarian extract but did not react with male plasma of grouper. Plasma vitellogenin level was determined by rocket immunoelectrophoresis and showed correlation with the gonad somatic index of female grouper.

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนกราบขอพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุการพันธ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม พร้อมทั้ง ดร. วิลาวลัย มหาบุษราคัม กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาแก้ไขปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน นักวิชาการประมง สถาบันวิจัยและเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จลุล่วง และขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอพระคุณ คุณแม่เปรมจิต บุญลิปตานนท์ และพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกท่านที่ให้ความห่วงใยและสนับสนุนการศึกษาตลอดมา ขอขอบคุณ คุณสาทิพย์ ทองนวล ที่ช่วยพิมพ์วิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งขอบคุณ คุณไพลิน เพ็ชรพิจิตร คุณสันติชัย รังสิยาภิรมย์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จ ประโยชน์ ผลสำเร็จ และส่วนดีทั้งหมดของงานวิจัยครั้งนี้ ขออุทิศให้แก่ผู้พี่สาวเจ้ากล่าวมาทุกท่าน

ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	23
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	24
วัสดุ	24
อุปกรณ์	25
วิธีการ	26
3. ผลการทดลอง	40
4. วิจารณ์	75
5. สรุป	89
เอกสารอ้างอิง	91
ภาคผนวก	102
ประวัติผู้เขียน	104



## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	น้ำหนักโมเลกุลและน้ำหนักหน่วยย่อยของไวเทลโลจีนิน ในปลาชนิดต่าง ๆ	17
2	ปริมาณฟอสเฟตของไวเทลโลจีนินในปลาชนิดต่าง ๆ	18
3	องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลโลจีนินในปลาชนิดต่าง ๆ	19
4	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลจีนินในปลา ขนาดของไข่ในปลาเรนโบว์เทราท์	20
5	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลจีนินในปลา กับระยะเวลาเจริญพันธุ์ของปลาเทราท์ทะเลจุด	21
6	ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อความเข้มข้น ของพลาสมาโปรตีน	42
7	การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลาที่ฉีด ฮอร์โมนเอสตราไดออล, $^{32}\text{p}$ -orthophosphate และ $^3\text{H}$ -leucine	46
8	ปริมาณฟอสเฟตของพลาสมาโปรตีนและไวเทลโลจีนิน	64
9	การแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจากซีรัมกระต่าย	66
10	ปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่า ครรชนีการสืบพันธุ์ต่าง ๆ	74

## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ปลากะรังปากแม่น้ำ ( <i>Epinephelus malabaricus</i> ) 1.2 กิโลกรัม	4
2	แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โปรตีนโพลีของแมลงและ สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง	13
3	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพของพลาสมาปลากะรัง	41
4	แบบแผนกัมมันตรังสีของแถบโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ของพลาสมาที่ฉีดเอสตรา ไดออล, $^{32}\text{P}$ -orthophosphate และ $^3\text{H}$ -leucine	44
5	การทำให้ไวเทลโลจีนิบรีสุกซ์จากพลาสมาด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel	45
6	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพของพลาสมาโปรตีนที่ทำให้บรีสุกซ์ด้วย คอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150	48
7	แบบแผนกัมมันตรังสีของแถบโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ	49
8	การทำให้ไวเทลโลจีนิบรีสุกซ์จากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150	50
9	การทำให้ไวเทลโลจีนิบรีสุกซ์จากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์เจล ฟิลเตรชัน ต่าง ๆ	52
10	แบบแผนโปรตีนของไวเทลโลจีนิบรีสุกซ์ในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ	54
11	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบมีเอสดีเอส	55

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
12	แบบแผนไกลโคโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ	57
13	แบบแผนลิโปโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ	58
14	การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส ที่มีความเข้มข้นของเจล 4-8 %	60
15	การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของไวเทลโลจีนินในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส ที่มีความเข้มข้นของ เจล 4-8 %	61
16	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความชันของการเคลื่อนที่สัมพัทธ์กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน	62
17	การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินในซีรัมกระต่าย	65
18	การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของไวเทลโลจีนินในพลาสมาและสารสกัดรังไข่	68
19	การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลาที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ	69
20	แบบแผนพลาสมาโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ของปลาเพศเมียที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ	71
21	การทำรีอกเกิด อิมมูโน อิเล็กโตรฟอริซิส ของพลาสมาปลาเพศเมียและไวเทลโลจีนินมาตรฐาน	72
22	กราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของยอดจรวดกับปริมาณไวเทลโลจีนิน	73

## ตัวย่อและสัญลักษณ์

กก.	=	กิโลกรัม
° F	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	เซนติเมตร
กก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
° C	=	degree Celcius
BSA	=	bovine serum albumin
cpm	=	count per minute
DEAE-Sephacel	=	diethylaminoethyl-Sephacel
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
g	=	acceleration (cm/sec <sup>2</sup> )
M	=	molar
mCi	=	milliCurie
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mM	=	milimolar
Nondenaturing	=	nondenaturing-polyacrylamide
-PAGE	=	gel electrophoresis
O.D.	=	optical density
PMSF	=	phenylmethylsulphonyl fluoride

## ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

PPO	=	2,5-diphenyloxazole
POPOP	=	1,4 bis[2-(5-phenyloxazolyl)]benzene
$R_f$	=	relative mobility
RNA	=	ribonucleic acid
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
Tris	=	tris(hydroxymethyl)aminomethane
$\mu\text{g}$	=	microgram
$\mu\text{l}$	=	microlitre
$\mu\text{M}$	=	micromolar
$\alpha$	=	alpha
$\beta$	=	beta

# 1. บทนำ

## บทนำต้นเรื่อง

ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง ที่มีวิวัฒนาการในเรื่องการสืบพันธุ์แตกต่างกันมาก ปลามีการสืบพันธุ์ทุกรูปแบบของการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (sexual reproduction) ของสมาชิกในอาณาจักรสัตว์ (animal kingdom) การผสมพันธุ์ของปลาเกิดได้ทั้งแบบที่มีการผสมพันธุ์ภายนอก และการผสมพันธุ์ภายในตัว ปลายังแตกต่างกันในเรื่องแหล่งและฤดูวางไข่ ตลอดจนพฤติกรรมการดูแลตัวอ่อน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความตลกของไข่ปลาแต่ละชนิด ความแตกต่างเหล่านี้เป็นผลมาจากวิวัฒนาการและการปรับตัวเป็นระยะเวลาอันยาวนานนับพันปี เพื่อให้การสืบพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งในระยะการปฏิสนธิและการอยู่รอดของตัวอ่อน

ไข่ปลามีลักษณะแตกต่างกันมากมายทั้งขนาด รูปร่างและสี แต่ลักษณะภายในไข่มีส่วนประกอบหลักแบบเดียวกัน คือประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ นิวเคลียส ไซโทพลาซึม และเปลือกไข่ ซึ่งทำหน้าที่หุ้มไข่ไม่ให้เป็นอันตราย ไซโทพลาซึมแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่จะแบ่งเซลล์เจริญไปเป็นคัพภะ (embryo) อีกส่วนคือโปรตีนโพลด์ (yolk protein) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ ลิพอไวเทลลิน (lipovitellin) และฟอสโฟไวทิน (phosvitin) โปรตีนโพลด์ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับพัฒนาการของคัพภะ โปรตีนโพลด์ในไข่ได้มาจากโปรตีนต้นตอที่สำคัญ คือ ไวเทลโลจีนิน (vitellogenin) ซึ่งมีไขมัน คาร์โบไฮเดรต ฟอสฟอรัส แคลเซียม และเหล็ก เป็นองค์ประกอบ ไวเทลโลจีนินจึงจัดเป็นลิพอไกลโคฟอสโฟโปรตีน (lipoglycophosphoprotein) ไวเทลโลจีนินถูกสังเคราะห์โดยตับเมื่อมีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol) ในเลือดสูง จากนั้นไวเทลโลจีนินถูกส่งผ่านกระแสเลือดไปยังรังไข่เพื่อเปลี่ยนไปเป็นโปรตีน 2 ชนิด คือ

ลิโพไวกเทอลินและฟอสไวกิน ในปลาเพศผู้จะไม่พบไวกเทอลิจินในกระแสเลือด แต่การฉีดปลาด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล สามารถกระตุ้นทำให้สังเคราะห์ไวกเทอลิจินได้ นอกจากนี้ ระดับไวกเทอลิจินในเลือดของปลาจะเปลี่ยนแปลงตามระยะพัฒนาการของไข่หรือตามขนาดการสังเคราะห์ไวกเทอลิจิน การหาปริมาณไวกเทอลิจินสามารถทำได้ทั้งทางตรงเช่น โดยการใช้เทคนิค rocket immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ radioimmunoassay เป็นต้น หรือโดยทางอ้อม เช่นการหาปริมาณของฟอสฟอรัสซึ่งจับอยู่กับซีรัมโปรตีน (serum protein bound phosphorus), ฟอสฟอรัสซึ่งจับอยู่กับสารอินทรีย์ (organic bound phosphorus), ฟอสฟอรัสซึ่งจับอยู่กับไขมัน (lipid bound phosphorus), โปรตีนทั้งหมด (total protein), ไขมันทั้งหมด (total lipid), คอเลสเตอรอล (cholesterol) และระดับแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$  levels)

การทำให้ไวกเทอลิจินของปลาบริสุทธิ์ทำได้หลายวิธี เช่น การเซนต์ริฟิวจ์ที่ความเร็วสูง (ultracentrifugation), การตกตะกอนด้วยแคทไอออน (cation) บางตัว, การใช้โครมาโตกราฟี แบบเจล ฟิลเตรชัน (gel filtration chromatography) แบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) หรือแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography) ในการศึกษาปลาสมมา ไวกเทอลิจินของปลากะรังครั้งนี้ อาศัยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน, เจล ฟิลเตรชัน และพรีพาราทีปเจล อิเล็กโตรฟอริซิส (preparative gel electrophoresis) เพื่อทำให้ไวกเทอลิจินบริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี รวมทั้งปริมาณไวกเทอลิจินในพลาสมาปลากะรัง เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับพัฒนาการของรังไข่ปลากะรังต่อไป

## การตรวจเอกสาร

### 1.1 ชื่อวิทยาศาสตร์ของปลากะรัง

ปลากะรังปากแม่น้ำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider, 1801) มีชื่อสามัญว่า grouper ชื่อการค้าคือ ปลาเก๋าจุดแดง เป็นปลาขนาดกลาง ส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติขนาดไม่เกิน 50 เซนติเมตร รูปร่างยาวแบนข้างเล็กน้อย ลำตัวกลม กระดูกหน้าแก้ม เป็นหยักละเอียดทางด้านบน ส่วนด้านล่างหักมุมเป็นหยักเป็นหนามขนาดใหญ่ 2-3 อัน พื้นบนขากรรไกรล่างมี 2 แถว ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 11 อัน ก้านครีบบอ่อน 15-16 อัน ครีบต่าง ๆ กลมมน ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน มีแถบสีน้ำตาลเข้ม ไม่ชัดเจนพาดขวางลำตัว 5-6 แถบ มีจุดสีเหลือง หรือสีส้มเล็ก ๆ ประอยู่ตลอดตัว ก้องและใต้คางไม่มีจุดสี (ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และ ดุสิต ต้นวิไล, 2532) (รูปที่ 1)

ปลาชนิดนี้พบบริเวณชายฝั่งทะเลที่น้ำมีความเค็มอยู่ในระดับตั้งแต่ 15-30 ppt ลูกปลาที่มีขนาดใหญ่คือมีความยาวประมาณ 2 ซม. จนถึง 6.5 ซม. มักพบมากในแถบชายฝั่งอ่าวไทยและแถบชายฝั่งทะเลอันดามันซึ่งมีความเค็มไม่เกิน 35 ppt อุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 28-32 °C ลักษณะน้ำใสมี pH ประมาณ 7.4-8.3 ในฤดูผสมคือตั้งแต่ปลายเดือนพฤศจิกายน ไปถึงเดือนกันยายนจะพบลูกปลาขนาดเล็กประมาณ 1.5-2 ซม. โดยพบมากในบริเวณจังหวัดสงขลา ปัตตานี และนราธิวาส จากการตรวจสอบในกระเพาะลูกปลาขนาดตั้งแต่ 1.5-6 ซม. พบพวกแพลงตอนสัตว์ ลูกปู แอมฟิพอด (amphipod) โคพีพอด (copepod) และกุ้งเคย แต่จะมีแอมฟิพอดมากที่สุด แหล่งวางไข่ของปลากะรังอยู่บริเวณทะเลลึก มีความเค็มสูง เมื่อไข่ฟักออกเป็นตัวและโตจนมีขนาด 1-2 ซม. ลูกปลาสามารถทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงความเค็ม และทนอยู่ในความเค็มต่ำลงได้ ปลากะรังที่มีน้ำหนัก 3-5 กก. ส่วนใหญ่เป็นเพศเมีย ปลาซึ่งมีน้ำหนักมากกว่า 6 กก. ขึ้นไปมักพบเป็นเพศผู้ สามารถทำให้ปลาเพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ได้ โดยการให้กินฮอร์โมนเมซิลเทสโทส





รูปที่ 1 ปลากระรังปากแม่น้ำ (*Epinephelus malabaricus*)  
1.2 กิโลกรัม

เตอโรน (methyltestosterone) 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ซึ่งจะเปลี่ยนเพศของปลาได้ภายใน 3 เดือน (Julavittayanukul, *et al.*, 1987)

## 1.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลากะรัง

### 1.2.1 กำเนิดของรังไข่และอัณฑะ

รังไข่และอัณฑะของปลากะรังเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดต่างกัน โดยรังไข่เกิดจากเซลล์ส่วนผิวของผนังช่องท้อง (peritoneal wall) เจริญมาเป็นสันตามยาวเรียกว่าคอร์เท็กซ์ (cortex) อัณฑะเจริญมาจากกลุ่มเซลล์ด้านในเรียกว่า เมดูลลา (medulla) เซลล์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง จะเจริญเร็วกว่าอีกกลุ่ม โดยกลุ่มเซลล์ที่เจริญช้ากว่าจะสลายไป ดังนั้นปลาตัวหนึ่งจะมีเฉพาะรังไข่หรืออัณฑะเพียงอย่างเดี๋ยวนั้น แต่ในปลาปากกลมและปลากระดูกแข็งบางชนิดมีกลุ่มเซลล์ต้นต่อเพียงชนิดเดียว ทั้งรังไข่ และอัณฑะเจริญมาจากส่วนที่เป็นคอร์เท็กซ์ ทำให้เชื่อกันว่าในปลากระดูกแข็งจะถูกควบคุมโดยพันธุกรรมซึ่งเป็นตัวกำหนดชนิดของสารกำหนดเพศ (sex inducer) ที่ปลาสร้างขึ้นว่าเป็น สารกำหนดเพศผู้หรือเพศเมีย สารดังกล่าวนี้อาจเป็นฮอร์โมนเพศ (sex hormone) ชนิดเดียวกับที่พบในปลาที่เจริญพันธุ์ (mature) หรืออาจเป็นไปได้ว่าตัวปลาสร้างสารที่ไม่ใช่ฮอร์โมนเพศ เพื่อกำหนดเพศ ในระยะเริ่มต้นนี้โดยเฉพาะ (Nagahama, 1983)

### 1.2.2 การสร้างไข่ (Oogenesis)

#### 1.2.2.1 การเพิ่มจำนวนโอโอโกเนีย (Oogonial proliferation)

โอโอโกเนียซึ่งเจริญมาจากเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ และขนาดของนิวเคลียส โอโอโกเนียกลายเป็นไพรมารี โอโอไซต์ (primary oocyte) เมื่อนิวเคลียสมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะดิพลอทีน (diplotene) ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ระยะที่ 1 (meiosis I)

### 1.2.2.2 การสร้างและสะสมโวลด์ (Vitellogenesis)

โอโอไซท์ในระยะนี้มีการเพิ่มขนาดโดยการสะสมโปรตีนโวลด์ภายในเซลล์ ชั้นตอนนี้เริ่มจากเยอร์มินัล อีพิทีเลียม (germinal epithelium) เจริญมาล้อมรอบโอโอไซท์ เรียกชั้นเซลล์นั้นว่า ฟอลลิเคิล (follicle) ฟอลลิเคิลจะค่อย ๆ เจริญแบ่งเป็น 3 ชั้น ชั้นนอกสุดเรียกธีคา เซลล์ (theca cell) ถัดเข้ามาคือชั้นแกรนูโลซา เซลล์ (granulosa cell) ระหว่างแกรนูโลซา เซลล์ กับโอโอไซท์ มีชั้นโซนา เรดิเอตา (zona radiata) หรือ โซนา เพลลูซิดา (zona pellucida) ตั้งอยู่นอกจากนี้ฟอลลิเคิล มีท่อเล็กๆ ทอดผ่านโซนา เรดิเอตาไปสู่ไซโทพลาซึมของโอโอไซท์ ซึ่งคาดว่าจะเป็นทางผ่านของสารอาหารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ ชั้นธีคาและแกรนูโลซามีเบสเมมเบร่า เมมเบร่า (basement membrane) กั้นกลาง ทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมนเพศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งมีหน้าที่โดยตรงต่อขบวนการสร้างและสะสมโวลด์ (Goetz, 1983)

การสร้างและสะสมโวลด์ แบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

ก. ระยะการสร้างโวลด์ภายในเซลล์ของโอโอไซท์

(Endogenous vitellogenesis)

โวลด์ที่สร้างขึ้นในระยะแรก มีลักษณะเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เรียกว่า โวลด์ เวซิเคิล (yolk vesicle) ซึ่งจะเริ่มปรากฏใกล้ ๆ ขอบเซลล์ก่อนแล้วจึงค่อย ๆ แฉไปทั่วไซโทพลาซึมของโอโอไซท์ โวลด์ เวซิเคิลจะค่อย ๆ เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ และในที่สุดเมื่อโอโอไซท์เจริญเต็มที่ โวลด์เหล่านี้จะไปรวมอยู่บริเวณขอบของโอโอไซท์เรียกคอร์ทิคัล แอลวีโอล (cortical alveoli) ซึ่งมีบทบาทในการผสมของเชื้อตัวผู้กับไข่ ในตอนเริ่มต้นของการสร้างโวลด์ภายในโอโอไซท์นี้ โซนา เรดิเอตายังไม่เจริญเต็มที่ เมื่อการสร้างโวลด์ระยะนี้สิ้นสุดลง โซนา เรดิเอตาจึงจะเจริญเต็มที่ โดยมีลักษณะคล้ายเช่นเดียวกับธีคา และแกรนูโลซา ซึ่งเจริญเต็มที่และเริ่มตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) โดยสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างโวลด์ระยะที่สองต่อไป

## ข. ระยะการรับโวลต์จากภายนอก (Exogenous vitellogenesis)

ฮอร์โมนเพศเมียโดยเฉพาะ 17 เบต้า-เอสตราไดโอล (17  $\beta$ -estradiol) ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดไปกระตุ้นให้ตับสร้างไวเทลโลจีนิน ซึ่งเป็นฟอสโฟลิพโอโปรตีน (phospholipoprotein) ไวเทลโลจีนิน จะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นโอโอไซท์จะรับสารนี้และเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนโวลต์เข้าไปสะสมในโอโอไซท์ต่อไป การรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่โอโอไซท์ที่ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน โวลต์ที่รับจากภายนอกนี้เรียกว่า โวลต์ แกรนูล (yolk granule) ในปลาบางชนิด เมื่อโอโอไซท์เจริญเต็มที่ โวลต์ แกรนูลจะรวมตัวกันทำให้ไข่มีลักษณะใสขึ้น (Goetz, 1983)

ส่วนประกอบอีกชนิดหนึ่งของโวลต์คือ หยดน้ำมัน (oil droplet) ที่สร้างขึ้นภายในโอโอไซท์ โดยเริ่มปรากฏขึ้นรอบ ๆ นิวเคลียส แล้วค่อย ๆ กระจายออกสู่ภายนอก การสร้างหยดน้ำมันนี้ในปลาบางชนิดพบว่าสร้างพร้อม ๆ กับ โวลต์ เวซิเคิล แต่ในบางชนิดพบว่าสร้างขึ้นภายหลังการสร้างโวลต์ แกรนูล (Goetz, 1983)

โอโอไซท์ที่สิ้นสุดการสะสมโวลต์แล้ว จะอยู่ในระยะพักรอการกระตุ้นจากฮอร์โมนเพื่อให้เกิดการเจริญขั้นสุดท้ายและเกิดการตกไข่

### 1.2.2.3 การเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ (Oocyte final maturation)

เมื่อโอโอไซท์สิ้นสุดการสะสมโวลต์ จะมีการแบ่งเซลล์ แบบไมโอซิสขั้นที่ 1 ในระยะนี้โอโอไซท์จะมีนิวเคลียสหรือเรียกว่า เซอร์มินัล เวซิเคิล (germinal vesicle) ขนาดใหญ่อยู่กึ่งกลางเซลล์หรืออยู่กึ่งกลางระหว่างจุดศูนย์กลางกับขอบเซลล์ เซอร์มินัล เวซิเคิล มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ต้องตรงด้วยน้ำยาบางชนิดให้ไซโทพลาซึมใสก่อน ในระยะนี้ ช่องไมโครไพล์ (micropyle) จะเกิดขึ้นทางแอนิมัล โพล (animal pole) ขณะที่ เซอร์มินัล เวซิเคิล จะค่อย ๆ เคลื่อนที่ไปทางแอนิมัล โพล และในที่สุดผนังของนิวเคลียสจะสลายไป เนื่องจากสิ้นสุดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะ

ที่ 1 เรียกระยะนี้ว่าการสลายของเยอร์มินัล เวซิเคิล (germinal vesicle breakdown) เป็นการสิ้นสุดการเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ ซึ่งได้กลายเป็นไข่ (ovum) อย่างสมบูรณ์ (Crain and Harvey, 1984)

### 1.2.3 การสร้างสเตอรอยด์ของรังไข่ (Steroidogenesis)

รังไข่นอกจากทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้ว ยังมีหน้าที่สร้างสเตอรอยด์อีกด้วย การสร้างสเตอรอยด์เป็นผลมาจากการกระตุ้นของฮอว์โมนโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมอง ภายในรังไข่มีการสร้างสเตอรอยด์ในพอลลิเคิลระยะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

#### 1.2.3.1 พอลลิเคิลก่อนการตกไข่ (Preovulatory follicle)

ในรังไข่มีการสร้างสเตอรอยด์ที่ชั้นเซลล์ของพอลลิเคิล ซึ่งได้แก่ แกรนูโลซา เซลล์ และที่ ซีคา เซลล์ชนิดพิเศษ (special theca cell) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าปกติ อินเตอร์สติเชียลเซลล์ (interstitial cell) ก็เป็นเซลล์ที่สามารถสร้างสเตอรอยด์ได้ (Foster, et al., 1983) ในการสร้าง 17 เบต้า-เอสตราไดออล ซึ่งเป็นฮอว์โมนเพศเมียที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างและสะสมโยล์คในโอโอไซท์ Nagahama (1983) ได้สรุปว่า การสร้างฮอว์โมนชนิดนี้น่าจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของชั้นซีคาและแกรนูโลซา โดยซีคาทำหน้าที่สร้างสารเริ่มต้น ซึ่งอาจเป็นเทสโทสเตอโรน (testosterone) แล้วส่งไปยังแกรนูโลซา และถูกเปลี่ยนไปเป็น 17 เบต้า-เอสตราไดออล ขบวนการเหล่านี้อยู่ภายใต้การควบคุมของโกนาโดโทรปิน ในส่วนที่เกี่ยวกับการตกไข่ (ovulation) Nagahama (1983) ได้สรุปการทดลองโดยละเอียดว่าในการสร้างสเตอรอยด์ควบคุมการสุกของไข่นั้น เซลล์ 2 ชนิดข้างต้น ทำหน้าที่ร่วมกันภายใต้อิทธิพลของโกนาโดโทรปิน เช่นเดียวกับการสร้างฮอว์โมนเพศเมีย โดยชั้นซีคาทำหน้าที่สร้างสารเริ่มต้น ซึ่งอาจเป็น 17 เบต้า-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (17  $\beta$ -hydroxyprogesterone) แล้วส่งไปยังแกรนูโลซาเพื่อเปลี่ยนไปเป็นสเตอรอยด์ควบคุมการสุกของไข่ต่อไป

### 1.2.3.2 ฟอลลิเคิลหลังการตกไข่ (Postovulatory follicle)

ภายหลังการตกไข่พบว่าอีคา เซลล์ ชนิดพิเศษยังทำหน้าที่ในการสร้างสเตอรอยด์ แต่จะสร้างนานเท่าใดขึ้นกับชนิดของปลา สเตอรอยด์ที่ถูกสร้างในระยะนี้ คือ โปรเจสเตอโรนและเทสโทสเตอโรน ซึ่งฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้อาจมีส่วนในการรักษาสภาพของไข่ หรืออาจมีอิทธิพลต่อการวางไข่ (Nagahama, 1983)

### 1.2.3.3 ฟอลลิเคิลในระยะสลายตัว (Atretic follicle)

ยังไม่มีข้อมูลสรุปว่า ฟอลลิเคิลในระยะนี้มีการสร้างสเตอรอยด์หรือไม่ หรือมีหน้าที่ในการทำลายและดูดซึมโอยล์ที่ค้างภายในไข่แต่เพียงอย่างเดียว

### 1.2.4 ชนิดของสเตอรอยด์ที่สร้างในรังไข่

สเตอรอยด์ที่ถูกสร้างในรังไข่ ได้แก่

#### 1.2.4.1 ฮอว์โมนเพศเมีย

ฮอว์โมนเพศเมียถูกสร้างในแกรนูโลซา ส่วนใหญ่เป็น 17 เบต้า-เอสตราไดออล หรือเอสโตรน (estrone) ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสร้างและสะสมโอยล์

#### 1.2.4.2 คอร์ติโคสเตอรอยด์ (Corticosteroid)

คอร์ติโคสเตอรอยด์เป็นฮอว์โมนควบคุมการเจริญขึ้นสุดท้ายของไข่ปลาบางชนิดเช่น ปลาจีนและปลาอื่น ๆ อีกหลายชนิด ในปลาจีนพบฮอว์โมนชนิดนี้ส่วนใหญ่สร้างที่อินเตอรัรีนัล (interrenal)

#### 1.2.4.3 โปรเจสติน (Progestin)

พบโปรเจสตินหลาย ๆ ชนิดในรังไข่ของปลาชนิดต่างๆ เช่นโปรเจสเตอโรนพบในปลาแปซิฟิก แซลมอน (pacific salmon) และปลาไน (nile) ส่วนในรังไข่ของปลาเรนโบว์ เทราท์ ปลาจีน ปลาอุกอัฟริกัน (channal catfish) เป็นต้น กลับพบโปรเจสตินชนิดอื่น เช่น 17 แอลฟา-ไฮดรอกซี-20 เบต้า-ไดไฮโดรโปรเจสเตอโรน (17  $\alpha$  -hy-

droxy-20  $\beta$ -dihydroprogesterone), 17 แอลฟา-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (17  $\alpha$ -hydroxyprogesterone) และ 20 แอลฟา- หรือ 20 เบต้า-ไดไฮโดรโปรเจสเตอโรน (20  $\alpha$ -หรือ 20  $\beta$ -dihydroprogesterone) พบว่าโปรเจสเตอโรนเหล่านี้เป็นสเตอรอยด์ที่ควบคุมการเจริญพันธุ์สุดท้ายของไข่ในปลา

#### 1.2.4.4 ฮอโรโมนเพศผู้ (Androgen)

เป็นที่น่าแปลกใจที่มีการสร้างฮอโรโมนเพศผู้ในรังไข่ของปลาหลายชนิด ฮอโรโมนเพศผู้บางชนิดเช่น แอนโดรสตีนิไดโอน (androstenedione) หรือเทสโทสเทอโรนเป็นสารเริ่มต้นของฮอโรโมนเพศเมีย (Fostier, *et al.*, 1983)

#### 1.2.5 หน้าที่ของสเตอรอยด์ในการเจริญของรังไข่

1.2.5.1 รังไข่ปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ ก็มีการสร้างสเตอรอยด์ การฉีด 17 เบต้า-เอสตราไดออลในปลาบางชนิด พบสเตอรอยด์นี้ไปกระตุ้นให้เซลล์โกนาโดโทรปินเจริญขึ้น ทำให้ปริมาณโกนาโดโทรปินในต่อมใต้สมองเพิ่มขึ้น

1.2.5.2 รังไข่ของปลาโตเต็มวัย ปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปว่าการเจริญ ของรังไข่ก่อนการสะสมไข่ ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนของโอโอโกเนีย อยู่ภายใต้อิทธิพลของสเตอรอยด์หรือไม่ สเตอรอยด์ที่อาจมีอิทธิพลต่อการเจริญระยะนี้คือฮอโรโมนเพศเมีย โดยในปลาบางชนิดพบว่า เอสตราไดออลสามารถกระตุ้นให้โอโอโกเนียเพิ่มจำนวนขึ้น (Oliverau and Oliverau, 1979)

รังไข่ระยะที่มีการสร้างและสะสมไข่ อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอโรโมนเพศเมีย การสร้างไข่ เจริญ ภายในโอโอไซท์ที่ถูกกระตุ้น โดยเอสตราไดออล เอสโตรน หรือ เอสตรีออล (estriol) ส่วนระยะการรับไข่ แกรนูล จากภายนอกนั้น 17 เบต้า-เอสตราไดออลมีบทบาทในการกระตุ้นตัวให้สังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน แล้วปล่อยออกสู่กระแสเลือด จากนั้นโอโอไซท์รับไวเทลโลจีนิน แล้วเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนภายในโอโอไซท์ การรับไวเทลโลจีนินจากกระแสเลือด อยู่ภายใต้การควบคุมของโกนาโดโทรปิน (Fostier, *et al.*, 1983) เมื่อการสะสมไข่สิ้นสุดลง ระดับของเอส

ตราไดออกซินเลือดจะลดลงทันที

รังไข่ในระยะที่มีการเจริญสูงสุดท้ายของไข่ การเจริญสูงสุดท้ายของไข่ถูกควบคุมโดยโกนาโดโทรปินซึ่งมีผลทางตรงต่อไข่ โดยโกนาโดโทรปินกระตุ้นให้พอลลิเคิลสร้างสเตอรอยด์เจริญพันธุ์ (maturational steroid) ซึ่งได้แก่  $17\alpha$ -ไฮดรอกซี- $20\beta$ -ไดไฮโดรโปรเจสเตอโรน สเตอรอยด์นี้จะออกฤทธิ์โดยตรงต่อโอโอไซท์ ทาให้เกิดการเจริญสูงสุดท้าย

รังไข่ในระยะที่มีการตกไข่ การตกไข่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสเตอรอยด์ แต่ถูกกระตุ้นโดยพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) ซึ่งอาจสร้างจากรังไข่เช่นเดียวกัน Goetz (1983) พบว่าการฉีด  $17\alpha$ -ไฮดรอกซี- $20\beta$ -ไดไฮโดรโปรเจสเตอโรน ช่วยกระตุ้นการเจริญสูงสุดท้ายของไข่โดยทาให้เกิดการตกไข่ เมื่อโอโอไซท์อยู่ในระยะที่มีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสไปยังขอบเซลล์ ซึ่งในขณะนั้นโกนาโดโทรปินในเลือดปลามีระดับสูง และมีการสร้างและสะสมพรอสตาแกลนดินในปริมาณที่มากพอสมควรแล้ว หากระดับโกนาโดโทรปินในเลือดไม่สูงมากพอ  $17\alpha$ -ไฮดรอกซี- $20\beta$ -ไดไฮโดรโปรเจสเตอโรนจะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ได้

### 1.3 ฮอร์โมนที่ควบคุมขบวนการสร้างไวเทลโลจีนิน

การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน เกิดขึ้นในระดับของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และถูกเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมนเอสโตรเจนในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Wallace, 1978; Peterson and Common, 1972; Craik, 1978) ส่วนในแมลงถูกควบคุมโดยฮอร์โมนเยาว์วัย (juvenile hormone) ซึ่งเป็นระบบที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene) ด้วยฮอร์โมน (Wahli, et al., 1981)

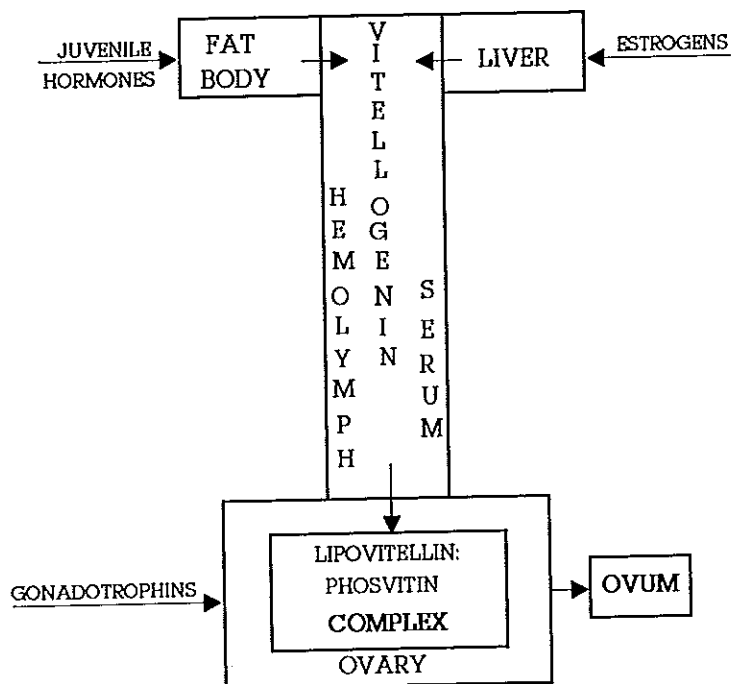
มีการศึกษาขบวนการสร้างไวเทลโลจีนินกันมาก ซึ่งสรุปโดย Wahli, et al. (1981), Tata and Smith (1979), Follett and Redshaw (1974) และ Clemens (1974) ซึ่งกล่าวว่า ยีนที่สร้างไวเทลโลจีนินอยู่ในเซลล์ตับของสัตว์เพศผู้ และเพศเมีย และถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน อาจมีเพียงหนึ่งยีน หรือ หลายยีนที่เป็นโฮโมโลกัส (homologous gene) ซึ่งมีรหัสที่จะสร้างโพลีเปปไทด์ (polypeptide) สายเดี่ยว



คือ ไวเทลโลจีนิน แล้วถูกย่อยตัดแปลงเป็นโพลีเปปไทด์หลายสาย ซึ่งพบใน โยลค์เชิงซ้อน (yolk complex) (Wallace and Jared, 1968; Wallace, et al., 1970; Wallace and Begovac, 1985) ตัวอย่างเช่น ในกบ (*Xenopus laevis*) มียีน 4 ยีนที่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนต้นตอ ยีนทั้ง 4 ยีนนี้เป็นยีนที่เหมือนกัน 2 คู่ (Wahli, et al., 1981) การแสดงออกของ ยีนเหล่านี้ถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือฮอร์โมนเออาร์วีวาย มีผลทำให้ มีการสังเคราะห์โยลค์เป็นจำนวนมาก เช่นในวงจรรีพอดิซันของกบตัวเมียมีน้ำ หนักรังไข่เพิ่มจาก 5% เป็น 16% ของน้ำหนักตัว ในช่วงระยะเวลาการสร้างเซลล์ ไข่ (Follett and Redshaw, 1974) การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักรังไข่ส่วน ใหญ่เป็นการเพิ่มของโยลค์เชิงซ้อน ตามปกติในกบเพศผู้จะ ไม่มีการสังเคราะห์ ไวเทลโลจีนิน แต่ทำให้กบเพศผู้สังเคราะห์ได้โดยการฉีดหรือฝังฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล (Follett and Redshaw, 1974; Wallace and Jared, 1968) แต่เนื่องจากกบเพศผู้ไม่มีรังไข่ที่จะรับไวเทลโลจีนิน จึงทำ ให้อัตราปริมาณไวเทลโลจีนินในซีรัมสูง และในที่สุดจะเหลือเป็นองค์ประกอบ ของซีรัมโปรตีน

ขบวนการสังเคราะห์โปรตีนโยลค์แสดงในรูปที่ 2 ไวเทลโลจีนินก่อนถูก ปลดปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด จะถูกตัดแปลงเป็นขั้นตอนหลังการสัง เคราะห์โปรตีนใหม่ ๆ ไวเทลโลจีนินในซีรัมโดยทั่วไปประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต ที่จับอยู่กับกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ในสายโพลีเปปไทด์ เนื่องจากไว เทลโลจีนินในซีรัมมีไขมัน (lipid) เป็นองค์ประกอบด้วย ดังนั้นการเติม ไขมันควรเกิดขึ้นก่อนที่จะถูกปลดปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด (Korsgaard, et al., 1976) ไวเทลโลจีนินในสิ่งมีชีวิตบางชนิด มีคาร์โบไฮเดรตจับอยู่ด้วยพันธะโค วาเลนต์ ดังนั้นสายโพลีเปปไทด์ของไวเทลโลจีนินจะถูกเติมด้วยฟอสเฟตและ คาร์โบไฮเดรต (Ansari, et al., 1971; Emmersen and Petersen, 1979; Korsgaard and Petersen, 1979) แล้วเชื่อมกับหมู่ไขมันก่อนที่ จะถูกปลดปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด

จากรูปที่ 2 ด้านล่างแสดงหลายขบวนการที่สำคัญต่อการสังเคราะห์โปร ตีนโยลค์ในกบ เนื้อเยื่อในรังไข่ของกบสามารถรับไวเทลโลจีนินได้เร็วกว่า



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โปรตีนไข่ของแมลงและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Wahli, et al., 1981)

ที่รับโปรตีนอื่นในอัตรา 5 หรือ 6 เท่า (Wallace, et al., 1972) แสดงว่าตัวรับที่จำเพาะ (specific receptor) ของไวเทลโลจีนินซึ่งอาจอยู่ที่ผิวนอกของไข่ที่เจริญพันธุ์แล้ว อาจจะมีจำนวนเพิ่มขึ้น Wiley and Dumont (1978) และ Follett and Redshaw (1968) ได้แสดงผลของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินว่า มีความจำเพาะต่อการรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่ไข่น้ำตัวครึ่งบกครึ่งน้ำ ซึ่งคล้ายกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่นปลาเรนโบว์เทราท์ (Tyler, et al., 1990) ที่มีขบวนการที่สำคัญเกิดขึ้นพร้อมกับที่ไวเทลโลจีนินเข้าสู่ไข่คือ ในระหว่างการรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่เซลล์ผ่านขบวนการดูดกลืนของเหลว (pinocytotic uptake) ไวเทลโลจีนินซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์สายยาวจะถูกตัดแบบจำเพาะหลายตำแหน่ง ทำให้ได้ส่วนประกอบ 2 ส่วนเกิดขึ้น คือลิโพไวเทลลินและฟอสโฟทิน โปรตีนทั้งสองส่วนนี้ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หลายสาย (Mc Collum, et al., 1986)

จากการศึกษาถึงโครงสร้างแบบอุลตรา (ultra structure) ของเซลล์เฮปาโทไซท์ (hepatocyte) ในตับ ในระหว่างที่มีการเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์ไวเทลโลจีนินโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเป็นแบบเดียวกันคือถูกกระตุ้นให้สร้างและหลั่งโปรตีนนี้ออกมา เป็นจำนวนมาก ตรวจพบไวเทลโลจีนินได้ภายใน 12 ชั่วโมง หลังจากให้ฮอร์โมน การสังเคราะห์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระยะเวลา 8-15 วัน หลังจาก 15 วัน ระดับไวเทลโลจีนินจะลดลงจนเป็นศูนย์ เมื่อมีการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนซ้ำเป็นครั้งที่สอง การตอบสนองจะเกิดเร็วขึ้นโดยเซลล์จะสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้ก่อน 8 วัน การกระตุ้นทั้งในครั้งแรก และครั้งที่สองจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เฮปาโทไซท์มีการเปลี่ยนแปลงเต็มที่และมีการเปลี่ยนแปลงแบบเดียวกัน คือสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน เพื่อที่จะศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากขบวนการเหนี่ยวนำนี้ จึงมีการพัฒนาวิธีการเลี้ยงเซลล์ตับในหลอดทดลอง การเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน ทำได้จากการเลี้ยงเซลล์ตับทั้งของกบเพศผู้และเพศเมีย นอกจากนี้ได้มีการทดลองใช้สเตอรอยด์ฮอร์โมนชนิดอื่น เช่น เทสโทสเตอโรน โปรเจสเตอโรน, คอร์ติซอล (cortisol) และเด็กซาเมธาโซน (dexamethasone) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน แต่ไม่ได้ผล จากการศึกษาเหล่านี้แสดงว่าเอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนชนิดเดียวที่

สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน การเหนี่ยวนำในตัว  
สิ่งมีชีวิตและในหลอดทดลอง ยังไม่มีรายงานถึงความแตกต่างที่สำคัญในขบวนการ  
ทั้งสอง แต่การเหนี่ยวนำในสิ่งมีชีวิตมีประสิทธิภาพสูงกว่าในหลอดทดลอง  
ดังนั้นการเหนี่ยวนำในหลอดทดลอง จึงต้องปรับปรุงที่จะเลี้ยงเซลล์ให้มีชีวิตอยู่  
ได้เป็นเซลล์ชนิดเดียวกันและสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นได้ดีขึ้น (Wahli,  
*et al.*, 1981)

ไวเทลโลจีนินในซีรัมเป็นโปรตีนที่มีความเสถียรมาก คือมีค่าครึ่งชีวิต  
(half life) ประมาณ 40 วัน ในกบเพศผู้และกบเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ออก  
โดยมีฮอร์โมนโกนาโดโทรปินควบคุมการรับไวเทลโลจีนินของเซลล์ไข่ที่ยังอ่อน  
และเหนี่ยวนำให้ไข่ที่เจริญเต็มที่แล้วถูกปล่อยออกจากถุง คือเกิดการตกไข่  
ไวเทลโลจีนินจะผ่านเข้าทางเส้นเลือดฝอยที่เปิดเข้าสู่โพรงของถุงหุ้มไข่ ผ่าน  
ไปตามช่องรอบๆเซลล์ไข่ แล้วแพร่เข้าไปในเซลล์ไข่ ไข่จะเลือกรับเอาไว  
เทลโลจีนินโดยขบวนการดูดกลืนของเหลวของเซลล์ (Wahli, *et al.*, 1981)

#### 1.4 ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

##### 1.4.1 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

สามารถทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมา ได้หลายวิธี  
Chan, *et al.* (1991) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลานิล (*tilapia*) ที่ถูก  
กระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล ในปริมาณ 0.5 มก./กก. ปลา  
บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl,  
pH 8 แล้วชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เพิ่มความเข้มข้นแบบต่อ  
เนื่องจาก 0-0.35 M พบว่าไวเทลโลจีนินถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้น  
ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.25 M ส่วน Hamazaki, *et al.* (1987)  
ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเมดากา (*medaka, Oryzias latipes*)  
บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟี แบบเจล ซิลิเคชัน และแบบแลกเปลี่ยนไอออน  
โดยใช้ Toyopearl HW-60S และ DEAE-cellulose แล้วชะด้วยเกลือ  
โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.5 M ไวเทลโลจีนินจะถูกชะออกจาก  
คอลัมน์ DEAE-cellulose ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.25-0.3 M

Copeland and Thomas (1988) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเทราท์ทะเลจุด (spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*) ซึ่งถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนไวเทลโลจีนินจากซีรัมด้วย 10 mM EDTA ในอัตราส่วนซีรัม 5 มล. ต่อ EDTA 2 ลิตร จากนั้นละลายตะกอนใน 0.5 M NaCl แล้วแยกด้วยคอลัมน์ Sepharose 6B ไวเทลโลจีนินถูกชะออกมาในพีค (peak) กลาง แต่ยังมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่ ส่วน Campbell and Idler (1980) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ (*Salmo gairdneri*) บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนไวเทลโลจีนิน แล้วละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.005 M จากนั้นแยกด้วยคอลัมน์ TEAE-cellulose แล้วทำการชะด้วยกรดซิตริก อะมิโน โพรพานอล (citric acid-2 amino propanol) แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Ultrogel AcA 22 พบว่าแยกไวเทลโลจีนินได้ถึง 57 % ในขณะที่ Riazi and Fremont (1988) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์บริสุทธิ์เช่นกัน โดยใช้การเซนตริฟิวจ์ความเร็วสูงที่ 150,000 X g นาน 24 และ 72 ชั่วโมง พบไวเทลโลจีนินมีค่าความหนาแน่นในการลอยตัว (density of flotation) เท่ากับ 1.28 กรัม/มล.

Wiley, et al. (1979) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนจากซีรัมด้วย 20 mM EDTA และ 0.5 M MgCl<sub>2</sub> แล้วละลายตะกอนไวเทลโลจีนินที่ได้ใน 1 M NaCl-50 mM Tris-HCl, pH 7.5

#### 1.4.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของไวเทลโลจีนิน

คุณสมบัติทางชีวเคมีของไวเทลโลจีนินสามารถแบ่งได้ดังนี้

##### 1.4.2.1 น้ำหนักโมเลกุล

ไวเทลโลจีนินของปลา เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างมาก คืออยู่ในช่วง 200,000-600,000 ดัลตัน และมักประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) จำนวนหลายหน่วย เช่นปลาทองมี 3 หน่วยย่อย เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 1 โมเลกุลของไวเทลโลจีนินของปลาประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หลายสายรวมกันเป็นโปรตีนเชิงซ้อน (complex protein)

ตารางที่ 1 น้ำหนักโมเลกุลและน้ำหนักหน่วยย่อยของไวเทลโลจีนิในปลาชนิดต่าง ๆ

ชนิดของปลา	น้ำหนักโมเลกุล	น้ำหนักหน่วยย่อย	วิธีการหา	ที่มา
ปลาเมดากา (medaka, <i>Oryzias latipes</i> )	420,000	200,000	SDS-PAGE	Hamazaki, et al., 1987
ปลาทอง (goldfish, <i>Carassius auratus</i> )	380,000	147,000 142,000 140,000	SDS-PAGE Nondenaturing-PAGE	de Vlaming, et al., 1980
ปลาเรนโบว์ เทราท์ (rainbow trout, <i>Salmo gairdneri</i> )	455,000	220,000	Gel filtration	Hara and Hirai, 1978
ปลาไนล์ (tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i> )	300,000	-	Nondenaturing-PAGE	Chan, et al., 1991
ปลาไหลญี่ปุ่น (Japanese eel, <i>Anguilla japonica</i> )	350,000	85,000 31,000 25,000	Gel filtration	Hara, et al., 1980
ปลาเทราท์ทะเลจุด (spottted seatrout, <i>Cynoscion nebulosus</i> )	220,000	-	Gel filtration	Copeland and Thomas, 1988
ปลาแซลมอน (landlocked atlantic salmon, <i>Salmo salar</i> )	520,000	176,000 127,000	Gel filtration	So, et al., 1985

#### 1.4.2.2 ปริมาณฟอสเฟต

ไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีนที่มีฟอสเฟต เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 2

#### ตารางที่ 2 ปริมาณฟอสเฟตของไวเทลโลจีนินในปลาชนิดต่าง ๆ

(Hamazaki, *et al.*, 1987; de Vlaming, *et al.*, 1980; Hara and Hirai, 1978; Hara, *et al.*, 1980)

ชนิดของปลา	ปริมาณฟอสเฟต (มก./มก.โปรตีน)
ปลาเมตากา	0.80 %
ปลาทอง	0.79 %
ปลาเรนโบว์ เทราท์	0.60 %
ปลาไหลญี่ปุ่น	0.71 %

#### 1.4.2.3 ปริมาณไขมัน

ไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีน ที่มีไขมันอยู่จำนวนมาก เช่นในปลาทองและปลาเรนโบว์ เทราท์ มีไขมันอยู่ถึง 21.0% และ 21.50% ของน้ำหนักทั้งหมด ตามลำดับ

#### 1.4.2.4 ค่าการเคลื่อนที่อิสระในอิเล็กโตรฟอรีซิส

(Free electrophoretic mobility, FEM)

ไวเทลโลจีนินของปลา มีค่าการเคลื่อนที่อิสระในอิเล็กโตรฟอรีซิสอยู่ค่อนข้างต่ำเช่นในปลาเมตากา มีค่า 3.8-3.9 ปลาทองมีค่า 3.8 ค่าการเคลื่อนที่อิสระในอิเล็กโตรฟอรีซิสก็คือค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility,  $R_f$ ) ซึ่งคำนวณตามวิธีการของ Rodbard (1976) และ Ferguson (1964) ที่อ้างโดย de Vlaming, *et al.* (1980)

### 1.4.2.5 องค์ประกอบกรดอะมิโน

จากการศึกษาปริมาณกรดอะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบโปรตีนของไวเทลโลเจนนินในปลาหลายชนิด พบว่ามีกรดอะมิโนพวก เซอรีน กลูตามีน อะลานีน ลูซีน และไลซีน อยู่เป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลโลเจนนินในปลาชนิดต่าง ๆ  
(Hamazaki, *et al.*, 1987)

กรดอะมิโน	ปลาเมดากา	ปลาทอง (โมล %)	ปลาเรนโบว์ เทราท์
Asparagine	8.0	6.5	8.9
Threonine	4.7	3.5	5.0
Serine	10.3	6.9	7.6
Glutamine	10.6	11.9	11.6
Proline	4.2	5.5	5.3
Glycine	4.4	4.6	4.3
Alanine	10.4	12.8	11.8
Valine	6.8	6.9	7.2
Methionine	2.4	2.0	2.6
Isoleucine	5.7	6.6	5.5
Tyrosine	3.6	2.6	3.0
Leucine	9.7	10.8	9.6
Phenylalanine	3.4	2.9	4.1
Histidine	2.4	2.3	2.1
Lysine	7.6	7.0	7.2
Arginine	5.0	4.9	4.6



### 1.4.3 ปริมาณไวเทลโลจินีในเลือดปลา

ปริมาณไวเทลโลจินีในเลือดของปลา จะเปลี่ยนแปลงตามระยะการพัฒนากาของไข่ Pacoli et al.(1990) ได้ศึกษาปริมาณไวเทลโลจินี ในปลาตู้กัวฟริกา โดยวิธี ELISA พบปริมาณไวเทลโลจินี  $30.21 \pm 5.36$  มก./มล.พลาสมา ในระยะก่อนการวางไข่และลดลงอย่างรวดเร็ว เป็น  $3.79 \pm 0.89$  มก./มล. พลาสมา หลังจากวางไข่ (Cecily, et al., 1980) ส่วน Copeland, et al. (1986) ได้ศึกษาปริมาณไวเทลโลจินีในปลาเรนโบว์ เทราท์ ตามวิธี radioimmunoassay พบว่าปริมาณไวเทลโลจินีจะเปลี่ยนแปลงตามขนาดของไข่ดังแสดงในตารางที่ 4 กล่าวคือเมื่อไข่เริ่มเจริญมากขึ้นมีขนาดใหญ่ขึ้น ระดับไวเทลโลจินีในพลาสมาที่สูงขึ้นเช่นกัน

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลจินีในพลาสมา กับขนาดของไข่ในปลาเรนโบว์ เทราท์ (Copeland, et al., 1986)

เส้นผ่าศูนย์กลางของไข่ (มม.)	ไวเทลโลจินี (ไมโครกรัม/มล. พลาสมา)
$0.39 \pm 0.01$	$13.50 \pm 10.2$
$0.40 \pm 0.01$	$28.50 \pm 14.80$
$0.42 \pm 0.01$	$43.30 \pm 24.60$
$0.48 \pm 0.01$	$125.00 \pm 30.00$
$0.51 \pm 0.01$	$163.40 \pm 47.50$

นอกจากนี้ Copeland and Thomas (1988) ได้ศึกษา ปริมาณไวเทลโลจีนิของปลาเทราท์ทะเลจุด โดยวิธีเดียวกัน ตามระยะการ เจริญพันธุ์ของปลา ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าเมื่อปลาเพศเมียมีระยะ การพัฒนาของรังไข่เพิ่มขึ้น ระดับไวเทลโลจีนิในพลาสมาก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน และเพิ่มสูงสุดเมื่อปลาเจริญพันธุ์เต็มที่ จากนั้นระดับจะลดลงเมื่อปลาวางไข่

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลจีนิในพลาสมา กับระยะ การเจริญพันธุ์ของปลาเทราท์ทะเลจุด (Copeland and Thomas, 1988)

เพศปลา	ระยะการเจริญพันธุ์	ไวเทลโลจีนิ (มก./มล. พลาสมา)
ผู้	ทุกระยะ	0.009 ± 0.001
เมีย	ระยะไม่เจริญพันธุ์	0.038 ± 0.010
เมีย	ระยะเริ่มต้นของการเจริญพันธุ์	0.105 ± 0.005
เมีย	ระยะกลางของการเจริญพันธุ์	1.594 ± 0.293
เมีย	ระยะเจริญพันธุ์เต็มที่	3.785 ± 0.305
เมีย	ระยะวางไข่	1.936 ± 0.391

#### 1.4.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ไวเทลโลจินี

Parker and Mckeown (1987) ได้เลี้ยงปลาเรนโบว์เทราท์ ในน้ำซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ค่าคือ 5.1 เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในน้ำที่มี pH เป็นกลาง และการเลี้ยงปลาในน้ำที่มีระดับแคลเซียมต่างกัน นาน 10 อาทิตย์ พบว่าปลาซึ่งเลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณแคลเซียมมาก จะมีไวเทลโลจินีสูง แต่ปลาซึ่งเลี้ยงในน้ำที่มี pH ค่า จะมีปริมาณไวเทลโลจินีน้อย แสดงว่าที่ pH ค่า จะยับยั้งการสังเคราะห์ไวเทลโลจินี และไปมีผลยับยั้งการสร้างไข่ แล้วทำให้ไข่ผิดปกติ ซึ่งทำให้เกิดการตายสูงในช่วงการพัฒนาของตัวอ่อน สอดคล้องกับผลของ Peterson and Korsgaard (1989) ที่พบว่าในสภาพที่ pH ค่า ๆ จะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) หรือการสังเคราะห์โปรตีนในช่วงที่ 2 ของขบวนการสะสมไข่สด ทำให้น้ำหนักของรังไข่น้อยและปริมาณไวเทลโลจินีจะลดลง นอกจากนี้ปริมาณแคลเซียมในน้ำมีผลต่อการสังเคราะห์ไวเทลโลจินี กล่าวคือถ้าปริมาณแคลเซียมในน้ำต่ำ ปริมาณไวเทลโลจินีในปลาสมาก็ต่ำด้วย

Norberg and Haux (1988) พบว่าปริมาณไวเทลโลจินีในเลือดลดปริมาณลง เมื่อใส่ยาฆ่าวัชพืชคือเพนทาคลอโรฟีนอล (pentachlorophenol) ซึ่งเป็นสารที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำต่าง ๆ แสดงว่าสารเคมีนี้มีผลต่อการสังเคราะห์ไวเทลโลจินีในปลา

Olin and Decken (1989) ได้ฉีด 17 เบต้า-เอสตราไดออลในปลาแซลมอน ด้วยปริมาณ 5 มก. ต่อน้ำหนักปลา 1 กก. แล้วเลี้ยงปลาในน้ำที่อุณหภูมิต่างกัน 2 ระดับ คือที่อุณหภูมิ 8° ซ และ 16° ซ พบว่าปลาสามารถสังเคราะห์ไวเทลโลจินีได้  $9.71 \pm 0.68$  มก./มล. ปลาสม่าที่ 8° ซ แต่ที่อุณหภูมิ 16° ซ ปลาสังเคราะห์ได้  $27.70 \pm 4.05$  มก./มล. ปลาสม่า แสดงว่าอุณหภูมิสูงมีผลต่อการสังเคราะห์ไวเทลโลจินีในปลาได้ดีกว่า ส่วนการสังเคราะห์ไวเทลโลจินีของปลาไหล (eel, *Anguilla anguilla*) ซึ่งได้ฉีด 17 เบต้า-เอสตราไดออล ก่อนแล้วเลี้ยงในน้ำจืดเทียบกับน้ำทะเล พบว่าปลาไหลสามารถสังเคราะห์ไวเทลโลจินีในน้ำทะเลได้มากกว่าในน้ำจืดถึง 2 เท่า (Petersen and Korsgaard, 1989)

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อการสังเคราะห์พลาสมา ไวเทลโลจีนิในปลากระรัง
2. เพื่อทำให้ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระรัง
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไวเทลโลจีนิกับสารสกัดจากรังไข่ และกับการเจริญพันธุ์ของปลากระรังเทศเมียว

## 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

### วัสดุ

#### ปลาตัวอย่าง

ปลาที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาคือปลากะรังจุดแดงหรือปลากะรังปากแม่น้ำ มีชื่อสามัญคือ grouper ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Epinephelus malabaricus* เป็นปลาเพศเมียที่มีขนาดความยาวลำตัว 25-40 เซนติเมตร น้ำหนัก 1-3.5 กิโลกรัม อายุ 1-3.5 ปี ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มชีววิทยาการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์ชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง

#### สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

จากบริษัท Merck ได้แก่ Acetic acid, Acrylamide, Bromophenol blue, Bis acrylamide (N, N' Methylene diacrylamide), Disodium hydrogen phosphate, Ethanol, Folin-Ciocalteus phenol reagent, Hydrochloric acid, Hydrogen peroxide, Methanol,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Sodium chloride, Sodium dihydrogen phosphate, N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine และ Sulphuric acid

จากบริษัท Sigma ได้แก่ Agarose, Bovine serum albumin, DEAE-Sephacel, 2,5-Diphenyloxazole, 1,4 Bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene, Sepharose CL-6B, Sodium dodecyl sulphate, Tris (hydroxy methyl) aminomethane, Triton X-100 และ Triton X-114

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

จากบริษัท May & Baker Ltd. ได้แก่ Ammonium molybdate และ Cupric sulphate

จากบริษัท Fluka ได้แก่ Coomassie Brilliant Blue R-250, Ethylenediamine tetraacetic acid และ Glycine

จากบริษัท Ajax chemicals ได้แก่ Citric acid

จากบริษัท Serva ได้แก่ 17  $\beta$ -Estradiol

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

จากบริษัท Hopkin & Williams ได้แก่ Xylene, Toluene และ Periodic acid

จากบริษัท Pharmacia ได้แก่ Sephadex G-150 และ Sephadex G-200

จากบริษัท BDH chemicals Ltd. ได้แก่ Sudan Black B และจากบริษัท Difco Laboratories ได้แก่ Freund's adjuvant complete และ Freund's adjuvant incomplete

### อุปกรณ์

Deep-freeze refrigerator ของ Scientemp., Centrifuge ของ Beckman รุ่น TJ-b, Refrigerated super speed centrifuge ของ Sorvall รุ่น RC 5B, Serofuge centrifuge ของ Clay Adam, UV-VIS spectrophotometer ของ Cecil รุ่น CE 272, Liquid scintillation counter ของ Beckman, Micropipette ของ Finn, Rod และ slab gel electrophoresis apparatus ของ Hoefer Scientific Instruments, Automatic fraction

collector ของ Gilson รุ่น 202, Microtube pump MP-3 ของ Eyela, 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

## วิธีการ

### 2.1 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1951) โดยใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสม (10-200 ไมโครกรัม) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์ (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ใน 0.1 N NaOH, 1% potassium sodium tartrate และ 0.5%  $\text{CuSO}_4$  ในอัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมสารละลายฟอลิน-ฟินอล (Folin-phenol reagent, Folin: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1) 0.3 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่มีโบริน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

สำหรับปริมาณโปรตีนของสารละลายที่เก็บจากคอลัมน์ ติดตามได้โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (O.D.<sub>280</sub>)

### 2.2 การหาปริมาณกัมมันตภาพรังสี

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

## 2.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส ที่ใช้ในการศึกษา เป็นแบบ เจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ซึ่งประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูง ประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง ประมาณ 6-7 เซนติเมตร

### 2.3.1 โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, Nondenaturing-PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ 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 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	
TEMED	5 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	
น้ำกลั่น	3.82 ml	1.07 ml	0.47 ml	

#### 2.3.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

ผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับ บัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40 % glycerol, 8 mM EDTA และ 0.4 % โบรโมเฟีนอล บลู (bromophenol



### 2.3.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

นำสารตัวอย่าง 3 ส่วน ผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% glycerol, 8 mM EDTA, 4% SDS, 4 %  $\beta$ -mercaptoethanol, และ 0.4 % โปรโมฟินอล บลู) 1 ส่วน ให้ได้สารละลายตัวอย่าง มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 2 มก./มล. ต่อจากนั้น ต้มในน้ำเดือด 2 นาที ก่อนทำอิเล็กโตรฟอรีซิส โดยเตรียมโปรตีนมาตรฐาน ทำนองเดียวกันกับสารตัวอย่าง

### 2.3.2.2 การทำอิเล็กโตรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่าง และ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (จากข้อ 2.3.2.1) ใส่ในแต่ละช่องของเจลส่วนบนแยกกัน โดยใช้ 0.025 M Tris-0.192 M glycine-1 % SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโตรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟ 30 mA คงที่ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ปิดไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

### 2.3.3 การย้อมสีโปรตีน

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

### 2.3.4 การย้อมสีไกลโคโปรตีน

ย้อมสีไกลโคโปรตีนด้วย periodic acid Schiff's (PAS) ตามวิธีของ Zacharius, *et al.* (1969) โดยแช่เจลแผ่นใน 12.5 % Trichloroacetic acid (TCA) นาน 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 15 วินาที แช่เจลในสารละลาย 1% periodic acid-3 % กรดน้ำส้ม นาน 50 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จนไอโอดेट ( $\text{IO}_3^-$ ) ออกหมด

โดยทดสอบด้วย 0.1 N AgNO<sub>3</sub> จนไม่มีตะกอนสีน้ำตาลเกิดขึ้น นำเจลไปแช่  
 ต่อในสารละลาย Schiff's (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวกข้อ 2) ในที่มีด  
 นาน 50 นาที ล้างสีออกด้วย 0.5 % โซเดียม เมทาไบซัลไฟท์ (sodium  
 metabisulphite) 3 ครั้งครั้งละ 10 นาที จึงล้างต่อด้วยน้ำกลั่น จนเห็น  
 แถบไกลโคโปรตีนเป็นสีม่วงชมพูชัดเจน

### 2.3.5 การย้อมสีลิโปโปรตีน

ย้อมสีลิโปโปรตีนด้วย ชูดาน แบล็ค บี (sudan black B)  
 ตามวิธีของ Prat, *et al.* (1969) โดยนำเจลแผ่นแช่ในสารละลาย  
 working (working solution, สารละลายประกอบด้วย 0.5 % ชูดาน  
 แบล็ค บี-50 % เอทานอล-50% กลีเซอรอล ซึ่งผสมกับ 2 % KOH ในอัตรา  
 ส่วน 3:2) นาน 40 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น ล้างเจลต่อด้วย 2 %  
 เอทานอล-2 % กรดน้ำส้ม นาน 25 นาที แล้วล้างเจลต่อด้วยน้ำกลั่น จน  
 เห็นแถบลิโปโปรตีนเป็นสีฟ้าเงินชัดเจน

### 2.3.6 การหาแถบโปรตีนที่มีสารกัมมันตรังสี

นำสารตัวอย่างที่มีสารกัมมันตรังสี <sup>3</sup>H หรือ <sup>32</sup>P ไปทำโพลี  
 อะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส แบบไม่แปลงสภาพ ในเจลแผ่นขนาด 16  
 x 18 x 0.15 เซนติเมตร ซึ่งเจลส่วนบนมีความเข้มข้นของอะครีลาไมด์  
 3 % และเจลส่วนล่างมีความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องของอะครีลาไมด์ 4-8 %  
 ใช้กระแสไฟ 30 mA นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลแผ่นไปย้อมสีด้วย บลู 4  
 ชั่วโมง แล้วล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย ตามวิธีการในข้อ 2.3.3  
 จากนั้นตัดเจลแผ่นออกเป็นแถบยาวตามช่องใส่สารตัวอย่าง หรือตามชนิดของ  
 สารตัวอย่าง แล้วนำเจลแต่ละสารตัวอย่างนี้ตัดตามขวางเป็นชิ้นเล็ก ๆ กว้าง  
 ขนาด 1 มิลลิเมตร แยกแต่ละชิ้นใส่ในขวดแก้วเล็ก ๆ (vial) เติม 30 %  
 ไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ขวดละ 200 ไมโครลิตร แล้วอบที่อุณหภูมิ  
 60 ° C ประมาณ 6 ชั่วโมง จนเนื้อเจลละลายหมด ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิ  
 ห้อง แล้วนำแต่ละขวดมาเติมสารผสมแสงวับ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณ  
 กัมมันตภาพรังสี (ตามวิธีการข้อ 2.2)

### 2.3.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ

หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนใน โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ตามวิธีของ Rodbard (1976) และ Ferguson (1964) ที่อ้างโดย de Vlaming, *et al.* (1980) โดยให้หลักการว่า โปรตีนจะเคลื่อนที่ในอิเล็กโตรฟอริซิสได้มากน้อยขึ้นกับประจุสุทธิของโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ในเจลส่วนล่าง กล่าวคือ นำสารละลายตัวอย่าง สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งเตรียมตามวิธีการข้อ 2.3.1.1 ไปทำอิเล็กโตรฟอริซิส ในโพลีอะครีลาไมด์ เจล แบบไม่แปลงสภาพ โดยเจลแต่ละแผ่น มีความเข้มข้นของเจลส่วนบนเท่ากัน (3 %) แต่เจลส่วนล่างของเจลแต่ละแผ่นจะมีความเข้มข้นของอะครีลาไมด์แตกต่างกันไป แผ่นละหนึ่งความเข้มข้นตั้งแต่ 4, 5, 6, 7 และ 8 % หลังการย้อมสีโปรตีน วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐาน และแถบสีโบรโมฟินอล บลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนในสารตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟินอล บลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์อะครีลาไมด์ในเจลส่วนล่าง (4-8 %) กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ที่คำนวณได้ จากกราฟที่ได้คำนวณหาความชัน (slop) ของแต่ละแถบโปรตีน แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความชันกับ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน นำค่าความชันของแถบโปรตีนในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสารตัวอย่างได้

#### 2.4 การหาปริมาณฟอสเฟต

หาปริมาณฟอสเฟตของสารตัวอย่างตามวิธีของ Fisk and Subbarow (1925) นำสารตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย molybdic TCA (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวกข้อ 4) จำนวน 1.8 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 X g นาน 10 นาที นำเฉพาะส่วนใส 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย p-phenylenediamine (0.5 % p-phenylenediamine dihydrochloride-5 % sodium disulphite) จำนวน 2 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานฟอสเฟต ซึ่งทำในทำนองเดียวกัน

#### 2.5 การฉีดปลาดัวยฮอร์โมนเอสตราไดออล

ฮอร์โมนที่ใช้ฉีดเพื่อกระตุ้นให้ปลากะรังสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน คือ 17 เบต้า-เอสตราไดออล ซึ่งละลายอยู่ใน 95 % เอทานอล ในการฉีดปลา จะใช้ฮอร์โมน 3 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เตรียมโดยการนำสารละลายฮอร์โมน 300 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำเกลือ (0.95 % NaCl) 700 ไมโครลิตร จนเข้ากันดี แล้วนำไปฉีดปลาบริเวณกล้ามเนื้อเส้นข้างตัว ทำการฉีดทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง เก็บเลือดทุกครั้งก่อนฉีดปลาแต่ละครั้ง เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในพลาสมา

#### 2.6 การเตรียมพลาสมาจากปลา

ทำให้ปลาสลบในน้ำที่ผสมด้วยควินาดีน (quinadine) เข้มข้น 5-10 ppm เจาะเลือดจากเส้นเลือดใหญ่บริเวณเหงือก โดยใช้เฮพารินเป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำเลือดไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 X g ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ผสมพลาสมากับ 1 mM phenylmethylsulphonyl-fluoride (PMSF) แล้วเก็บไว้ที่ -20°C

## 2.7 การฉีดปลาด้วย $^3\text{H}$ -Leucine และ $^{32}\text{P}$ -Orthophosphate

นำ  $^3\text{H}$ -leucine 0.25 mCi ผสมกับ PBS, pH 7 (5 mM phosphate buffer, pH 7-0.9% NaCl) จนมีปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร และนำ  $^{32}\text{P}$ -carrier free orthophosphate 0.35 mCi ผสมกับบัฟเฟอร์ตัวเดียวกัน จนได้ปริมาตร เป็น 1 มิลลิลิตร แล้วฉีดปลาแต่ละตัวด้วยสารกัมมันตรังสีคนละชนิด เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อเหนือเส้นข้างตัว หลังจากฉีดสารโอมเอสตราไดออกดครั้งที่ 3 เรียบร้อยแล้ว จากนั้นเก็บเลือดจากบริเวณเหงือกของปลาหลังการฉีดสารกัมมันตรังสี 24 ชั่วโมง นำไปเตรียมเอาเฉพาะส่วนพลาสมาตามวิธีการในข้อ 2.6

## 2.8 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมา

### 2.8.1 คอลัมน์ DEAE-Sephacel

เติม DEAE-Sephacel ลงในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร ปล่อยให้เรซิน (resin) อัดเรียงตัวกันจนได้ความสูง 15 เซนติเมตร หรือมีปริมาตรของเรซินในคอลัมน์เป็น 78 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วย 0.2 M sodium citrate-0.2% Triton X-100 ตามวิธีของ Wallace (1965) แล้วปรับให้คอลัมน์สมดุล (equilibrate) ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเรซิน

นำพลาสมาที่ได้จากการฉีดสารกัมมันตรังสี  $^3\text{H}$ -leucine และ  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate (จากข้อ 2.7) มาอย่างละ 4 มิลลิลิตร ผสมกัน เก็บไว้ 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนและปริมาณกัมมันตภาพรังสี (ตามข้อ 2.2) นำพลาสมา 6 มิลลิลิตร นี้ใส่ลงในคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 15 มิลลิลิตร ต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (O.D.<sub>280</sub>) ล้างคอลัมน์จนมีค่า O.D.<sub>280</sub> เป็นศูนย์ จึงทำการชะคอลัมน์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นเพิ่มแบบต่อเนื่องจาก 0 M (250 มล.) ถึง 0.35 M (250 มล.) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF

นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสี รวมสารละลายหลอดที่มีค่า O.D.<sub>280</sub> หรือปริมาณกัมมันตภาพรังสีสูงของแต่ละพีค (peak) เข้าด้วยกัน ทำการวัดปริมาณโปรตีน และปริมาณกัมมันตภาพรังสีของสารละลายที่รวมไว้ แล้วทำให้เข้มข้นโดยใส่ในถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ซึ่งยอมให้โมเลกุลเล็กกว่า 12,000 ดัลตัน ผ่านเข้าออกได้ แล้วใช้ CM-cellulose โครมอกราฟีในถุงไดอะไลซิส เก็บไว้ที่ 4° C จนเหลือสารละลายในถุงปริมาตรเพียงเล็กน้อย แล้วนำสารละลายไปวัดปริมาตร หาปริมาณโปรตีน และหาปริมาณกัมมันตภาพรังสี

### 2.8.2 คอลัมน์ Sephadex G-150

เตรียม Sephadex G-150 ในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.1 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร มีปริมาตรเรซิน 72 มิลลิลิตร ล้างและปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

นำสารละลายเข้มข้นของพีคสุดท้าย (D4) ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วย NaCl ที่ความเข้มข้น 200 mM (จากข้อ 2.8.1) ไปไดอะไลซิส (dialyse) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 -1 mM PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4° C จากนั้นใส่ลงในคอลัมน์ Sephadex G-150 โดยปรับให้มีอัตราไหล 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.9 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า O.D.<sub>280</sub> และหาปริมาณกัมมันตภาพรังสี รวมสารละลายหลอดที่มีปริมาณกัมมันตภาพรังสีสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose ทำนองเดียวกับข้อ 2.8.1

### 2.8.3 คอลัมน์ Sephadex G-100, Sephadex G-200,

Sepharose CL-6B และ Bio Gel P-300

เตรียม Sephadex G-100, Sephadex G-200, Sepharose CL-6B และ Bio Gel P-300 แต่ละเรซิน ในคอลัมน์ขนาดเดียวกัน (1.1 x 75 เซนติเมตร มีปริมาตรเรซิน 72 มิลลิลิตร) และทำตามวิธีการ

เดียวกันกับข้อ 2.8.2 ทุกประการ จากนั้นนำสารละลายเข้มข้นของพีคสุดท้าย ( $D_4$ ) ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel จากข้อ 2.8.1 ซึ่งผ่านการไดแอกไลซ์เรียบร้อยแล้ว ใส่ลงในคอลัมน์เจล ฟิลเตรชัน ทางต้นนี้แต่ละคอลัมน์ แล้วทำการชะโปรตีนและศึกษาต่อตามวิธีการข้อ 2.8.2 ทุกประการ

#### 2.8.4 วิธีพาราทึบ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส (Preparative gel electrophoresis)

ทำการแยกสารละลายรวม (พีค S1) ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 (ข้อ 2.8.2) ด้วยอิเล็กโตรฟอริซิสแบบพาราทึบ เจล ซึ่งเป็น โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ

##### 2.8.4.1 การเตรียมเจลแผ่น

เตรียมเจลแผ่น ที่มีขนาด 16 X 18 เซนติเมตร หน้า 3 มิลลิเมตร ตามวิธีการทำ โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ (ข้อ 2.3.1) โดยมีความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ในเจล ส่วนบน 3 % และเจลส่วนล่าง 5% เจลส่วนบนเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่าง เพียงช่องเดียวขนาด 3 X 10 เซนติเมตร

##### 2.8.4.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

ผสมสารละลายรวมที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 กับ 40 % กลีเซอรอล ในอัตราส่วน 1:1

##### 2.8.4.3 การทำอิเล็กโตรฟอริซิส

เติมสารตัวอย่างจากข้อ 2.8.4.2 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปรตีน 6.25 มิลลิกรัม ลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นเปิดกระแสไฟ 20 mA นาน 10 ชั่วโมง ปิดกระแสไฟ แล้วตัดเจลตรงกลางแผ่นเป็นแถบกว้าง 0.2 เซนติเมตร ยาวตลอดแผ่นเจล นำส่วนนี้ไปย้อมสีคумаซี บลู เข้มข้น 2 % ประมาณ 30 นาที เมื่อเห็นแถบโปรตีนที่ต้องการ นำไปเทียบตำแหน่งกับเจลแผ่นส่วนที่เหลือซึ่งไม่ได้ย้อมสี จากนั้นตัดเฉพาะแถบโปรตีนที่ต้องการแต่ละแถบแยกจากกันออกจากเจลแผ่นที่ไม่ได้ย้อมสี แล้วทำการชะโปรตีนออกจากชิ้นเจลต่อไป

#### 2.8.4.4 การชะโปรตีนออกจากเจล

##### ก. การชะโปรตีนโดยทำอิเล็กโตรฟอริซิสใน

##### เจลแท่งแบบแนวตั้ง

นำเจลที่มีโปรตีนแต่ละแถบ จากข้อ

2.8.4.3 ไปเตรียมเป็นเจลแท่ง โดยจุ่มขึ้นเจลนี้ในสารผสมอะครีลาไมด์ของเจลแท่งส่วนล่างที่มีความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ 5 % จากนั้นปล่อยให้เจลส่วนล่างแข็งตัว เติมเจลส่วนบนให้มีความเข้มข้น 3 % แล้วปิดส่วนปลายเปิดด้านล่างของเจลแต่ละแท่งด้วยถุงไดแอไลซ์เพื่อรับโปรตีนที่จะถูกชะออกมาทำอิเล็กโตรฟอริซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ตามวิธีการในข้อ 2.3.1 โดยเปิดกระแสไฟ 20 mA นาน 6 ชั่วโมง เก็บโปรตีนที่ถูกชะออกมาไว้ในถุงไดแอไลซ์ นำไปทำให้เข้มข้น และศึกษาแบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส และศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของไวเทลโลจีนต่อไป

##### ข. การชะโปรตีนแบบแนวนอนโดยกระแสไฟ

นำชิ้นเจลที่มีแถบโปรตีนที่ต้องการ (จากข้อ

2.8.4.3) ใส่ในถุงไดแอไลซ์แล้วนำไปวางตามแนวขวางในภาชนะสำหรับทำอิเล็กโตรฟอริซิส ทำอิเล็กโตรฟอริซิสตามแนวนอนซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ (submarine) จากนั้นชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลสู่ถุงไดแอไลซ์โดยให้กระแสไฟ 15 mA เมื่อครบ 8 ชม. นำสารละลายในถุงไปทำให้เข้มข้นและศึกษาต่อตามวิธีของข้อ ก.

#### 2.9 การเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนในกระต่าย

##### 2.9.1 การกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่าย

กระต่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาว ตาแดง 2 ตัว น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน นำไวเทลโลจีนบริสุทธิ์ซึ่งเตรียมได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 (ข้อ 2.8.2) ไปฉีดกระตุ้นกระต่ายโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 4-5 จุด โดยใช้ปริมาณไวเทลโลจีนและระยะเวลาการกระตุ้นเป็นดังนี้



ตัวที่ 1 อากิตยที่ 1 ฉีดไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร 2 อากิตยที่ถัดมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 อากิตยที่ต่อมาฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 0.5 มิลลิลิตร

ตัวที่ 2 อากิตยที่ 1 ฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร 2 อากิตยที่ถัดมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 อากิตยที่ต่อมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 0.25 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 0.5 มิลลิลิตร

### 2.9.2 การเก็บเลือดและการเตรียมซีรัม

เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดบริเวณหู 5 มิลลิลิตร ทุกครั้งก่อนฉีดไวเทลโลจีนินแต่ละครั้ง และหลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 อากิตย ตั้งเลือดไว้ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}$  C นาน 18 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วนำไปเซนต์ริฟิวจ์ที่ความเร็ว  $1,250 \times g$  ที่  $4^{\circ}$  C เป็นเวลา 15 นาที เก็บซีรัม (serum) ไว้ที่  $-20^{\circ}$  C เพื่อใช้ทดสอบแอนติบอดี

### 2.9.3 การทดสอบการมีแอนติบอดี

ทดสอบการมีแอนติบอดีของซีรัมกระต่าย ที่ได้รับการฉีดสารไวเทลโลจีนิน ด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1953) ดังนี้ เท 0.3 % อะกาโรส (agarose) ใน 0.95 % NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์ (slide) ทั้งในอะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่  $80^{\circ}$  C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเท 1.5% อะกาโรส ใน 0.95 % NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์แผ่นเดิม ทั้งให้เย็น แล้วเจาะอะกาโรสให้เป็นหลุม ทดสอบการมีแอนติบอดีโดยเติมซีรัมของกระต่ายที่ฉีดไวเทลโลจีนินครบ 6 อากิตย ในหลุมกลาง หลุมข้างรอบ ๆ เติมไวเทลโลจีนินหรือแอนติเจน แล้วเก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นที่  $4^{\circ}$  C ต่างคืน ถ้ามีแอนติบอดีในซีรัมกระต่าย จะเห็นแถบการตกตะกอน (precipitin band) ของแอนติเจนและแอนติบอดีระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมกับหลุมที่ใส่แอนติเจน

ซึ่งเห็นได้ชัดจากการย้อมสไลด์ด้วยสีคูมาซี บลู 0.02 % นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย 5 % เมธานอล-7.5 % กรดน้ำส้ม ชุดควบคุมของการทดลองได้จากการใช้ซีรัมของกระต่ายก่อนการฉีดไวเทรลโลจีนินแทน

#### 2.9.4 การแยกแอนติบอดี

เมื่อตรวจสอบซีรัมของกระต่าย ที่ฉีดไวเทรลโลจีนินแต่ละครั้งแล้ว พบว่ามีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีสูง ทำการเก็บเลือดจากกระต่ายจำนวนมาก ทั้งให้แข็งตัวที่ 4° ซ จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 1,250 X g นาน 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนซีรัมไปแยกตามวิธีของ Warden และ Giese (1984) โดยนำซีรัมไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50 % ซ้ำมคืน แล้วนำไป เซนตริฟิวจ์ ที่ 22,600 X g นาน 30 นาที ที่ 4° ซ ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer), pH 7 แล้วนำไปไดแอไลซ์ในบัฟเฟอร์ตัวเดิม 1 ตัน นำสารละลายที่ได้ 16 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel (ขนาด 2.6 X 10.2 เซนติเมตร) ที่ปรับให้สมดุลก่อนด้วย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ตัวเดียวกัน ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร แอนติบอดี (IgG) จะหลุดออกมาใน พีคแรก (Wallace, 1965) รวมสารละลายของพีคแรกเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose จนได้ปริมาตรเท่ากับปริมาตรซีรัมที่ใส่ลงในคอลัมน์ แล้วทดสอบการมีแอนติบอดีโดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion

#### 2.10 การทำรีเอเจนต์ อิมมูโน อิเล็กโทรฟอรีซิส (Rocket immuno-electrophoresis)

ทำรีเอเจนต์ อิมมูโน อิเล็กโทรฟอรีซิส โดยดัดแปลงวิธีของ Yano (1987)

##### 2.10.1 การเตรียมอะกาโรส เจล

นำ อะกาโรส 1% ใน 0.95% NaCl ซึ่งทำให้หลอมเหลวที่ 80° ซ ไปผสมกับแอนติบอดี 2 % แล้วเทลงบนแผ่นแก้ว ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เจาะหลุมใส่สารตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

### 2.10.2 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและไวเทลโลจีนิ (1.19 มก./มล.) ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานโดยการผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4 mM EDTA และ 0.2 % โบรโมเฟีนอล บลู) ในอัตราส่วน 1 : 1

### 2.10.3 การทำอิเล็กโตรฟอรีซิส

หยอดสารตัวอย่างลงในหลุมใส่ตัวอย่าง หลุมละ 0.5 ไมโครลิตร และหยอดไวเทลโลจีนิมาตรฐาน ในแต่ละหลุมให้มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กัน ใช้ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโตรฟอรีซิส จากนั้นเปิดกระแสไฟตอนที่ 50 โวลต์ หลังจากครบ 12 ชั่วโมง ปิดไฟ แล้วนำแผ่นอะกาโรสแช่ในสีย้อม 0.02 % คูมาซี บลู 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 5 % เมทานอล-7 % กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบการตกตะกอนชัดเจน

### 2.11 การเตรียมสารสกัดรังไข่ของปลา

นำรังไข่ปลาหนัก 10 กรัม บดละเอียดใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านผ้าก๊อช 8 ชั้น นำสารละลายใส่ไปเซนตริฟิวจ์ที่ 22,600 X g ที่ 4° ซ นาน 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสไว้ที่ -20° ซ

### 2.12 การหาค่าดัชนีการสืบพันธุ์

ค่าดัชนีการสืบพันธุ์ (gonad somatic index, GSI) ของปลาเพศเมียหรือเพศผู้ สามารถคำนวณตามวิธีของ Hoar (1969) ได้จากสูตร

$$\text{ค่าดัชนีการสืบพันธุ์} = \frac{\text{น้ำหนักของอวัยวะหรือรังไข่ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัว (กรัม)}} \times 100$$

### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 พลาสมาไวเทลโลจีนิน

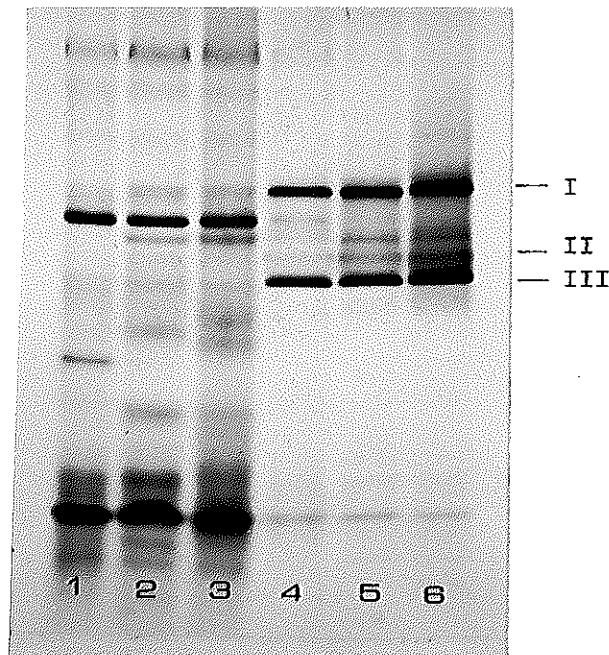
##### 3.1.1 แบบแผนโปรตีนของพลาสมา

เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของพลาสมา ในโพสโอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่า แบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์และที่ยังไม่เจริญพันธุ์คล้ายกันมาก ไม่พบความแตกต่างของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากอย่างเห็นได้เด่นชัด ดังแสดงผลในรูปที่ 3 แถวที่ 2-3 แต่แบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลาเพศผู้ ค่อนข้างแตกต่างจากของปลาเพศผู้ (แถวที่ 1) กล่าวคือไม่พบโปรตีนบางแถบในปลาเพศผู้ และมีโปรตีนบางแถบพบเฉพาะในพลาสมาของปลาเพศผู้

##### 3.1.2 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อการสังเคราะห์

###### พลาสมาโปรตีน

จากการฉีดปลาเพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (ขนาดประมาณ 1-1.5 กิโลกรัม) ด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล ในปริมาณ 3 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง พบว่า ปลามีการสังเคราะห์พลาสมาโปรตีนเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีด (ตารางที่ 6) คือมีความเข้มข้นของพลาสมาโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 95 มก./มล. พลาสมา เป็น 150, 260 และ 320 มก./มล. พลาสมา ตามลำดับ เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพลาสมาโปรตีนเหล่านี้โดยใช้ปริมาณพลาสมาอย่างละ 5 ไมโครลิตร เท่ากัน ในโพสโอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ พบว่าแบบแผนโปรตีนเปลี่ยนไปหลังจากการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1 ได้ 3 วัน (รูปที่ 3 แถวที่ 4) คือแถบโปรตีน I, II และ III มีปริมาณมากขึ้น เมื่อเทียบกับโปรตีนแถบอื่น ๆ และปริมาณโปรตีนทั้ง 3 แถบนี้ ยิ่งเพิ่มมากขึ้นหลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (รูปที่ 3 แถวที่ 5-6)



รูปที่ 3 แบบแผนโปรตีนในโพสโอะคริลลาไมค์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แบบไม่  
แปลงสภาพ ของพลาสมาปลากระริง

- แฉวที่ 1 พลาสมาของปลาเทศผู้  
 แฉวที่ 2 พลาสมาของปลาเทศเมียที่เจริญพันธุ์  
 แฉวที่ 3 พลาสมาของปลาเทศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์  
 แฉวที่ 4 พลาสมาของปลาเทศเมียหลังฉีดฮอร์โมนเอสตรา  
 ไดออล ครั้งที่ 1  
 แฉวที่ 5 พลาสมาของปลาเทศเมียหลังฉีดฮอร์โมนเอสตรา  
 ไดออล ครั้งที่ 2  
 แฉวที่ 6 พลาสมาของปลาเทศเมียหลังฉีดฮอร์โมนเอสตรา  
 ไดออล ครั้งที่ 3

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแฉวเท่ากัน แฉวละ 25 ไมโครกรัม

ตารางที่ 6 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อความเข้มข้นของพลาสติก  
โปรตีน

การฉีดฮอร์โมน	โปรตีน (มก./มล. พลาสติก)
ก่อนการฉีดฮอร์โมน	95
หลังการฉีดฮอร์โมน ครั้งที่ 1	150
หลังการฉีดฮอร์โมน ครั้งที่ 2	260
หลังการฉีดฮอร์โมน ครั้งที่ 3	320

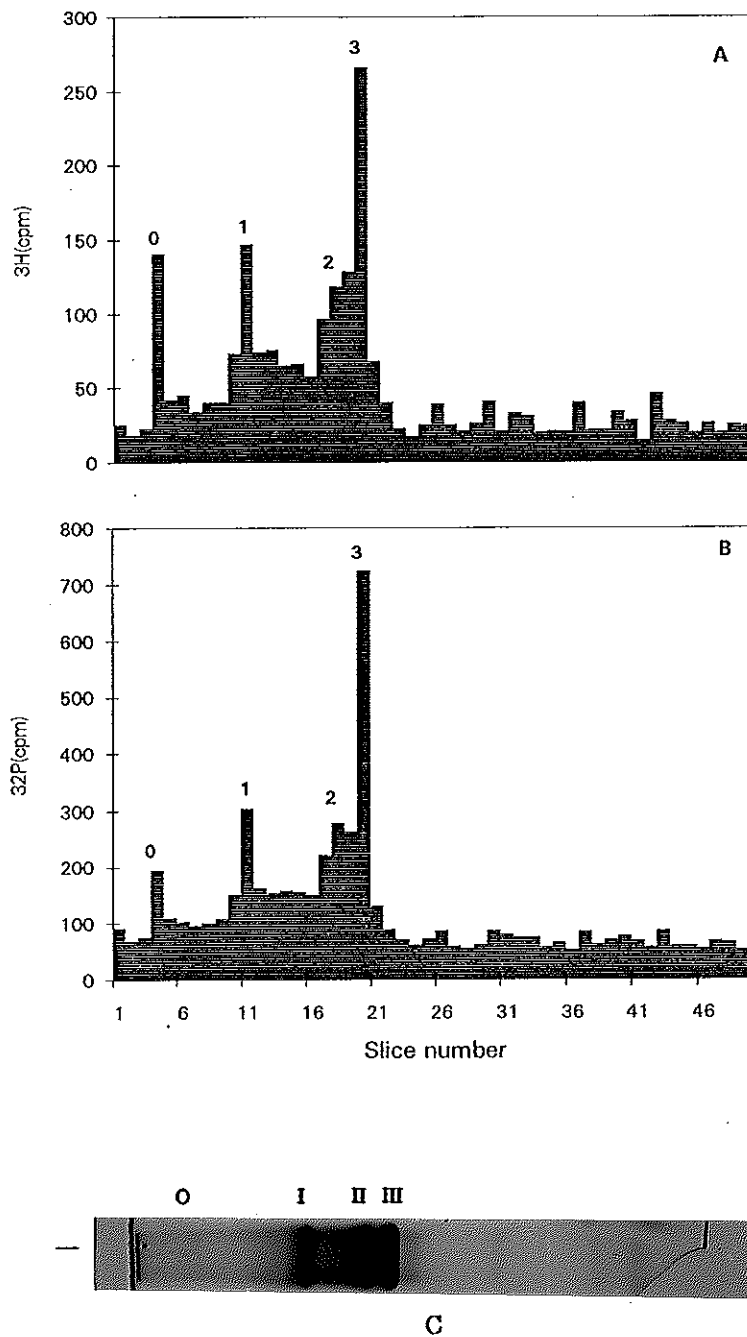
### 3.1.3 ผลของการฉีด $^{32}\text{P}$ -Orthophosphate และ $^3\text{H}$ -Leucine

ในการฉีดปลาด้วยสารกัมมันตรังสี  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate และ  $^3\text{H}$ -leucine ปริมาณ 0.35 mCi และ 0.25 mCi ตามลำดับ หลังการฉีดเอสตราไดออล ครั้งที่ 3 พบว่ามีปริมาณกัมมันตภาพรังสี สำหรับ  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ในพลาสมาเป็น 8,346 cpm/มก. ไพรตีน และ 3,192 cpm/มก. ไพรตีน ตามลำดับ และเมื่อหาแถบไพรตีนที่มีสารกัมมันตรังสีทั้งสองชนิดติดฉลากอยู่ โดยการตัดเจลตามวิธีการข้อ 2.3.6 พบไพรตีนที่มีกัมมันตภาพรังสีของ  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  อยู่ 4 แถบ คือแถบที่ 0, 1, 2 และ 3 (รูปที่ 4 A,B) เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของแถบทั้ง 4 กับแถบไพรตีนที่ย้อมด้วยสีคูมาซี บลู (รูปที่ 4 C) พบว่า แถบ 0 ตรงกับแถบไพรตีน 0 ซึ่งย้อมติดสีคูมาซี บลู จาง แถบที่ 1 ตรงกับแถบไพรตีน I แถบที่ 2 ตรงกับแถบไพรตีน II และ แถบที่ 3 ตรงกับแถบไพรตีน III

## 3.2 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ

### 3.2.1 คอลัมน์ DEAE-Sephacel

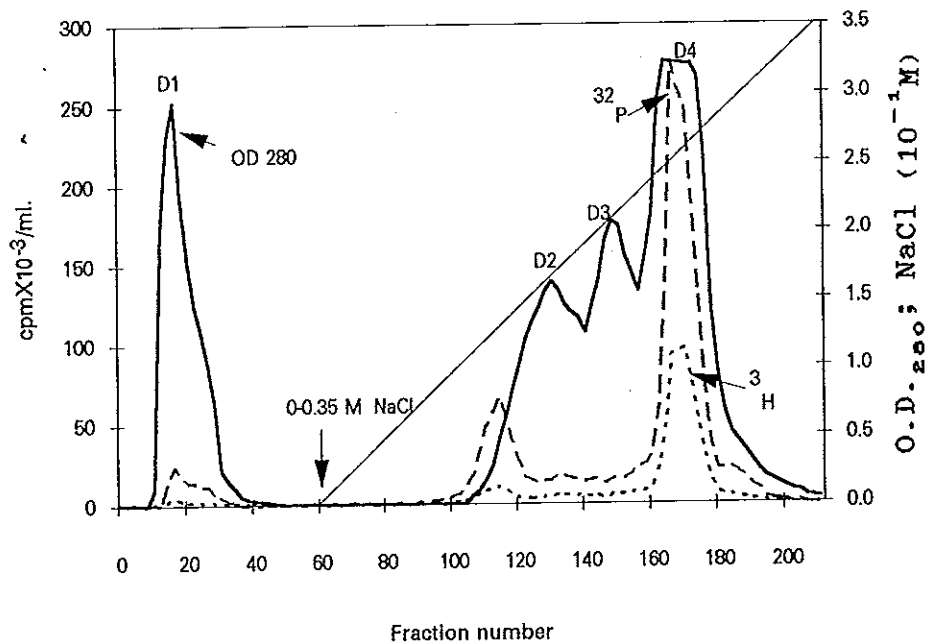
จากการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิจากพลาสมาที่มีสารกัมมันตรังสี  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าไพรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์จะหลุดออกมาเป็นฟีดแรก (D1) ซึ่งพบสารกัมมันตรังสีในฟีดนี้น้อยมาก (รูปที่ 5) และเมื่อชะคอลัมน์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นแบบต่อเนื่อง 0-0.35 M พบว่ามีไพรตีนถูกชะออกมา 3 ฟีด คือฟีด D2, D3 และ D4 ฟีด D2 และฟีด D3 มีปริมาณไพรตีน (O.D. 280) มากปานกลาง และมีปริมาณสารกัมมันตรังสีทั้ง  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  ต่ำมาก ในขณะที่ฟีดสุดท้าย (D4) ซึ่งถูกชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.25 M เป็นฟีดที่มีปริมาณไพรตีนและสารกัมมันตรังสีมากที่สุด คิดเป็นไพรตีน 22.13%,  $^{32}\text{P}$  53.8 % และ  $^3\text{H}$  67.0 % ของสารเริ่มต้น (ตารางที่ 7 และรูปที่ 5) นอกจากนี้ทั้ง  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  ถูกชะออกมาก่อนฟีด D2 เล็กน้อยด้วยปริมาณที่ไม่มากนัก แต่ตำแหน่งนี้มีไพรตีนถูกชะออกมาน้อยมาก



รูปที่ 4 แบบแผนกัมมันตรังสีของแถบโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ของพลาสมาปลาที่ฉีดเอสตราไดออล,  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate และ  $^3\text{H}$ -leucine

- A. แบบแผนกัมมันตรังสีของ  $^3\text{H}$
- B. แบบแผนกัมมันตรังสีของ  $^{32}\text{P}$
- C. แบบแผนโปรตีนของพลาสมาที่ย้อมด้วยสีคูมาซี บลู





**รูปที่ 5 การทำให้ไวเทรโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel**

แยกไวเทรโลจีนินจากพลาสมา 6 มล. โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.6 X 15 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 30 มล./ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มล.

ตารางที่ 7 การท้าวหาผลเฉลี่ยนับรังสีจากผลการทดลองทางเทคนิคของสารที่ติดยวกับ 3H-leucine และ 32P-orthophosphate

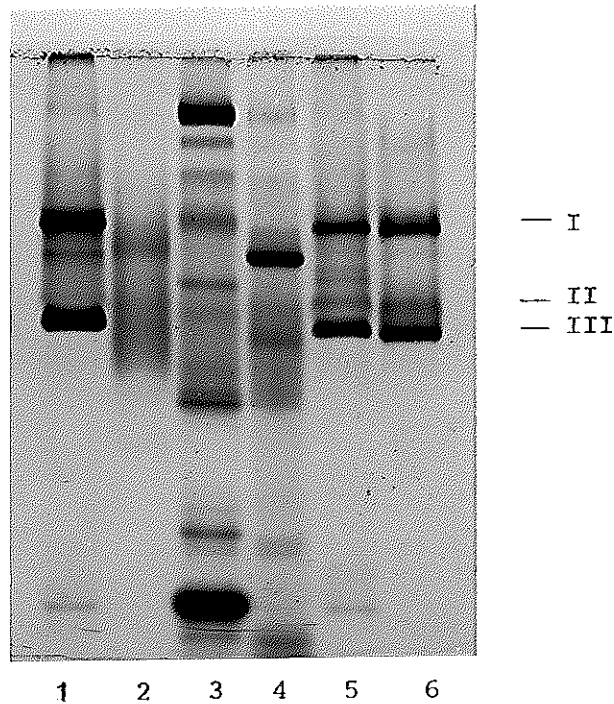
ผลการทดลอง	3H			32P						
	ปร.ต้น	cpmX10 <sup>3</sup>	cpm/mg	%	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	cpmX10 <sup>3</sup>	cpm/mg	%	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	
ผลรวม	1920.0	100.0	6,128	3,192	100.0	1.0	16,025	8,346	100.0	1.0
คอลัมน์ DEAE-Sephacel (พีค D4)	425.0	22.1	4,110	9,671	67.0	3.0	8,622	20,287	53.8	2.4
คอลัมน์ Sephadex G-150 (พีค S1)	368.5	19.2	3,595	9,757	58.7	3.1	7,694	20,909	48.0	2.5

เมื่อนำสารละลายรวมจากพีคต่าง ๆ ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ไปศึกษาแบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรพอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ พบว่ามีเฉพาะพีค D4 (รูปที่ 6 แถวที่ 5) ที่มีแถบโปรตีน I, II และ III ใกล้เคียงกับแถบโปรตีนทั้ง 3 ซึ่งพบในพลาสมา (รูปที่ 6 แถวที่ 1) มากที่สุด ในขณะที่แบบแผนโปรตีนของพีค D1, D2 และ D3 แตกต่างไปจากแถบโปรตีนทั้ง 3 แถบ ของพลาสมามาก แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไวเทลโลจีนิญกษะออกมานในพีคสุดท้ายนี้ และเมื่อหาแถบโปรตีนที่มีสารกัมมันตรังสี  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  ติดตามอยู่กับของโปรตีนพีค D4 พบว่ามีโปรตีน 4 แถบ (0,1,2,3) ที่มีสารกัมมันตรังสี ทั้ง  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  (รูปที่ 7 C, D) คล้ายคลึงกับของพลาสมา (รูปที่ 7 A, B)

### 3.2.2 คอลัมน์ Sephadex G-150

เมื่อนำสารละลายรวมจากพีค 4 (D4) ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel ทำให้เข้มข้น แล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 จะได้โปรตีนออกมา 3 พีค พีคแรก (S1) มีปริมาณโปรตีนและมีกัมมันตภาพรังสีของ  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  ปริมาณมาก คือมีโปรตีน 368.5 มิลลิกรัม,  $^3\text{H}$  3,595,000 cpm และ  $^{32}\text{P}$  7,694,000 cpm โดยคิดเป็น 19.2, 58.7 และ 48.0 % ของสารเริ่มต้น ตามลำดับ พีคที่ 2 (S2) และ 3 (S3) มีปริมาณโปรตีนอยู่น้อยมากและไม่มีปริมาณกัมมันตภาพรังสี ดังแสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 7 ไวเทลโลจีนิญกษะในพีค S1 มีความบริสุทธิ์ของ  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  เพิ่มขึ้น 3.1 และ 2.5 เท่าของพลาสมาเริ่มต้น ตามลำดับ

เมื่อรวมสารละลายพีค S1 ทำให้เข้มข้น แล้วนำไปทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรพอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ พบว่าสารละลายพีค S1 นี้ มีโปรตีนเหลือเพียง 3 แถบ คือ แถบ I, II และ III (รูปที่ 6 แถวที่ 6) เมื่อนำโพลีอะคริลาไมด์ เจล ของโปรตีนพีค S1 ไปตัดหาปริมาณกัมมันตภาพรังสี ดังแสดงผลในรูปที่ 7 E และ 7 F พบว่าพีค S1 มีโปรตีน 3 แถบ ซึ่งมีสารกัมมันตรังสี  $^3\text{H}$  และ  $^{32}\text{P}$  คือ แถบที่ 1,2,3 ซึ่งตรงกับแถบโปรตีน I, II และ III ของรูปที่ 6 ตามลำดับ และอัตราส่วนของปริมาณ

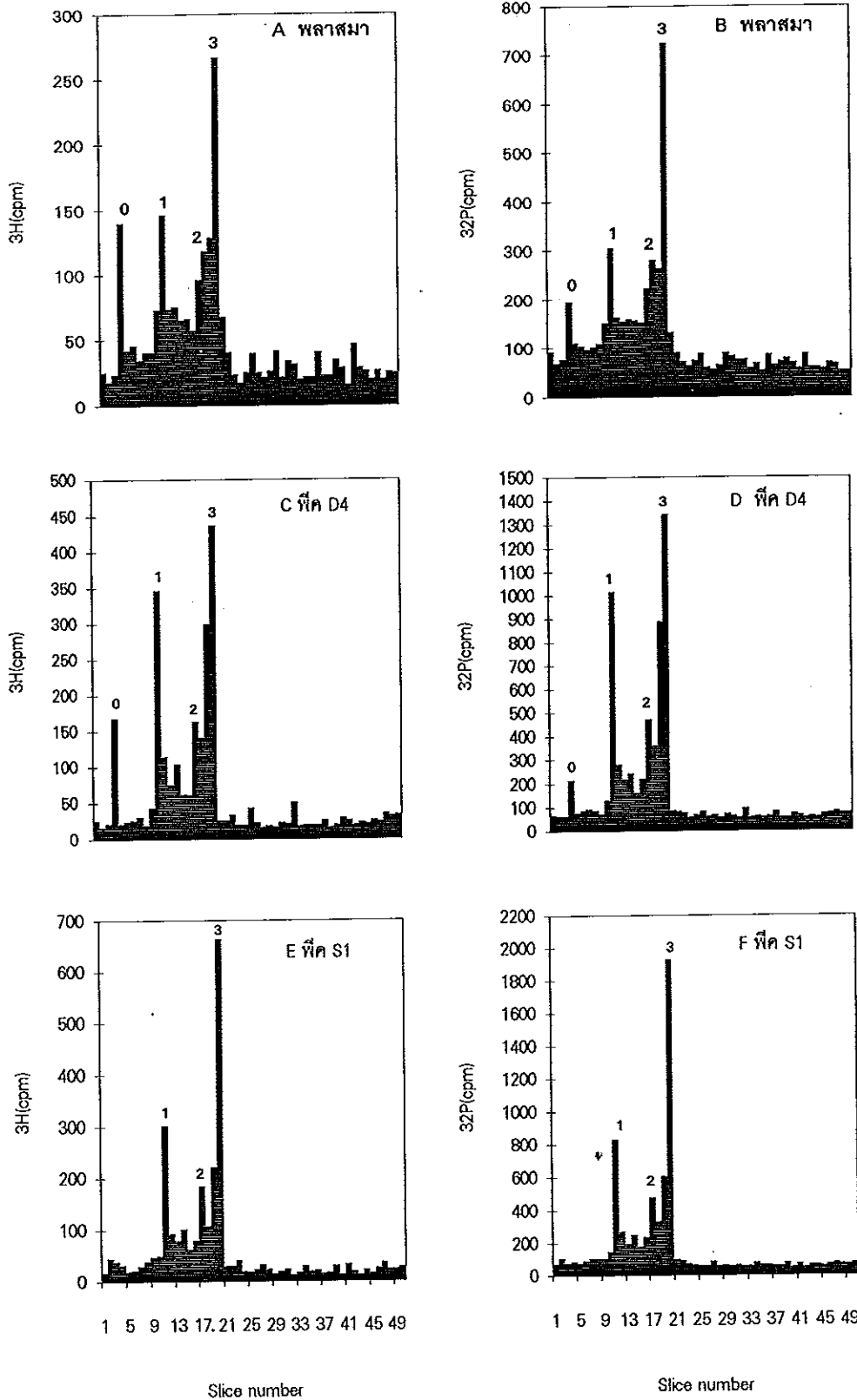


รูปที่ 6 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่  
 แปลงสภาพ ของพลาสมาโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-  
 Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150

- แถวที่ 1 พลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล
- แถวที่ 2 พีค D1 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel
- แถวที่ 3 พีค D2 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel
- แถวที่ 4 พีค D3 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel
- แถวที่ 5 พีค D4 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel
- แถวที่ 6 พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 ไมโครกรัม ยกเว้น

แถวที่ 2 15 ไมโครกรัม



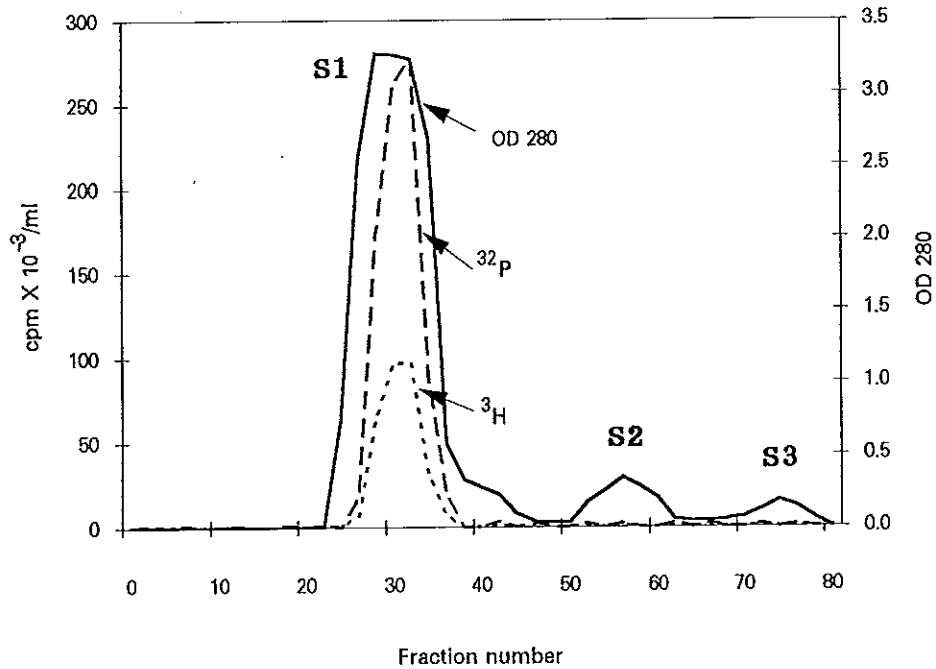
รูปที่ 7 แบบแผนกัมมันตรังสีของแถบโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล

อีเล็กโตรพอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ

A, B พลาสมา

C, D สารละลายพีก D4 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

E, F สารละลายพีก S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150



รูปที่ 8 . การทำให้ไวเทเลโลจีนินบริสุทธิ์จากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150

แยกพีค D4 1.5 มล. (425 มก.) จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 (1.1 X 75 ซม.) แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 5 มล./ชั่วโมง จนมีค่า O.D.280 เป็นศูนย์ เก็บสารละลายหลอดละ 0.9 มล.

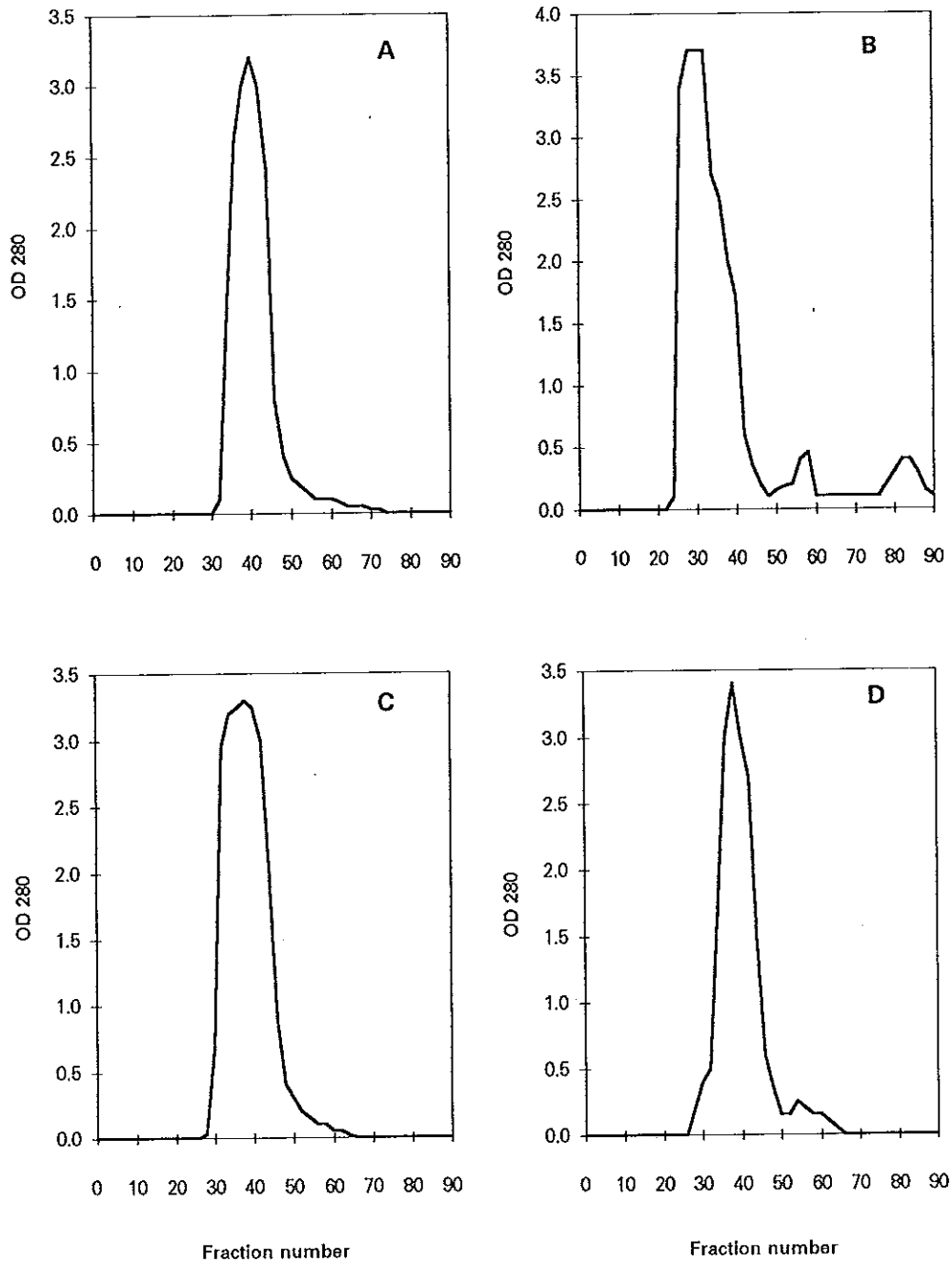
กัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  :  $^3\text{H}$  ของแถบ 1, 2 และ 3 เป็น 2.75, 2.75 และ 2.86 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้ง 3 แถบ ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 นี้เป็นไวเทลโลจีนิน ซึ่งประกอบด้วยแถบโปรตีนอย่างน้อย 3 ชนิด ไม่ใช่การปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่น

### 3.2.3 คอลัมน์ เจล พิลเตรชัน ชนิดต่าง ๆ

เมื่อนำสารละลายจากพีค D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel ทำให้เข้มข้นและแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100, Sephadex G-200, Sepharose CL-6B หรือโดยคอลัมน์ Bio Gel P-300 ซึ่งใช้ขนาดคอลัมน์ที่เท่ากัน เปรียบเทียบกัน ดังแสดงผลในรูปที่ 9 พบว่าแบบแผนโปรตีน (O.D. 280) ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เหล่านี้คล้ายคลึงกัน คือประกอบด้วยโปรตีนพีคใหญ่พีคเดียว (ประมาณหลอดที่ 30-50) ยกเว้นจากคอลัมน์ Sepharose CL-6B จะพบโปรตีนพีคเล็กตามมาอีกหนึ่งพีคที่ประมาณหลอดที่ 55 ในขณะที่จากคอลัมน์ Sephadex G-200 จะมีแบบแผนของโปรตีนคล้ายกับของคอลัมน์ Sephadex G-150 (รูปที่ 8) คือมีโปรตีนพีคเล็กอีกสองพีคถูกชะตามมา แต่เมื่อนำโปรตีนพีคใหญ่พีคแรกจากคอลัมน์เหล่านี้ไปศึกษาแบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอร์ซีส แบบไม่แปลงสภาพ เปรียบเทียบกับพีค S1 ของคอลัมน์ Sephadex G-150 พบว่าโปรตีนพีคแรกที่ได้จากคอลัมน์เหล่านี้ยังมีโปรตีนแถบอื่นปะปนอยู่ไม่พบเฉพาะ 3 แถบ (I, II, III) ดังปรากฏในพีค S1 (รูปที่ 6 แถวที่ 6) แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอร์ซีส แบบไม่แปลงสภาพ ของโปรตีนพีคใหญ่จากคอลัมน์ เจล พิลเตรชัน ดังกล่าว ไม่ได้แสดงผลไว้ในวิทยานิพนธ์นี้

### 3.2.4 พรียาราทีบ เจล อิเล็กโตรพอร์ซีส

เมื่อนำโปรตีนพีค S1 ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 ปริมาณ 7 มิลลิกรัม ไปศึกษาต่อโดยการทำพรียาราทีบ เจล อิเล็กโตรพอร์ซีส ตามวิธีการในข้อ 2.8.4 พบว่าเมื่อตัดเจลระหว่างแถบโปรตีน I และ III ออกจากกัน แล้วทำการชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลไปอยู่ในถุงไดแอไลซ์ ตามวิธีการข้อ 2.8.4.4 ข. พบว่าวิธีการนี้สามารถแยกโปรตีนแถบ III ออก



รูปที่ 9 การทำให้ไวเทเลโลจีนินบริสุทธิ์จากฟีด D4 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์เจล ฟิลเทรชัน ต่าง ๆ

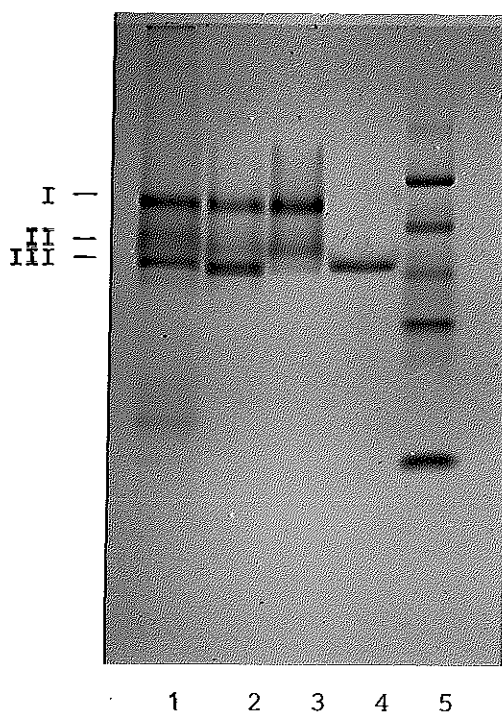
แยกฟีด D4 425 มก. จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 (A), Sephadex G-200 (B), Bio Gel P-300 (C) หรือ Sepharose CL-6B (D) แยกกัน แล้วล้างแต่ละคอลัมน์ (1.1x75 ซม.) ด้วย 50 mM Tris HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 5 มล./ชั่วโมง จนมีค่า O.D.280 เป็น 0 เก็บสารละลายหลอดละ 0.9 มล.



จากแถบ I และ II ได้ แต่ไม่สามารถแยกโปรตีนแถบ I และ II ออกจากกันอย่างสมบูรณ์ โดยสามารถชะโปรตีนแถบ I & II (รูปที่ 10 แถวที่ 3) ออกมาได้ 2.6 มิลลิกรัม และแถบ III (รูปที่ 10 แถวที่ 4) ได้ 1.9 มิลลิกรัม สามารถชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลรวมทั้งหมดคิดเป็น 64.3 % ของไวเทลโลจีนบริสุทธิ์ที่ใช้ในการศึกษาเริ่มต้น ในทำนองเดียวกันการชะแถบไวเทลโลจีนจากเนื้อเจลตามวิธีการข้อ 2.8.4.4 ก. จะชะโปรตีนแถบ I & II ออกมาด้วยกันได้ 1.5 มิลลิกรัม และแถบ III ได้ 1.1 มิลลิกรัม คิดโปรตีนรวมที่ชะได้เป็น 37.1 % ของสารเริ่มต้น

### 3.2.5 โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอรีซิส แบบมีเอสดีเอส

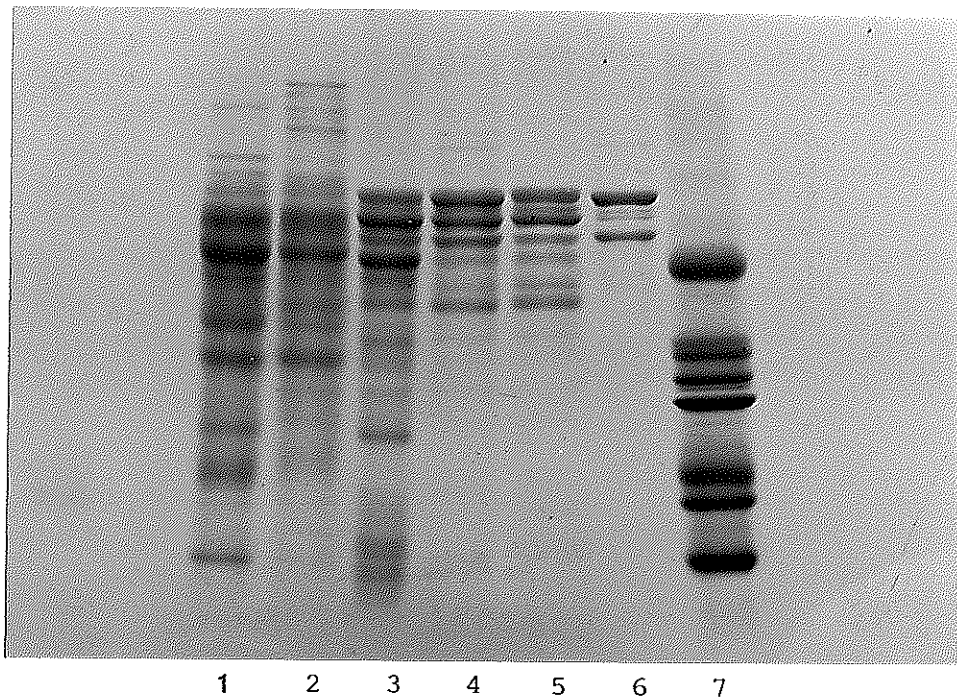
ในการทดสอบความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีน ซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากพลาสมา ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 โดยการทำให้โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอรีซิส แบบมีเอสดีเอส พบว่าสารละลาย พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150 ซึ่งปรากฏโปรตีนเพียง 3 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ จะปรากฏแถบโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอรีซิส แบบมีเอสดีเอส มากกว่า 10 แถบ (รูปที่ 11 แถวที่ 4) ในทำนองเดียวกันโปรตีน I & II ที่แยกได้จากพรีพาราทีป เจล อิเล็กโตรพอรีซิส ก็มีแถบโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอรีซิส แบบมีเอสดีเอส ประมาณ 10 แถบ (รูปที่ 11 แถวที่ 5) โปรตีน III ที่แยกได้จากพรีพาราทีป เจล อิเล็กโตรพอรีซิส มีแถบโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ประมาณ 6 แถบ (รูปที่ 11 แถวที่ 6) การใช้โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอรีซิส แบบมีเอสดีเอส ทดสอบความบริสุทธิ์ของขั้นตอนการทำให้ไวเทลโลจีนบริสุทธิ์ จึงใช้ไม่ได้ผลกับไวเทลโลจีนของปลากะรัง ทั้งนี้เพราะไวเทลโลจีนของปลากะรังประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์จำนวนมาก



รูปที่ 10 แบบแผนโปรตีนของไวเทลโลจีนินในโพสโอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส แบบไม่แปลงสภาพ

- แถวที่ 1 พลาสมาของปลาที่ฉีดด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล
- แถวที่ 2 ไวเทลโลจีนิน (พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150)
- แถวที่ 3 ไวเทลโลจีนิน แถบ I & II
- แถวที่ 4 ไวเทลโลจีนิน แถบ III
- แถวที่ 5 โปรตีนมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วยไซโรไกลบูลิน, เฟอรัวีน, คากาเลส, เลคเทท ดีไฮโดรจีเนส และอัลบูมิน

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 25 ไมโครกรัม



รูปที่ 11 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส แบบมี  
 เอสดีเอส

แถวที่ 1 พลาสมาของปลาเพศผู้

แถวที่ 2 พลาสมาของปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์

แถวที่ 3 พลาสมาของปลาเพศเมียที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล

แถวที่ 4 ไวเทลโลจีนิน (พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150)

แถวที่ 5 ไวเทลโลจีนิน แถบ I & II

แถวที่ 6 ไวเทลโลจีนิน แถบ III

แถวที่ 7 โปรตีนมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วยไซโทโครลูบิน, เฟอริทิน,  
 คาทาเลส, เลคเทก ดีไฮโดรจีเนส และอัลบูมิน

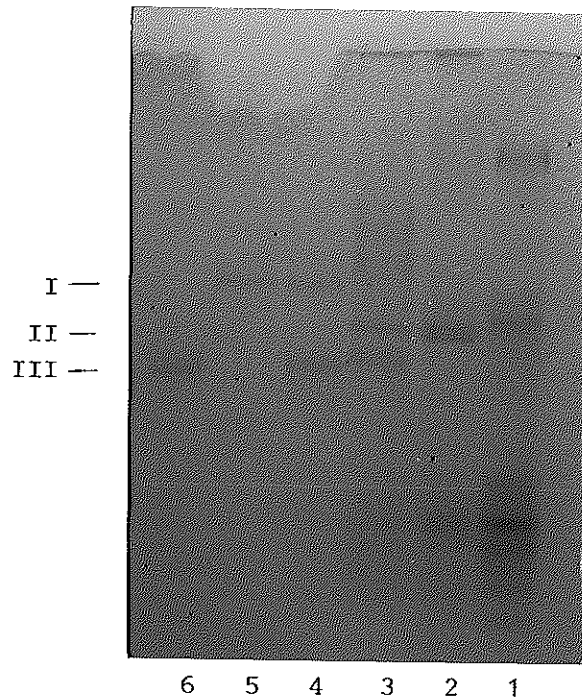
ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 25 ไมโครกรัม

### 3.3 คุณสมบัติของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

#### 3.3.1 ไกลโคโปรตีนและลิโปโปรตีน

จากการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (พีค S1) ซึ่งได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 แล้วย้อมด้วยสีอูมาซี บลู พบว่า ไวเทลโลจีนินของปลากะรัง ย้อมติดสีอูมาซี บลู 3 แถบ แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีน และประกอบด้วยโปรตีนถึง 3 ชนิด คือ แถบ I, II และ III (รูปที่ 6 แถวที่ 6) เมื่อนำเจลนี้ไปย้อมสี ฟิเอเอส ตามวิธีการข้อ 2.3.4 ซึ่งเป็นการย้อมติดสีของส่วนคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบในโปรตีน พบว่าไวเทลโลจีนิน แถบ I และ III ย้อมติดสีฟิเอเอส เข้มชัดเจน แต่แถบที่ II ติดสีจางมาก จนมองแทบไม่เห็นในรูปถ่าย (รูปที่ 12 แถวที่ 4-6) ขณะเดียวกันกลับพบแถบหนึ่งแถบที่ย้อมติดสีฟิเอเอสในตำแหน่งเหนือแถบ I ซึ่งแถบนี้ย้อมไม่ติดสีอูมาซี บลู ในรูปที่ 6 (รูปที่ 12 แถว 5) จึงไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นแถบอะไร พลาสมาของปลาเพศผู้และปลาเพศเมียที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล (รูปที่ 12 แถวที่ 1, 2) มีโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบหลายแถบและเห็นความแตกต่างของแบบแผนไกลโคโปรตีนในพลาสมาของปลาทั้งสองเพศนี้ได้ชัดเจน สำหรับพลาสมาของปลาเพศเมียที่ฉีดด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล จะพบโปรตีน แถบ I, II, III และโปรตีนอีกบางแถบที่ย้อมติดสีฟิเอเอสเช่นกัน (รูปที่ 12 แถวที่ 3)

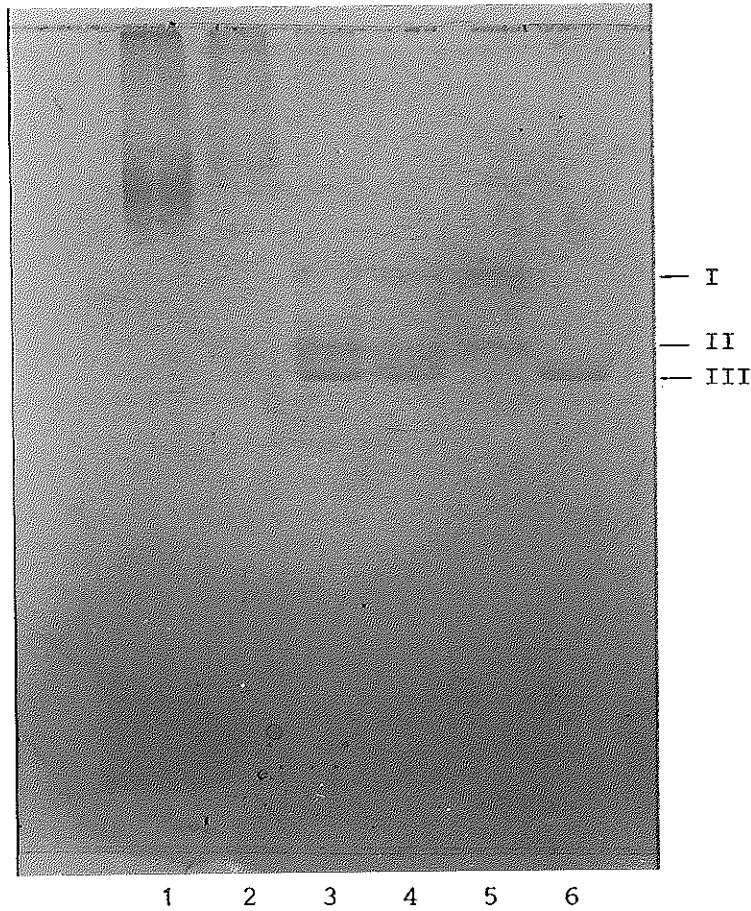
ในการศึกษาโปรตีนที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (ลิโปโปรตีน) โดยการย้อมโปรตีนในเจลด้วยสี ทูดาน แบล็ค บี พบว่า โปรตีนในพลาสมาของปลาเพศผู้และเพศเมียมีแถบโปรตีนที่ย้อมติดสีทูดาน แบล็ค บี เพียงเล็กน้อย ที่พบมากเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก (รูปที่ 13 แถวที่ 1, 2) แสดงว่าในพลาสมาของปลากะรังมีโปรตีนที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่น้อย ส่วนโปรตีนทั้ง 3 แถบ ของพลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล และไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ย้อมติดสี ทูดาน แบล็ค บี เห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 13 แถวที่ 3, 4) ในทำนองเดียวกัน ไวเทลโลจีนิน แถบ I & II (รูปที่ 13 แถวที่ 5) และแถบ III (รูปที่ 13 แถวที่ 6) ซึ่งแยกได้จากการทำพรีพาราทีป เจล



รูปที่ 12 แบบแผนไกลโคโปรตีนในพอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส  
แบบไม่แปลงสภาพ

- แถวที่ 1 พลาสมาของปลาเพศผู้
- แถวที่ 2 พลาสมาของปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์
- แถวที่ 3 พลาสมาของปลาเพศเมียที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล
- แถวที่ 4 ไวเทลโลจีนิน (พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150)
- แถวที่ 5 ไวเทลโลจีนิน แถบ I & II
- แถวที่ 6 ไวเทลโลจีนิน แถบ III

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 25 ไมโครกรัม



รูปที่ 13 แบบแผนลิโพโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส  
แบบไม่แปลงสภาพ

- แถวที่ 1 พลาสมาของปลาเพศผู้
- แถวที่ 2 พลาสมาของปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์
- แถวที่ 3 พลาสมาของปลาเพศเมียที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล
- แถวที่ 4 ไวเทลโลจีนิน (พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150)
- แถวที่ 5 ไวเทลโลจีนิน แถบ I & II
- แถวที่ 6 ไวเทลโลจีนิน แถบ III

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 25 ไมโครกรัม

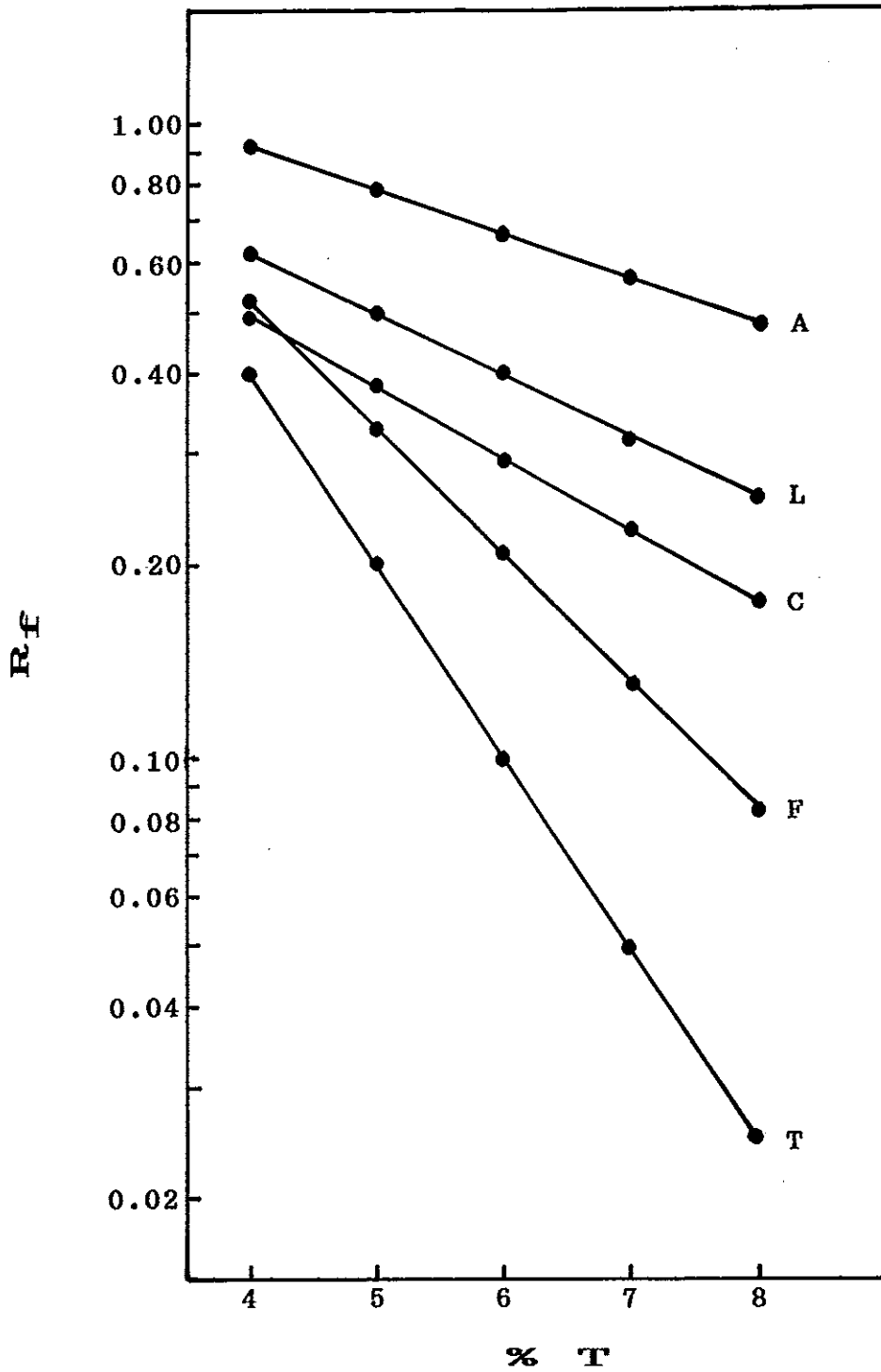
อีเล็กโตรพอรีซิส ก็ย่อมติดสีชุดาน แบล็ค บี ได้ดีเช่นกัน แสดงว่าไวเทลโลจี นินทั้ง 3 แถบนี้เป็นลิโปโปรตีนหรือมีไขมัน เป็นองค์ประกอบ

### 3.3.2 หน่วยย่อย

จากรูปที่ 11 แสดงแบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเล็กโตรพอรีซิส แบบมีเอสดีเอสของพลาสมาปลากะรังและของไวเทลโลจี นิน พลาสมาปลากะรังเพศผู้ (แถวที่ 1) ปรากฏแถบโปรตีนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล น้อยอยู่เป็นจำนวนมากและมีมากกว่าในพลาสมาของปลาเพศเมีย (แถวที่ 2) ในขณะที่ พบแถบโปรตีนที่มีโมเลกุลน้ำหนักมากในพลาสมาปลาเพศเมียมากกว่า ของปลาเพศผู้ สำหรับพลาสมาของปลาเพศเมียที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล (แถวที่ 3) ปรากฏโปรตีนบางแถบแตกต่างไปจากพลาสมาของปลาเพศเมียที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน ไวเทลโลจี นินหรือพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150 (แถวที่ 4) มีแถบโปรตีนจำนวนใกล้เคียงกับของไวเทลโลจี นิน แถบ I & II (แถวที่ 5) ซึ่งมีแถบโปรตีนมากกว่า 10 แถบ ในทานองเดียวกันไวเทลโลจี นินแถบที่ III ก็มีโปรตีนหลายแถบคือมีประมาณ 6 แถบ (แถวที่ 6)

