สรุป

จากการศึกษาการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาโดย ELISA และการศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินโดยประยุกต์ใช้ VPC ในวิธี ELVBA ของงานวิทยานิพนธ์นี้สามารถสรุปได้ดังนี้

1. สามารถทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงแล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR กล่าวคือในการแยกพลาสมาของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง ไวเทลโลจีนินถูกแยกออกมาใน KBr ที่ d = 1.24 มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 427 ไมโครกรัม คิดเป็น 4.9% ของโปรตีนพลาสมาเริ่มต้น เมื่อนำไปแยกผ่านด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR สามารถแยกไวเทลโลจีนินให้บริสุทธิ์ได้ มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเป็น 138 ไมโครกรัม คิดเป็น 1.6% ของโปรตีนเริ่มต้น

2. การฉีดไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ปริมาณครั้งละ 20 ไมโครกรัม เข้าในผิวหนังและใต้ชั้นผิวหนังของกระต่ายหลาย ๆ จุด สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิดโพลีโคลนอล เมื่อตกตะกอนโปรตีนในซีรัมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50% แล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีถูกชะออกมาในพีคแรกมีปริมาณโปรตีน 8.55 มิลลิกรัม คิดเป็น 3.04% ของซีรัมทั้งหมด

3. จากการทำ Dot blot พบว่ากระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ได้หลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งที่ 2 และสามารถสังเคราะห์ได้มากขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีด

4. ภาวะที่เหมาะสมของการวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาด้วย ELISA คือใช้ 1^{o}Ab และ 2^{o}Ab ที่เจือจาง 1:3,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที และขัดขวางการจับ

เพลทของ 1^{o}Ab และ 2^{o}Ab โดยบ่มด้วย 3% BSA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5. จากการทำกราฟมาตรฐานของไวเทลโลจีนินด้วย ELISA พบว่าใช้วัดปริมาณของไวเทลโลจีนินในช่วง 0-100 นาโนกรัม (0-600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

6. การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากระบอกดำมีไข่และไม่มีไข่ พบว่าไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลามีไข่มีมากกว่าของปลาไม่มีไข่ 90 เท่า และการแตกของเม็ดเลือดแดงไม่มีผลต่อการวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาด้วย ELISA

7. ตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำจากสารสกัดเมมเบรนโอโอไซท์ที่มี n-octyl-β-D-glucopyranoside โดยวิธี Western blot หลังการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดัลตัน เมื่อบ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ แต่ไม่พบในชุดที่ไม่มีการบ่มด้วยไวเทลโลจีนิน แสดงว่าแถบโปรตีนนี้ควรเป็นตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไซท์

8. การพัฒนาใช้ ELISA และ ELVBA สำหรับวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนของโอโอไซท์ พบว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมต่อการทดสอบ เนื่องจากปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนมีน้อยมาก และมีการปนเปื้อนของโปรตีนโยล์คมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชุดที่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์และชุดควบคุมได้

9. จากการเตรียมไวเทลโลจีนินเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (VPC) และแยก VPC ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR พบว่า VPC ที่แยกได้เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 700 กิโลดัลตัน และจากค่าน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจีนิน (480 กิโลดัลตัน) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (44 กิโลดัลตัน) บ่งชี้ได้ว่า ไวเทลโลจีนิน 1 โมเลกุลยึดจับกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 5 โมเลกุล

10. การจับกันระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไซท์กับ VPC ในวิธี ELVBA ทำในบัฟเฟอร์วิเคราะห์ที่ pH 6 ที่มี 7.5 mM Ca^{2+} และ 7.5 mM Mg^{2+} และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

11. การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของเซลล์โอโอไซท์ของปลากระบอกดำและวิเคราะห์ด้วย Scatchard's plot พบว่าโอโอไซท์ขนาดเส้นผ่าศูนย์

กลาง 0.47 มิลลิเมตร มีค่าปริมาณการจับมากที่สุดของ VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนิน เป็น 4.95 พิโคกรัมต่อเซลล์โอโอไซท์ และค่า K_d เท่ากับ 0.325 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร