

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

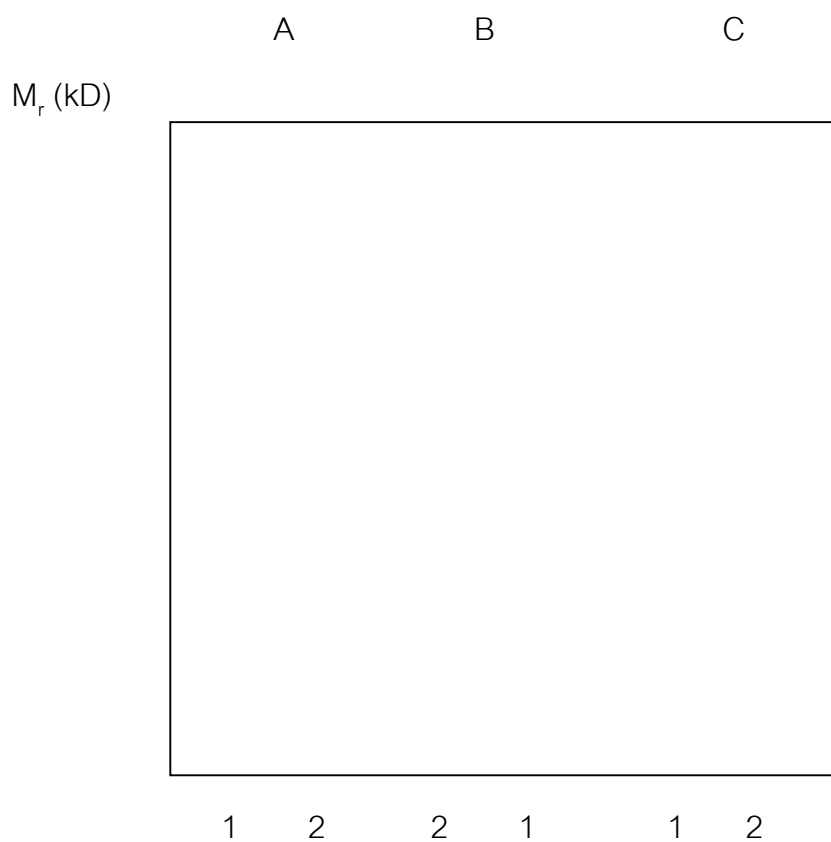
3.1 พลาสมาไวเทลโลจีนิน

จากการนำพลาสมาของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่ไปทำ nondenaturing PAGE พบแบบแผนโปรตีนที่ย้อมด้วยสีค้อมาซีบลู ดังแสดงในรูปที่ 5A และจากการทำ Western blot แล้วย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็คบี (รูปที่ 5B) พบแถบโปรตีนไม่แตกต่างกันกับแบบแผนโปรตีนใน nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีค้อมาซีบลู และเมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากระบอกดำ ปรากฏแถบโปรตีนประมาณ 2 แถบ (รูปที่ 5C) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 (P480) และ 250 (P250) กิโลดัลตัน ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ พีรพงษ์ พึ่งแย้ม (2545) ที่พบไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 (P480) และ 240 (P240) กิโลดัลตัน ในงานวิทยานิพนธ์นี้ได้กำหนดชื่อโปรตีนทั้ง 2 แถบ คือ P480 และ P250 เป็นแถบของไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากระบอกดำ

3.2 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลากระบอกดำ

3.2.1 การแยกพลาสมาโดยวิธีการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง

เมื่อนำสารละลายแต่ละหลอดที่ได้จากการแยกพลาสมาโดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง มาทำ nondenaturing PAGE พบว่าแบบแผนโปรตีนในสารละลายที่มีความหนาแน่นของ KBr แตกต่างกัน (ดังรูปที่ 6) คือ มีโปรตีน P480 และ P250 มากในสารละลายหลอดที่ 21-24 ซึ่งมีความหนาแน่นของ KBr เป็น 1.24 กรัมต่อมิลลิลิตร ($d = 1.24$) และแบบแผนโปรตีนนี้คล้ายคลึงกับแบบแผนโปรตีนของสารละลายหลอดที่ 15-17 หลังแยกพลาสมาของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงของ พีรพงษ์ พึ่งแย้ม (2545) ที่มีโปรตีน P480 และ P240 ซึ่งเป็นไวเทลโลจีนินในสารละลาย KBr ที่มีความหนาแน่นเป็น 1.23 กรัมต่อมิลลิลิตร จึงรวมสารละลายหลอดที่ 21-24 เข้าด้วยกัน และทำให้เข้มข้น พบว่ามีปริมาณโปรตีน



รูปที่ 5 แบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลากะบอกดำจากการทำ Nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (A) และ Western blot ที่ย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็คบี (B) หรือย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะบอกดำ (C)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (15 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 พลาสมาปลาเพศเมียมีไข่ (20 ไมโครกรัม)

M_r (kD)

M P 16 17 18 M 19 20 21 22 23 24 25 28 30 32 35

**รูปที่ 6 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคумаซีบลูของ
พลาสมาหลังการแยกโดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง**

M โปรตีนมาตรฐาน (15 ไมโครกรัม)

P พลาสมา (15 ไมโครกรัม)

หมายเลขแสดงเป็นหลอดที่ของสารละลาย (7-10 ไมโครกรัม) ดังนี้

16	หลอดที่ 16 (d = 1.20)	17	หลอดที่ 17 (d = 1.20)
18	หลอดที่ 18 (d = 1.20)	19	หลอดที่ 19 (d = 1.20)
20	หลอดที่ 20 (d = 1.24)	21	หลอดที่ 21 (d = 1.24)
22	หลอดที่ 22 (d = 1.24)	23	หลอดที่ 23 (d = 1.24)
24	หลอดที่ 24 (d = 1.24)	25	หลอดที่ 25 (d = 1.24)
28	หลอดที่ 28 (d = 1.29)	30	หลอดที่ 30 (d = 1.29)
32	หลอดที่ 32 (d = 1.50)	35	หลอดที่ 35 (d = 1.50)

ทั้งหมด 427 ไมโครกรัม คิดเป็น 4.9 % เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาโปรตีนของปลากระบอกดำเริ่มต้น (8.66 มิลลิกรัม) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทำให้ไวเทลโลจีนิบรีสุทธีจากพลาสมา

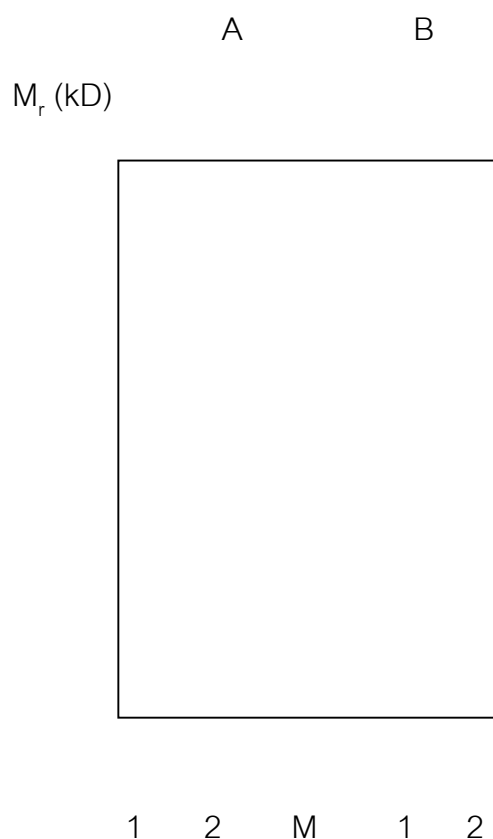
Samples	Protein	
	µg	%
Plasma	8,660	100
Ultracentrifugation (pool d = 1.24)	427	4.9
Superdex 200 eluate (peak S1)	138	1.6

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง

เมื่อนำสารละลายรวมหลอดที่ 21-24 (d = 1.24) ไปตรวจหาแถบไวเทลโลจีนิบรีสุทธีด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทธีของปลากระบอกดำ ปรากฏแถบที่เกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 7 คล้ายคลึงกับการตรวจหาแถบไวเทลโลจีนิบรีสุทธีในสารละลายหลอดที่ 16 ด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทธีของปลากระังโดย Western blot (พีรพงษ์ พึ่งแย้ม, 2545)

3.2.2 การแยกสารละลาย d = 1.24 จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงไปด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR

เมื่อนำสารละลายรวม d = 1.24 จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงไปแยกผ่านคอลัมน์ Superdex 200 HR พบว่า โปรตีนถูกชะออกมาด้วยบัฟเฟอร์ที่ถูกติดตามโดยค่า A280 (รูปที่ 8) ปรากฏออกมา 4 พีค เมื่อนำสารละลายหลังการผ่านคอลัมน์ Superdex 200 HR ไปทำ nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคумаซีบลู (รูปที่ 9) พบว่าสารละลายในหลอดที่ 34-37 ซึ่งอยู่ในพีค S1 ปรากฏโปรตีน P480 และสารละลายในหลอดที่ 38-42 ปรากฏโปรตีน P250 เท่านั้น และเมื่อรวมสารละลายพีค S1 (หลอดที่ 34-37) แล้วทำให้เข้มข้น พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด 138 ไมโครกรัม คิดเป็น 1.6% เมื่อเทียบกับพลาสมาเริ่มต้น (ตารางที่ 1) จากนั้นนำสารละลายเข้มข้นพีค S1 ที่

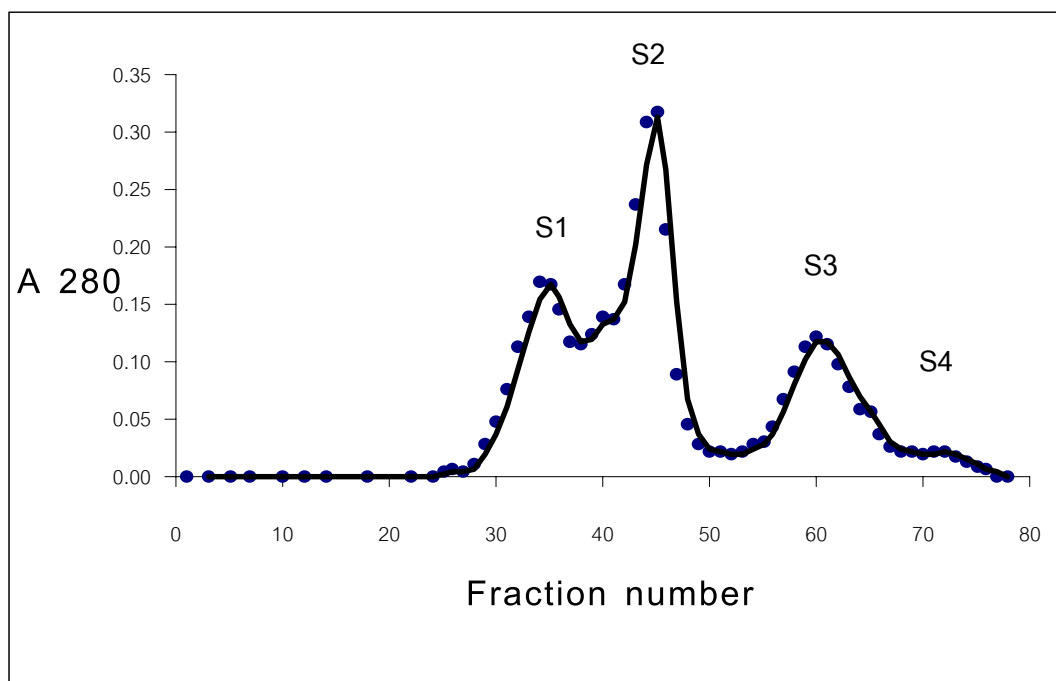


รูปที่ 7 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลาย $d = 1.24$ จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงและสารละลายพีค S1 ที่ได้จากคอลัมน์ Superdex 200 HR ซึ่งย่อยด้วยสี่คามาซีปลู (A) และทำ Western blot (B) ซึ่งย่อยด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

M เป็นโปรตีนมาตรฐาน (15 ไมโครกรัม)

แถวที่ 1 สารละลายพีค S1 จากคอลัมน์ Superdex 200 HR
(12 ไมโครกรัม)

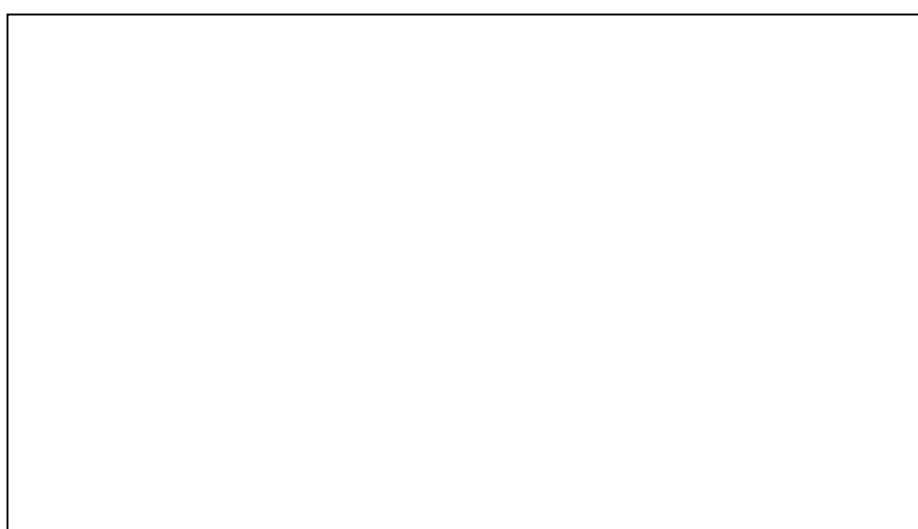
แถวที่ 2 สารละลายรวม $d = 1.24$ จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง
(15 ไมโครกรัม)



รูปที่ 8 การแยกไวเทลโลจีนินจากสารละลายรวม $d = 1.24$ ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR

นำสารละลายรวม $d = 1.24$ ที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง ซึ่งทำให้เข้มข้นเหลือปริมาตรเป็น 200 ไมโครลิตร (272 ไมโครกรัม) ไปผ่านคอลัมน์ Superdex 200 HR แล้วล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF อัตราไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 300 ไมโครลิตร

M_r (kD)



30 31 32 34 36 M 38 40 42 44 46 48

รูปที่ 9 แบบแผนโปรตีนของสารละลายซึ่งได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR ใน Nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู

โดยที่ M เป็นโปรตีนมาตรฐาน (10 ไมโครกรัม)

หมายเลขแสดงหลอดที่ของสารละลาย (4-8 ไมโครกรัม) ดังนี้

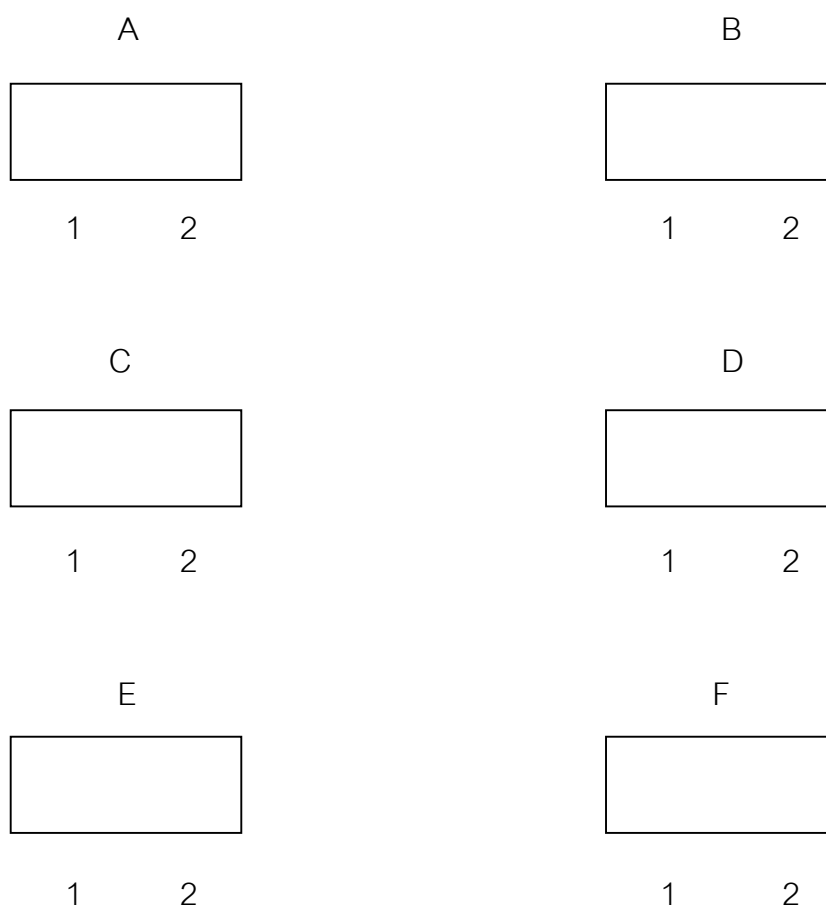
30	หลอดที่ 30	31	หลอดที่ 31
32	หลอดที่ 32	34	หลอดที่ 34
36	หลอดที่ 36	38	หลอดที่ 38
40	หลอดที่ 40	42	หลอดที่ 42
44	หลอดที่ 44	46	หลอดที่ 46
48	หลอดที่ 48		

ทำ nondenaturing PAGE และย้อมด้วยสีค้อมาซีบลู และไปทำ Western blot โดยย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากระบอกดำ (รูปที่ 7) พบว่า โปรตีน P480 ซึ่งแยกจากคอลัมน์ Superdex 200 HR เป็นไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์

3.3 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ของปลากระบอกดำ

3.3.1 การสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่าย

จากการเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิแบบโพลีโคลนอล โดยการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ของปลากระบอกดำ พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิได้หลังการฉีดครั้งที่ 2 และสังเคราะห์มากขึ้นหลังการฉีดครั้งที่ 3 ไม่พบแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิในซีรัมกระต่ายก่อนการฉีดแอนติเจน ดังแสดงผลในรูปที่ 10 (A-D) การเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ที่มีการฉีดเข้าในผิวหนังร่วมกับการฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลาย ๆ จุด รวมครั้งละ 20 ไมโครกรัม พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีได้ภายใน 2 สัปดาห์ ไม่แตกต่างกับการฉีดกระต่ายด้วยไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ของปลากะรัง ครั้งละ 1,000 ไมโครกรัม เข้าใต้ผิวหนังเพียงอย่างเดียว (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) และจากการทดลองของ Yao และ Crim (1996) พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีได้ในระยะเวลา 5 เดือน หลังการฉีดไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ของปลาโอเซียนเพาท์ (*M. americanus* L.) ปริมาณครั้งละ 1 มิลลิกรัมเข้าใต้ผิวหนังเพียงอย่างเดียว หรือการฉีดในผิวหนังเพียงอย่างเดียวด้วยไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จากปลาอิงลิชโซล (English sole, *Pleuronectes vetulus*) ครั้งละ 100 ไมโครกรัม (Roubal et al., 1997) ทำให้กระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีได้ภายใน 2 สัปดาห์ ทำนองเดียวกับ Takemura และ Kim (2001) ที่กระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีได้ในระยะเวลา 4-5 สัปดาห์ หลังการฉีดไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ของปลาหมอเทศปริมาณ 400 ไมโครกรัม หรือการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) ด้วยเอนไซม์ citrate synthase จากหัวใจหมู ครั้งละ 200 ไมโครกรัม ทำให้กระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีได้ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (Brennand et al., 1986) แสดงว่าการฉีดเข้าในผิวหนังร่วมกับการฉีดใต้ผิวหนังด้วย



รูปที่ 10 การทำ Dot blot ของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ในซีรัม
กระต่าย

- 1 BSA (15 ไมโครกรัม)
 - 2 ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (1 ไมโครกรัม)
 - A ปุ่มกับซีรัมก่อนฉีดไวเทลโลจีนิน
 - B ปุ่มกับซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนินครั้งที่ 1
 - C ปุ่มกับซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนินครั้งที่ 2
 - D ปุ่มกับซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนินครั้งที่ 3
 - E ปุ่มกับซีรัมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต
 - F ปุ่มกับแอนติบอดีหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel
- ใช้ซีรัมอย่างละ 5 ไมโครลิตร (โปรตีน 8-15 ไมโครกรัม)

แอนติเจนครั้งละปริมาณไม่มากก็สามารถกระตุ้นกระต่ายให้สังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้ อาจเป็นเพราะไวเทลโลจีนินที่ถูกฉีดเข้าในผิวหนังถูกทำลายได้ช้ากว่าการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยวิธีอื่น เช่น ฉีดเข้าใต้ผิวหนังหรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งพบว่าต้องใช้แอนติเจนปริมาณมากหรืออาจเป็นเพราะไวเทลโลจีนินเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่จึงมีสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีต่อการสังเคราะห์แอนติบอดี

3.3.2 การแยกแอนติบอดีจากซีรัม

เมื่อแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจากซีรัมกระต่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร (281 มิลลิกรัมโปรตีน) โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50% แยกได้โปรตีน 97.44 มิลลิกรัม คิดเป็น 34.68% ของซีรัมโปรตีนเริ่มต้น เมื่อแยกแอนติบอดีด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีถูกชะออกมาในพีคแรก (Wallace, 1965) และมีปริมาณโปรตีน 8.55 มิลลิกรัม คิดเป็น 3.04% ของซีรัมโปรตีนทั้งหมด แอนติบอดีที่ผ่านการแยกทั้งสองขั้นตอนนี้สามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ได้ดีเช่นเดียวกับของซีรัมกระต่ายก่อนผ่านคอลัมน์ ดังแสดงผลในรูปที่ 10 (E-F)

3.4 การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาโดยเทคนิค ELISA

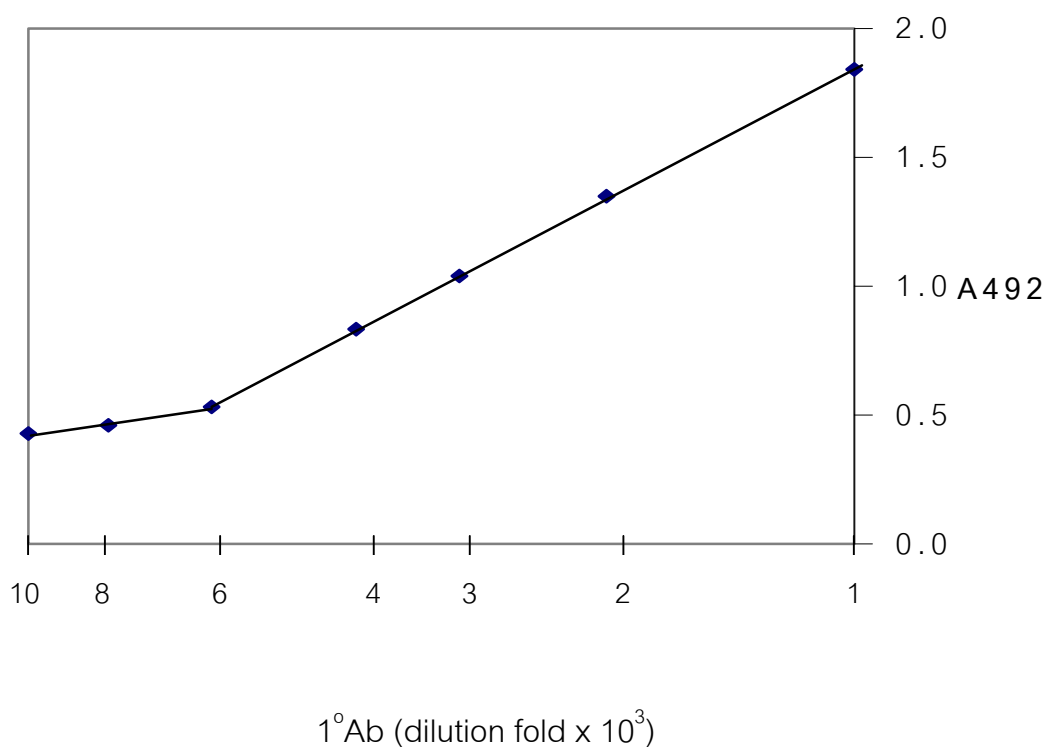
3.4.1 การหาภาวะที่เหมาะสมของการวัดปริมาณไวเทลโลจีนิน

ในการหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค ELISA ซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ คือ การเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากระบอกดำ (1°Ab) โดยใช้ไวเทลโลจีนินปริมาณ 500 นาโนกรัม เคลือบในเพลทแล้วบ่มกับ 1°Ab ที่มีการเจือจางค่าต่าง ๆ แล้ววัดความเข้มของสีของผลผลิต (A492) ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ดังแสดงในรูปที่ 11 พบว่า ค่า A492 เพิ่มขึ้นแปรผันเป็นเส้นตรงตามความเข้มข้นของ 1°Ab (4.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ใช้ระหว่างการเจือจาง 1:4,000 ถึง 1:1,000 เท่า ซึ่งค่าการเจือจาง 1°Ab ที่เหมาะสม คือ 1:3,000 เนื่องจากให้ค่า A492 ไม่สูงหรือต่ำเกินไป ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ไวเทลโลจีนินปริมาณ 500 นาโนกรัม และ 1°Ab ที่เจือจาง 1:3,000 เท่า แล้วหาค่าการเจือจาง 2°Ab ที่เหมาะสม ให้ผลในทำนอง

เดียวกันกับ 1°Ab โดยพบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นค่อนข้างเป็นเส้นตรงตามความเข้มข้นของ 2°Ab (4.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ใช้ระหว่างการเจือจาง 1:50,000 ถึง 1:10,000 เท่า โดยค่าการเจือจาง 2°Ab ที่เหมาะสม คือ 1:25,000 ดังแสดงในรูปที่ 12 ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:3,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งต่อไป