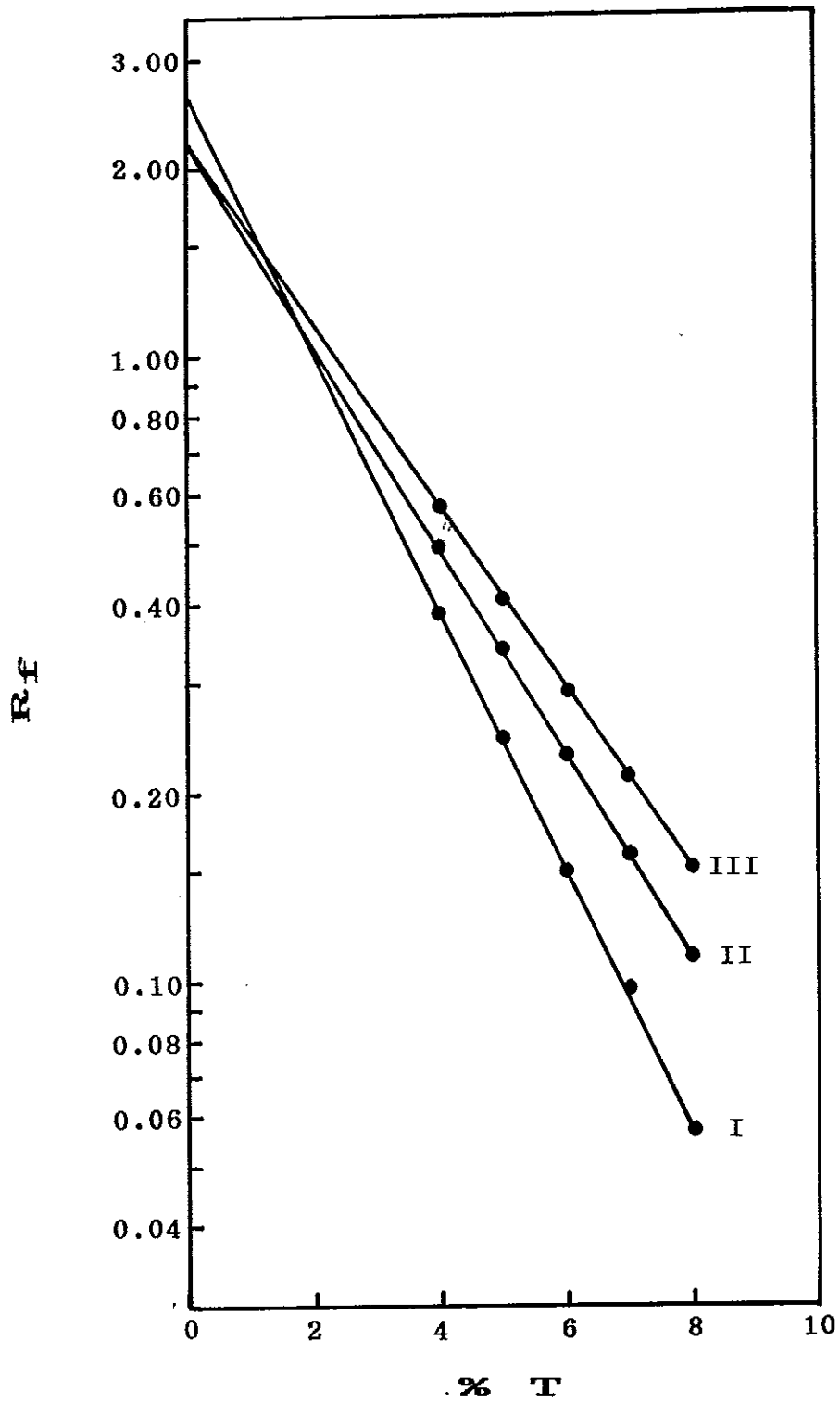
### 3.3.3 น้ำหนักโมเลกุล

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจี นิน ตามวิธีของ Rodbard (1976) และ Ferguson (1964) ที่อ้างโดย de Vlaming, *et al.* (1980) โดยการหาอีเล็กโตรพอรีซิสในเจลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าความสัมพันธ์ของ  $\log$  ของการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน 5 ตัว ซึ่งได้แก่ ไธโรโกลบูลิน ( $M_r$  669,000,) เพอร์ริทิน ( $M_r$  440,000), คาทาเลส ( $M_r$  232,000), เลคเทท ดีไฮโดรจีเนส ( $M_r$  140,000) และ อัลบูมิน ( $M_r$  67,000) ในโพลีอะครีลาไมด์ เจล ความเข้มข้น 4-8 % มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังแสดงผลในรูปที่ 14 ในทานองเดียวกัน  $\log$  ของการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของไวเทลโลจี นินแถบ I, II และ III ในโพลีอะครีลาไมด์ เจล ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ก็มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเช่นเดียวกัน (รูปที่ 15) เมื่อนำความชันของกราฟแต่ละเส้นไปหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจี นินแต่ละแถบ จากกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 16) สามารถคำนวณได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจี นินแถบ I เป็น 470,000



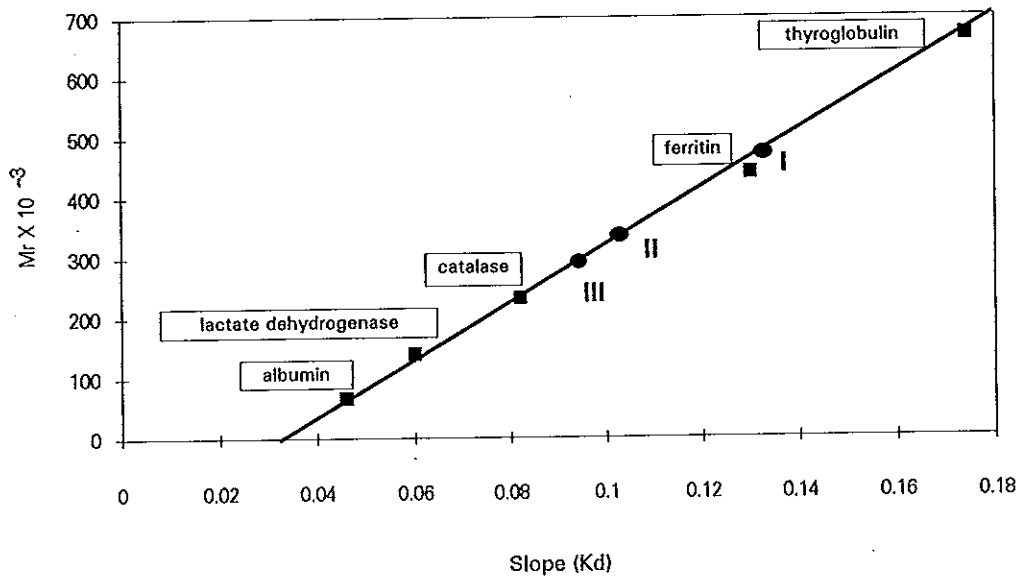
รูปที่ 14 การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานในโพลีอะคริลาไมด์  
 เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นของเจล 4-8 %  
 T = Thyroglobulin, L = Lactate dehydrogenase  
 F = Ferritin, C = Catalase, A = Albumin





รูปที่ 15 การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของไวเทลโลจีนินในโพลีโออะคริลาไมด์  
เจล อิเล็กโตรพอริซิส ที่มีความเข้มข้นของเจล 4-8 %

- |     |              |         |
|-----|--------------|---------|
| I   | ไวเทลโลจีนิน | แถบ I   |
| II  | ไวเทลโลจีนิน | แถบ II  |
| III | ไวเทลโลจีนิน | แถบ III |



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความชันของการเคลื่อนที่สัมพัทธ์  
กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

- |     |              |         |
|-----|--------------|---------|
| I   | ไวเทลโลจีนิน | แถบ I   |
| II  | ไวเทลโลจีนิน | แถบ II  |
| III | ไวเทลโลจีนิน | แถบ III |

ดัลตัน, แถบ II เป็น 335,000 ดัลตัน และ แถบ III เป็น 290,000 ดัลตัน

### 3.3.4 ปริมาณฟอสเฟตของพลาสมา โปรตีนและไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

จากตารางที่ 8 พบว่าปริมาณฟอสเฟตในพลาสมาของปลา กะรังเพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์, ที่เจริญพันธุ์ และของปลาเพศผู้ที่เจริญพันธุ์มี ปริมาณฟอสเฟตใกล้เคียงกัน คือ 0.51, 0.48 และ 0.45 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน ตามลำดับ ปริมาณฟอสเฟตจะเพิ่มขึ้นเป็น 5.80 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน ในปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล และไวเทลโลจีนิน บริสุทธิ์มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบถึง 6.80 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน

## 3.4 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

### 3.4.1 การสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่าย

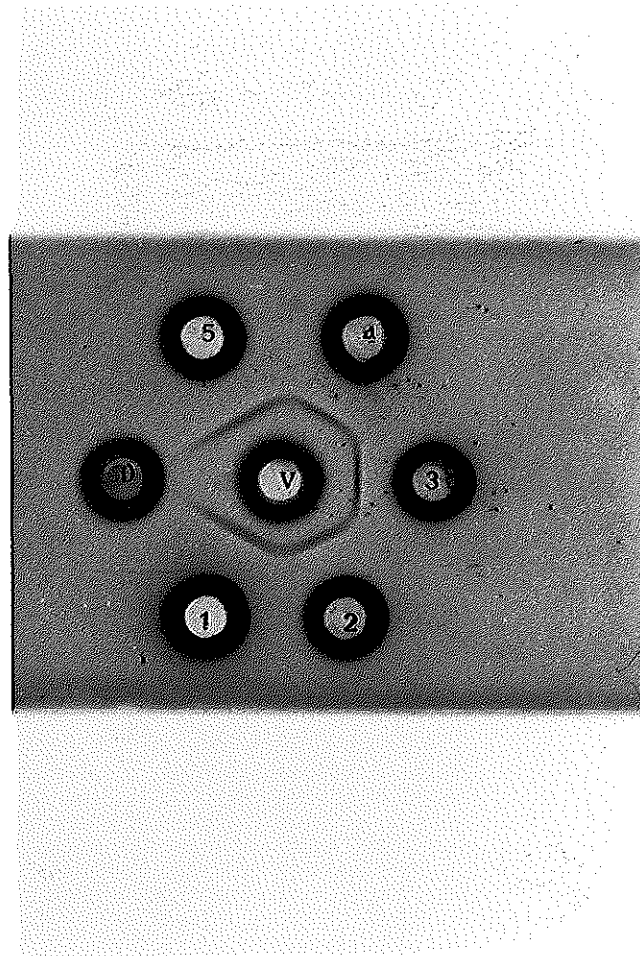
จากการฉีดกระต่าย 2 ตัว แยกกันด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (พีค S<sub>1</sub> จากคอลัมน์ Sephadex G-150) ปริมาณครั้งละ 0.5 และ 1 มก. พบว่า กระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้ไม่แตกต่างกัน โดยจะเริ่มสังเคราะห์แอนติบอดีหลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งที่ 1 และสังเคราะห์มากขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีด ทั้งนี้ไม่พบแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินในซีรัมกระต่ายก่อนการฉีดแอนติเจน (รูปที่ 17)

### 3.4.2 การแยกแอนติบอดีจากซีรัม

ในการแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน จากซีรัมกระต่าย 16 มิลลิลิตร โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และคอลัมน์ DEAE-Sephacel เมื่อล้างด้วย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จะได้โปรตีนที่ค แรกหลุดออกมา ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินได้ แสดงว่าแอนติบอดีไม่จับกับ DEAE-Sephacel จากการแยกนี้จะได้แอนติบอดี 43.0 มิลลิกรัม โดยคิดเป็น 2.5 % ของซีรัมโปรตีนทั้งหมด ขั้นตอนต่าง ๆ ของการแยกได้แสดงไว้ในตารางที่ 9 แอนติบอดีที่ผ่านการแยกเกิดปฏิกิริยา การตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ได้ดี เช่นเดียวกับของซีรัมกระต่ายก่อน ผ่านคอลัมน์ ดังแสดงผลในรูปที่ 17 (หุ้ม 3 และ 4)

ตารางที่ 8 ปริมาณฟอสเฟตของพลาสติกมาโปรตีนและไวเทลโลจีนิน

	ปริมาณฟอสเฟต (ไมโครกรัม/กก.โปรตีน)
พลาสติกมาปลาเพศผู้ที่เจริญพันธุ์	0.45
พลาสติกมาปลาเพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์	0.51
พลาสติกมาปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์	0.48
พลาสติกมาปลาเพศเมียที่กระตุ้นด้วย	5.80
17 เบต้า-เอสตราไดออล	
ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์	6.80



รูปที่ 17 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของการ  
สังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน ในซีรัมกระต่าย

- V ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์
- 0 ซีรัมของกระต่ายก่อนฉีดไวเทลโลจีนิน
- 1 ซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนิน ครั้งที่ 3
- 2 ซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนิน ครั้งที่ 2
- 3 ซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนิน ครั้งที่ 1
- 4 แอนติบอดี 10 ไมโครกรัม
- 5 แอนติบอดี 20 ไมโครกรัม

ปริมาณซีรัมในแต่ละหลุม (หลุม 0-3) 10 ไมโครลิตร

ตารางที่ 9 การแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจากซีรัมกระต่าย

	ปริมาณ (มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	ผลที่ได้ (%)
ซีรัม	16.0	1680.0	100.0
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม	9.2	782.0	64.5
ซิลเฟต ที่ความอิ่มตัว 50 %			
คอลัมน์ DEAE-Sephacel	52.0	62.8	3.7
ทำให้เข้มข้นด้วย	10.5	43.0	2.5
CM-cellulose			

### 3.4.3 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับพลาสมา ไวเทลโลจีนิน

จากการทดสอบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจากซีรัมกระด้าง กับพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลากระรังเพศผู้, เพศเมียที่เจริญพันธุ์และยังไม่เจริญพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 18 B พบว่าพลาสมาของปลาเพศผู้ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับแอนติบอดี (a) ในขณะที่พลาสมาของปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์ (b) และที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (c) จะเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับแอนติบอดีได้ไม่ต่างกัน เช่นเดียวกันกับพลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล (d) และไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (e) แต่ซีรัมของกระด้างที่เก็บก่อนฉีดแอนติเจน (S) จะไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาต่าง ๆ เหล่านี้ (รูปที่ 18 A)

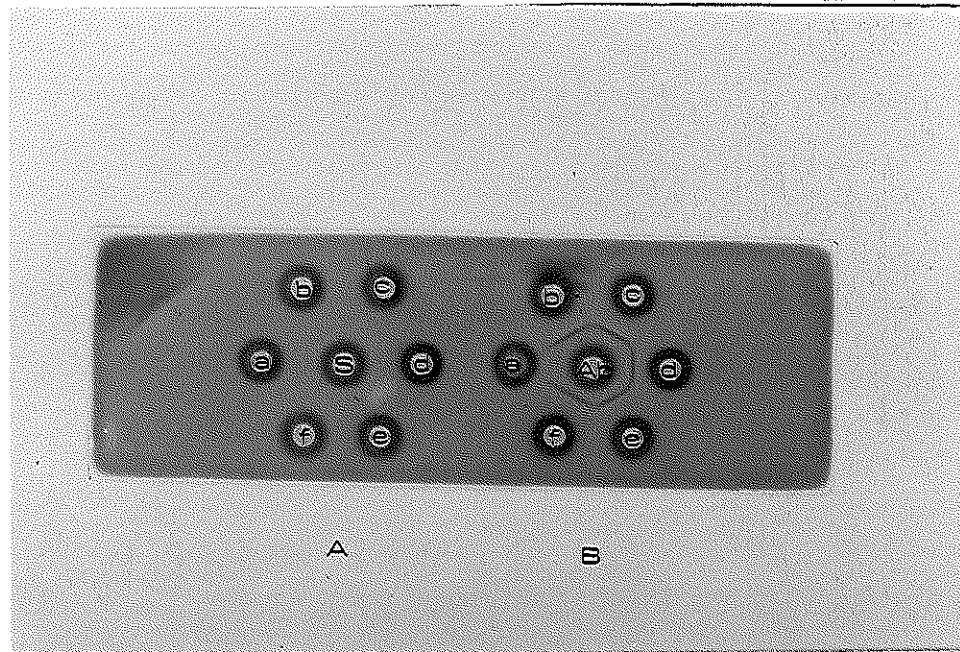
### 3.4.4 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับสารสกัด รังไข่

ในการเตรียมสารสกัดจากรังไข่ของปลาเพศเมีย ที่เจริญพันธุ์ ตามวิธีการข้อ 2.11 แล้วนำมาทดสอบปฏิกิริยาการตกตะกอนกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจากซีรัมกระด้าง พบว่าสารสกัดรังไข่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับแอนติบอดีได้ดี (รูปที่ 18 B, f) แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับซีรัมกระด้างที่ไม่ได้ฉีดไวเทลโลจีนิน (รูปที่ 18 A, f)

## 3.5 พลาสมาไวเทลโลจีนินของปลาเพศเมียที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ

### 3.5.1 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับแอนติบอดี

จากการทดสอบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจากซีรัมกระด้างกับพลาสมาของปลากระรังเพศเมียที่มีค่าครรภ์การสืบพันธุ์ต่าง ๆ กัน ในรูปที่ 19 B พบว่าพลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่าครรภ์การสืบพันธุ์ตั้งแต่ 1 ถึง 10 เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับแอนติบอดีได้ไม่ต่างกัน (รูปที่ 19 B, b-f) เมื่อใช้ปริมาณพลาสมาในการทดลองเท่ากันหมดเป็น 10 ไมโครลิตร ในขณะที่พลาสมาของปลาเพศผู้ไม่เกิดปฏิกิริยาเช่นนี้กับแอนติบอดี (รูปที่ 19 B, a) ในทำนองเดียวกันชุดควบคุมของการทดลองคือ

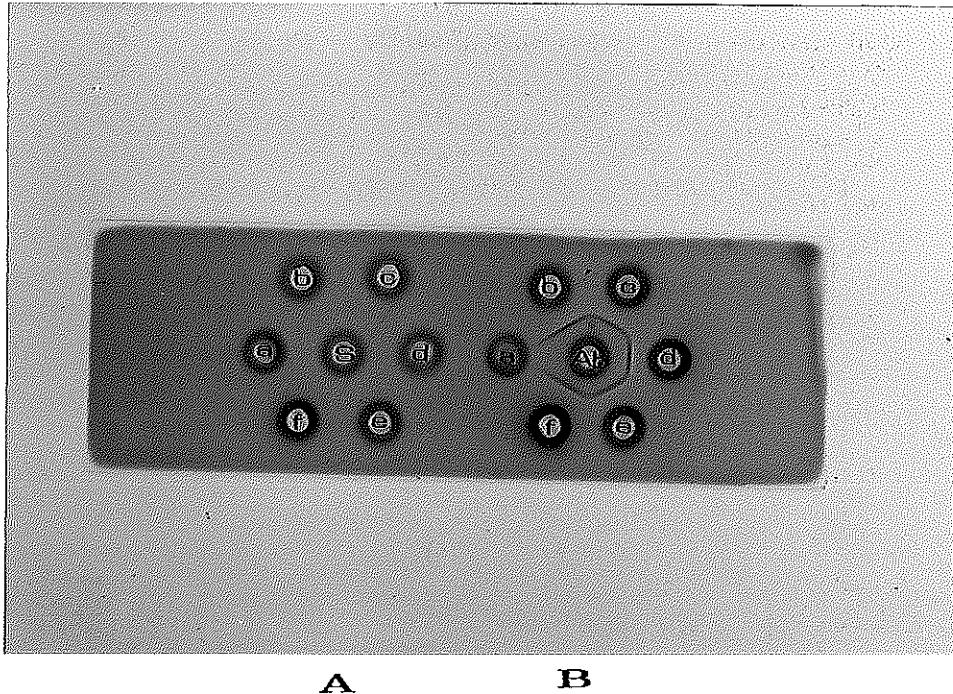


รูปที่ 18 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของ  
ไวเทลโลจิ้นในพลาสมาและสารสกัดรังไข่

- a พลาสมาของปลาเพศผู้
- b พลาสมาของปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์
- c พลาสมาของปลาเพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์
- d พลาสมาของปลาเพศเมียที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล
- e ไวเทลโลจิ้นบริสุทธิ์
- f สารสกัดรังไข่ของปลา
- S ซีรัมของกระต่ายก่อนฉีดไวเทลโลจิ้น
- Ab แอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้นจากกระต่าย

ปริมาตรพลาสมาหรือซีรัมหลุมละ 10 ไมโครลิตร





รูปที่ 19 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของ  
 พลาสมาไวเทลโลจีนินของปลาที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ

- a พลาสมาของปลาเพศผู้
- b พลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่าอัตราชนิการสีบพันธุ = 1
- c พลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่าอัตราชนิการสีบพันธุ = 2
- d พลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่าอัตราชนิการสีบพันธุ = 3
- e พลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่าอัตราชนิการสีบพันธุ = 5
- f พลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่าอัตราชนิการสีบพันธุ = 10
- S ซีรัมของกระต่ายก่อนฉีดไวเทลโลจีนิน

Ab แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจากกระต่าย

ปริมาณพลาสมาหรือซีรัม หลุมละ 10 ไมโครลิตร

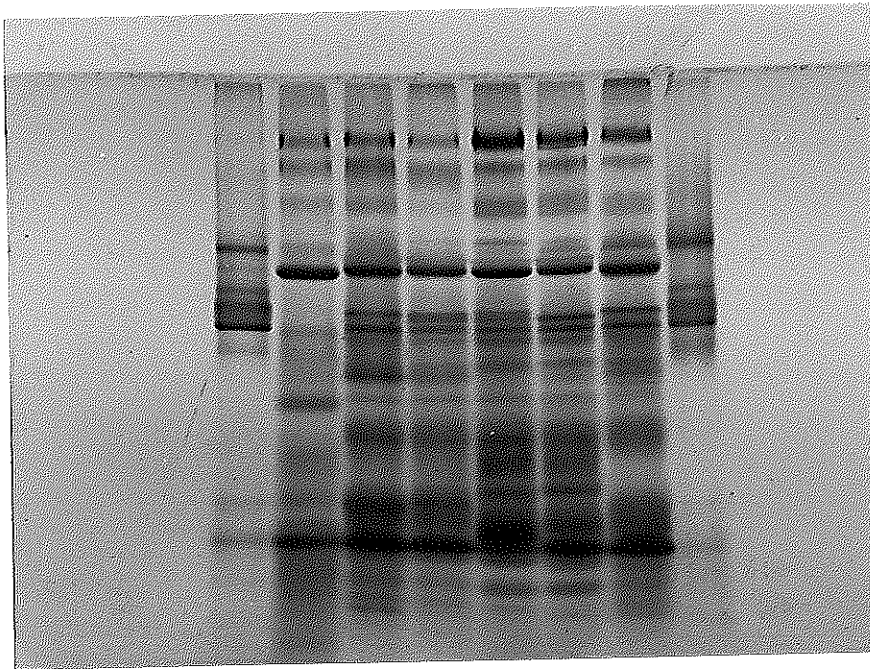
ซีรัมของกระด่ายก่อนฉีดไวเทรโลจีนิน ก็ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับ พลาสมาของปลาต่างๆ เหล่านี้ (รูปที่ 19 A)

### 3.5.2 โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรฟอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ

จากการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรฟอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพของพลาสมาปลากะรัง เพศเมีย ที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าที่ค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ต่าง ๆ คือ 1, 2, 3, 5, 10 แบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลาเหล่านี้คล้ายคลึงกันมาก (รูปที่ 20 แถวที่ 3-7) และพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากบางแถบ ตรงกับแถบโปรตีนของพลาสมาปลาเพศเมียที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล แถบโปรตีนในพลาสมาของปลาเพศผู้จะแตกต่างอย่างเห็นได้เด่นชัดจากแถบโปรตีนในพลาสมาของเพศเมีย

### 3.5.3 ร็อกเก็ต อิมมูโน อิเล็กโทรฟอรีซิส

การหาปริมาณไวเทรโลจีนินในพลาสมาทำได้ โดยใช้วิธีร็อกเก็ต อิมมูโน อิเล็กโทรฟอรีซิส โดยคำนวณปริมาณไวเทรโลจีนินจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสของไวเทรโลจีนินบริสุทธิ์ที่ทราบปริมาณแน่ชัด (รูปที่ 21 แถวที่ 6-9) จากความสูงของยอดจรวดนำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของยอดจรวดกับปริมาณไวเทรโลจีนินที่ใช้ ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 22 ด้วยวิธีการนี้ทำให้คำนวณปริมาณไวเทรโลจีนินในพลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ต่าง ๆ ได้จากความสูงของยอดจรวด (รูปที่ 21 แถวที่ 1-5) พบว่าพลาสมาของปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์เท่ากับ 5 มีปริมาณไวเทรโลจีนินสูงสุดคือ 18.0 มก./มล. พลาสมา และลดต่ำลงตามค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ที่ลดลง คือพลาสมาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ เป็น 3, 2 และ 1 จะมีปริมาณไวเทรโลจีนินเป็น 16.0, 11.2 และ 8.4 มก./มล. พลาสมา ตามลำดับ พลาสมาของปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์เท่ากับ 1 มีปริมาณไวเทรโลจีนินในพลาสมาต่ำสุด นอกจากนั้นปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์เป็น 10 มีระดับพลาสมาไวเทรโลจีนินเป็น 15.2 มก./มล. พลาสมา ต่ำกว่าของปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์เป็น 5 ดังแสดงผลในตารางที่ 10 และ รูปที่ 21



1 2 3 4 5 6 7 1

**รูปที่ 20** แบบแผนพลาสมาโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรี

**ซิส** แบบใหม่แปลงสภาพ ของปลาเพศเมียที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ

แถวที่ 1 พลาสมาของปลาที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล

แถวที่ 2 พลาสมาของปลาเพศผู้

แถวที่ 3 พลาสมาของปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ = 1

แถวที่ 4 พลาสมาของปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ = 2

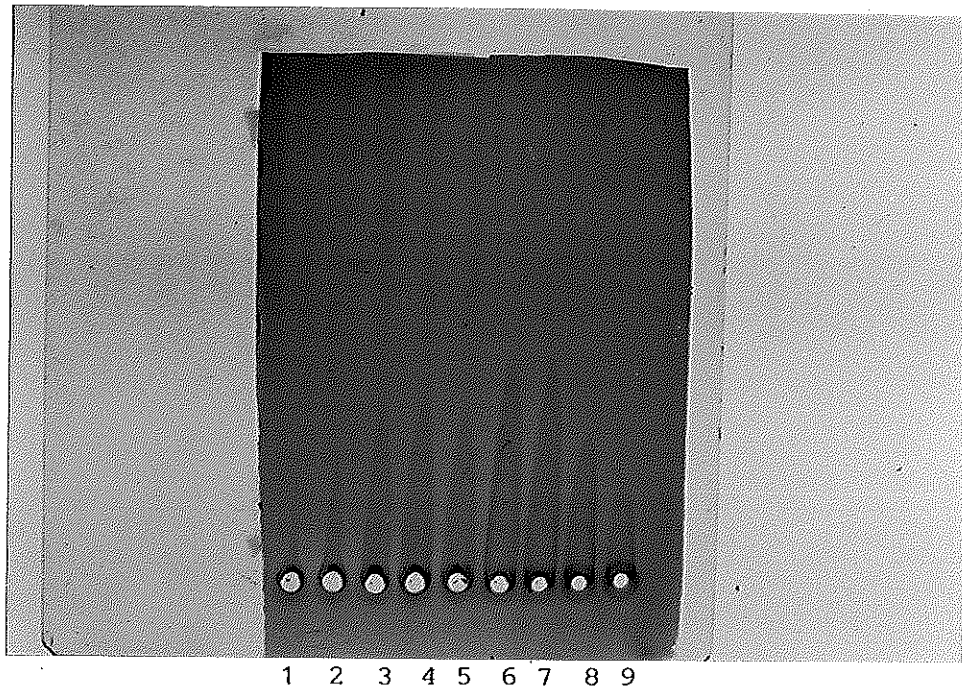
แถวที่ 5 พลาสมาของปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ = 3