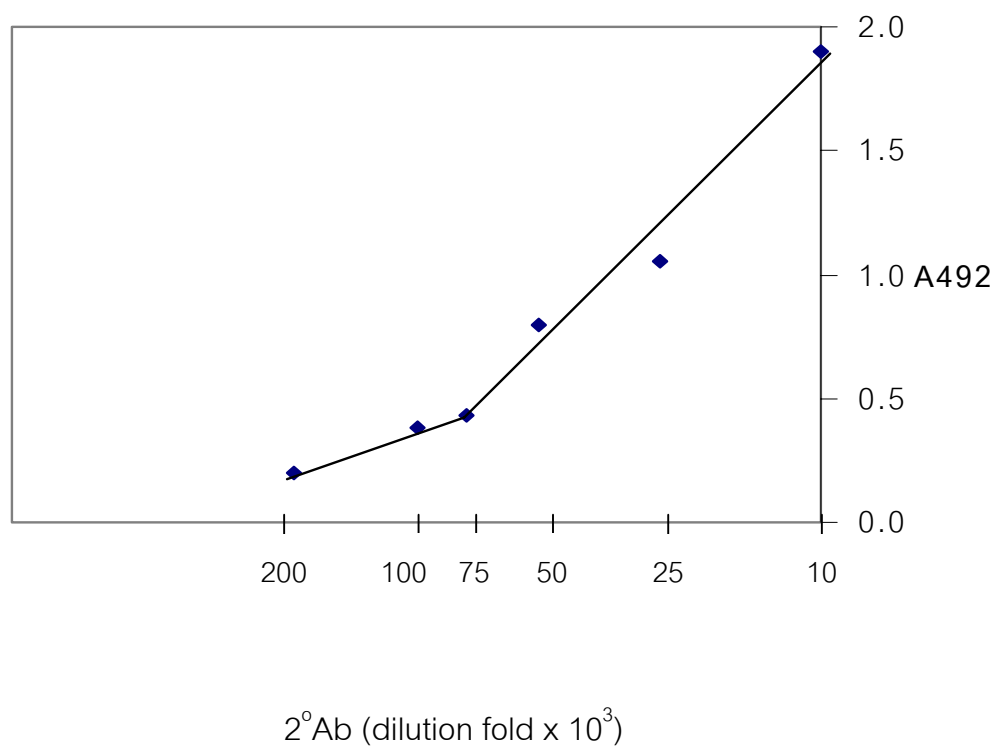
นอกเหนือจากการใช้แอนติบอดีที่เหมาะสมแล้ว ได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งยึดติดอยู่กับ 2°Ab พบว่าค่า A492 ที่วัดการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรท OPD และ H_2O_2 และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากการทดลองหาความเข้มข้นของ OPD ที่เหมาะสม พบว่า A492 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามความเข้มข้นของ OPD ที่ใช้ในครั้งแรก และมีค่าเริ่มคงที่เมื่อใช้ OPD เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 13A) ซึ่งความเข้มข้นของ OPD ที่เหมาะสม คือ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากให้ค่า A492 ไม่สูงหรือต่ำเกินไป ส่วน H_2O_2 นั้น ให้ผลทำนองเดียวกัน คือ ค่า A492 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ใช้ในครั้งแรก และมีค่าเริ่มคงที่เมื่อใช้ H_2O_2 เข้มข้น 0.006% แต่ H_2O_2 เข้มข้นมากกว่า 0.01% ทำให้ค่า A492 เริ่มลดลงเล็กน้อย ดังนั้นความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ให้ค่า A492 มากที่สุดและเหมาะสมคือ 0.01% (รูปที่ 13B) และเวลาการเกิดปฏิกิริยานั้นพบว่า A492 เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา และเริ่มคงที่เมื่อใช้เวลา 20 นาที (รูปที่ 13C) จึงเลือกใช้ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที

ดังนั้นในการทดสอบหาปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาโดย ELISA ใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:3,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที



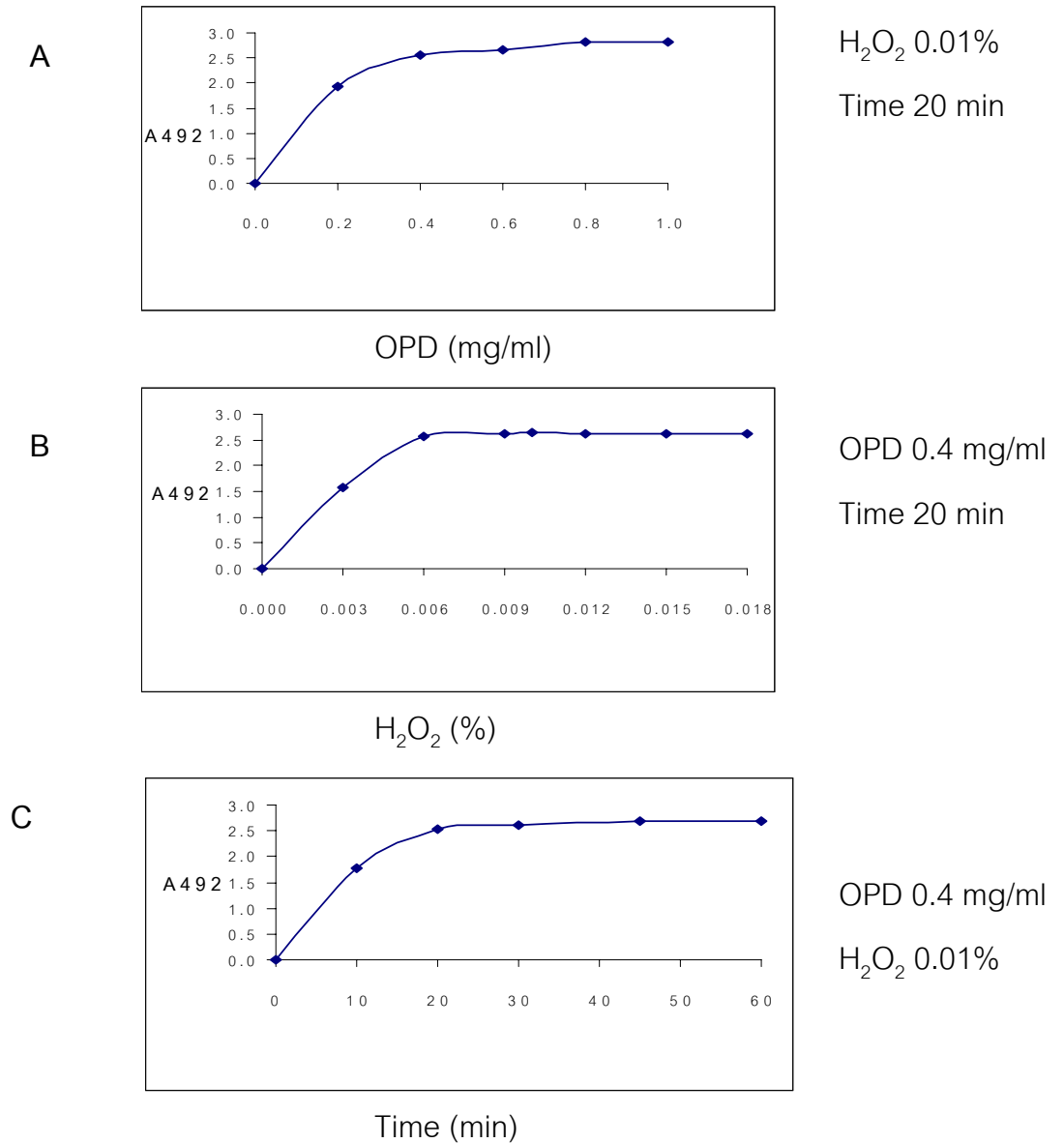
รูปที่ 11 การเจือจางที่เหมาะสมของ 1°Ab ใน ELISA

ในการทดสอบผลของการเจือจางของ 1°Ab ตั้งแต่ 1:10,000 ถึง 1:1,000 เท่า โดยใช้ไวเทลโลจีนิน 500 นาโนกรัม, 2°Ab เจือจางที่ 1:25,000, ความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H₂O₂ เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที



รูปที่ 12 การเจือจางที่เหมาะสมของ 2°Ab ใน ELISA

ในการทดสอบผลของการเจือจาง 2°Ab ตั้งแต่ 1:200,000 ถึง 1:10,000 เท่า โดยใช้ไวเทลโลจีนิน 500 นาโนกรัม, 1°Ab เจือจางที่ 1:3,000, OPD เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H₂O₂ เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที



รูปที่ 13 ภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีออกซิเดสใน ELISA

ในการทดสอบใช้ 1^oAb และ 2^oAb ที่เจือจาง 1:3,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ

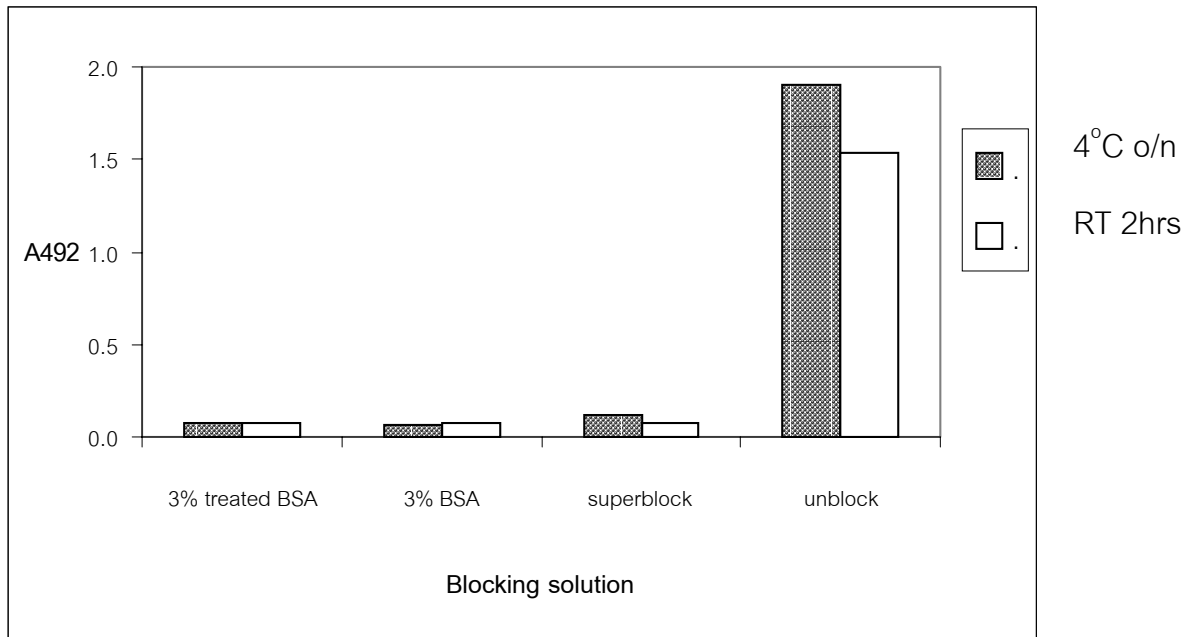
- A ผลของการใช้ OPD ที่ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- B ผลของการใช้ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 0-0.018 %
- C ผลของการเกิดปฏิกิริยาที่เวลา 0-60 นาที

3.4.2 การขัดขวางการจับเพลท

เนื่องจากในขั้นตอนการทำ ELISA มี 1°Ab และ 2°Ab ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับเพลทได้ จึงขัดขวางการจับของ 1°Ab และ 2°Ab กับเพลท โดยใช้ 3% BSA, 3% treated BSA (ดูภาคผนวกประกอบ) หรือ superbloc (Pierce) เปรียบเทียบกันโดยบ่มเพลทด้วยสารละลายแต่ละชนิดเหล่านี้หลุมละ 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทียบกับที่อุณหภูมิ 4°C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ล้าง 3 ครั้ง แล้วบ่มเพลทด้วย 1°Ab และ 2°Ab ตามขั้นตอนการทำ ELISA พบว่า การบ่มเพลทในภาวะที่มี 3% BSA, 3% treated BSA หรือ superbloc ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถขัดขวางการจับของ 1°Ab และ 2°Ab กับเพลทได้ไม่แตกต่างกัน คือสามารถขัดขวางได้ 95.2%, 95.4% และ 95.3% ตามลำดับ ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 16 ชั่วโมง สามารถขัดขวางได้ไม่แตกต่างกับการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง คือสามารถขัดขวางได้ 95.8%, 96.0% และ 93.8% ตามลำดับ (รูปที่ 14) ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือก 3% BSA เป็นตัวขัดขวาง และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเป็นการประหยัดเวลา

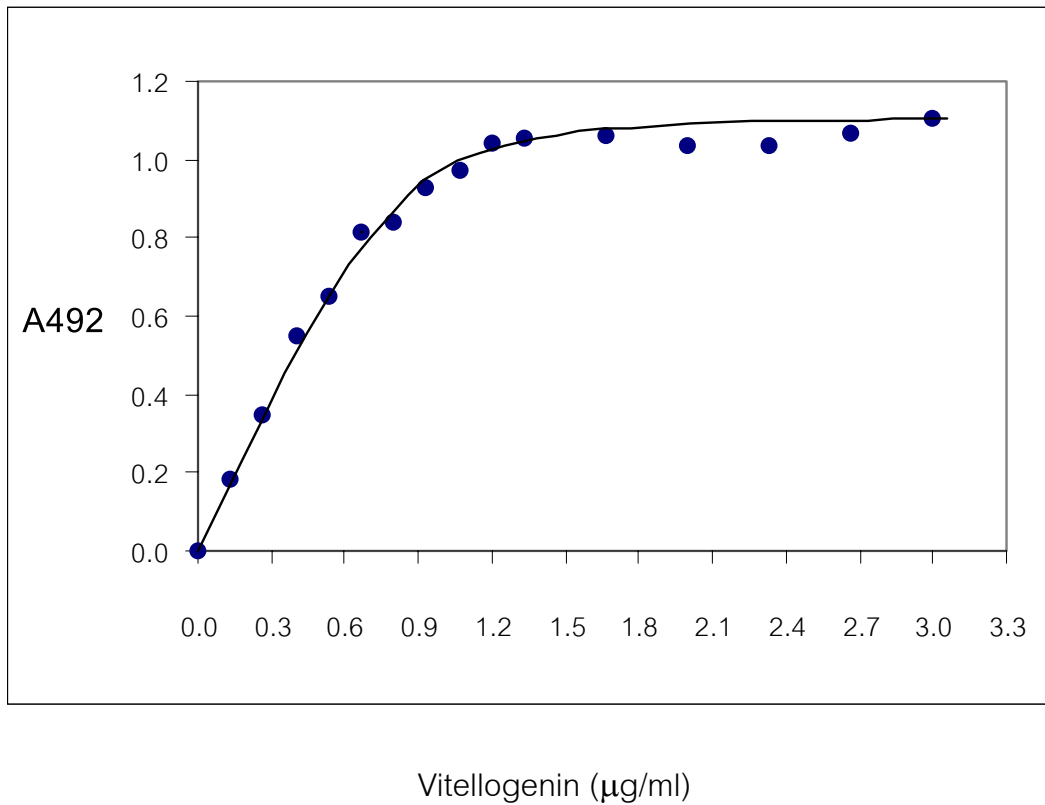
3.4.3 การทำกราฟมาตรฐานของไวเทลโลจีนิบรีสุทธี

การทำกราฟมาตรฐานของไวเทลโลจีนิบรีสุทธี เพื่อใช้ในการวัดปริมาณของไวเทลโลจีนิบรีสุทธีในพลาสมา พบว่า ค่า A492 เพิ่มขึ้นแปรผันเป็นเส้นตรงตามปริมาณของไวเทลโลจีนิบรีสุทธีที่เพิ่มขึ้นในช่วง 0–100 นาโนกรัม (0–600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และเพิ่มขึ้นมากที่สุดและคงที่เมื่อปริมาณของไวเทลโลจีนิบรีสุทธีมากกว่า 200 นาโนกรัม ปริมาณของไวเทลโลจีนิบรีสุทธีที่มากกว่านี้จะทำให้มีไวเทลโลจีนิบรีสุทธีเหลือโดยไม่จับกับเพลท (รูปที่ 15) ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกใช้ปริมาณของไวเทลโลจีนิบรีสุทธีในช่วงไม่เกิน 600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นไวเทลโลจีนิบรีสุทธีมาตรฐานของการทำ ELISA ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ Bon และคณะ (1997) โดยกราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณไวเทลโลจีนิบรีสุทธีของปลาเรนโบว์เทราท์ด้วย competitive ELISA อยู่ในช่วง 20–320 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (การจับ 20–80%) และมีการจับที่ 50% เป็น 78 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ Lomax และคณะ (1998) ทำกราฟมาตรฐานของไวเทลโลจีนิบรีสุทธีของปลา



รูปที่ 14 ผลของการขัดขวาง 1°Ab และ 2°Ab ในการจับเพลทด้วย 3% BSA, 3% treated BSA หรือ superbloc (Pierce)

ในการทดสอบใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:3,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ และความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H₂O₂ เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของไวเทลโลเจินบริสุทธิ์ใน ELISA

ในการทดสอบใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:3,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ และความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H₂O₂ เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที

อิงลิชโซลด้วย competitive ELISA ซึ่งใช้ตรวจวัดปริมาณไวเทลโลจีนิในในช่วง 10–450 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (การจับ 20-85%) และมีการจับที่ 50% เป็น 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในทำนองเดียวกับ Fenske และคณะ (2001) วัดปริมาณไวเทลโลจีนิของปลาฆ่าตายในช่วง 3-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (การจับ 30-85%) ด้วย competitive ELISA แสดงให้เห็นว่าการวัดปริมาณไวเทลโลจีนิด้วย ELISA เป็นวิธีที่มีความไวสูง

3.4.4 การวัดปริมาณไวเทลโลจีนิในพลาสมาโดย ELISA

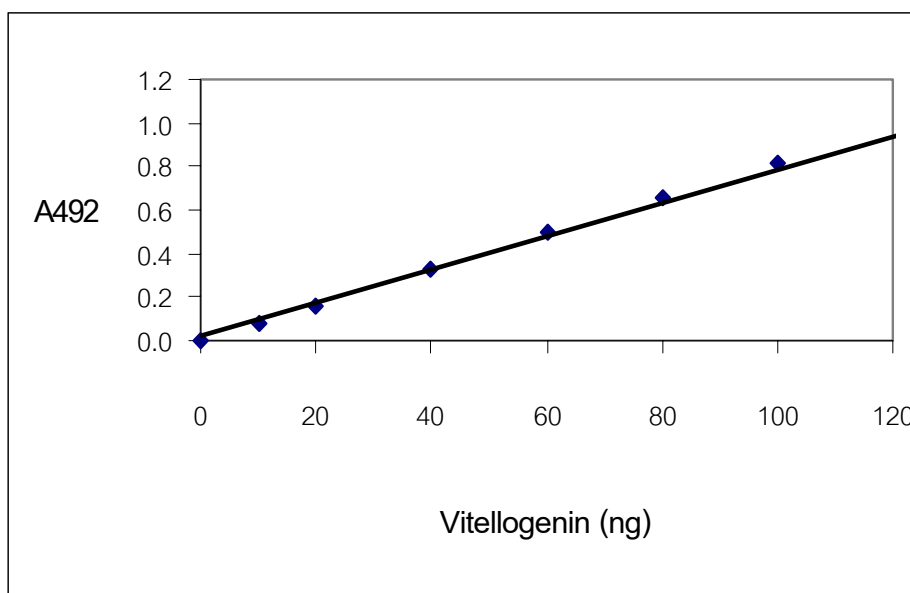
เมื่อทำการวัดปริมาณไวเทลโลจีนิในพลาสมา โดยเจาะพลาสมาปลา กระบอกดำที่ทราบความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1:10, 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 เท่า แล้วนำสารละลายพลาสมาเจาะดังกล่าว ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ โดย ELISA ควบคู่กับการทำกราฟมาตรฐานของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ (รูปที่ 16) จากการทดลองพบว่า ในพลาสมาของปลากระบอกดำไม่มีไข่ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด เป็น 5.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายพลาสมาที่เจาะจาง 1:10 เท่า มีค่า A492 เป็น 0.447 สามารถคำนวณเป็นความเข้มข้นของไวเทลโลจีนิในพลาสมาเท่ากับ 3.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 0.07 % ของโปรตีนในพลาสมา และในพลาสมาของปลากระบอกดำมีไข่ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดเป็น 7.696 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายพลาสมาที่เจาะจาง 1:1,000 เท่า มีค่า A492 เป็น 0.647 สามารถคำนวณเป็นความเข้มข้นของไวเทลโลจีนิในพลาสมาเท่ากับ 490.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 6.37 % ของโปรตีนในพลาสมา ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การวัดปริมาณไวเทลโลจีนิในพลาสมาโดย ELISA

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น ของโปรตีน (mg/ml)	A492 ของการเจาะจาง				ความเข้มข้นของ ไวเทลโลจีนิ (µg/ml)
		1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	
ปลาไม่มีไข่	5.005	0.447	0.075	0.006	0.001	3.38
ปลาที่มีไข่	7.696	1.301	1.064	0.647	0.052	490.17
ปลาที่มีไข่ (H)	11.024	1.356	1.098	0.986	0.092	696.99

H = Hemolysed blood

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานของไวเทลโลเจินบริสุทธิ์ในการวัดปริมาณไวเทลโลเจินในพลาสมาโดย ELISA

ในการทดสอบใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:3,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ และความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H₂O₂ เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที

จะเห็นได้ว่าปลากระบอกดำมีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจินเพิ่มขึ้นประมาณ 90 เท่าเมื่อปลามีการสะสมโปรตีนโพลีคีนไนไซ ซึ่งเป็นทำนองเดียวกับปลาฆ่าลาย (*D. rerio*) มีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจินเพิ่มขึ้น 200 เท่า (Holbech *et al.*, 2001) และสอดคล้องกับการทดลองของ Bon และคณะ (1997) ซึ่งวัดปริมาณไวเทลโลเจินของปลาเรนโบว์เทราท์ในระยะต่าง ๆ พบว่าไม่สามารถตรวจพบไวเทลโลเจินในพลาสมาปลาเพศผู้ ส่วนปลาเพศเมียวัยไม่เจริญพันธุ์มีไวเทลโลเจินในพลาสมาเป็น 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปลาเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ในขั้นก่อนสะสมโปรตีนโพลีคีน (previtellogenic stage) และปลาเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ในขั้นสะสมโปรตีนโพลีคีน (vitellogenic stage) มีไวเทลโลเจินสูงกว่าปลาเพศเมียวัยไม่เจริญพันธุ์เป็น 25 และ 1,000 เท่า ตามลำดับ ขณะที่ Lomax และคณะ (1998) ซึ่งใช้ตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจินของปลาอิงลิชโซลในระยะต่าง ๆ ด้วย competitive ELISA พบว่าปลาอิงลิชโซลเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ในขั้นก่อนสะสมโปรตีนโพลีคีนมีไวเทลโลเจินในพลาสมาเป็น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่พลาสมาของปลาเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ในขั้นสะสมโปรตีนโพลีคีนมีไวเทลโลเจินเพิ่มขึ้นเป็น 17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลดลงเมื่อปลาอยู่ในระยะวางไข่หรือระยะพักซึ่งมีไวเทลโลเจิน 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำพลาสมาของปลากระบอกดำมีไข่ที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง และมีความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดเป็น 11.024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายพลาสมาที่เจือจาง 1:10,000 เท่า มีค่า A492 เป็น 0.092 สามารถคำนวณเป็นความเข้มข้นของไวเทลโลเจินในพลาสมาเท่ากับ 696.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 6.32 % ของโปรตีนในพลาสมา จะเห็นได้ว่าพลาสมาที่ใช้ในการทดสอบแม้จะมีหรือไม่มี การแตกของเม็ดเลือดแดงก็ไม่มีผลต่อการตรวจวัดไวเทลโลเจินในพลาสมาโดย ELISA บ่งชี้ถึงความจำเพาะของเทคนิคนี้

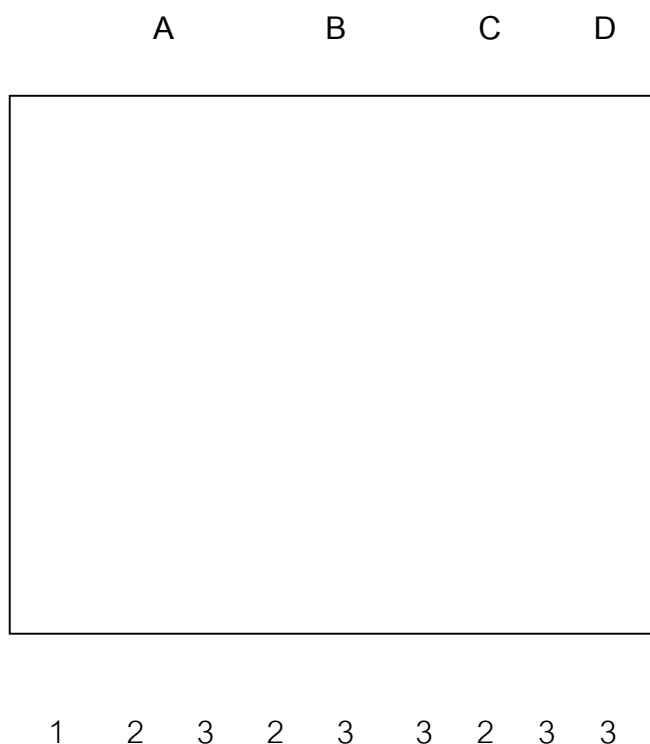
3.5 การศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนของโอโอไฮท์

3.5.1 การตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินโดย Western Blot

เมื่อนำสารสกัดเมมเบรนและสารสกัดรังไข่ของปลากระบอกดำไปทำ SDS-PAGE สภาพไมรีดีวส์ และทำ Western blot ดังแสดงในรูปที่ 17 ปรากฏแบบแผนโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ย้อมด้วย Ponceau S (รูปที่ 17B) คล้ายกับแถบโปรตีนในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (รูปที่ 17A) แสดงว่าโปรตีนในแผ่นเจลส่วนใหญ่ถูกขนถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมื่อนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปย้อมเปรียบเทียบระหว่างการบ่มและไม่บ่มกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ พบว่าสารสกัดเมมเบรนชุดที่ไม่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ปรากฏโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 95 กิโลดัลตัน (P95) และ 85 กิโลดัลตัน (P85) ที่ย้อมติดสีของแอนติบอดี (รูปที่ 17C แถวที่ 3) ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 แถบนี้อาจเป็นโปรตีนโยลค์ที่ปนเปื้อนเนื่องจากพบแถบดังกล่าวในสารสกัดรังไข่ของปลากระบอกดำด้วย (รูปที่ 17C แถวที่ 2) ส่วนสารสกัดเมมเบรนชุดที่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ปรากฏโปรตีน 3 แถบ คือ P95, P85 และแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดัลตัน (P55) ที่ย้อมติดสีของแอนติบอดี (รูปที่ 17D) แสดงว่าแถบโปรตีน P55 ควรเป็นตัวรับไวเทลโลจีนินที่พบในเมมเบรนของโอโอไฮท์ เหมือนกับการทดลองของ ฟีรพงษ์ พึ่งแย้ม (2545) พบว่าตัวรับไวเทลโลจีนินในเมมเบรนของโอโอไฮท์ปลากระบอกดำ มีขนาด 55 กิโลดัลตัน ต่างจากตัวรับไวเทลโลจีนินของคางคก (*X. laevis*) ที่มีขนาด 115 กิโลดัลตัน (Stifani *et al.*, 1990b) หรือปลา coho salmon (*O. kisuth*) มีขนาด 100 กิโลดัลตัน (Stifani *et al.*, 1990a) ปลาเรนโบว์เทราท์ (*O. mykiss*) มีขนาด 100 กิโลดัลตัน (Lancaster and Tyler, 1994) และปลา white perch (*M. americana*) มีขนาด 157 กิโลดัลตัน (Tao *et al.*, 1996)

3.5.2 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินโดย ELISA

ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนของโอโอไฮท์ โดย ELISA ใช้ภาวะที่เหมาะสมเหมือนกับการวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมา คือ สารละลาย 1°Ab และ 2°Ab เจือจางที่ 1:3,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ และความ



รูปที่ 17 การทำ Western blot ของสารสกัดเมมเบรนและสารสกัดรังไข่ เปรียบเทียบระหว่างการย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (A) และสี Ponceau S (B) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรี (C) และการบ่มด้วยไวเทลโลจีนิบรีสุทรีแล้วย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรี (D)

- แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (12 ไมโครกรัม)
- แถวที่ 2 สารสกัดรังไข่ (4 ไมโครกรัม)
- แถวที่ 3 สารสกัดเมมเบรนจากโอโอไซต์ (30 ไมโครกรัม)

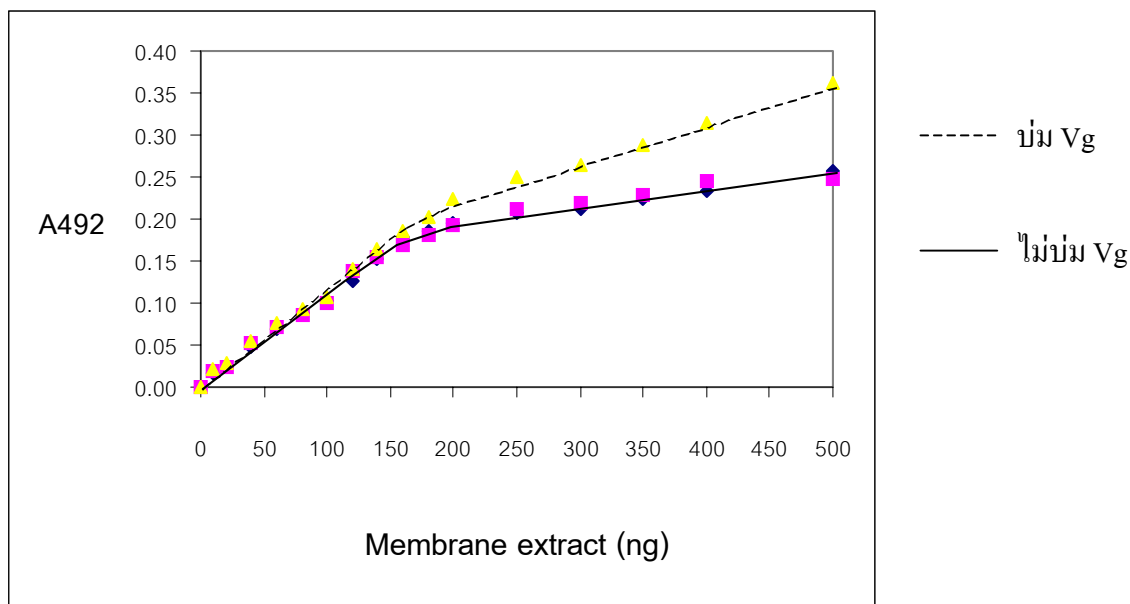
เข้มข้นของ OPD เท่ากับ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของ H_2O_2 เท่ากับ 0.01 % และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 20 นาที

การหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเมมเบรนที่เหมาะสมในการหาปริมาณของตัวรับไวเทลโลจีนิน พบว่า ค่า A492 เพิ่มขึ้นแปรผันตรงตามปริมาณโปรตีนของสารสกัดเมมเบรนในช่วง 0-150 นาโนกรัม และเพิ่มขึ้นอย่างช้าเมื่อปริมาณของสารสกัดเมมเบรนมากกว่า 160 นาโนกรัม ซึ่งปริมาณสารสกัดเมมเบรนที่มากกว่านี้จะทำให้มีโปรตีนเหลือโดยไม่จับกับเพลท (รูปที่ 18) แต่ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนของโอโอไฮท์นั้นทำการทดลอง 2 ชุดควบคู่กัน คือชุดที่บ่มและไม่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ พบว่าค่า A492 ในชุดที่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์มีค่าไม่แตกต่างกับค่า A492 ของชุดที่ไม่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ในข้างต้นที่เป็นเส้นตรง อาจเนื่องจากสารสกัดเมมเบรนมีปริมาณของตัวรับไวเทลโลจีนินน้อยมาก และมีการปนเปื้อนของโอล์โคโปรตีนในปริมาณมากซึ่งจับกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้ด้วย จึงเป็นเทคนิคที่ไม่เหมาะกับการวัดปริมาณของตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนของโอโอไฮท์ และด้วยเหตุนี้การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในเมมเบรนของโอโอไฮท์ ในรายงานที่ผ่านมาจึงไม่ใช้วิธี ELISA แต่นิยมใช้วิธี RIA

3.6 การเตรียมไวเทลโลจีนินเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (VPC)

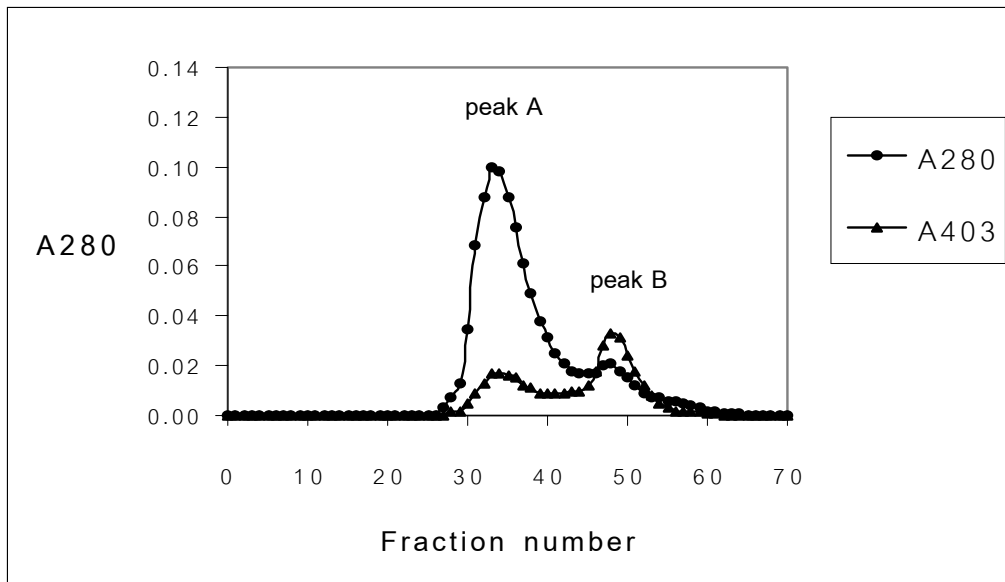
3.6.1 การแยก VPC ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR

จากการนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยึดติดกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ตามวิธีการข้อ 2.8 ได้เป็น VPC แล้วแยก VPC ออกจากไวเทลโลจีนินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอิสระด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR เมื่อชะคอลัมน์ด้วย TB-PMSF พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค (รูปที่ 19) คือ พีค A (หลอดที่ 30-40) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนใหญ่ถูกชะออกมา และพีค B (หลอดที่ 45-52) เมื่อติดตามเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย A403 ปรากฏพีคตรงกับสารละลายพีค A และพีค B และเมื่อวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบสารละลายทั้งสองพีคมีแอกทิวิตีของเอนไซม์ (รูปที่ 20) จากค่าปริมาตรชะบ่งชี้ว่าสารละลายพีค A เป็น VPC ส่วนสารละลายพีค B เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอิสระ



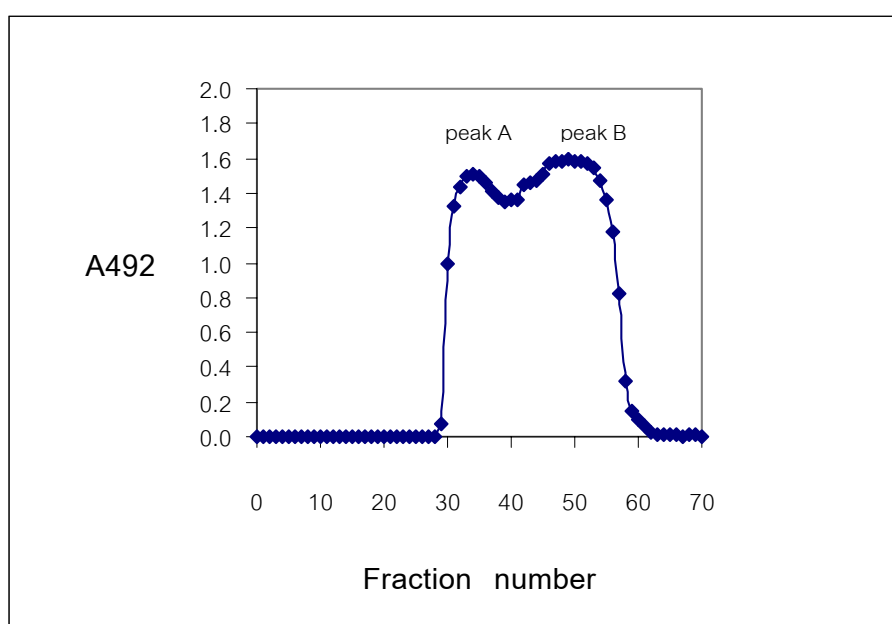
รูปที่ 18 การหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเมมเบรนที่เหมาะสมในการหาปริมาณของตัวรับไวเทลโลจีนิน

หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเมมเบรนที่เหมาะสมด้วย ELISA แบบ บ่มและไม่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 500 นาโนกรัม โดยใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:3,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ และความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 20 นาที



รูปที่ 19 การแยก VPC ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR

นำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยึดติดกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ตามวิธีการข้อ 2.8 แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Superdex 200 HR ซะด้วย TB-PMSF ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปวัดหาค่า A280 และ A403



รูปที่ 20 การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังแยก VPC ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR

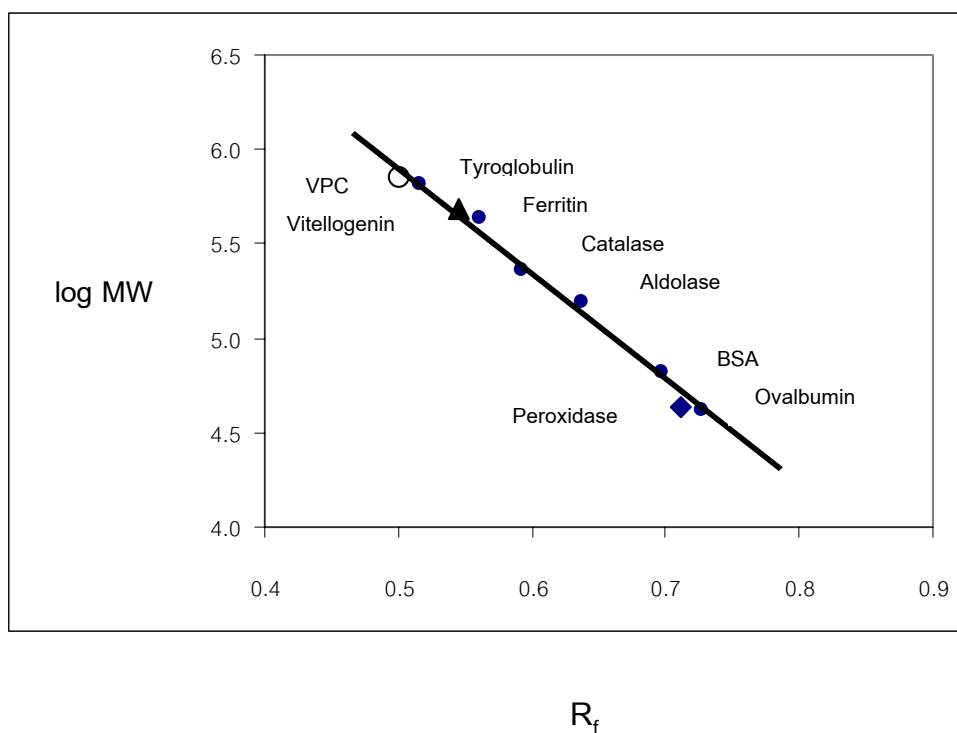
นำสารละลายแต่ละหลอดที่ผ่านคอลัมน์ Superdex 200 HR ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทหลุมละ 2 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย OPD ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H₂O₂ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จึงหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่า A492

และไม่ปรากฏฟีดของไวเทลโลจินิกอิสระ ทำให้ไวเทลโลจินิกที่เติมลงไปในปฏิริยาถูกใช้จนหมด จึงรวมสารละลายฟีด A เพื่อใช้ศึกษาต่อไป ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Laverdure และ Soyez (1988) โดยนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยัดติดกับไวเทลลินของกิ้งมังก (H. americanus) แล้วแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G200 เมื่อชะออกด้วยบัฟเฟอร์ พบว่าโปรตีนถูกชะออกมา 3 ฟีด เมื่อทดสอบหาแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ปรากฏว่ามีแอกทิวิตีในโปรตีนฟีดแรก (หลอดที่ 16-18) ซึ่งมีปริมาตรชะใกล้เคียงกับปริมาตรภายนอกเม็ดเจลนั้นเป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยัดติดกับไวเทลลิน และโปรตีนฟีดสุดท้ายซึ่งเป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ไม่ถูกยัดติดกับไวเทลลิน ส่วนฟีดที่ 2 นั้นเป็นไวเทลลินอิสระซึ่งเป็นฟีดที่ไม่มีแอกทิวิตี

จากการทดลองความเป็นแอนติเจนโดยวิธี Dot blot พบว่า VPC มีสมบัติเป็นแอนติเจนเหมือนกับไวเทลโลจินิก โดยสามารถเกิดปฏิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจินิกบริสุทธิ์ได้ (ไม่แสดงผล)

3.6.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ VPC โดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของ VPC ที่เตรียมได้ (ฟีด A) จากข้อ 3.6.1 โดยทำโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า \log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของ VPC ได้ 700 กิโลดัลตัน ขณะที่ฟีด B มีน้ำหนักโมเลกุลคำนวณได้เป็น 44 กิโลดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 21 ซึ่งยืนยันว่าฟีด B เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอิสระ เนื่องจากไวเทลโลจินิกมีน้ำหนักโมเลกุล 480 กิโลดัลตัน และจากน้ำหนักโมเลกุลของ VPC และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส บ่งชี้ว่า VPC ประกอบด้วยไวเทลโลจินิก 1 โมเลกุลยัดติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 5 โมเลกุล หรือมีอัตราส่วนระหว่างไวเทลโลจินิกต่อเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 1:5 แตกต่างจากการทดลองของ Laverdure และ Soyez (1988) ซึ่งยัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสติดกับไวเทลลิน 1 โมเลกุล ได้ในอัตราส่วน 1:1



รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของ VPC
โดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

หาน้ำหนักโมเลกุลของ VPC โดยคอลัมน์ Superdex 200 HR ซึ่งปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย TB แล้วเติม VPC, $K_2Cr_2O_7$ (M_r 294), Blue dextran (M_r 2,000,000) และโปรตีนมาตรฐาน อันได้แก่ Thyroglobulin (M_r 669,000), Ferritin (M_r 440,000), Catalase (M_r 232,000), Aldolase (M_r 158,000), BSA (M_r 67,000), Peroxidase (M_r 44,000) และ Ovalbumin (M_r 43,000) ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ TB ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายไหลออกละ 0.5 มิลลิลิตร

3.7 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินโดย Enzyme-Linked Vitellogenin Binding Assay (ELVBA)

3.7.1 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนโดย ELVBA

หาภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนโดย ELVBA ดังนี้คือ ปริมาณที่เหมาะสมของ VPC (รูปที่ 22) พบว่า ค่า A492 เพิ่มขึ้นตามปริมาณของ VPC และมีค่าเริ่มคงที่เมื่อปริมาณของ VPC มากกว่า 15 นาโนกรัม ดังนั้นจึงเลือกใช้ VPC ปริมาณ 15 ไมโครกรัมต่อหลุมเป็นปริมาณของ VPC ที่เหมาะสม

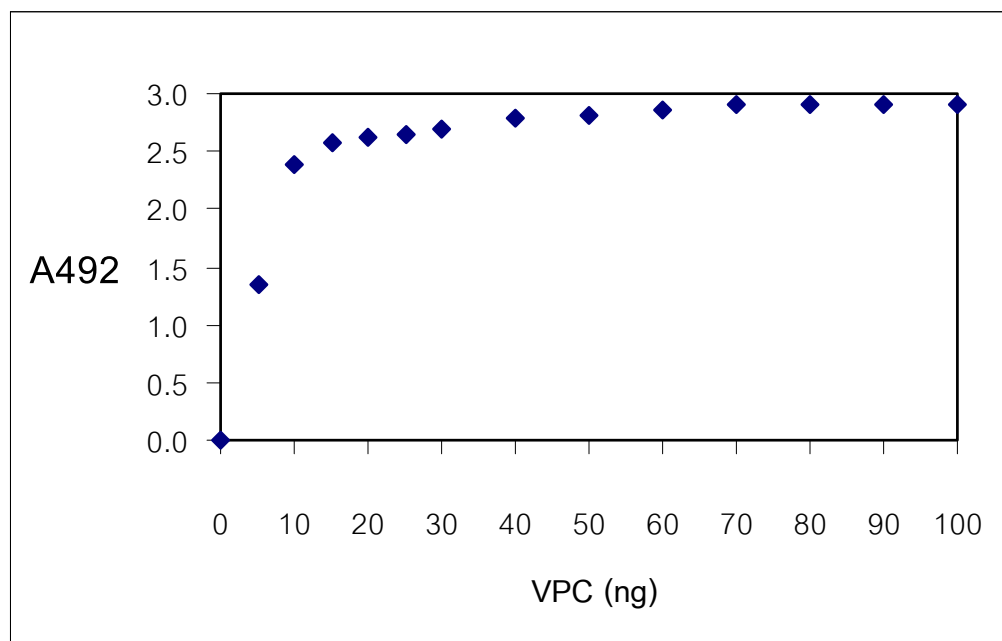
จากการหาความเข้มข้นของ OPD ที่เหมาะสม พบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ OPD และมีค่าเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ความเข้มข้นของ OPD ที่เหมาะสมคือ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีค่า A492 ที่ไม่สูงหรือต่ำเกินไป (รูปที่ 23A)

เมื่อหาความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เหมาะสม พบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ H_2O_2 และเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 0.004% แต่ค่า A492 จะเพิ่มขึ้นจนสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 0.01% และเมื่อความเข้มข้นของ H_2O_2 มากกว่า 0.01% ค่า A492 จะค่อย ๆ ลดลง ดังนั้นความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เหมาะสม คือ 0.01% (รูปที่ 23B)

การหาระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมพบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา และเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเป็น 15 นาที ดังนั้นระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมคือ 15 นาที (รูปที่ 23C)

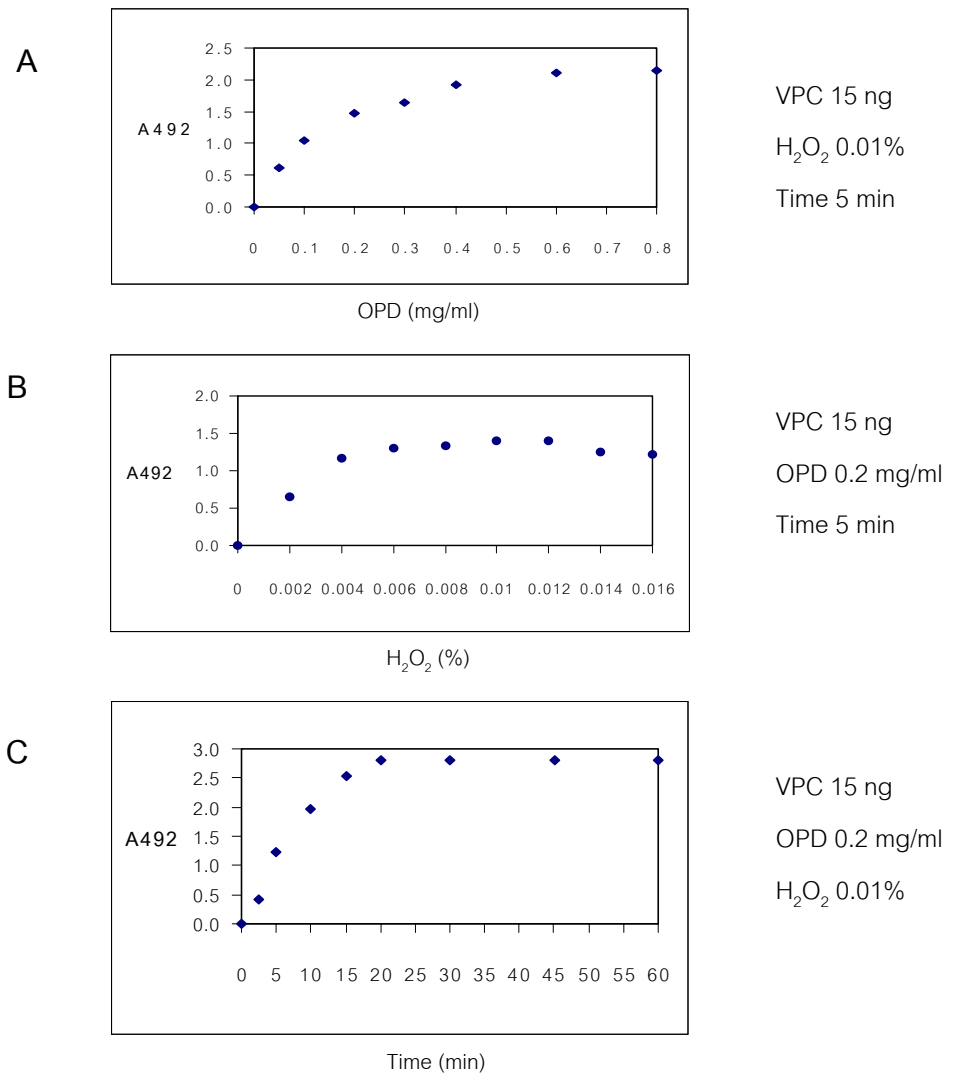
การทำกราฟมาตรฐานของ VPC เพื่อใช้ในการวัดปริมาณของตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรน พบว่า ค่า A492 เพิ่มขึ้นแปรผันเป็นเส้นตรงตามปริมาณของ VPC ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 0 – 20 นาโนกรัม ดังแสดงในรูปที่ 24

เมื่อวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรน โดยนำสารสกัดเมมเบรนเคลือบเพลทให้มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0 ถึง 500 นาโนกรัม แล้วบ่มกับ VPC



รูปที่ 22 ปริมาณของ VPC ที่เหมาะสมสำหรับวิธี ELVBA

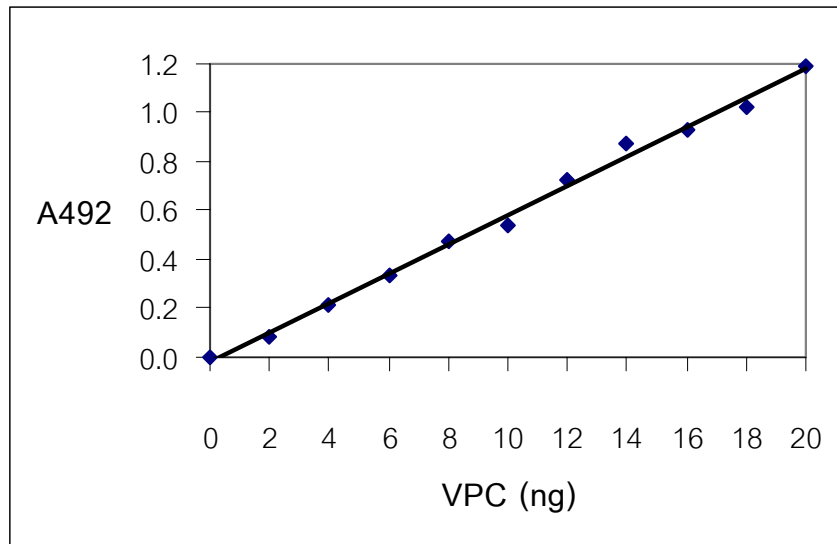
ใส่ VPC ในไมโครไตเตอร์เพลท หลุมละ 150 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณในช่วง 0-100 นาโนกรัม จากนั้นเติมสารละลาย OPD ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H_2O_2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 นำไปวัดค่า A492



รูปที่ 23 ภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสใน VPC สำหรับวิธี ELVBA

ในการทดสอบใช้ VPC ปริมาณ 15 นาโนกรัม

- A ผลของการใช้ OPD ที่ความเข้มข้น 0-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- B ผลของการใช้ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 0-0.016 %
- C ผลของการเกิดปฏิกิริยาที่เวลา 0-60 นาที



รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานของ VPC สำหรับวิธี ELVBA

ในการทดสอบใช้ความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.2 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร, ความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 15 นาที

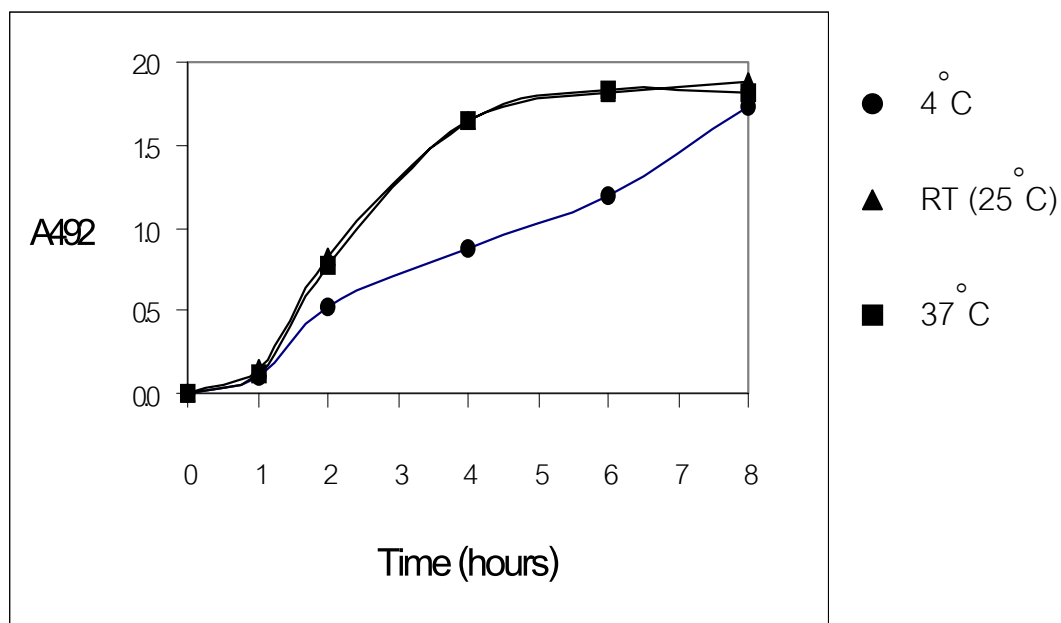
นำไปวัดแอกทิวิตี พบว่า A492 มีค่าต่ำมาก (ไม่แสดงผล) แม้ว่าเพิ่มปริมาณของสารสกัดเมมเบรนเป็น 500 นาโนกรัม สามารถวัดค่า A492 ได้เพียง 0.009 เท่านั้น แสดงว่าการสกัดเมมเบรนของโอโอไฮท์ด้วย n-octyl- β -D-glucoside อาจสกัดตัวรับไวเทลโลจีนินออกมาได้น้อยมากหรือเมมเบรนมีปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินที่น้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ ดังนั้นการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนด้วย ELVBA จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมกับการทดสอบ ในการทดลองข้อต่อไปจึงหาตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของเซลล์โอโอไฮท์แทนการหาจากสารสกัดเมมเบรน

3.7.2 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโอโอไฮท์โดยวิธี

ELVBA

การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไฮท์ โดยนำโอโอไฮท์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.42 ถึง 0.53 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นไขปลาที่มีการสะสมของโพลีโพรพิลีนแล้ว ปริมาณ 0.2 กรัม (จำนวนประมาณ 800 ฟอง) ไปวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนิน

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA ได้แก่ อุณหภูมิ และระยะเวลาของการบ่มระหว่างสารละลาย VPC กับโอโอไฮท์ pH และความเข้มข้นของไอออน จากการทดลองผลกระทบของอุณหภูมิและระยะเวลาของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 25 พบว่าการจับกันระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาบ่มที่นานขึ้น เมื่อบ่มโอโอไฮท์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ, อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) หรือที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยการจับกันระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนเริ่มคงที่ที่เวลา 4 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง และ 37 °ซ และให้ผลเหมือนกันทั้งสองอุณหภูมิ ส่วนที่อุณหภูมิ 4 °ซ ต้องใช้เวลานานถึง 8 ชั่วโมง จึงจะมีปริมาณการจับกันระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโอโอไฮท์คงที่ใกล้เคียงกับการบ่มที่อุณหภูมิห้อง และที่ 37 °ซ ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกใช้การบ่มระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของเซลล์โอโอไฮท์ที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อใช้วัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA



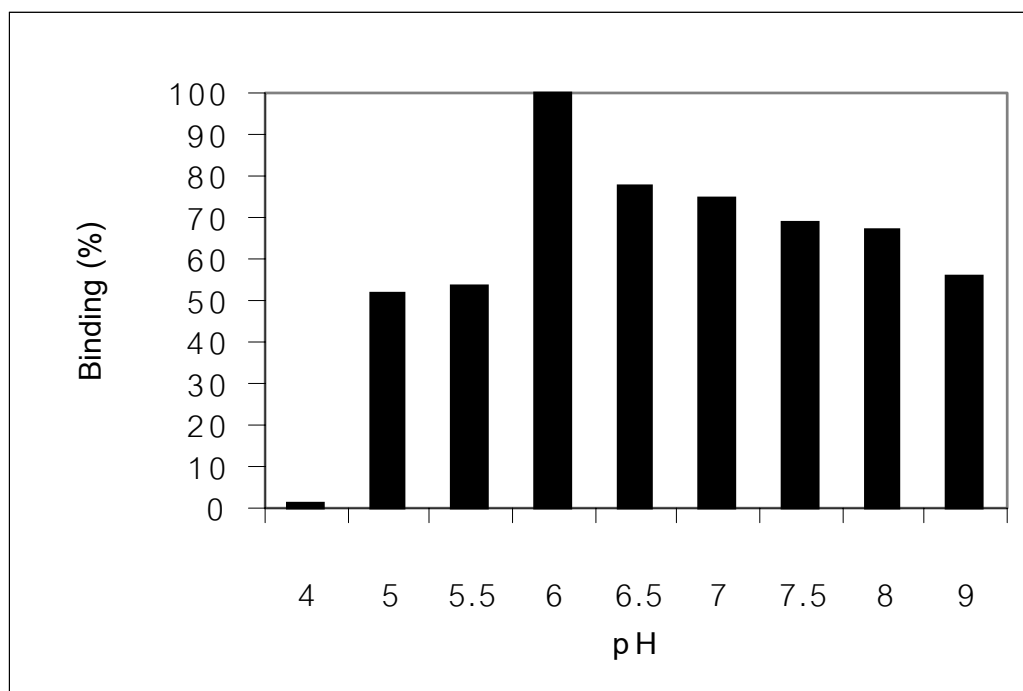
รูปที่ 25 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนิบบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA

นำไอโซไซท์ที่เตรียมไว้หลดละ 0.2 กรัม บ่มกับ VPC ที่เจือจาง 1:400 เท่า ด้วย 0.1 M PBS ปริมาตร 400 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ, อุณหภูมิห้อง และ 37 °ซ ในแต่ละอุณหภูมิใช้ระยะเวลาบ่มในช่วง 0-8 ชั่วโมง จากนั้นเติม OPD ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H₂O₂ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H₂SO₄ แล้ววัดค่า A492

ในการศึกษาผลของ pH ทดสอบโดยใช้บัฟเฟอร์ตรวจสอบมี pH ต่าง ๆ กันในช่วง 4-9 พบว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ตรวจสอบที่มี pH ต่ำกว่า 4 จะทำให้ไม่เกิดการจับหรือจับกันเพียงเล็กน้อยระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนินกับ VPC และที่ pH 6 เกิดการจับกันได้มากที่สุด หากเพิ่ม pH มากขึ้นหรือต่ำกว่า 6 การจับกันระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนลดลง (รูปที่ 26) ดังนั้นในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไฮท์โดย ELVBA จึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ตรวจสอบที่ pH 6 เช่นเดียวกับ Yusko และคณะ (1981) ที่พบว่าไวเทลโลจีนินของไก่จับกับเมมเบรนของโอโอไฮท์ของไก่ได้มากที่สุดที่ pH 6 และ Chan และคณะ (1991) พบว่าตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไฮท์ของปลาจับกับไวเทลโลจีนินที่ติดฉลากด้วย ¹²⁵I ได้มากที่สุดที่ pH 6 เช่นกัน

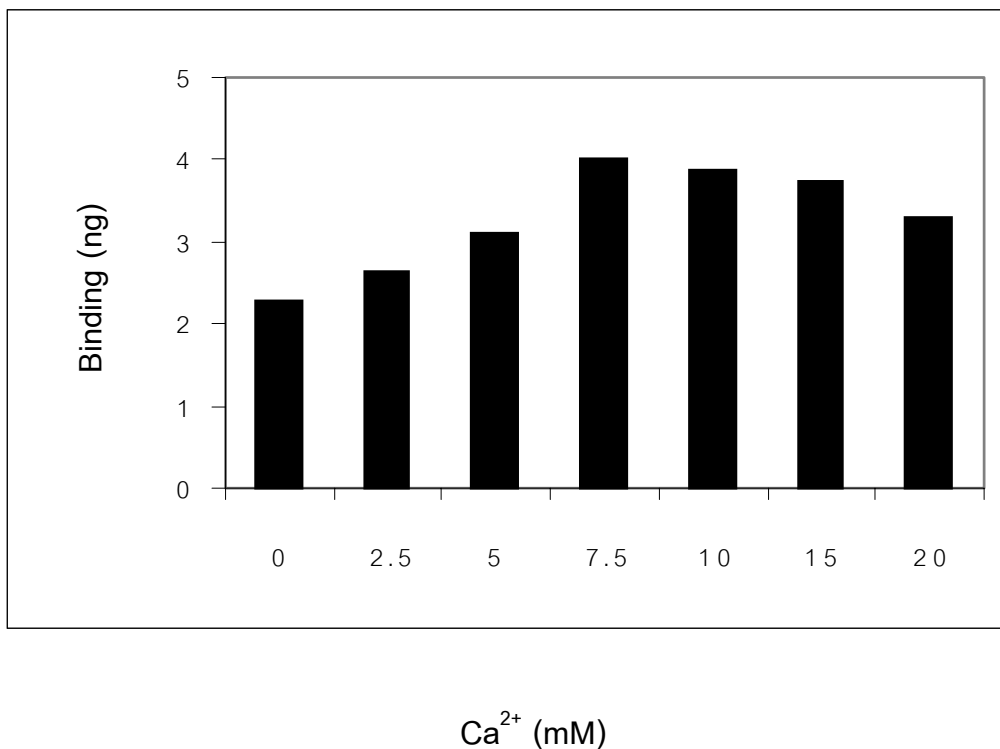
จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ Ca^{2+} โดยใช้ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในช่วง 0-20 mM พบว่า การจับกันระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้น 7.5 mM จะทำให้เกิดการจับกันมากที่สุด (รูปที่ 27) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} มากกว่า 7.5 mM การจับจะค่อย ๆ ลดลง ทำนองเดียวกันกับผลของความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่พบว่า การจับกันระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งที่ 7.5 mM ทำให้เกิดการจับกันมากที่สุด และเมื่อความเข้มข้นของ Mg^{2+} เพิ่มมากกว่า 7.5 mM จะทำให้การจับค่อย ๆ ลดลง (รูปที่ 28) ทำนองเดียวกันกับ Chan และคณะ (1991) ที่พบว่าความเข้มข้นของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เป็น 10 mM และ 7.5 mM ตามลำดับ ทำให้ตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไฮท์ของปลาจับกับไวเทลโลจีนินที่ติดฉลากด้วย ¹²⁵I ได้มากที่สุด ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้กำหนดให้การวัดปริมาณของตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนในภาวะที่บัฟเฟอร์ตรวจสอบมี pH 6 ความเข้มข้นของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เป็น 7.5 mM และการบ่มระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

เมื่อวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไฮท์ ดังแสดงในรูปที่ 29 โดยนำโอโอไฮท์หนัก 0.2 กรัม มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.47 มิลลิเมตร เป็น



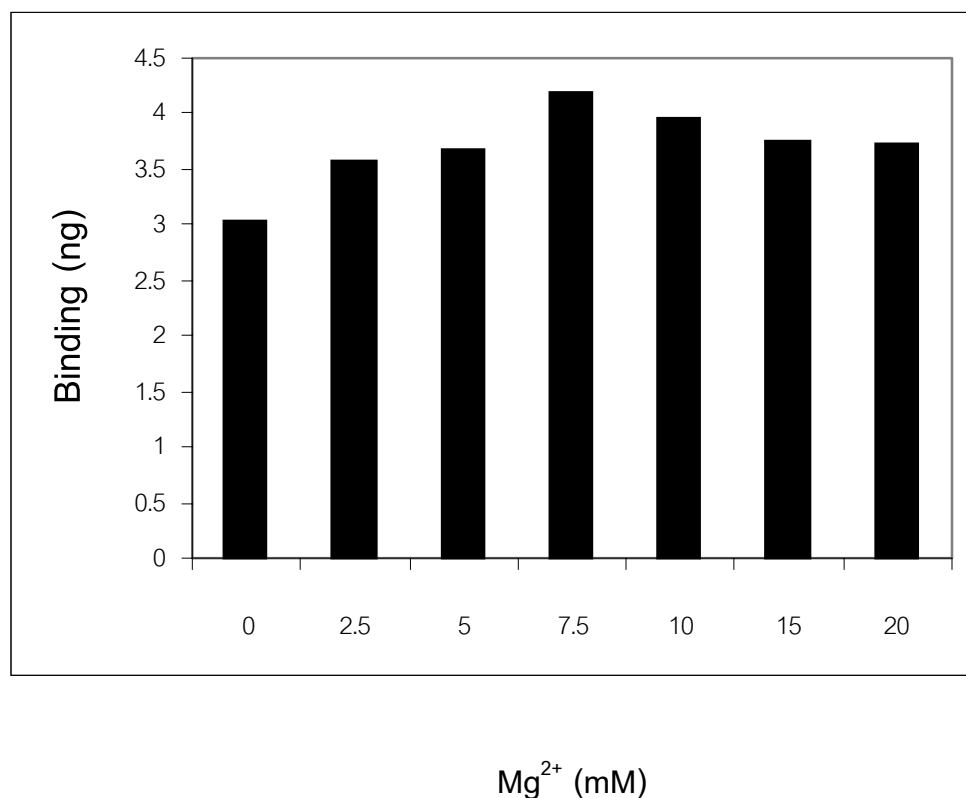
รูปที่ 26 ผลของ pH ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจินบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA

นำไอโซไซท์ที่เตรียมไว้หาคณะ 0.2 กรัม บ่มกับ VPC (ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เจือจาง 1:400 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง และใช้ระยะเวลาบ่ม นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม OPD ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H_2O_2 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 แล้ววัดค่า A492



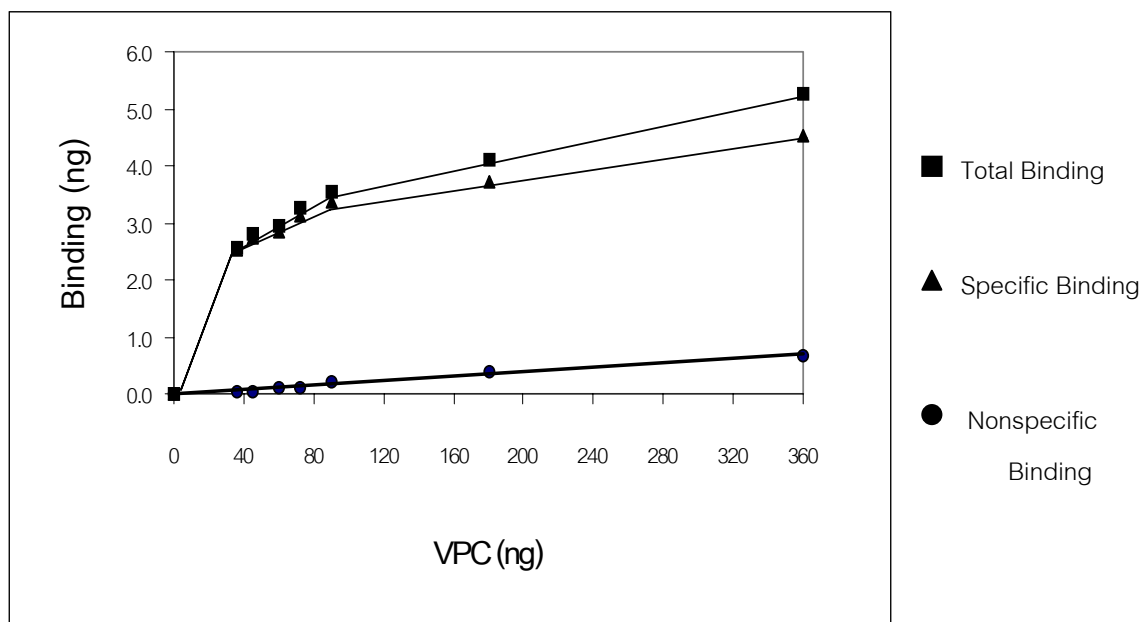
รูปที่ 27 ผลของความเข้มข้นของ Ca²⁺ ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจินินบน เมมเบรนโดยวิธี ELVBA

นำไอโซไซท์ที่เตรียมไว้หาคณะ 0.2 กรัม บ่มกับ VPC (ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เจือจาง 1:400 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M PBS ที่เติม Ca²⁺ ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-20 mM ปริมาตร 400 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง และใช้ระยะเวลาบ่มนาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม OPD ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H₂O₂ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H₂SO₄ แล้ววัดค่า A492



รูปที่ 28 ผลของความเข้มข้นของ Mg²⁺ ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA

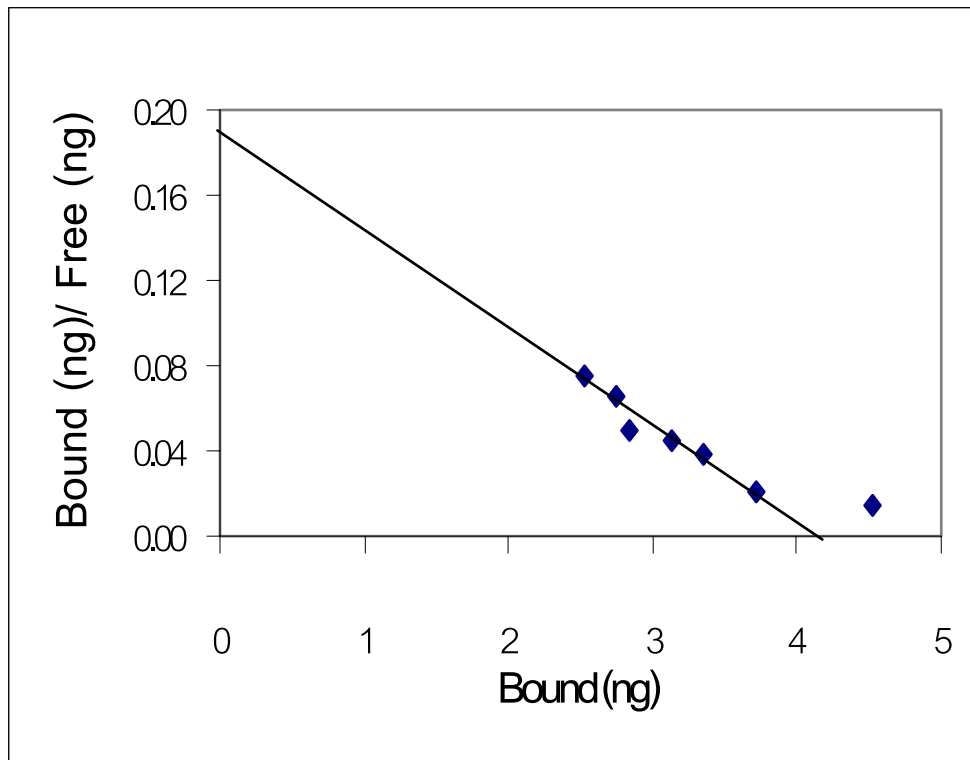
นำไอโซไซท์ที่เตรียมไว้หาคณะ 0.2 กรัม บ่มกับ VPC (ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เจือจาง 1:400 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M PBS ที่เติม Mg²⁺ ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-20 mM ปริมาตร 400 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง และใช้ระยะเวลาบ่มนาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม OPD ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H₂O₂ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H₂SO₄ แล้ววัดค่า A492



รูปที่ 29 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจินิกบนเมมเบรนของไอโอไซท์โดยวิธี ELVBA

นำไอโอไซท์หนัก 0.2 กรัม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.467 มิลลิเมตร เป็นไอโอไซท์ในระยะเวลาการสะสมโปรตีนโพลีค ตรวจนับได้จำนวน 856 เซลล์ บ่มกับสารละลาย VPC ที่มีปริมาณต่าง ๆ กัน โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง และใช้ระยะเวลาบ่มในช่วง 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม OPD ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H_2O_2 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 แล้ววัดค่า A492 จากนั้นหาปริมาณการจับของตัวรับไวเทลโลจินิกบนเมมเบรน

ไอโอไซท์ในระยะเวลาการสะสมโปรตีนโพลีคลอเนล ตรวจจับได้จำนวน 856 เซลล์ บ่มกับสารละลาย VPC ที่มีปริมาณต่าง ๆ กัน จากนั้นนำไปหาแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกิดขึ้น พบว่าปริมาณการจับทั้งหมด (total binding) ของ VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ VPC ที่ใช้บ่ม ในช่วงแรกมีการจับได้อย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่เมื่อปริมาณของ VPC เป็น 90 นาโนกรัม ในขณะที่การจับแบบไม่จำเพาะ (nonspecific binding) เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงแปรผันตามปริมาณ VPC ที่ใช้ (รูปที่ 29) จากนั้นเมื่อคำนวณหาปริมาณการจับจำเพาะ (specific binding) โดยนำค่าปริมาณการจับทั้งหมดลบออกด้วยปริมาณการจับที่ไม่จำเพาะ และนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณ VPC ที่ไม่จับกับตัวรับ (unbound) แล้วนำค่าที่ได้ทำ Scatchard's plot ของการจับระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของไอโอไซท์ (รูปที่ 30) พบว่าการจับของ VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินเป็นแบบตำแหน่งจับชนิดเดียว (single class of binding site) เหมือนที่พบในตัวรับไวเทลโลจีนินของปลานิล (Chan *et al.*, 1991) และมีค่าการจับสูงสุด (B_{max}) เท่ากับ 4.7 พิโคกรัมต่อเซลล์ไอโอไซท์ และมีค่า K_d เท่ากับ 48 นาโนกรัมของ VPC ต่อ มิลลิลิตร หรือ 68.5 pM ซึ่งมีความจำเพาะของการจับสูงกว่า เพราะมีค่า K_d ต่ำกว่าการทดลองของ Laverdure และ Soyez (1988) ที่ทดสอบการจับระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนินของกุ่มมังกกร (*H. americana*) กับไวเทลลิน พบว่ามีค่า K_d เท่ากับ 73 nM และผลการทดลองที่รายงานโดย Stifani และคณะ (1990b) ที่วัดการจับระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนินของ coho salmon กับไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่ามีค่า K_d เท่ากับ 180 nM ส่วน Tao และคณะ (1996) รายงานผลการจับระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนินของปลา white perch กับไวเทลโลจีนิน พบว่าปริมาณการจับมากที่สุดของไวเทลโลจีนินกับตัวรับไวเทลโลจีนินมีค่าเท่ากับ 35 พิโคกรัมของไวเทลโลจีนินต่อ มิลลิกรัมของโปรตีนเมมเบรน และมีค่า K_d เท่ากับ 200 nM นอกจากนี้ Chan และคณะ (1991) ได้หาจำนวนตัวรับของแต่ละไอโอไซท์และค่า K_d ของตัวรับไวเทลโลจีนินในไอโอไซท์ที่มีขนาดต่าง ๆ ของปลานิล (*O. niloticus*) ที่จับกับไวเทลโลจีนินที่ติดฉลากด้วย ¹²⁵I ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าไอโอไซท์จะมีปริมาณตัวรับและค่า K_d เพิ่มขึ้นจากรยะก่อนสะสมโปรตีนโพลีคลอเนลไปเป็นระยะสะสมโปรตีนโพลีคลอเนล และมีค่าลดลงในระยะก่อน



รูปที่ 30 Scatchard plot ของการจับระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนิน
บนเมมเบรนกับ VPC

การวางไข่ ในทำนองคล้ายกัน Lancaster และ Tyler (1994) ที่พบว่าโอโอไซท์ที่อยู่ในระยะก่อนการผสมโปรตีนโกลด์ของปลาเรนโบว์เทราท์ (*O. mykiss*) มีค่า B_{max} และ K_d เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในระยะผสมโปรตีน ไปจนถึงระยะก่อนการวางไข่ (ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองเหล่านี้ จะเห็นว่ายังมีรายงานเกี่ยวกับตัวรับไวเทลโลจินินในปลาชนิดต่าง ๆ ยังไม่มากนัก และการศึกษาที่มีหน่วยการคำนวณค่า B_{max} ที่หลากหลาย ทำให้เป็นการยากที่จะเปรียบเทียบกับการทดลองกับของปลากระบอกดำ ส่วนค่า K_d ที่มีรายงานจะมีช่วงทั้งในระดับ nM ถึง μ M สำหรับของปลากระบอกดำพบว่าค่า K_d อยู่ในช่วงของ pM เนื่องจากวิทยานิพนธ์นี้ไม่สามารถหาโอโอไซท์ขนาดหรือมีระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ต่าง ๆ กัน เพื่อมาศึกษาค่า B_{max} และ K_d ได้ แต่จากผลการทดลองของปลานิล (Chan *et al.*, 1991) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Lancaster and Tyler, 1994) จะเห็นได้ว่าปริมาณตัวรับไวเทลโลจินินทั้งค่า B_{max} และ K_d มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการผสมโปรตีนโกลด์ โดยทำหน้าที่รับไวเทลโลจินินจากกระแสเลือดมาเปลี่ยนเป็นโปรตีนโกลด์ในเซลล์โอโอไซท์ และมีแนวโน้มที่จะคงที่หรือลดลงเมื่อการผสมไวเทลโลจินินเสร็จสิ้นและไข่สมบูรณ์พร้อมจะถูกวางต่อไป

ในงานวิทยานิพนธ์นี้สามารถพัฒนาเทคนิค ELVBA เพื่อใช้แทนวิธี RIA ซึ่งใช้สารกัมมันตรังสีที่ก่อให้เกิดมลพิษและอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง ได้เป็นอย่างดี วิธี ELVBA ที่พัฒนาได้สามารถใช้หาปริมาณตัวรับไวเทลโลจินินบนเมมเบรนของโอโอไซท์ได้ โดยมีความจำเพาะและความไวสูง (ระดับนาโนกรัม) เพราะไม่ต้องอาศัยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจินิน เช่นที่ใช้ในวิธี ELISA ซึ่งแอนติบอดีนี้สามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนโกลด์ที่ปนเปื้อนในสารสกัดเมมเบรนได้ และวิธี ELVBA เป็นประโยชน์ในการศึกษาตัวรับไวเทลโลจินินของปลากระบอกดำและของปลาอื่น ๆ ต่อไปได้

ตารางที่ 3 ค่า B_{max} และ K_d ของปลาบางชนิด

Fish	Oocyte		B_{max}	K_d	Reference
	Stage	Diameter			
Greenback grey mullet (<i>L. subviridis</i>)	Vitellogenic	0.47 mm	4.7 pg / cell	68.5 pM *	วิทยานิพนธ์นี้
White perch (<i>M. americana</i>)	-	-	35 pM/ mg membrane	200 nM	Tao <i>et al.</i> , 1996
Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Previtellogenic	0.1 mm	9.98×10^9 receptor/cell	1.51 μ M	Chan <i>et al.</i> , 1991
	Vitellogenic	0.7 mm	3.65×10^{12} receptor/cell	1.07 μ M	
	Preovulated	2.3 mm	3.53×10^{12} receptor/cell	0.30 μ M	
Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	Previtellogenic	0.4-0.6 mm	70.8-260.5 fmole/mg protein	$1.3-3.5 \times 10^{-9}$ M	Lancaster and Tyler, 1994
	Vitellogenic	0.8 mm	242 fmole/mg protein	3.3×10^{-9} M	
	Prespawning	3.0 mm	329.9 fmole/mg protein	1.8×10^{-9} M	

* ในงานวิทยานิพนธ์นี้ pM ของ K_d คำนวณจากปริมาณ VPC ที่จับกับ หารด้วย M_r ของ VPC (700 kDa)