แถวที่ 6 พลาสมาของปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ = 5

แถวที่ 7 พลาสมาของปลาที่มีค่าธรรมชาติการสืบพันธุ์ = 10

ปริมาตรพลาสมาในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 5 ไมโครลิตร

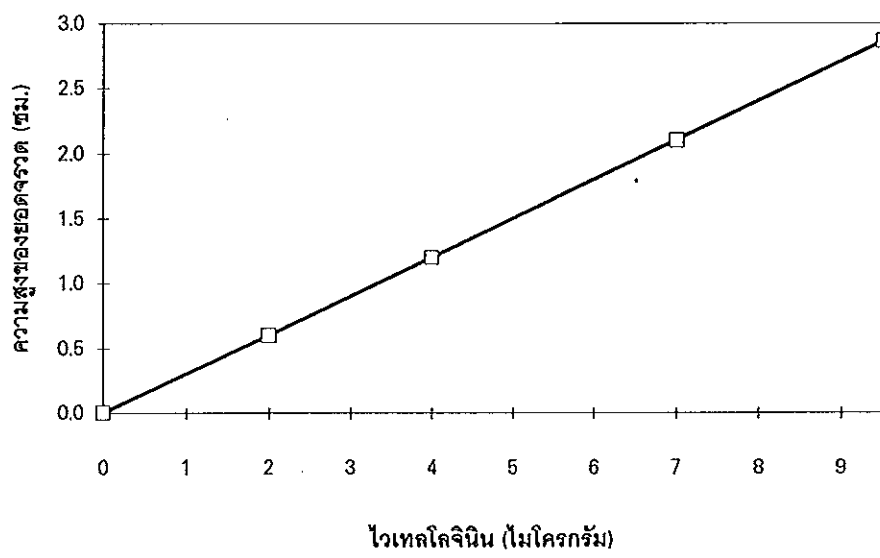
ยกเว้นแถวที่ 1 มีปริมาณโปรตีน 25 ไมโครกรัม



**รูปที่ 21 การทำร็อกเก็ต อิมบูโน อิเล็กโทรพอรีซิสของพลาสติกพลาเพศเมีย และไวเทลโลจันมาตรฐาน**

แถวที่ 1	พลาสติกของปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 1
แถวที่ 2	พลาสติกของปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 2
แถวที่ 3	พลาสติกของปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 3
แถวที่ 4	พลาสติกของปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 5
แถวที่ 5	พลาสติกของปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 10
แถวที่ 6-9	ไวเทลโลจันบริสุทธิ์ที่มีปริมาณโปรตีน 11.90, 9.52, 7.14, และ 4.76 ไมโครกรัม ตามลำดับ

ปริมาณพลาสติกในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 0.5 ไมโครลิตร



รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของยอดจรวดกับ ปริมาณไอเทลโลจีนิน

ตารางที่ 10 ปริมาณไอเทลโลจีนิในพลาสติกของปลาเทศเมียที่มีค่าดัชนี  
การสืบพันธุ์ต่าง ๆ

พลาสติก	ไอเทลโลจีนิ (มก./มล. พลาสติก)
ปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 1	8.4
ปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 2	11.2
ปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 3	16.0
ปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 5	18.0
ปลาที่มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ = 10	15.2

## 4. วิจัยารณ์

### 4.1 พลาสมาไวเทลโลจีนิน

#### 4.1.1 แบบแผนโปรตีนของพลาสมา

ในการศึกษาแบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลากะรัง โดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าพลาสมาโปรตีนของปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์ และของปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์มีแบบแผนที่คล้ายกันมาก แต่จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดจากพลาสมาของปลาเพศผู้ (รูปที่ 3) โดยทั่วไปปลาชนิดนี้เป็นปลาที่สามารถเปลี่ยนเพศได้ คือเมื่อมีอายุน้อยเป็นเพศเมียเมื่อมีน้ำหนัก 3-4 กิโลกรัม จะอยู่ในสภาพเจริญพันธุ์ เมื่อปลาอายุประมาณ 6-7 ปี มีน้ำหนักประมาณ 7 กิโลกรัม ขึ้นไป ก็จะเปลี่ยนเป็นเพศผู้ จากแบบแผนของพลาสมาโปรตีนแสดงให้เห็นว่า ปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์และปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์มีแบบแผนที่คล้ายกัน แต่จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปลี่ยนเป็นเพศผู้ โดยเฉพาะแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่มากนักจะแตกต่างกันมาก แต่แถบโปรตีนตรงตำแหน่งของไวเทลโลจีนินกลับไม่พบความแตกต่างระหว่างพลาสมาของปลาทั้ง 2 เพศ ซึ่งต่างจากปลานิลที่ได้ศึกษาโดย Chan, *et al.* (1991) ปลานิลเป็นปลาที่ไม่มีการเปลี่ยนเพศ แบบแผนของพลาสมาโปรตีนของปลานิลเพศเมียและเพศผู้แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะแถบโปรตีนไวเทลโลจีนิน ซึ่งจะพบเฉพาะในปลาเพศเมียนั้น ผลการศึกษานี้สามารถนำแบบแผนพลาสมาโปรตีนมาใช้แยกเพศปลากะรังได้ในตนเองเดียวกับของปลานิล

#### 4.1.2 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อการสังเคราะห์

##### พลาสมาโปรตีน

จากการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลในปริมาณ 3 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม พบว่าหลังจากฉีดปลาครั้งแรกได้ 3 วัน จะมีปริมาณโปรตีนในพลาสมาเพิ่มขึ้น 1.6 เท่า หลังการฉีดครั้งที่ 2 เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า และหลังการฉีดครั้งที่ 3 เพิ่มขึ้น 3.4 เท่า (ตารางที่ 6) และจากแบบแผนของ

พลาสมาโปรตีนในโพสอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ปรากฏโปรตีน 3-4 แถบที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อใช้ปริมาณพลาสมาโปรตีนในการทดลองเท่ากับโปรตีนของปลาที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน จึงเห็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยบางแถบจางลง เมื่อเทียบกับแบบแผนโปรตีนของพลาสมาที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน (รูปที่ 3) โปรตีน 3-4 แถบ (แถบ I, II, III และอีกแถบ) ที่เพิ่มขึ้นจากผลของการฉีดฮอร์โมนนั้นน่าจะเป็นไวเทลโลจีนินเพราะจากผลของ So, *et al.* (1985) ซึ่งได้ฉีดปลาแซลมอนด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออลในปริมาณ 5 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 5 วัน พบปริมาณพลาสมาโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 9, 20 และเมื่อครบ 27 วัน จะมีแถบไวเทลโลจีนินเพิ่มมากขึ้นส่วนแถบโปรตีนอื่นจะเห็นจางลง และจากการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่าก่อนการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลมีระดับโปรตีนในพลาสมาเป็น 55 มก./มล. พลาสมา เมื่อฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลในปริมาณ 5 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 3 วัน จะมีระดับโปรตีนในพลาสมาเพิ่มขึ้นเป็น 77 มก./มล. พลาสมา ภายใน 6 วัน ซึ่งสูงกว่าการฉีดด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออลในปริมาณ 2 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ที่โปรตีนเพิ่มเป็น 58 มก./มล. พลาสมา (Campbell and Idler, 1980) ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าฮอร์โมนเอสตราไดออลเป็นตัวกระตุ้นให้ปลาสังเคราะห์พลาสมาโปรตีนหรือไวเทลโลจีนินเพิ่มขึ้น (Wangh, 1982)

นอกจากปริมาณของฮอร์โมนเอสตราไดออลที่ใช้ในการฉีดแล้ว อุณหภูมิก็มีผลอย่างมากต่อการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน Olin and Von der Decken (1989) พบว่าที่อุณหภูมิ 16° ซ ปลาแซลมอนมีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินปริมาณสูงกว่าที่ระดับอุณหภูมิ 8° ซ

สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน โดยใช้ต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ได้เช่นกัน Hara, *et al.* (1980) ใช้ต่อมใต้สมองของปลาแซลมอน ในปริมาณ 16 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ฉีดปลาไหลญี่ปุ่น โดยทำการฉีดอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง ประมาณ 5-10 ครั้ง ในระยะเวลา 3 เดือน พบว่าปลาไหลญี่ปุ่นสามารถสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้เช่นกัน



#### 4.1.3 ผลการฉีดสารกัมมันตรังสี $^{32}\text{P}$ -Orthophosphate และ $^3\text{H}$ -Leucine

Chan, *et al.* (1991) ได้ใช้  $^{32}\text{P}$ -phosphorus และ  $^3\text{H}$ -leucine เป็นตัวบ่งชี้ว่าโปรตีนแถบใดเป็นไวเทลโลจีนิน โดยการนำพลาสมาของปลานิลเพศผู้ ที่ผ่านการฉีดด้วยเอสตราไดออลและสารกัมมันตรังสีทั้งสองชนิดไปแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบโปรตีนที่มี  $^{32}\text{P}$  ติดฉลากอยู่ถูกชะออกมาด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ในพีคเดียว ส่วนโปรตีนที่มี  $^3\text{H}$  ติดฉลากอยู่ถูกชะออกมาใน 2 พีค เมื่อทำการศึกษาต่อ พบว่าไวเทลโลจีนินของปลานิลอยู่ที่พีคเดียวซึ่งมีทั้ง  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ติดฉลากอยู่ เช่นเดียวกับ de Vlaming, *et al.* (1980) ได้ใช้  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate และ  $^3\text{H}$ -leucine เป็นตัวติดตามการแยกไวเทลโลจีนินในปลาทอง พบไวเทลโลจีนินเป็นฟอสโฟโปรตีนที่มีทั้ง  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ติดฉลากอยู่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ในพีคเดียวเช่นกัน แต่ประกอบด้วยแถบโปรตีน 3 แถบ ในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอร์ซิส แบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งมีอัตราส่วนของ  $^{32}\text{P} : ^3\text{H}$  ของโปรตีนทั้ง 3 แถบ มีค่าใกล้เคียงกัน

เมื่อฉีดปลากะรังด้วยสารกัมมันตรังสี  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate และ  $^3\text{H}$ -leucine หลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล 3 ครั้ง เพื่อให้  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  เป็นตัวติดตามโปรตีนหรือไวเทลโลจีนินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ แล้วนำพลาสมาที่มีสารกัมมันตรังสีอยู่ ไปทำโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอร์ซิส แบบไม่แปลงสภาพ และทำการตัดเจลเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปหาปริมาณกัมมันตภาพรังสี เพื่อดูว่าโปรตีนแถบใดมีสารกัมมันตรังสี  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ติดฉลากอยู่ พบว่าพลาสมาของปลากะรังมีสารกัมมันตรังสีทั้งสองชนิดติดฉลากอยู่ 4 แถบ คือแถบ 0, 1, 2 และ 3 แถบ 0 ย้อมติดสีดูมา ซี บลู น้อยมาก (ตรงกับแถบ 0 ในรูปที่ 4 C) จนเกือบมองไม่เห็นแถบโปรตีน รวมทั้งมีปริมาณกัมมันตภาพรังสีของทั้ง  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ไม่มากนัก และมีอัตราส่วน

$^{32}\text{P}$  :  $^3\text{H}$  เป็น 1.37 ส่วนโปรตีนที่มีสารกัมมันตรังสีติดฉลากอยู่เป็นจำนวนมาก คือแถบ 1, 2 และ 3 ซึ่งมีอัตราส่วน  $^{32}\text{P}$  :  $^3\text{H}$  เป็น 2.70, 2.70 และ 2.80 ตามลำดับ โปรตีนแถบ 1, 2 และ 3 นี้ย่อมติดสีดูมาซีบลู คือตรงกับ แถบที่ I, II และ III ตามลำดับ ในรูปที่ 4 C และรูปที่ 3 แถว 6 แสดงว่าโปรตีนทั้ง 4 แถบนี้เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอสตราไดออล เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในปลาอื่น ๆ (Chan, *et al.*, 1991; So, *et al.*, 1985; de Vlaming, *et al.*, 1980) พอสรุปได้ว่า โปรตีน แถบ 1(I), 2(II) และ 3(III) เป็นไวเทลโลจีนินของปลากระริง แต่แถบ 0(O) อาจจะเป็นหรือไม่เป็นไวเทลโลจีนิน เพราะมีค่าอัตราส่วน  $^{32}\text{P}$  :  $^3\text{H}$  ต่างไปจากอีกสามแถบมาก ซึ่งต้องศึกษาต่อไป

#### 4.2 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

##### 4.2.1 คอลัมน์ DEAE-Sephacel

จากการแยกพลาสมาของปลากระริง ซึ่งได้ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล,  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate และ  $^3\text{H}$ -leucine โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่ามีโปรตีนหนึ่งพีค (D1) หลุดออกมาจากคอลัมน์ก่อนการชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ แสดงว่าเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับเรซินและเป็นโปรตีนที่มีประจุบวก หลังการชะคอลัมน์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องแบบ 2 ส่วน (2 chamber) (linear gradient) พบโปรตีนถูกชะออกมา 3 พีคคือพีค D2, D3 และ D4 โดยถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน พีคสุดท้าย (D4) จับกับเรซินมากที่สุด เพราะใช้ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0.25 M) มากที่สุด รวมทั้งเป็นพีคที่มีปริมาณโปรตีน (O.D.<sub>280</sub>) และมีปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  มากที่สุดเช่นกัน Hamazaki, *et al.* (1987) ได้ทำการ

แยกไวเทลโลจีนิชโดยคอลัมน์ DEAE-cellulose พบว่าไวเทลโลจีนิชถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.25-0.3 M ซึ่งใกล้เคียงกับพีค D4 ของปลากระวัง แต่ de Vlaming, *et al.* (1980) พบว่าการชะไวเทลโลจีนิชจากคอลัมน์ DEAE-cellulose ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยเพิ่มความเข้มข้นแบบต่อเนื่อง ซึ่งให้การชะแบบ 3 ส่วน ที่เป็นการชะแบบ nonlinear gradient สามารถแยกไวเทลโลจีนิชได้ดีกว่าการชะแบบ 2 ส่วน ซึ่งเป็นแบบ linear gradient แต่ในการทำให้ไวเทลโลจีนิชของปลากระวังบริสุทธิ์โดยการชะคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 2 แบบ พบว่าได้ผลการแยกที่ไม่แตกต่างกันมากนัก จึงไม่ได้เสนอผลการชะโปรตีนแบบ 3 ส่วน ในวิทยานิพนธ์นี้

เมื่อนำโปรตีนพีค D4 ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ไปทำโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ปรากฏโปรตีนประมาณ 9-10 แถบ ที่ข้อมติดสีคูมาซี บลู (รูปที่ 6) แต่มีโปรตีน 4 แถบ (แถบ 0, 1, 2, 3 ในรูปที่ 7 C, D) ซึ่งตรงกับแถบ 0, I, II, III ตามลำดับ ในรูปที่ 6 แถว 5 และรูปที่ 3 แถว 6 ของพลาสติก ที่มีปริมาณกัมมันตภาพรังสีของทั้ง  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  อยู่เป็นจำนวนมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการแยกไวเทลโลจีนิชของปลาอื่น ๆ โดยคอลัมน์ชนิดเดียวกันนี้ (Chan, *et al.*, 1991; de Vlaming, *et al.*, 1980) ดังได้กล่าวแล้วในข้อ 4.1.3 สรุปได้ว่า โปรตีนทั้ง 3 แถบ [แถบ 1(I), 2(II) และ 3(III)] ในพีค D4 เป็นไวเทลโลจีนิช แต่แถบ 0(O) ที่มีค่าอัตราส่วน  $^{32}\text{P} : ^3\text{H}$  ต่างไปจากอีก 3 แถบมาก อาจจะเป็นหรือไม่เป็นไวเทลโลจีนิชจากการแยกพลาสติกปลากระวังโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel นี้ แยกโปรตีนพีค D4 ได้ 425.0 มก. คิดเป็น 22.1 % ของพลาสติกโปรตีนเริ่มต้น และมีสารกัมมันตรังสี  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  บริสุทธิ์ขึ้น 2.4 และ 3.0 เท่า ตามลำดับ คิดเป็น 53.8 และ 67.0 % ของพลาสติกโปรตีนเริ่มต้น ตามลำดับ

#### 4.2.2 คอลัมน์ Sephadex G-150

เมื่อนำพีค D4 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ที่ทำให้เข้มข้นมากขึ้นไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-150 ได้โปรตีนออกมา 3 พีค คือพีค S1, S2 และ S3 พีคแรก (S1) มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด ปริมาณกัมมันตภาพรังสีของทั้ง  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  พบเฉพาะในพีคแรกเท่านั้น พีคที่ 2 (S2) และ 3 (S3) ไม่มีกัมมันตภาพรังสีอยู่เลยและมีโปรตีนจำนวนน้อย เมื่อนำพีค S1 ไปทำโพลิอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ พบว่าโปรตีนบางชนิดที่พบในสารละลายพีค D4 รวมทั้งแถบ 0(0) ถูกแยกออกไปโดยคอลัมน์ Sephadex G-150 และปรากฏเฉพาะไวเทลโลจีนิน 3 แถบ ในสารละลายพีค S1 (I, II และ III) ที่ย้อมติดสีคูมาซี บลู (รูปที่ 6 แถวที่ 6) จากการติดตามปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ของไวเทลโลจีนินในพีค S1 พบว่ามีแถบกัมมันตรังสี 3 แถบ เช่นกันคือแถบ 1, 2 และ 3 (รูปที่ 7 E, F) ซึ่งเป็นแถบที่ตรงกับแถบไวเทลโลจีนิน I, II และ III ตามลำดับ อัตราส่วนของกัมมันตภาพรังสี  $^{32}\text{P}$  ต่อ  $^3\text{H}$  ในแถบ 1, 2 และ 3 มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 2.75, 2.75 และ 2.86 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณ  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ในไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แถบ มีค่าคงที่ ซึ่งคล้ายกับของปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) จากการแยกพีค D4 โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 ไม่สามารถแยกแถบไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แถบ (แถบ I, II และ III) ออกจากกันได้ เมื่อลองใช้โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน อื่น ๆ เช่น คอลัมน์ Sephadex G-100, Sephadex G-200, Bio Gel P-300 และ Sepharose CL-6B เพื่อทำการแยกพีค D4 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ต่อ ก็พบไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แถบ นี้ถูกชะออกมาด้วยกัน ไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยคอลัมน์เหล่านี้ ซึ่งสอดคล้องผลของ Emmersen and Petersen (1976) และของ Idler, *et al.* (1979) ที่พบว่าการใช้คอลัมน์แบบเจลฟิลเตรชันไม่สามารถแยกแถบไวเทลโลจีนินของปลาซลมอนออกจากกันได้ เมื่อเปรียบเทียบผลการแยกพีค D4

โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 กับคอลัมน์ เจล พิลเตรชั่น ชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ พบว่าคอลัมน์ Sephadex G-150 สามารถแยกไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แยกออกจากโปรตีนชนิดอื่น ๆ และมีผลทำให้ไวเทลโลจีนินที่แยกได้บริสุทธิ์กว่าการแยกโดยคอลัมน์อื่น ๆ เหล่านี้ จึงกล่าวได้ว่า การแยกพีค D4 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ต่อโดยคอลัมน์ Sephadex G-150 จะได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ซึ่งประกอบด้วยแถบโปรตีน 3 แถบ ที่มี  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ติดฉลากอยู่ที่นี้ เพราะไม่พบแถบโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่มีสารกัมมันตรังสีติดฉลากปะปนอยู่รวมทั้งแถบ 0 หรือแถบโปรตีน 0 ซึ่งอาจจะเป็นโปรตีนอื่นที่ถูกสังเคราะห์ใหม่ ที่เป็นผลมาจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล แต่ไม่ได้เป็นไวเทลโลจีนิน ดังที่พบเช่นเดียวกันในการแยกไวเทลโลจีนินของปลานิล (Chan, *et al.*, 1991) เพราะมีค่ากัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  :  $^3\text{H}$  เป็น 1.37 ซึ่งต่างจากของไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แถบ (I, II, III) และมีน้ำหนักโมเลกุลต่างจากไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แถบ เพราะถูกกำจัดออกไปโดยคอลัมน์ Sephadex G-150 ผลจากการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 นี้ จะได้ไวเทลโลจีนิน 368.5 มก. คิดเป็น 19.2 % ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น และจากค่ากัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  พบว่าแยกไวเทลโลจีนินได้บริสุทธิ์ขึ้น 2.5 และ 3.1 เท่า ตามลำดับ คิดเป็น 48.0 และ 58.7 % ของสารเริ่มต้น ตามลำดับ

การติดตามความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีนิน ในขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ไม่สามารถทำได้ โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอส ทั้งนี้เพราะไวเทลโลจีนินประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์จำนวนมาก (ดังจะได้กล่าวในข้อ 4.3.2) ทำให้มีความยุ่งยากในการวิเคราะห์แถบโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาในปลาแซลมอนและปลาเรนโบว์ เทราที่พบว่าไม่สามารถใช้โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีนินได้ เพราะจะปรากฏจำนวนแถบโปรตีนมากมาย ทำให้ยากในการบอกถึงความบริสุทธิ์ของไวเทลโล

จินินใต้ (So, *et al.*, 1985; Wiley, *et al.*, 1979) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงอาศัยการศึกษาแบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพและอัตราส่วนระหว่างปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  ต่อของ  $^3\text{H}$  เป็นหลักซึ่งสอดคล้องกับวิธีการของ de Vlaming, *et al.* (1980)

#### 4.2.3 พร็อพาราทیب เจล อิเล็กโตรฟอริซิส

เมื่อนำพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150 หรือไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ไปทำพร็อพาราทیب เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ เพื่อทำการแยกแถบโปรตีนทั้ง 3 แถบของไวเทลโลจีนินออกจากกัน พบว่าเมื่อตัดเจลซึ่งมีแถบโปรตีนเหล่านี้แยกกัน แล้วทำการชะเพื่อไล่โปรตีนที่อยู่ในเนื้อเจลออกมา พบว่าไวเทลโลจีนินแถบที่ I และ II ยังปรากฏอยู่ด้วยกัน (รูปที่ 10 แถวที่ 3) ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่สามารถแยกแถบที่ III ออกไปเป็นแถบเดี่ยวได้ (รูปที่ 10 แถวที่ 4) ในการชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลแบบแวนอนโคดโดยกระแสไฟ (ข้อ 2.8.3.4 ข) พบว่าโปรตีนถูกชะออกมา 64.3 % ซึ่งมากกว่าการชะโปรตีนแบบการทำอิเล็กโตรฟอริซิสในเจลแท่งแบบแนวตั้ง (ข้อ 2.8.3.4 ก) ซึ่งยุ่งยากกว่าและชะโปรตีนได้ปริมาณที่น้อยมากคือได้ 37.1 %

#### 4.3 คุณสมบัติของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

##### 4.3.1 ไกลโคลิโฟโปรตีน

จากการย่อยแยกโปรตีนของไวเทลโลจีนินในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ด้วยสี่คูลมาซี บลู ปรากฏโปรตีนที่ย้อมติดสีนี้ 3 แถบ โปรตีนทั้ง 3 แถบนี้ ย้อมติดสีพีเอเอส เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจีนินของปลากระรังทั้ง 3 แถบ มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งของไวเทลโลจีนิน แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในไวเทลโลจีนิน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในไวเทลโลจีนินของปลาตึกเคิล แบล็ก (stickle black) มีค่า 17.3-37.4 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน และประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส (mannose) และ

กลูโคส (glucose) เป็นจำนวนมาก (Coven, *et al.*, 1987) ส่วน  
ไวเทลโลเจนนินของปลาเมดากามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 132 ไมโครกรัม/มก.  
โปรตีน (Hamazaki, *et al.*, 1987)

เมื่อทำการย่อยไวเทลโลเจนนินด้วยสี่ซูดาน แบล็ค บี ซึ่งเป็นสี  
ที่ย้อมติดส่วนไขมัน พบว่าแถบไวเทลโลเจนนินทั้ง 3 แถบ ย้อมติดสี่ซูดาน แบล็ค  
บี แสดงว่าไวเทลโลเจนนินของปลากะรังมีไขมันเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสอดคล้อง  
กับการศึกษาของ Fremont, *et al.* (1984) ที่พบไวเทลโลเจนนินของปลา  
แซลมอนมีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 20% และเป็นไขมันที่มีฟอสเฟตเป็นส่วน  
ประกอบ (phospholipid) มากกว่าไขมันพวกไตรกลีเซอไรด์ (trigly-  
ceride) และคอเลสเตอรอล(cholesterol) ในขณะที่ Silversand and  
Haux (1991) พบว่าปริมาณไขมันในไวเทลโลเจนนินของปลาหลายชนิดเช่นปลา  
คอด (cod) เรนโบว์ เทราท์ เทอร์บ็อก (turbot) และปลาวอลฟ์ฟิช  
(wolffish) มีประมาณ 16-18 % ของน้ำหนักแห้ง โดยประกอบด้วยไขมัน  
ชนิดฟอสโฟลิพิด(phospholipid) และไขมันที่เป็นกลาง(neutral lipid)  
ประมาณ 70 % และ 16-18 % ของไขมันทั้งหมด ตามลำดับ ส่วนกรดไขมัน  
(fatty acid) เป็นชนิดกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty  
acid) ถึง 50 %

#### 4.3.2 หน่วยย่อย

จากการศึกษาจำนวนหน่วยย่อยของไวเทลโลเจนนินบริสุทธิ์ ใน  
โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบมีเอสดีเอส ดังแสดงผลในรูป  
ที่ 11 พบว่าไวเทลโลเจนนินบริสุทธิ์ (พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-150)  
มีแบบแผนโปรตีนใกล้เคียงกับของไวเทลโลเจนนิน แถบที่ I & II ที่ได้จาก  
การทำพีพาราทึบ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส คือมีประมาณ 10 แถบ ส่วนไวเทล  
โลเจนนิน แถบที่ III มีแถบโปรตีนประมาณ 6 แถบ ติดสี่ย้อมคумаซี บลู เข้ม  
2 แถบชัดเจน จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ไวเทลโลเจนนินของปลากะรัง  
ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ หรือหน่วยย่อยที่มีขนาดต่าง ๆ กัน จำนวนมาก  
ประกอบกันเป็นโปรตีนเชิงซ้อน (complex protein) ขนาดใหญ่ คุณสมบัติ

ของไวเทลโลจินิกินเช่นนี้พบในปลาหลายชนิดเช่นปลาเรนโบว์ เทราท์ (Wiley, *et al.*, 1979) ปลาทอง (de Vlaming, *et al.*, 1980) เป็นต้น เนื่องจากไวเทลโลจินิกินของปลากะรังและของปลาอื่น ๆ ดังกล่าวนี้ ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์จำนวนมาก จึงไม่นิยมใช้โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบมีเอสดีเอส ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจินิกินหรือใช้ติดตามความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจินิกินในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

#### 4.3.3 น้ำหนักโมเลกุล

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจินิกิน แถบ I, II และ III ไม่สามารถหาได้โดยการทำโครมาโตกราฟี แบบเจล ฟิลเตรชัน ด้วยคอลัมน์ Sephadex ชนิดต่าง ๆ หรือ Sepharose CL-6B และ Bio Gel P-300 ได้ ดังได้กล่าวแล้ว ทั้งนี้เพราะไวเทลโลจินิกินทั้ง 3 แถบ ถูกชะออกมาในตำแหน่งเดียวกันจากคอลัมน์เหล่านี้ ในขณะที่เดียวกันการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบมีเอสดีเอส ก็ไม่ได้ผลเพราะไวเทลโลจินิกินประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวนมากมาย ดังนั้นจึงหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวัดอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของไวเทลโลจินิกินแต่ละแถบ ในการทำโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ที่มีความเข้มข้นของโพลีอะครีลาไมด์ เจล ต่าง ๆ กัน แล้วนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์มาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลตามวิธีของ Rodbard (1976) และ Ferguson (1964) ที่อ้างโดย de Vlaming, *et al.* (1980) พบว่าไวเทลโลจินิกิน แถบที่ I มีน้ำหนักโมเลกุล 470,000 ดัลตัน แถบที่ II มีน้ำหนักโมเลกุล 335,000 ดัลตัน และแถบที่ III มีน้ำหนักโมเลกุล 290,000 ดัลตัน และจากผลการพล็อตกราฟ ระหว่างความสัมพันธ์ของ  $\log$  การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ( $\log R_r$ ) กับความเข้มข้นของโพลีอะครีลาไมด์ เจล ในรูปที่ 15 พบว่ากราฟของไวเทลโลจินิกินแต่ละแถบเป็นเส้นตรง กราฟของแถบ II และ III ตัดแกน Y (Y-intercept) ซึ่งเป็น  $\log R_r$  ที่จุดเดียวกัน แสดงว่าไวเทลโลจินิกินแถบ ที่ II และ III มีความหนาแน่นของประจุที่ผิวเท่ากัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน (Ferguson, 1964; Rodbard, 1976) ในขณะที่



ไวเทลโลจันิน แลบทที่ I ตัดแกน Y ที่คนละจุด แสดงถึงความหนาแน่นของ ประจุและน้ำหนักโมเลกุลต่างจากของแลบทที่ II และ III ผลการทดลองนี้ คล้ายกับของไวเทลโลจันินของปลาทอง ซึ่งมี 3 แลบทเช่นกัน และมีน้ำหนัก โมเลกุลของหน่วยย่อยเป็น 230,000, 330,000 และ 380,000 ดัลตัน นอกจากนี้ไวเทลโลจันินของปลาทองแลบทที่ I ตัดกับแกน Y ที่คนละจุดกับของ แลบทที่ II และ III ซึ่งตัดแกน Y ที่จุดเดียวกันเช่นกัน (de Vlaming, *et al.*, 1980) ไวเทลโลจันินของปลาโดยทั่วไปจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200,000-600,000 ดัลตัน

#### 4.3.4 ปริมาณฟอสเฟต

จากการเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟต ของปลาสมาลากะรัง เพศเมียที่เจริญพันธุ์ ยังไม่เจริญพันธุ์และของปลาเพศผู้ พบว่ามีปริมาณไม่แตกต่างกันคืออยู่ในช่วง 0.45-0.51 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน แต่ปริมาณฟอสเฟต ของปลาเพศเมียที่ถูกฉีดกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอสตราไดออลเพิ่มมากขึ้นประมาณ 12 เท่า (5.80 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน) ควบคู่ไปกับการสังเคราะห์ไวเทล โลจันินที่เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันพบว่าไวเทลโลจันินบริสุทธิ์มีฟอสเฟตเป็น องค์ประกอบถึง 6.80 ไมโครกรัม/ มก. โปรตีน ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของ ไวเทลโลจันินทั่วไป ปริมาณฟอสเฟตในไวเทลโลจันินของปลากะรังนี้ใกล้เคียง กับค่าที่พบในไวเทลโลจันินของปลาอื่น ๆ เช่นในปลาไหลญี่ปุ่น พบฟอสเฟตใน ไวเทลโลจันินและในโปรตีนโพลีดี เป็น 7.1 และ 6.3 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน ตามลำดับ (Hara, *et al.*, 1980) ส่วนไวเทลโลจันินของปลา เรนโบว์ เทราท์ มีฟอสเฟต 6.0 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน (Campbell and Idler, 1980) จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจันิน ของปลากะรังมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหรือเป็นฟอสโฟโปรตีน ดังเช่นไวเทล โลจันินของปลาอื่น ๆ ดังนั้นเมื่อฉีด  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate ในปลาหลังการ ฉีดด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล จึงพบกัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  ปรากฏอยู่ใน แลบทโปรตีนของไวเทลโลจันิน เหมือนกับของปลานิลและปลาทอง (Chan, *et al.*, 1991; de Vlaming, *et al.*, 1980)

#### 4.4 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

##### 4.4.1 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระริง

เมื่อนำไวเทลโลจีนินของปลากระริง ไปฉีดกระต่ายที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือฉีดกระต่ายตัวละ 0.5 มก. และ 1 มก. ต่อครั้ง แยกกันพบว่าที่ความเข้มข้นทั้งสองระดับนี้ สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินที่ฉีดเข้าไปได้และได้ผลไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับผลของ Copeland and Thomas (1988) ซึ่งได้ฉีดไวเทลโลจีนินของปลาเทราท์ทะเลจุดในกระต่ายโดยการฉีด 3 ครั้ง ด้วยปริมาณ 400, 100 และ 50 ไมโครกรัม ตามลำดับ ทุก ๆ 3 อาทิตย์ พบว่ากระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้ดีเช่นกัน

เมื่อทำการแยกแอนติบอดีจากซีรัมของกระต่าย ที่ได้โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 50 % และนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีจะหลุดออกมาในพีคแรกก่อนการชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ทั้งนี้เพราะโปรตีนที่หลุดออกมาในพีคแรกนี้เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินได้เช่นเดียวกับซีรัมกระต่ายก่อนทำการแยก (รูปที่ 17 หลุม 3, 4) แสดงว่าแอนติบอดีที่แยกได้เป็นโปรตีนที่ไม่จับกับเรซิน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wallace (1965) ที่พบ IgG หลุดออกมาจากคอลัมน์ DEAE-cellulose โดยไม่จับกับเรซิน จากการแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระริงจากซีรัมกระต่าย สามารถแยกแอนติบอดีได้ 62.8 มก. เมื่อทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose สูญเสียโปรตีนไปประมาณ 31 % จึงเหลือแอนติบอดีเพียง 43.0 มก. คิดเป็น 2.5 % ของโปรตีนทั้งหมดในซีรัมของกระต่าย

##### 4.4.2 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนของแอนติบอดี

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินปลากระริง ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลากระริงเพศผู้ แต่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลากระริงเพศเมียทั้งที่เจริญพันธุ์ และยังไม่เจริญพันธุ์และกับสารสกัดจากรังไข่ แสดงว่าไวเทลโลจีนินของปลากระริง เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะใน

ปลาสมาลาเพศเมีย และมีความเกี่ยวข้องกันหรืออาจมีโครงสร้างที่คล้ายกันกับโปรตีนในสารสกัดจากรังไข่ ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนโพลีค ในทำนองเดียวกันแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนนินของปลาไหลญี่ปุ่น เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับปลาสมาลาของปลาเพศเมียและสารสกัดจากรังไข่ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับปลาสมาลาของปลาเพศผู้ (Hara, *et al.*, 1980) นอกจากนี้แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนนินของปลาเมดากา สามารถเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับสารสกัดจากตับ (Hamazaki, *et al.*, 1987) แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนนินของปลาแซลมอน เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับปลาสมาลา สารสกัดจากตับและสารสกัดจากรังไข่ของปลาชนิดเดียวกัน แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับปลาสมาลาของปลาวินเทอร์ เฟลันเดอร์ (winter flounder) ปลาเรนโบว์ เทราท์ และปลาทอง (So, *et al.*, 1985) Redshaw and Follet (1976) พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนนินของนก ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลเจนนินของปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ในไฟลัมเดียวกัน ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องระหว่างไวเทลโลเจนนิน สารสกัดจากตับและสารสกัดจากรังไข่หรือจากรังไข่ของปลาหรือของสัตว์ชนิดเดียวกัน ซึ่งสนับสนุนคำกล่าวที่ว่าไวเทลโลเจนนินถูกสังเคราะห์จากตับ ส่งออกไปตามกระแสเลือดและไปสะสมเป็นโปรตีนโพลีคในไข่ ในขณะที่เดียวกันผลการทดลองยังแสดงให้เห็นถึง ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนของสัตว์ชนิดเดียวกัน โดยไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับโปรตีนของสัตว์ต่างชนิด

#### 4.5 ปลาสมาลาไวเทลโลเจนนินของปลาเพศเมียที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ

ค่าอัตราชน้การสืบพันธุ์ของปลา บ่งบอกถึงวัยเจริญพันธุ์ของปลาได้เป็นอย่างดี การพัฒนาของรังไข่จะเกิดน้อยในปลาที่มีค่าอัตราชน้การสืบพันธุ์ต่ำ ค่าอัตราชน้การสืบพันธุ์เพิ่มมากขึ้น แสดงถึงการเจริญพันธุ์ของรังไข่มากขึ้นและปลาเจริญพันธุ์เต็มทีเมื่อค่าอัตราชน้การสืบพันธุ์เป็น 10 ในที่นี้ได้ทำการศึกษาปลาสมาลาไวเทลโลเจนนินของปลากระรังเพศเมีย ที่มีค่าอัตราชน้การสืบพันธุ์ต่าง ๆ กัน

เมื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนของแอนติบอดี ต่อไวเทลโลจีนินกับพลาสมาของปลากระริงเพศเมียที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ คือมีค่าการสืบพันธุ์เป็น 1, 2, 3, 5 และ 10 โดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบว่าพลาสมาของปลาทั้งหมดนี้เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับแอนติบอดีได้ทั้งหมด และไม่พบความแตกต่างระหว่างพลาสมาของปลาซึ่งมีค่าการสืบพันธุ์ที่ต่างกันได้ แสดงว่าวิธีการตรวจหาระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาโดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion นี้ ไม่สามารถบอกความแตกต่างของระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลา ที่มีระยะพัฒนาการของรังไข่ที่แตกต่างกันได้ เพราะอาจเป็นวิธีการที่ไม่ไว (sensitive) เพียงพอ เช่นเดียวกับการติดตามแบบแผนโปรตีนในพลาสมาของปลาเพศเมียที่มีค่าการสืบพันธุ์ต่าง ๆ กัน ในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส แบบไม่แปลงสภาพ (รูปที่ 20) ก็ไม่พบความแตกต่างระหว่างแบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลาเหล่านี้ แสดงว่าวิธีการทั้งสองวิธีนี้ยังไม่ไวพอที่จะบอกความแตกต่างของระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินดังกล่าวได้

จากการวัดระดับปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลากระริง ที่มีค่าการสืบพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธีรีดอกเกิด อิมมูโน อิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินมีค่าต่ำสุด ในปลาที่มีค่าการสืบพันธุ์เท่ากับ 1 (8.4 มก./มล. พลาสมา) และมีค่าเพิ่มขึ้นตามค่าการสืบพันธุ์ที่มากขึ้น จนมีค่าสูงสุดในปลาที่มีค่าการสืบพันธุ์เท่ากับ 5 (18.0 มก./มล. พลาสมา) และมีค่าลดลงเมื่อค่าการสืบพันธุ์ เท่ากับ 10 (15.2 มก./มล. พลาสมา) โดยทั่วไปไวเทลโลจีนินในพลาสมาจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามค่าการสืบพันธุ์หรือพัฒนาการของรังไข่ที่เพิ่มขึ้น เมื่อไข่เจริญพันธุ์เต็มที (ovum) ระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินจะลดลงก่อนการวางไข่ So, et al. (1985) ได้วัดปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินในปลาชลมอน โดยวิธี radio-immunoassay พบว่าไวเทลโลจีนินมีค่าต่ำสุด (0.12 มก./มล. พลาสมา) เมื่อปลามีค่าการสืบพันธุ์เท่ากับ 0.8 และเพิ่มขึ้นเป็น 17.50 มก./มล. พลาสมา เมื่อปลามีค่าการสืบพันธุ์ เป็น 3.8 และมีค่าสูงสุดเป็น

21.60 มก./มล. พลาสมา เมื่อปลา มีค่าดัชนีการสืบพันธุ์เป็น 6.0 ซึ่ง เป็นระยะเวลาก่อนวางไข่หนึ่งเดือน จากนั้นปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนิ นมี ต่ำลดลงช้า ๆ ก่อนการวางไข่ และลดลงอย่างรวดเร็วหลังการวางไข่ การ ศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ (Copeland, *et al.*, 1986; Whitehead, *et al.*, 1983) และในปลาแซลมอน (*Oncorhynchus keta*) (Ueda, *et al.*, 1984) ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับของปลากะรังในครั้ง นี้ ที่ พบปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนิ นของปลากะรังมีระดับเพิ่มขึ้นตามพัฒนาการของ ไข่ที่เพิ่มขึ้นจนมีค่าดัชนีการสืบพันธุ์ เป็น 5 และเมื่อดัชนีการสืบพันธุ์ เท่ากับ 10 ซึ่งเป็นระยะที่ไข่เจริญพันธุ์เต็มที่ ปริมาณไวเทลโลจีนิ นจะลดลง เป็นที่น่าเสียดายที่ในช่วงของการศึกษาวิจัยนี้ ไม่สามารถหาปลาที่มีค่าดัชนี การสืบพันธุ์ระหว่าง 5 ถึง 10 ได้ และเนื่องจากปลากะรังมีการวางไข่ปีละ ครั้ง ไม่สามารถรอเก็บข้อมูลจากการวางไข่ครั้งต่อไปได้ ทำให้ขาดข้อมูล เกี่ยวกับระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิ นในช่วงค่าดัชนีการสืบพันธุ์ดังกล่าว แต่ อย่างไรก็ตาม การวัดระดับปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนิ นโดยวิธีรีดอกที อิมมู โน อีเล็กโตรฟอริซิส ก็เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่จะบอกความแตกต่างของ ระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิ นในปลากะรัง ที่มีขั้นตอนการพัฒนาของไข่ระยะ ต่าง ๆ ได้

## 5. สรุป

จากการศึกษาไวเทลโลจีนินของปลากระรัง สามารถสรุปพอสังเขป ได้ดังนี้

1. แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอริซิส ของพลาสมาปลาเพศผู้และเพศเมียมีความแตกต่างกัน แต่ของปลาเพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์และปลาเพศเมียที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ มีลักษณะที่คล้ายกันมาก

2. การฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล ในปริมาณ 3 มก. ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง ทำให้ปลากระรังสังเคราะห์พลาสมาโปรตีนเพิ่มขึ้น 3.4 เท่า

3. การฉีดสารกัมมันตรังสี  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate และ  $^3\text{H}$ -leucine ในปริมาณ 0.35 mCi และ 0.25 mCi ตามลำดับ หลังจากฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลครั้งที่ 3 พบแถบโปรตีนที่มีสารกัมมันตรังสีทั้งสองชนิดนี้ติดฉลากอยู่ 4 แถบ ซึ่ง 3 แถบ เป็นแถบโปรตีนของไวเทลโลจีนิน อีกแถบจะหายไปในพื้นที่ตอนการทำให้บริสุทธิ์

4. ในการทำให้ไวเทลโลจีนินจากพลาสมาบริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150 แยกได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 368.5 มก. คิดเป็น 19.2 % ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น และจากค่ากัมมันตภาพรังสีของ  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  พบว่าแยกไวเทลโลจีนินได้บริสุทธิ์ขึ้น 2.5 และ 3.1 เท่า ตามลำดับ คิดเป็น 48.0 และ 58.7% ของสารเริ่มต้นตามลำดับ

5. ไวเทลโลจีนินของปลากระรังประกอบด้วยแถบโปรตีน 3 แถบในโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรพอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งได้แก่แถบที่ I, II และ III และมีน้ำหนักโมเลกุล 470,000, 335,000 และ 290,000 ตัดต้น ตามลำดับ ไวเทลโลจีนินทั้ง 3 แถบ มี  $^{32}\text{P}$  และ  $^3\text{H}$  ติดฉลากอยู่ ซึ่งมีอัตราส่วน  $^{32}\text{P} : ^3\text{H}$  สำหรับแถบ I, II และ III เป็น

2.75, 2.75 และ 2.86 ตามลำดับ

สามารถแยกไวเทลโลจีนินแถบที่ III ออกจากแถบที่ I และ II ได้โดยการทำพรีพาราทีป เจล อิเล็กโตรฟอริซิส แต่ไม่สามารถแยกแถบที่ I และ II ออกจากกันได้ ไวเทลโลจีนินแถบที่ I&II ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ มากกว่า 10 สาย ในขณะที่ แถบที่ III มีประมาณ 6 สาย

6. ไวเทลโลจีนินมีคาร์โบไฮเดรต และไขมัน เป็นองค์ประกอบ เพราะย้อมติดสีพีเอเอส และสีซูดาน แบล็ค บี และมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ ถึง 6.80 ไมโครกรัม/มก. โปรตีน

7. การฉีดไวเทลโลจีนินในปริมาณครั้งละ 0.5 หรือ 1 มก. สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้ เมื่อนำซีรัมกระต่ายไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel จะแยกได้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินออกมาในพีคแรกไม่จับกับเรซิน และได้แอนติบอดี 43.0 มก. คิดเป็น 2.5% ของซีรัมโปรตีน

8. แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนใน Ouchterlony double immunodiffusion กับพลาสมาของปลากระรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์ พลาสมาของปลาเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ และสารสกัดจากรังไข่ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาเพศผู้

9. การเปรียบเทียบปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินในปลาเพศเมียที่มีวัยเจริญพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion และวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ ไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างด้านปริมาณได้ แต่วัดหาปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินของปลาวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ ได้ โดยวิธีรีอกเก็ต อิมมูโน อิเล็กโตรฟอริซิส ซึ่งมีปริมาณต่ำสุดในปลาที่มีค่าดรชนี้การสืบพันธุ์เป็น 1 และมีค่าเพิ่มขึ้นตามดรชนี้การสืบพันธุ์ จนมีค่าสูงสุดเมื่อปลามีค่าดรชนี้การสืบพันธุ์ เป็น 5 แล้วมีค่าลดลงเมื่อปลามีค่าดรชนี้การสืบพันธุ์เท่ากับ 10

## เอกสารอ้างอิง

- ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และดุสิต ตันวิไล. 2530. ชนิดของปลากระรังที่พบใน  
น่านน้ำไทย ระหว่างปี 2524-2530 รายงานผลการประชุมทบทวน  
ผลงานวิจัยการเพาะเลี้ยงปลากระรัง ณ สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ  
ชายฝั่ง 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.
- Ansari, A.Q., Dolphin, D.J., Lazier, C.B., Munday, K.A.  
and Akhtar, M. 1971. Chemical composition of  
estrogen induced calcium binding glycoprotein  
in *Xenopus laevis*. Biochem. J. 122 : 107-113.
- Bloch, M.E. and Schneider, J.D. 1801. Systema Ichthyologiae  
Iconibus. CX Illustratum. Post obitum auctoris  
opus interpolavit. Sanderiand Commissum, Berolin.  
p. 584.
- 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. Sea-  
sonal levels of serum vitellogenin and oocyte  
growth in the channel catfish *Ictalurus puncta-  
tus*. 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. 1974. The synthesis of egg protein by steroid hormones. Prog. Biophys. Mol. Biol. 28 : 69-107.
- 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 (2) : 487-493.
- 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(1) : 17-23.
- Covens, M., Coven, 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. 88 B (1) : 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. Endocrin. 35 : 445-454.

- 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., 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.
- Emmersen, B.K. and Petersen, J.M. 1976. Natural occurrence and experimental induction by estradiol- $17\beta$  of lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 54 B : 443-446.
- Emmersen, B.K. and Petersen, J.M. 1979. Vitellogenin, lipid and carbohydrate metabolism during vitellogenesis and pregnancy and after hormonal induction in the blenny (*Zoarces bibiparis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 63 B : 245-251.
- Fisk, C.H. and Subbarow, Y. 1925. Measurement of inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* 66 : 375-400.
- Follett, B.K. and Redshaw, M.R. 1968. The effects of oestrogen and gonadotrophin on lipid and protein metabolism in *Xenopus laevis* Daudin. *J. Endocr.* 40 : 439-456.

- Follett, B.K. and Redshaw, M. R. 1974. Vitellogenesis in amphibia. In Physiology of the Amphibia (Lofts, B., ed.), Vol. 2 , pp. 219-309, Academic Press Inc., New York.
- 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.
- Fremont, L., Legar, L., Petridou, B. and Gozzelino, M. T. 1984. Effects of a (n-3) polyunsaturated fatty acid deficient diet on profiles of serum vitellogenin and lipoprotein vitellogenin trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids* 19 : 522-528.
- 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.
- Hamazaki, T. S., Iuchi, I. and Yamagami, K. 1987. Purification and identification of vitellogenin and its immunohistochemical : detection in growing oocytes of the teleost *Oryzias latipes*. *J. Exp. zool.* 242 : 333-341.

- 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.* 59(B) : 339-343.
- 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.* 65 B : 315-320.
- 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.
- Idler, D.R., Hwang, S.J. and Crim, L. W. 1979. Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmuno assay. *J. Fish Res. Board Can.* 26 : 574-578.
- Julavittayanukul, P., Puthinawaratt, C., Suteemechaikul, N. 1987. Study on grouper hatchery and nursery. Proceedings of Meeting on Reconsidering or Results of Research on Grouper Propagation at National Institute of Coastal Aquaculture, Songkhla, 23-25 February 1987, pp. 74-81.
- Korsgaard, B., Emmersen, B.K. and Petersen, I.M. 1976. Natural occurrence and experimental induction by oestradiol-17 $\beta$  of a lipophosphoprotein in flounder (*Platichthys desus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 54B : 443-446.

- Korsgaard, B. and Petersen, I. M. 1979. Vitellogenin, lipid and carbohydrate metabolism during vitellogenesis and pregnancy in the blenny (*Zoarces Viviparus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 63B : 245-251.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteria phage T. *Nature* 227 : 680-695.
- 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.
- McCollum, 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 (2) : 151-157.
- 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 (A), pp. 223-275, Academic Press Inc., New York.
- Norberg, B. and Haux, C. 1988. A homologous radioimmuno assay for rainbow trout (*Salmo trutta*) vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.* 5(2): 59-68.
- Olin, T. and Von der Decken, A. 1989. Vitellogenin synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) at different acclimation temperatures. *Aquaculture* 79 : 397-402.

- Olivereau, M. and Olivereau, J. 1979. Effect of estradiol- $17\beta$  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.
- Parker, D.B. and Mckeown, B.A. 1987. Effects of pH and for calcium-enriched freshwater on plasma levels of vitellogenin and  $Ca^{2+}$  and on bone calcium content during exogenous vitellogenesis in rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 87A (2) : 267-273.
- Petersen, I. M. and Korsgaard, B. 1989. Experimental induction of vitellogenin synthesis in eel (*Anguilla anguilla*) adapted to seawater or freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B (1) : 57 -60.
- Peterson, A.J. and Common, T.H. 1972. Estrone and estradiol concentrations in peripheral plasma laying

- hens as determined by radioimmuno assay. *Can. J. Zool.* 50 : 395-404.
- Prat, J. P., Lamy, J. N. and Weill, J. D. 1969. Coloration des<sup>3</sup> lipoproteins apres electrophorese en gel de polyacrylamide. *Bull Soc. Chim. Biol.* 51: 1367.
- 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 radioimmuno assay. *Comp. Biochem. Physiol.* 55 A : 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 (3) : 525-529.
- Rodbard, D. 1976. Method of Protein separation. (Catsim-poolas, N., ed.), Vol 2, pp. 145-179, Plenum, 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.
- Tata, J.R. and Smith, D.F. 1979. Vitellogenesis a versatile model for hormonal regulation of gene expression. *Rec. Prog. Horm. Res.* 35 : 47-95.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.R. and Bromage, N.R. 1990. An in vitro culture system for studying vitellogenin uptake into ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. 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.
- 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 Begovac, P.C. 1985. Phosvitins in fundulus oocytes and eggs. J. Biol. Chem. 260 (20) : 11268-11270.
- 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., Jared, D.W. and Nelson, B.L. 1970. Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. I. Preliminary studies. J. Exp. Zool. 175 : 259-270
- Wallace, R.A., Nickol, J.M., Ho, T. and Jared D.W. 1972. Studies on amphibian yolk. The relative roles of autogenous and hetero synthetic 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  $^{125}\text{I}$ -thyroxin. *J. Chrom.* 314 : 295-302.
- Whitehead, C., Bromage, N.R. and Breton, B. 1983. Changes in serum levels of gonadotropin, oestradiol  $17\beta$  and vitellogenin during the first and subsequent reproductive cycles of female rainbow trout. *Aquaculture* 34 : 317-325.
- 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.
- Yano, I. 1987. Effect of  $17\alpha$ -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.

## ภาคผนวก

### 1. การเตรียม 0.2 % คูมาซี บลู

ชั่งคูมาซี บลู (Coomassie brilliant blue R-250) 2 กรัม ละลายใน 95% เมทานอล 500 มล. จนสีละลายหมด จากนั้นเติมกรดน้ำส้ม (glacial acetic acid) 70 มล. และเติมน้ำกลั่น จนมีปริมาตรครบ 1,000 มล. กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 4 เก็บสารละลายไว้ในขวดทึบแสง

### 2. การเตรียมสารละลาย Periodic Acid Schiff's (PAS)

ชั่งสารฟุคซิน (fuchsin) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่เดือด 100 มล. ผสม แล้วต้มบนแผ่นความร้อน (hot plate) นาน 5 นาที ที่งให้อุณหภูมิ ลดลงเป็น 50° ซ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นเติม 20 มล. ของ 1 N กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 1.9 กรัม โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ (sodium metabisulfite) ผสมจนเข้ากันดี เก็บในที่มืดนาน 24 ชั่วโมง เติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) 2 กรัม ผสมนาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเก็บในขวดทึบแสงและที่อุณหภูมิเย็น

### 3. การเตรียมสารละลายสีย้อมโปรตีนที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ

#### 3.1 สารละลาย stock (Stock solution)

ละลาย ซูดาน แบล็ค บี (sudan black B) 1 กรัม ใน 45 % เอทานอล ปริมาณ 900 มล. ทำการรีฟลักซ์ (reflux) นาน 1 ชม. ที่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมเอทานอลจนครบ 900 มล. และเติมกลีเซอรอล 100 มล. ผสมนาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง

### 3.2 สารละลาย working (Working solution)

ผสมสารละลาย stock 60 มล. กับ 2 % KOH 40 มล. เตรียม  
ก่อนใช้ 5 นาที

### 3.3 สารละลาย rinsing (Rinsing solution)

ผสม 95% เอทานอล : น้ำส้ม : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1:3

## 4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณฟอสเฟต

### 4.1 สารละลาย Molybdic-TCA

ผสมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.  $H_2SO_4$ ) 15 มล. กับน้ำกลั่น  
25 มล. เติมแอมโมเนียม โมลิบเดต (ammonium molybdate) 2.5 กรัม  
ปรับปริมาตรเป็น 50 มล. เติม 10% กรดไตรคลอโร อะซิติก (trichloro  
acetic acid, TCA) จำนวน 50 มล.

### 4.2 สารละลาย p-Phenylenediamine

ละลาย p-phenylenediamine dihydrochloride 0.5  
กรัม กับโซเดียม ไดซัลไฟท์ (sodium disulfite) 5 กรัม ในน้ำกลั่น  
แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

### 4.3 สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต (8 มก. %)

ละลาย  $KH_2PO_4$  0.3514 กรัม ใน 10 N  $H_2SO_4$  10 มล.  
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร (Fisk and Subbarow, 1925)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายไพฑูรย์ บุญสีปัตตานนท์

วัน เดือน ปีเกิด 1 เมษายน 2503

วุฒิการศึกษา

<u>วุฒิ</u>	<u>ชื่อสถาบัน</u>	<u>ปีที่สำเร็จการศึกษา</u>
วท.บ. (ประมง)	ม.เกษตรศาสตร์	2526

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน (ถ้ามี)

นักวิชาการประมง 5

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ. สงขลา

ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา