1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การสร้างไข่ (oogenesis) เป็นกระบวนการพัฒนาจากโอโอโกเนีย (oogonia) ไปเป็นโอโอไซท์ (oocyte) และเป็นวิธีการที่สำคัญที่สุดของสัตว์ออกลูกเป็นไข่ (oviparous animal) ในการเจริญเติบโตของโอโอไซท์จากขนาดเล็กให้มีขนาดใหญ่ขึ้นนั้นมีการสะสมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (embryo) หลังการปฏิสนธิ (fertilization) โดยที่ไวเทลโลจีนิน (vitellogenin) ซึ่งเป็นพลาสมาโปรตีน (plasma protein) ที่สังเคราะห์โดยตับ (Mommsen and Walsh, 1988) ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนและเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของโปรตีนโยล์ค (yolk protein) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Korsgaard and Petersen, 1979) เช่น ปลาชนิดต่าง ๆ สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibian) สัตว์เลื้อยคลาน (reptile) และสัตว์ปีก (avian) นั้น มีการขนส่งไวเทลโลจีนินผ่านกระแสเลือดไปยังรังไข่ เมื่อไวเทลโลจีนินถูกรับเข้าสู่โอโอไซท์จะถูกย่อยเปลี่ยนเป็นโปรตีนโยล์ค (Wallace and Selman, 1981, Liu *et al*., 1996)

การรับไวเทลโลจีนินจากพลาสมา (plasma) เข้าสู่เซลล์ในระหว่างการเจริญเติบโตของโอโอไซท์ ได้มีการศึกษาในกบ (*Xenopus sp.*) พบว่าเนื้อเยื่อในรังไข่ของกบเลือกรับพลาสมาไวเทลโลจีนินได้เร็วกว่าโปรตีนอื่น ๆ ในพลาสมาถึง 5-6 เท่า (Wallace *et al*., 1972) แสดงให้เห็นถึงการมีตัวรับที่จำเพาะของไวเทลโลจีนินบนผิวของโอโอไซท์ (specific oocyte plasma membrane receptor) ซึ่งช่วยรับไวเทลโลจีนินเข้าโอโอไซท์โดยอาศัยกระบวนการ receptor-mediated endocytosis (Opresko and Wiley, 1987a,b) สำหรับในปลายังมีรายงานเกี่ยวกับตัวรับไวเทลโลจีนินในเมมเบรน (membrane) ของโอโอไซท์ไม่มากนัก ได้แก่การศึกษาจากปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) (Tyler *et al*., 1990a,b; Lancaster and Tyler, 1994), ปลา coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Stifani *et al*., 1990a), ปลานิล

(tilapia, *Oreochromis niloticus*) (Chan *et al*., 1991) และปลา white perch (*Morone americana*) (Tao *et al*., 1996) ในการศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินของปลาเหล่านี้อาศัยการติดฉลากไวเทลโลจีนินด้วยสารกัมมันตรังสี (radioisotope) คือ ^{125}I ทั้งสิ้น แล้วติดตามการจับ (binding) ระหว่างไวเทลโลจีนินกับตัวรับโดยวิธี radioimmuno-assay (RIA) งานวิทยานิพนธ์นี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาเทคนิคในการศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินโดยไม่ใช้สารกัมมันตรังสี เพราะสารกัมมันตรังสีเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยพัฒนาเทคนิค ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) แทน เนื่องจาก ELISA เป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูงและไม่เป็นอันตราย ประกอบกับการศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินต้องใช้โอโอไซท์จำนวนมาก งานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินโดยใช้ปลากระบอกดำเป็นตัวอย่างในการศึกษา เพราะเป็นปลาที่มีขนาดเล็ก ราคาไม่แพง หาแม่ปลาได้ง่าย และมีจำนวนไข่มากเมื่อเทียบกับขนาดตัวของแม่ปลา (น้ำหนักตัว 80-300 กรัม) นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ จึงเหมาะที่จะใช้ปลากระบอกดำเป็นตัวอย่างการศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินเป็นอย่างมาก อีกทั้งปลากระบอกดำเป็นปลากระดูกแข็งที่มีการผสมพันธุ์ของไข่นอกตัวปลา ดังนั้นเอมบริโอของปลาเหล่านี้ใช้โปรตีนโยล์คเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต ปริมาณของโปรตีนโยล์คจึงสะท้อนคุณภาพของไข่ ความสามารถในการผสมพันธุ์ของไข่และการเจริญเติบโตของลูกปลา ด้วยเหตุนี้งานวิทยานิพนธ์นี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไซท์ของปลากระบอกดำ เพื่อนำไปสู่การศึกษากลไกการรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่โอโอไซท์ต่อไป อันจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มผลผลิตปลากระบอกดำได้ในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1.1 ชีววิทยาของปลากระบอกดำ

ปลากระบอกดำ จัดเป็นปลาในวงศ์ (family) Mugilidae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lisa subviridis* และชื่อสามัญว่า greenback grey mullet มีลักษณะลำตัวเรียวยาว ทรงกระบอก บริเวณหลังมีสีเทาเข้มหรือเขียวคล้ำ มีแถบสีเทาจาง ๆ 4-5 แถบ พาดไปตามความยาวของลำตัวแนวเดียวกับเกล็ด ด้านท้องและด้านข้างลำตัวเป็นสีขาวเงินวาว รูปร่างขอบครีบหางมีสีคล้ำและเว้าเล็กน้อย มีครีบหลังแยกเป็น 2 ครีบ ตามีเยื่อไขมันคลุมปิดม่านตา เป็นปลาที่มีฟันขนาดเล็กและสั้น มีลำไส้ยาวและเยื่อบุช่องท้องเป็นสีดำ มีขนาดลำตัว 10-40 เซนติเมตร เพศเมียมีขนาดโตกว่าเพศผู้ ปลากระบอกดำเพศเมียสามารถเจริญพันธุ์ได้เมื่อมีขนาดความยาวประมาณ 18 เซนติเมตร หนัก 80 กรัม และเพศผู้มีขนาดความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร หนัก 45 กรัม อาหารของปลากระบอกดำเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ (zooplankton) ไดอะตอม (diatom) สาหร่าย (algae) พืชทะเล ตะกอนสารอนินทรีย์ (inorganic sediment) และตัวอ่อนของแมลงและหอย (Chan and Chua, 1979)

ปลากระบอกดำเป็นปลาน้ำกร่อยชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณปากแม่น้ำหรือแหล่งน้ำกร่อย และสามารถอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดได้ มักอยู่รวมกันเป็นฝูงว่ายไปตามผิวน้ำ ปลาแต่ละฝูงเป็นปลาเพศเดียวกัน แต่ปลาทั้งสองเพศจะอยู่รวมกันเมื่อเข้าฤดูผสมพันธุ์ โดยที่ปลากระบอกดำเพศผู้ 4-5 ตัว จะเข้าผสมพันธุ์กับปลาเพศเมียที่มีไข่แก่ และทำการวางไข่ในเวลากลางคืน ปลากระบอกดำสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี แต่พบมากที่สุดในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน–ตุลาคม จำนวนไข่ต่อแม่ปลาขึ้นกับขนาดของแม่ปลา โดยทั่วไปประมาณ 40,000-145,000 ฟอง (Chan and Chua, 1980) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.73 มิลลิเมตร และใช้เวลาฟักออกมาเป็นตัว 17-21 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27-30 °ซ ระดับความเค็ม 29-32 ppt แล้วลูกปลาเข้ามาหากินและเติบโตในบริเวณชายฝั่ง โดยเริ่มกินอาหารเมื่ออายุได้ 3 วัน และทนต่อสภาวะความเค็มที่แตกต่างกันได้ เมื่ออายุได้ 30 วัน ลูกปลาจะเข้าสู่ปลาวัยเยาว์

(juvenile) ซึ่งสามารถเติบโตในความเค็มที่ต่ำได้ หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ปรับสภาพจนสามารถเจริญในน้ำจืดได้ ปลากระบอกดำจะมีขนาด 28 เซนติเมตร ภายใน 1 ปี (สมชาติ สุขวงศ์ และ นริศ ธนะคุ้มชีพ, 2520; นิเวศน์ เรืองพานิช และคณะ, 2536; ชูสินธุ์ ชนะสิทธิ์ และคณะ, 2541)

1.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลา

การสืบพันธุ์ของปลามีความสำคัญในแง่ของการมีลูกหลานสืบต่อไปในอนาคต เพื่อมิให้สูญพันธุ์ไป อวัยวะที่ใช้ในการสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีชื่อรวม ๆ ว่า อวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) อันได้แก่ อัณฑะ (testis) ของเพศผู้สำหรับสร้างตัวอสุจิ (spermatozoa) มีลักษณะเป็นฝัก (roe) สีครีม พบอยู่ที่ผนังช่องท้องอยู่ด้านบน มีท่อเปิดเข้าสู่ genital pore เมื่อตัวอสุจิเจริญเต็มที่แล้ว จะถูกรีดออกมามีลักษณะเป็นครีมสีขาว เรียกว่า น้ำเชื้อ (milt) ซึ่งประกอบด้วยตัวอสุจิจำนวนมาก ส่วนปลาเพศเมียมีรังไข่ (ovary) สำหรับสร้างไข่ (ovum) อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับอัณฑะ

1.2.1 แบบการสืบพันธุ์ของปลา

แบบการสืบพันธุ์ที่ต่างกันมีผลให้อวัยวะสืบพันธุ์มีความแตกต่างกันไป แต่ลักษณะพื้นฐาน เช่น เซลล์ต่าง ๆ ที่ประกอบเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เหล่านั้นยังคงคล้ายกันและทำหน้าที่สำคัญคือสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) (Nagahama, 1983) โดยทั่วไปแล้วสามารถแบ่งแบบการสืบพันธุ์ของปลาออกเป็น 3 แบบ คือ

1.2.1.1 การสืบพันธุ์แบบแยกเพศ

(Bisexual reproduction หรือ Dioecious)

การสืบพันธุ์แบบแยกเพศเป็นการสืบพันธุ์ที่มีทั้งเพศผู้และเพศเมียซึ่งมีการสร้างตัวอสุจิและไข่แยกกันในแต่ละตัว การผสมพันธุ์อาจเป็นแบบภายนอกตัว (external fertilization) หรือแบบภายในตัว (internal fertilization) ไข่ที่ถูกผสมแล้วจะมีการเจริญและพัฒนาเป็น 3 แบบ

ก. แบบ oviparous คือ การที่ไข่ได้รับการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ตัวอ่อนเจริญและพัฒนาโดยอาศัยอาหารจากไข่แดงหรือโยล์ค (yolk) ซึ่งมีทั้งชนิด

ไข่ลอย ไข่ครึ่งลอยครึ่งจม และไข่ที่จมลงสู่ท้องน้ำโดยมีส่วนของไข่ยึดติดกับวัสดุใต้น้ำ

ข. แบบ viviparous คือ การที่ไข่ได้รับการผสมพันธุ์ภายในตัวแม่ มีการเจริญพัฒนาโดยอาศัยอาหารทางสายสะดือ พบในปลาฉลาม (shark) และปลากะเบน (ray) บางชนิด โดยมีสายเลือดจากท่อนำไข่แล้วกระจายห่อหุ้มโยล์คของตัวอ่อนไว้ ทำหน้าที่ส่งอาหารและถ่ายของเสีย

ค. แบบ ovoviviparous คือ การที่ไข่ได้รับการผสมพันธุ์ภายในแต่ตัวอ่อนเจริญพัฒนาโดยอาศัยอาหารจากโยล์คของตัวมันเอง มดลูกเป็นเพียงที่ปกป้องอันตรายเท่านั้น พบในปลาสอด (swordtail)

1.2.1.2 การสืบพันธุ์แบบกะเทย

(Hermaphrodite หรือ Monoecious)

การสืบพันธุ์แบบกะเทย หมายถึง การสืบพันธุ์ที่มี 2 เพศในปลาตัวเดียวกัน แต่ส่วนใหญ่จะผสมพันธุ์ภายในตัวเองไม่ได้ ในปลาจะพบการสืบพันธุ์แบบนี้น้อยมาก พบในปลาปากกลม (lamprey) ปลากะพง (sea bass) ปลาเทราท์ (trout) ปลาคอด (cod) และปลากะรัง (grouper) แต่ส่วนมากเป็นกะเทยแบบ protandric hermaphrodite คือเป็นเพศผู้ในระยะแรกของช่วงชีวิต หลังจากนั้น จึงมีพัฒนาการเป็นเพศเมีย

1.2.1.3 การสืบพันธุ์แบบไข่ไม่ได้รับการผสมเชื้อ

(Pathenogenesis หรือ Gynogenesis)

การสืบพันธุ์แบบไข่ไม่ได้รับการผสมเชื้อ หมายถึง การเกิดลูกที่ไม่ได้รับการผสมจากตัวอสุจิ ตัวอสุจิเป็นเพียงตัวกระตุ้นให้ไข่สุกเท่านั้น ลูกที่เกิดมาจะมีโครโมโซม (chromosome) n เดียวและเป็นเพศเดียวทั้งหมด ซึ่งไม่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ พบในปลาสอด ปลาหางนกยูง (guppy) และปลาหัวตะกั่ว (killifish)

1.2.2 อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย

รังไข่เป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของปลากระดูกแข็ง เจริญมาจากเซลล์ส่วนผิวของผนังช่องท้อง (peritoneal wall) เจริญหนาเป็นสันตามยาวเรียกว่า คอร์เทกซ์ (cortex) รังไข่ของปลาปกติจะมีเป็นคู่ ทอดยาวไปตามความยาวของช่องท้องโดยยึดติดกับช่องท้องด้วยเยื่อ mesovarium ถ้าเป็นปลาที่มีถุงลม รังไข่จะอยู่ใต้ถุงลม รังไข่จะ

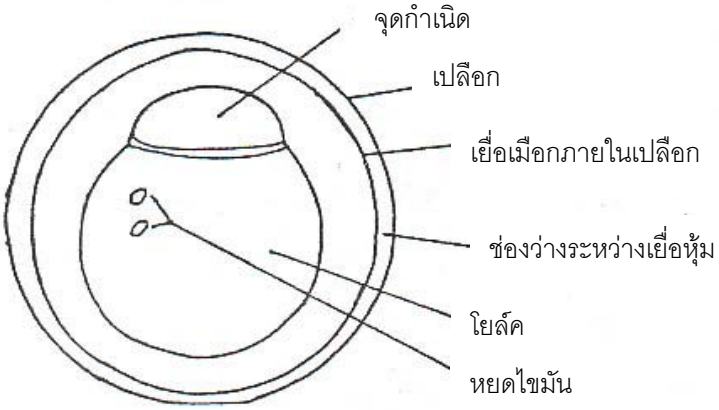
มีปลายด้านหนึ่งติดกับท่อนำไข่ (oviduct) เพื่อใช้สำหรับปล่อยไข่ออกไป เมื่อไข่แก่พร้อมสำหรับการผสมพันธุ์แล้วจะเคลื่อนตามท่อมารวมที่ urogenital pore แล้วจึงออกสู่ภายนอกตัวปลา

ผนังรังไข่ด้านนอกมีชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) หุ้มไว้โดยรอบเรียกว่า tunica albuginea ภายในรังไข่มีชั้นเยอร์มินัลอิพิธีเลียม (germinal epithelium) บุโดยรอบมีลักษณะเป็นหลืบยื่นออกจากผนังมาสู่กึ่งกลางรังไข่เรียกว่า ovigerous fold ภายในหลืบนี้มีเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น (primordial germ cell) ซึ่งจะเจริญเป็นโอโอโกเนียต่อไป และเมื่อกระบวนการสร้างไข่เริ่มเกิดขึ้นเซลล์ของเยอร์มินัลอิพิธีเลียมจะเจริญมาล้อมรอบโอโอโกเนียกลายเป็นโครงสร้างของฟอลลิเคิล (follicle)

1.2.3 การสร้างไข่ (Oogenesis) และลักษณะของไข่

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ เรียกว่า oogenesis เซลล์ไข่เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในตัวปลา ในขณะที่สร้างไข่ เนื้อเยื่อเซลล์ผิว หรือ granulosa จะใช้อาหารที่เก็บไว้เป็นจำนวนมากในรูปของเม็ดโยล์ค (granular yolk) ซึ่งเป็นโปรตีนและไขมันที่อยู่ในรูปของหยดน้ำมัน จำนวนของไข่ที่สร้างจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของปลา อายุ ขนาด และอาหาร รวมทั้งฤดูกาลและอุณหภูมิด้วย ปลาที่มีการดูแลลูกอ่อนจะมีจำนวนไข่น้อยกว่าปลาที่ปล่อยไข่ให้อยู่ตามธรรมชาติ จำนวนไข่ปลาในการตั้งท้องแต่ละครั้ง เรียกว่า fecundity ขนาดของไข่ปลาขึ้นกับขนาดของแม่ปลาและพันธุ์ปลา ถ้าแม่ปลามีขนาดใหญ่ไข่ก็มีขนาดใหญ่ตามไปด้วย

ไข่ปลาส่วนมากมีลักษณะกลม บางชนิดอาจเป็นรูปรี หรือ คล้ายหยดน้ำ โดยทั่ว ๆ ไปเมื่อไข่สุกแล้วจะมีเยื่อบาง ๆ ห่อหุ้มอยู่ ถ้าเป็นปลาที่ออกลูกเป็นไข่จะมีต่อมสร้างเปลือกไข่หุ้มรอบไข่ที่เจริญเต็มที่แล้วจะมีรูเปิดเล็ก ๆ เรียกว่า ไมโครไพล์ (micropyle) อยู่ตรง polar body ซึ่งช่องนี้เป็นช่องที่ให้น้ำเข้า ทำให้เปลือกไข่พองออก ถ้าไข่ถูกผสมแล้ว ไมโครไพล์จะปิดทำให้น้ำเข้าไม่ได้ แต่ยังมีการแพร่ (diffusion) ระหว่างน้ำและก๊าซในบริเวณรอบ ๆ ไข่ เปลือกไข่ที่ถูกน้ำจะแข็งขึ้น แต่ถ้าเป็นไข่ที่เจริญในตัวแม่เปลือกจะไม่แข็ง โดยที่ไข่ปลาแต่ละฟองประกอบด้วยสิ่งต่อไปนี้คือ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 องค์ประกอบของไข่ในปลาชนิดต่าง ๆ (วิมล เหมะจันทร, 2540)

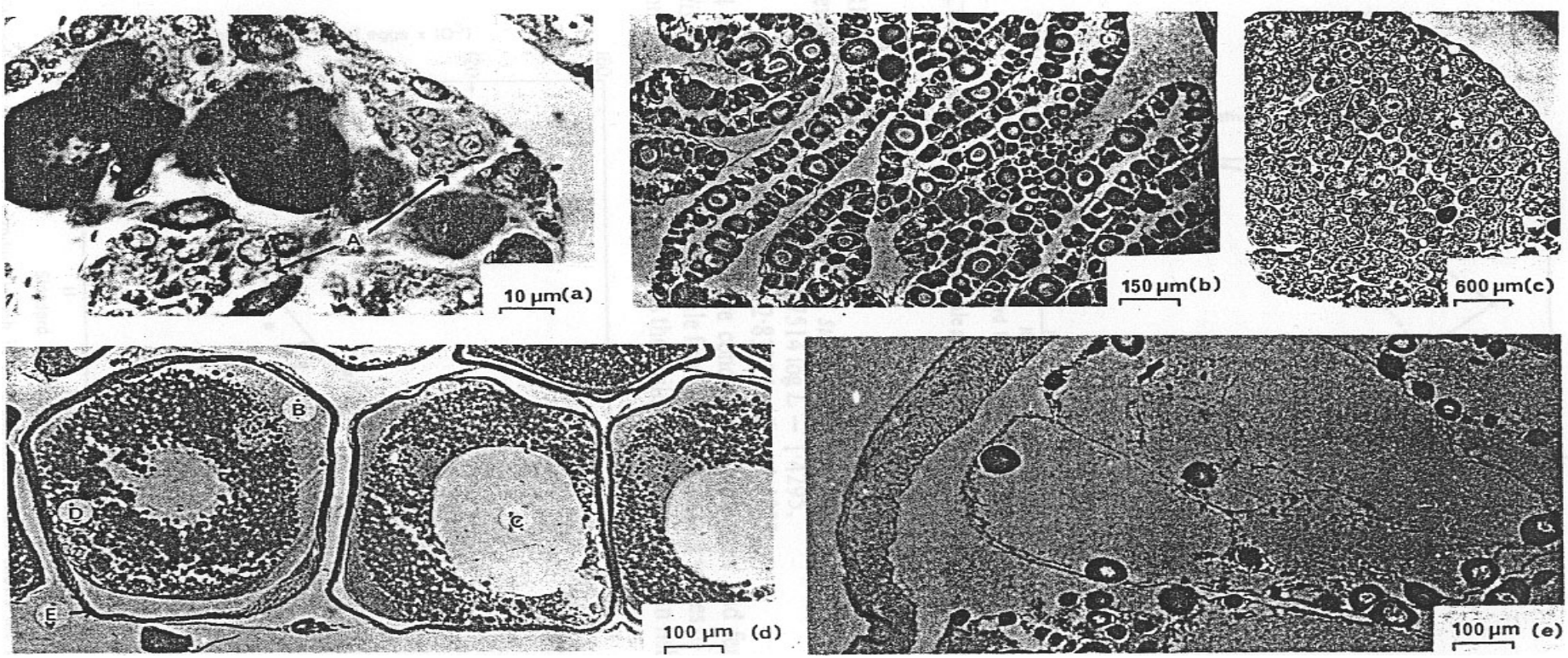
1.2.3.1 เปลือกไข่ (egg shell หรือ egg capsule) เป็นเยื่อบาง ๆ อยู่ชั้นนอกและชั้นรองอาจจะเรียกว่า chorion ไข่ปลาที่เติบโตในน้ำจะมีเปลือกที่ไม่แข็ง แต่มักมีวุ้นหรือเมือกเหนียวล้อมอยู่รอบ ๆ

1.2.3.2 perivitelline space คือช่องเก็บน้ำหรือไข่ขาว ช่วยในการลอยตัวของไข่ที่อยู่ภายในทำให้ไข่หมุนได้รอบ ๆ

1.2.3.3 ไซโทพลาซึม (cytoplasm) คือส่วนของตัวไข่มี perivitelline membrane หุ้มอยู่รอบ ๆ โดยที่ภายในจะมีโยล์คและจุดกำเนิด

1.2.3.4 จุดกำเนิด (original disc หรือ blastodisc) อยู่ติดกับเยื่อหุ้มด้านไซโทพลาซึม (cytoplasmic membrane) ตอนใดตอนหนึ่งที่ค่อนข้างจะหนาทึบกว่าส่วนอื่นๆ ภายในมีนิวเคลียส (nucleus) ที่มีโครโมโซมสำหรับถ่ายทอดลักษณะของแม่ปลาไปสู่ลูกปลา

1.2.3.5 โยล์ค อยู่ใต้จุดกำเนิด เป็นที่เก็บสะสมอาหารสำหรับ ตัวอ่อนภายในอาจจะมีหยดไขมันสะสมอยู่ และมีโปรตีนโยล์คที่ได้จากไวเทลโลจีนินในเลือดซึ่งถูกสังเคราะห์โดยตับเมื่อมีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol) ในเลือดสูง



รูปที่ 3 ขั้นตอนการเจริญพันธุ์ของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของปลากระบอกดำ (*Lisa subviridis*) (Chan and Chua, 1980)
(a) ขั้นที่ 1 (b) ขั้นที่ 2 และ 3 (c) ขั้นที่ 4 และ 5 (d) ขั้นที่ 6 (e) ขั้นที่ 7 โดยที่ (a) ถึง (c) ย้อมด้วยสี Delafield's haematoxylin และ eosin ขณะที่ (d) และ(e) ย้อมด้วยสี Mallory Heidenhain. A คือ nests of chromatin-nucleolus oocyte, B คือ eccentric nucleus of ripe oocyte, C คือ centric oil globule, D คือ yolk globule และ E คือ oolema

นอกจากนี้ฟอลลิเคิลมีท่อเล็ก ๆ ทอดผ่านโซนาเรดิเอตาไปสู่ไซโทพลาซึมของโอโอไซท์ ซึ่งเป็นทางผ่านของสารอาหารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ ส่วนชั้นธีคาและแกรนูโลซามีเบสเมนท์เมมเบรน (basement membrane) กั้นกลาง (Guraya, 1979) ทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมนเพศ (sex hormone) โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งมีหน้าที่โดยตรงต่อกระบวนการสร้างและสะสมโยล์ค (Goetz, 1983) จนกระทั่งโอโอไซท์สิ้นสุดการสะสมโยล์ค ซึ่งระยะนี้โอโอไซท์จะมีนิวเคลียสหรือเรียกว่า เยอร์มินัลเวซิเคิล (germinal vesicle) ขนาดใหญ่อยู่กึ่งกลางเซลล์หรืออยู่กึ่งกลางระหว่างจุดศูนย์กลางกับขอบเซลล์ และไมโครไพล์จะเกิดขึ้นทางเอนิมัลโพล (animal pole) ขณะที่เยอร์มินัลเวซิเคิลค่อย ๆ เคลื่อนที่ไปทางเอนิมัลโพลและผนังของนิวเคลียสจะสลายไปเรียกระยะนี้ว่า การสลายของเยอร์มินัลเวซิเคิล (germinal vesicle breakdown) เป็นการสิ้นสุดการเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์กลายเป็นไข่อย่างสมบูรณ์ (Craik and Harvey, 1984a)

การเจริญพันธุ์ของรังไข่ที่ศึกษาในปลากระบอกดำ (Chan and Chua, 1980) สามารถแบ่งออกขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อวัยวะสืบพันธุ์ยังมีขนาดเล็กมาก มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายอยู่ใกล้หรือแนบติดกับกระดูกสันหลัง มีความโปร่งแสง ส่วนมากมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า เรียกระยะนี้ว่า virgin (รูปที่ 3a)

ขั้นที่ 2 มีการโป่งออกของอวัยวะสืบพันธุ์ มีความโปร่งใสหรือมีสีแดงเทา มีความยาวประมาณครึ่งหนึ่งหรือมากกว่าครึ่งหนึ่งของช่องท้อง มองเห็นได้โดยใช้เลนส์ขยาย เรียกระยะนี้ว่า developing virgin หรือ recovering spent (รูปที่ 3b)

ขั้นที่ 3 อวัยวะสืบพันธุ์มีสีแดงส้มและสีขุ่น มีเส้นเลือดฝอยมาหล่อเลี้ยง สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจน และสามารถเห็นไข่เป็นเม็ดสีขาวด้วยตาเปล่า เรียกระยะนี้ว่า maturing (รูปที่ 3b)

ขั้นที่ 4 รังไข่มีสีเหลือง สามารถเห็นไข่เป็นเม็ดได้อย่างชัดเจน รังไข่มีการขยายใหญ่ยาวประมาณ 2 ใน 3 ของช่องท้อง และมีลักษณะเป็นทรงกระบอก เรียกระยะนี้ว่า mature (รูปที่ 3c)

ขั้นที่ 5 รังไข่มีการขยายใหญ่ยาวเต็มช่องท้อง สามารถเห็นไข่เป็นเม็ดกลมสีขุ่นซึ่งบรรจุเต็มไปด้วยโยล์ค เรียกระยะนี้ว่า gravid (รูปที่ 3c)

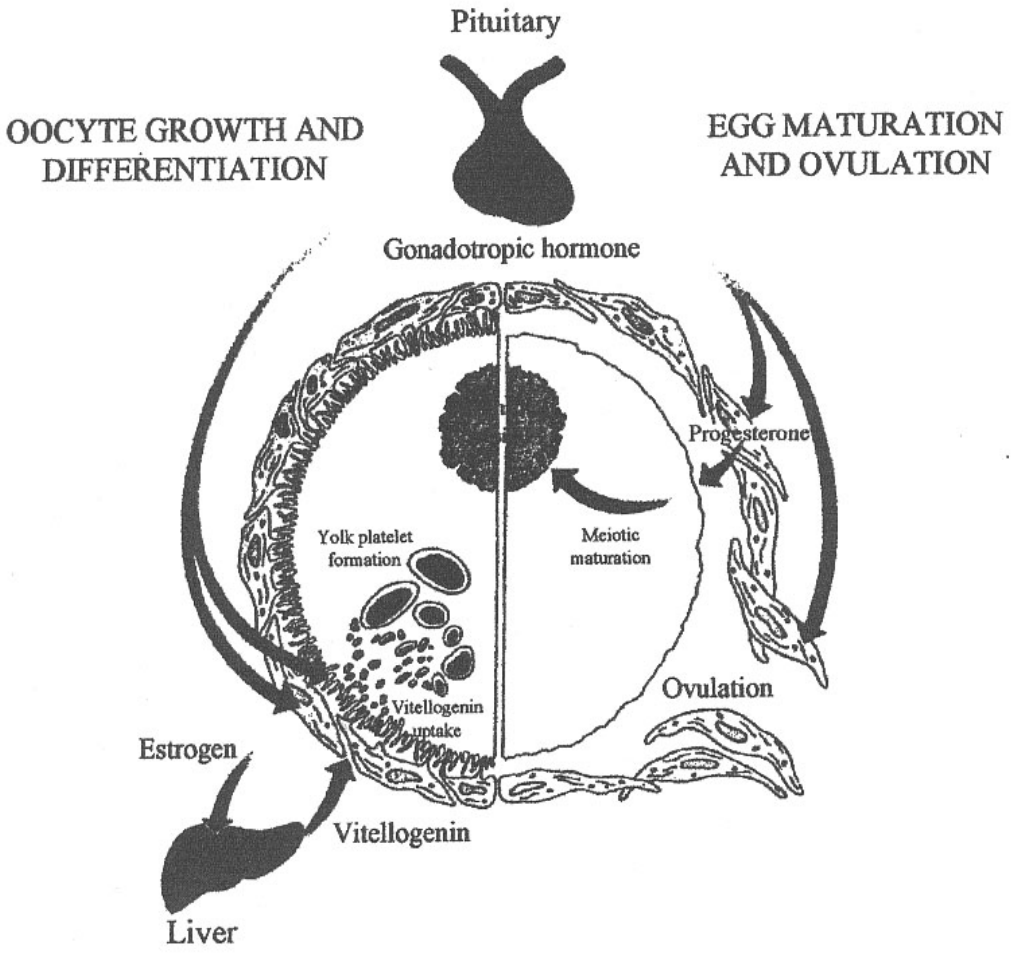
ขั้นที่ 6 ไข่เกือบทั้งหมดมีความโปร่งใส และเมื่อรีดเบา ๆ ไข่จะไหลพุ่งออกมา ช่วงนี้อวัยวะสืบพันธุ์ลดน้ำหนักลงจนถึงระดับที่ไข่ถูกปล่อยไปจนหมด เรียกระยะนี้ว่า ระยะวางไข่ (spawning) (รูปที่ 3d)

ขั้นที่ 7 เป็นระยะพัก รังไข่จะฝ่อตัว อาจจะมีส่วนของเซลล์สืบพันธุ์เหลืออยู่บ้างหรือไม่มีเลย เรียกระยะนี้ว่า spent (รูปที่ 3e)

1.3 ฮอร์โมนที่ควบคุมกระบวนการสร้างไวเทลโลจีนิน

ต่อมเพศ (sex gland) สร้างฮอร์โมนเพศ ได้แก่ androgenic hormone ในเพศผู้ และ estrogenic hormone ในเพศเมีย ฮอร์โมนมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ ลักษณะทางเพศขั้นที่สอง (secondary sex characters) และการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ฮอร์โมนเหล่านี้เกิดจากเซลล์พิเศษในรังไข่และอัณฑะซึ่งควบคุมโดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) หากขาดฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจะมีผลทำให้การเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์หยุดชะงักทั้งการเปลี่ยนแปลงจากวัยเยาว์ไปสู่ตัวโตเต็มวัยและวงจรการวางไข่ ฮอร์โมนที่ได้จากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ luteinizing hormone (LH) และ follicle stimulating hormone (FSH) ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และเกิดลักษณะทางเพศขั้นที่สอง

เนื่องจากการสร้างไข่เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของปลาเพศเมีย โดยการควบคุมของฮอร์โมนควบคุม (regulating hormone) (de Vlaming, 1974) (รูปที่4) ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่สร้างจาก meso-adenohypophysis ในต่อมใต้สมองที่หลั่งออกมาจะไปตามกระแสเลือดสู่รังไข่ มีผลกระตุ้นให้เกิดพัฒนาการเจริญพันธุ์ของโอโอไซท์ และยังมีผลกระตุ้นเซลล์ฟอลลิเคิล (follicle cell) ให้สังเคราะห์เอสโตรเจน (Nagler and Idler, 1992) ซึ่งเป็นเอสตราไดออลปฐมภูมิ (primarily estradiol) บทบาทของเอสตราไดออลคือการกระตุ้นให้ตับสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน (Emmersen and Petersen,1976; Wallace, 1985)



รูปที่ 4 กระบวนการควบคุมพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่และการสร้างไวเทลโลจีนินโดยฮอร์โมน (Nicolas, 1999)

นอกเหนือจากฮอร์โมนเอสโตรเจนแล้ว พบว่ากลุ่มสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนหรือสารแปลกปลอมทางชีวภาพที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม เรียกว่า ซีโนเอสโตรเจน (xenoestrogen) และซีโนไบโอติก (xenobiotic) เป็นกลุ่มสารเคมีสังเคราะห์ที่ทำหน้าที่เหมือนเอสโตรเจนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ สารเคมีกลุ่มยาปราบศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) สารซักฟอก (detergent) อัลคิลฟีนอล (alkyl phenol) ไดออกซิน (dioxin) ยารักษาโรค และน้ำมันเชื้อเพลิง สารเหล่านี้มีผลต่าง ๆ ต่อสิ่งมีชีวิต เช่น สามารถจับกับตัวรับ (receptor) ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์มะเร็งปอดของคน (Folmar *et al*., 2000) บ่งชี้ว่าสารซีโนไบโอติกมีผลต่อการเกิดมะเร็งได้ อีกทั้งยังมีผลต่อการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้ในสัตว์น้ำ เช่น จากการทดลองถึงผลของสาร nonylphenol ต่อปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่าสารนี้มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน (gene) สำหรับสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินในตับในระยะเวลา 3-10 วัน หลังการฉีดสาร nonylphenol ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเข้าสู่ปลาเรนโบว์เทราท์ทั้งเพศผู้และเมีย (Arukwe *et al*., 2002) สำหรับผลของสาร carbofuran ต่อปลาดุกอัฟริกัน (*Heteropneustes fossilis*) ที่จัดอยู่ในกลุ่มปลาดุก (catfish) พบว่าหลังการให้สาร carbofuran เป็นเวลา 30 วัน ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับของไวเทลโลจีนินในซีรัม (serum) และรังไข่ของปลาระยะก่อนการวางไข่ (Chatterjee *et al*., 2001) และ Ishibashi และคณะ (2001) ทดลองผลของสาร bisphenol A ต่อปลาทอง (goldfish, *Carassius auratus*) โดยพบว่าปลาทองเพศผู้ที่ได้รับสาร bisphenol A ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร นาน 28 วัน สามารถสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้ 201 ± 90 และ 104,552 ± 24,920 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงใช้การวัดระดับไวเทลโลจีนินในปลาเพศผู้เพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนของสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในแหล่งน้ำ เนื่องจากในภาวะปกติปลาเพศผู้ไม่สังเคราะห์ไวเทลโลจีนินซึ่งเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในเพศเมีย (female specific protein) (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538; Takemura and Kim, 2001)

1.4 ไวเทลโลจีนิน

ไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีนตั้งต้นของโยล์คในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ออกลูกเป็นไข่ ได้แก่ แมลง (insect) (Pan *et al*., 1969) อาร์โทรปอด (arthropod) (Lui and O'Connor, 1977) นีมาโทด (nematode) (Klass *et al*., 1979) หอยเม่นทะเล (sea urchin) (Amant *et al*., 1986) ปลา (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996; Roubal *et al*., 1997; Nicolas, 1999) สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Rudack and Wallace, 1968) และสัตว์ปีก (Greengard *et al*., 1964) สัตว์มีกระดูกสันหลังมีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินโดยตับ (Mommsen and Walsh, 1988) ภายใต้การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล (Hara and Hirai, 1978) หลังจากไวเทลโลจีนินหลั่งออกจากตับจะถูกขนถ่ายทางกระแสเลือดไปยังโอโอไซท์ที่กำลังเติบโตในรังไข่ ไวเทลโลจีนินถูกนำเข้าโอโอไซท์ด้วยกระบวนการ receptor-mediated endocytosis (Opresko and Wiley, 1987a,b) แล้วมีการย่อยไปเป็นโปรตีนโยล์ค คือ ลิโพไวเทลลิน (lipovitellin) และฟอสไวทิน (phosvitin) ซึ่งขั้นตอนข้างต้นเกิดขึ้นระหว่างการเจริญพันธุ์ของรังไข่ การเก็บสะสมโปรตีนโยล์คเกิดขึ้นเพื่อใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (Follett and Redshaw, 1974; Wallace, 1978; Korsgaard and Petersen, 1979; Byrne *et al*., 1989) โดยปกติสามารถพบไวเทลโลจีนินในเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ (mature female) และไม่พบหรือพบในระดับที่ต่ำมากในเพศผู้ (male) หรือเพศเมียที่ยังเจริญไม่เต็มวัย (immature female) เช่นที่พบในปลากะรัง (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538) แต่ในเพศผู้สามารถเกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้เมื่อมีการกระตุ้นโดยการฉีดเอสโตรเจน (de Vlaming *et al*., 1980; van Boheman and Lambert, 1981)

ไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีขนาดตั้งแต่ 220 ถึง 600 กิโลดัลตัน ตามชนิดของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน อาจประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) หลายสายหรือหน่วยย่อย (subunit) รวมกันเป็นโปรตีนเชิงซ้อน (complex protein) เช่น การทำ Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (Nondenaturing PAGE) พบว่าไวเทลโลจีนินของปลาทอง (*C. auratus*) มีน้ำหนัก

โมเลกุล 380 กิโลดัลตัน (de Vlaming *et al*., 1980) ไวเทลโลจีนินของปลา white perch (*M. americana*) มีน้ำหนักโมเลกุล 340 กิโลดัลตัน (Tao *et al*., 1996) ไวเทลโลจีนินของปลากะพง (striped bass, *Morone saxatilis*) มีน้ำหนักโมเลกุล 425 กิโลดัลตัน (Tao *et al*., 1996) และจากการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน (gel filtration chromatography) พบว่า ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ (*O. mykiss*) มีน้ำหนักโมเลกุล 442 กิโลดัลตัน (Brion *et al*., 2000) ไวเทลโลจีนินของปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) มีน้ำหนักโมเลกุล 370 และ 220 กิโลดัลตัน (Takemura and Kim, 2001) เป็นต้น

ไวเทลโลจีนินในพลาสมาโดยทั่วไปประกอบด้วยปริมาณที่แตกต่างกันของหมู่ฟอสเฟตที่จับอยู่กับกรดอะมิโน serine ในสายโพลีเปปไทด์ มีไขมันเป็นองค์ประกอบ และไวเทลโลจีนินในสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีคาร์โบไฮเดรตจับอยู่ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) จึงนิยามว่า ไวเทลโลจีนินเป็นฟอสโฟลิโพไกลโคโปรตีน (phospho-lipoglycoprotein) จากการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในไวเทลโลจีนิน พบว่ากรดอะมิโน alanine, glutamine, leucine และ lysine มีปริมาณมากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดพบว่าสายโพลีเปปไทด์ของไวเทลโลจีนินจะถูกเติมด้วยฟอสเฟตและคาร์โบไฮเดรต (Ansari *et al*., 1971; Emmersen and Petersen, 1979; Korsgaard and Petersen, 1979) แล้วเชื่อมกับไขมันก่อนที่จะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด ในปลาดุก (Bradley and Grizzle, 1989) และปลานิล (Chan *et al*., 1991) พบว่าไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดียว ส่วนปลาทอง (de Vlaming *et al*., 1980) และปลาไหลญี่ปุ่น (Japanese eel) (Hara *et al*., 1980) ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หลายสาย

ไวเทลโลจีนินมีสมบัติเป็นแอนติเจน (antigen) ที่ดีมาก เมื่อหาความสัมพันธ์ของไวเทลโลจีนินในพลาสมากับโปรตีนโยล์ค พบว่าโปรตีนโยล์คเกิดปฏิกิริยา (cross reactivity) กับแอนติบอดี (antibody) ต่อพลาสมาไวเทลโลจีนินได้ (Wallace and Begovac, 1985; Utarabhand and Bunlipatanon, 1996; พีรพงษ์ พึ่งแย้ม, 2545)

และสามารถนำแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินมาประยุกต์ใช้โดยอาศัยหลักการทาง immunoassay

1.4.1 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

Wiley และคณะ (1979) ทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของกบ (*Xenopus laevis*) โดยการตกตะกอนไวเทลโลจีนินด้วย 20 mM EDTA (ethylene-diaminetetraacetic acid) และ 0.5 M $MgCl_2$ แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 M NaCl จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Cellulose ส่วน Norberg และ Haux (1985) ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ (*Salmo gairdneri*) และปลาซีเทราท์ (sea trout, *Salmo trutta*) บริสุทธิ์เช่นเดียวกัน โดยการตกตะกอนด้วย 20 mM EDTA ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7 และ 0.5 M $MgCl_2$ จากนั้นละลายตะกอนแล้วแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลาเทราท์ทั้งสองชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 440 กิโลดัลตัน และ Brown และคณะ (1997) ทำให้ไวเทลโลจีนินของ tuatara (*Sphenodon punctatus*) บริสุทธิ์จากพลาสมาของสัตว์เลื้อยคลานชนิดนี้ที่ถูกกระตุ้นการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน

Riazi และ Fremont (1988) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ (*S. gairdneri*) บริสุทธิ์โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง (ultracentrifugation) ที่ความเร็ว 150,000 x g นาน 24 และ 72 ชั่วโมง พบไวเทลโลจีนินมีค่าความหนาแน่นในการลอยตัว (density of floatation) เท่ากับ 1.28 กรัมต่อมิลลิลิตร และพีรพงษ์ พึ่งแย้ม (2545) ได้ทำการแยกไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ (*L. subviridis*) โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงที่ความเร็ว 14,433 x g นาน 18 ชั่วโมง พบว่าไวเทลโลจีนินอยู่ในสารละลาย KBr ที่ความหนาแน่น (d, density) เท่ากับ 1.23 กรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปแยกไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR

Utarabhand และ Bunlipatanon (1996) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล (17β-estradiol) บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จากการชะด้วย NaCl ที่เพิ่ม

ความเข้มข้นแบบต่อเนื่อง (linear gradient) จาก 0-0.5 M พบว่าไวเทลโลจีนินถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 0.25 M NaCl แล้วนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 แยกได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ขณะที่ Heppell และ Sullivan (1999) ได้แยกไวเทลโลจีนินของปลา gag (*Mycteroperca microlepis*) ซึ่งเป็นปลาวงศ์เดียวกับปลากะรังให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียวโดยคอลัมน์ DEAE-agarose ซึ่งไวเทลโลจีนินถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 0.25-0.30 M NaCl

Takemura และ Teruya (1997) นำพลาสมาของปลา coral trout (*Plectropomus leopardus*) ผ่านคอลัมน์ hydroxylapatite เนื่องจากไวเทลโลจีนินมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบที่เป็นน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ กลูโคส (glucose) หรือ แมนโนส (mannose) จากนั้นจึงนำไปผ่านคอลัมน์ Sephacyl S-300 ได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ขนาด 350 กิโลดัลตัน ทำนองเดียวกันกับ Hashimoto และคณะ (2000) ทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลา barfin flounder และ Fukada และคณะ (2003) ทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลาคาร์พ (carp, *Cyprinus carpio*) โดยผ่านคอลัมน์ hydroxylapatite และคอลัมน์ Superose 6B

1.4.2 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

ไวเทลโลจีนินและลิโพไวเทลลินเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ มีสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดี เหมาะสำหรับการสังเคราะห์แอนติบอดีเพื่อประยุกต์ใช้ทาง immunoassay เช่น การวัดระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาเรนโบว์เทราท์เพศเมียเพื่อศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ด้วย ELISA (Bon *et al.*, 1997) หรือการวัดความเข้มข้นของไวเทลโลจีนินในซีรัมของปลา flounder (*Pleuronectes yokohamae*) เพศผู้ เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในทะเล (Hashimoto *et al.*, 2000) เป็นต้น ซึ่งอาจใช้อยู่ในรูปแอนติบอดีชนิดโพลีโคลนอล (polyclonal antibody) ซึ่ง Rodriguez และคณะ (1989) กระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาลิ้นหมา (sole, *Solea vulgaris*) ด้วยการนำไวเทลโลจีนินปริมาตร 500 ไมโครลิตร (500 ไมโครกรัม) ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย

EDTA และ Mg^{2+} ผสมกับ Freund's complete adjuvant ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณหลังของกระต่าย 20 จุดที่แตกต่างกัน ต่อจากนั้นฉีดซ้ำอีก 4 ครั้ง ทุกสัปดาห์ จึงฉีดซ้ำโดยใช้ระยะเวลาห่างกัน 15 วัน อีก 2 ครั้ง จะได้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาลิ้นหมา ซึ่งตรวจสอบการสังเคราะห์แอนติบอดีโดย radial immunodiffusion ใน 1.5% agarose gel พบว่ามีการสังเคราะห์แอนติบอดีที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินและพลาสมาของปลาลิ้นหมาเพศเมียเต็มวัย แต่ไม่เกิดกับพลาสมาของปลาเพศผู้ และ Mañanós และคณะ (1994a,b) นำไวเทลโลจีนินของปลากะพง (*Dicentrachus labrax* L.) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant (1:1) ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังของกระต่าย จึงฉีดซ้ำอีก 4 ครั้ง ทุกสัปดาห์ และฉีดทุก 2 สัปดาห์ อีก 4 ครั้ง จึงเก็บเลือดเพื่อแยกแอนติบอดี เมื่อนำไปทดสอบ พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เป็นอย่างดีกับไวเทลโลจีนินของปลากะพง ขณะที่ Yao และ Crim (1996) นำไวเทลโลจีนินจากปลาโอเชียนเพาท์ (ocean pout, *Macrozoarces americanus* L.) ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังของกระต่ายขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ (white New Zealand rabbit) ที่มีน้ำหนักตัว 2-3 กิโลกรัม หลังจากนั้น 1 เดือน จึงฉีดซ้ำด้วยไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant จำนวน 2 ครั้ง เว้นระยะเวลาครั้งละ 1-1.5 เดือน หลังการฉีดกระต่ายครั้งสุดท้ายเป็นระยะเวลา 1 เดือน เจาะเลือดกระต่ายเพื่อแยกแอนติบอดีที่ใช้สำหรับทำ radioimmunoassay ติดตามไวเทลโลจีนินของปลาโอเชียนเพาท์, lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) และ Atlantic cod (*Gadus morhua*) พบว่า แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาโอเชียนเพาท์เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาโอเชียนเพาท์เท่านั้น ส่วน Utarabhand และ Bunlipatanon (1996) ใช้ไวเทลโลจีนินของปลากะรัง (*E. malabaricus*) ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังของกระต่ายขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ 4-5 จุด ฉีดซ้ำด้วยไวเทลโลจีนินปริมาณ 1 มิลลิกรัม ทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง และฉีดครั้งสุดท้ายด้วยไวเทลโลจีนินปริมาณ 0.5 มิลลิกรัม พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังหลังการฉีดด้วยไวเทลโล

จีนินครั้งแรก และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีด และ Fenske และคณะ (2001) นำไวเทลโลจีนินจากปลาม้าลาย (zebrafish, *Danio rerio* Hamilton-Buchanan) 100 ไมโครกรัมใน Freund's complete adjuvant ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังกระต่าย หลังจากนั้นใช้ไวเทลโลจีนิน 30 ไมโครกรัมที่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ฉีดในวันที่ 14, 28 และ 56 ทำการฆ่ากระต่ายในวันที่ 80 เพื่อนำเลือดไปแยกแอนติบอดี ในขณะที่พีรพงษ์ พึ่งแย้ม (2545) นำไวเทลโลจีนิน บริสุทธิ์ของปลากระบอกดำ 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังของกระต่ายขาว 2-3 จุด และในผิวหนัง (intradermal) 3-4 จุด ทุกสัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ฉีดด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 20 ไมโครกรัมที่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากระบอกดำหลังการฉีดด้วยไวเทลโลจีนินครั้งที่ 2 และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีด ซึ่งสามารถนำแอนติบอดีที่ได้ไปใช้ในการทำ Western blot และ ELISA ได้เป็นอย่างดี

สำหรับการใช้ในรูปแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (monoclonal antibody) ได้แก่ การทดลองของ Goodwin และคณะ (1992) ฉีดไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ปริมาณ 30 ไมโครกรัมที่ผสมกับ Freund's complete adjuvant เข้าใต้ชั้นผิวหนังของหนูพันธุ์ Balb/c ฉีดซ้ำอีก 2 ครั้ง ทุก 2 สัปดาห์ ด้วยไวเทลโลจีนิน 30 ไมโครกรัมที่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant และก่อนทำการฆ่าหนู 3 วัน ฉีดไวเทลโลจีนิน 50 ไมโครกรัม เมื่อฆ่าหนูแล้ว นำเซลล์ม้าม (spleen cells) ของหนูไปเชื่อม (fuse) กับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง (myeloma cell line) แล้วคัดเลือกเอาเซลล์ที่เกิดไฮบริด (spleen-myeloma hybrid cell) ไปเพาะเลี้ยงเพื่อให้สังเคราะห์แอนติบอดี ซึ่งตรวจสอบการสังเคราะห์แอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA และตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีโดย Western blot พบว่าแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนขนาด 150 กิโลดัลตัน ในพลาสมาปลาเพศผู้ที่ถูกฉีดด้วยเอสตราไดออล แต่ไม่พบในปลาเพศผู้กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ถูกฉีดฮอร์โมน ขณะที่ Kordes และคณะ (2002) ใช้ลิโพไวเทลลินบริสุทธิ์ของปลาเมดากา (medaka,

Oryzias tatipes) ปริมาณ 220 ไมโครกรัม ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังของหนูพันธุ์ Balb/c x Black 57 จำนวน 3 ครั้ง รวมระยะเวลา 7 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 3 วัน จึงฆ่าหนูเพื่อนำเซลล์ม้ามของหนูไปเชื่อมกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง แล้วคัดเลือกเอาเซลล์ที่เกิดไฮบริดไปเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล จากการทดสอบพบว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยากับลิโพไวเทลลินของปลาเมดากา และสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนิน และโปรตีนโยล์คที่ไม่ได้ทำบริสุทธิ์ของปลาเมดากา โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับเลือดของปลาเพศผู้

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินหรือลิโพไวเทลลินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา มีความจำเพาะสูงมากต่อไวเทลโลจีนินและลิโพไวเทลลินของปลาชนิดนั้น ๆ เช่น แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาโอเชียนเพาท์เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาโอเชียนเพาท์เท่านั้น (Yao and Crim, 1996) แต่มีแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินหรือลิโพไวเทลลินของปลาบางชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาชนิดอื่นได้ เช่น แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาแซลมอน (salmon, *Salmo salar*) สามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ (*O. mykiss*) (Watts *et al*., 2003) และแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาไน (*C. carpio*) สามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลา fathead minnow (*Pimephales promeles*) ได้ (Mylchreest *et al*., 2003) หรือแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาในวงศ์เดียวกัน รวมทั้งปลากระบอกดำได้ด้วย (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538; พีรพงษ์ พึ่งแย้ม, 2545)

1.5 **ตัวรับไวเทลโลจีนิน** (Vitellogenin receptor)

สัตว์ออกลูกเป็นไข่มีกระบวนการที่สำคัญคือ receptor mediated endo-cytosis เพื่อนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ไข่และสะสมในรูปของโปรตีนโยล์ค ซึ่งมีผลต่อพัฒนาการเจริญพันธุ์ของโอโอไซท์ ตัวรับไวเทลโลจีนินที่อยู่บริเวณผิวเซลล์โอโอไซท์จะมีปริมาณและความสามารถในการจับจำเพาะแปรผันตามปริมาณของไวเทลโลจีนินในพลาสมา จากการทดลองของ Dhadialla และคณะ (1992) พบว่าตัวรับไวเทลโลจีนิน

ของยุง (mosquito, *Aedes aegypti*) มีการจับจำเพาะต่อไวเทลโลจีนินและมีบริเวณจับ (binding site) เพียงแห่งเดียว และเมื่อทดลองโดยการใช้สาร suramin ซึ่งเป็นสารโพลีซัลเฟตโพลีไซคลิกไฮโดรคาร์บอน (polysulphated polycyclic hydrocarbon) ที่มีผลลดการจับกันระหว่างตัวรับกับสารลิแกนด์ (ligand) หลายชนิด เช่น low density lipoprotein (LDL) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ไวเทลโลจีนินของไก่ ไวเทลโลจีนินของแมลงสาบ (cockroach) และตั๊กแตน (locust) เป็นต้น การทดลองโดยบ่มตัวรับกับไวเทลโลจีนินของยุงเป็นเวลา 10-20 นาที ทำให้เกิดการจับกันระหว่างตัวรับและไวเทลโลจีนิน เมื่อเติมสาร suramin ที่มีความเข้มข้น 5 mM บ่มเป็นเวลา 30 หรือ 70 นาที พบว่าปริมาณของไวเทลโลจีนินที่จับกับตัวรับลดลง แสดงว่าตัวรับไวเทลโลจีนินมีการจับและปล่อยไวเทลโลจีนินออกได้ เพื่อที่จะสามารถนำตัวรับกลับมาใช้ใหม่ได้

ตัวรับไวเทลโลจีนินสามารถพบได้ในสัตว์ต่าง ๆ เช่น ตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโอโอไซท์ของยุง มีขนาด 205 กิโลดัลตัน และมีค่าความจำเพาะของการจับ (K_d) ระหว่างตัวรับกับไวเทลโลจีนินเป็น 26 nM (Dhadialla *et al.*, 1992) และ 15 nM (Sappington *et al.*, 1995) ส่วนตัวรับไวเทลโลจีนินของแมลงสาบ (*Nauphoeta cinerea*) มีค่า K_d ระหว่างตัวรับกับไวเทลโลจีนินเป็น 0.5 μM (König and Lanzrein, 1985) แต่ไม่จับกับไวเทลโลจีนินของแมลงสาบ *Leucophaea maderae* ในขณะที่ตัวรับไวเทลโลจีนินของ *L. maderae* สามารถจับกับไวเทลโลจีนินของ *N. cinerea* ได้ สำหรับตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโอโอไซท์ของกุ้งมังกร (lobster, *Homarus americanus*) ถูกสกัดออกจากเมมเบรนได้อย่างมีประสิทธภาพมากที่สุด โดย 0.1 % sodium deoxycholate (DOC) (Laverdure and Soyez, 1988) และมีค่า K_d ระหว่างตัวรับกับไวเทลลิน (vitellin) เป็น 70 nM

ตัวรับไวเทลโลจีนินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ใน low density lipoprotein receptor (LDLR) gene superfamily ที่มีส่วนประกอบ 5 ส่วน คือ 1) ligand binding domain 2) epidermal growth factor domain 3) *o*-linked sugar domain 4) transmembrane domain และ 5) cytoplasmic domain ตัวรับไวเทลโลจีนินของกบ (Okabashi *et al.*, 1996) และไก่ (Bujo *et al.*, 1995) มีชุดของยีนของ ligand

binding domain เหมือนกับ very low density lipoprotein receptor (VLDLR) มากกว่า LDLR ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นั่นคือ ตัวรับไวเทลโลจีนินมีชุดของยีนของ ligand binding domain จำนวน 8 ซ้ำเหมือนกับ VLDLR ส่วนของ LDLR มีเพียง 7 ซ้ำ

จากการศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินของรังไข่กบ พบว่ามีขนาด 115 กิโลดัลตัน (Stifani *et al*., 1990b) เลือกรับพลาสมาไวเทลโลจีนินได้ดีกว่าพลาสมาโปรตีนชนิดอื่น 5-6 เท่า แสดงให้เห็นว่ารังไข่มีตัวรับที่จำเพาะกับไวเทลโลจีนิน (Wallace *et al*., 1972) ต่อมา Opresko และ Wiley (1987a,b) พบว่าการรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่โอโอไซท์ของกบอาศัยตัวรับ โดยพบว่าการจับระหว่างไวเทลโลจีนินกับตัวรับเป็นการจับแบบไม่ถาวร และความเสถียรของตัวรับไวเทลโลจีนินจะลดลงเมื่อย่อยตัวรับด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ด้วยภาวะที่ไม่รุนแรง (0 °ซ นาน 35 นาที)

ในการสกัดเมมเบรนจากเซลล์โอโอไซท์ของไก่ด้วย octyl-β-D-glucoside แล้วแยกด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) สภาพไม่รีดิวซ์ (nonreduced) หลังการขนถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนโทรเซลลูโลส (nitro-cellulose membrane) ทำการบ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของไก่ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ^{125}I ปรากฏแถบของสารกัมมันตรังสีตรงแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 96 กิโลดัลตัน ซึ่งเป็นแถบตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโอโอไซท์ของไก่ (Stifani *et al*., 1988) เมื่อทำการสกัดเมมเบรนจากเซลล์โอโอไซท์ของไก่ด้วย 1% Triton X-100 แล้วทำต่อวิธีการเดิมแต่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของกบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ^{125}I แทนไวเทลโลจีนินของไก่ ปรากฏแถบสารกัมมันตรังสีตรงกับแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 96 กิโลดัลตัน แต่พบเฉพาะจากการทดลองที่แยกด้วย SDS-PAGE สภาพไม่รีดิวซ์เท่านั้น คณะผู้ทดลองจึงได้สรุปว่า พันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ที่อยู่ระหว่างสายเปปไทด์มีบทบาทสำคัญต่อการทำหน้าที่ของตัวรับไวเทลโลจีนิน (Stifani *et al*., 1990b) เช่นเดียวกับตัวรับลิโพโปรตีน (lipoprotein receptor) ชนิดอื่น ๆ เช่น VLDLR ของไก่ นอกจากนี้พบว่าตัวรับไวเทลโลจีนินของไก่สามารถจับ

กับไวเทลโลจีนินของกบได้ แสดงว่าไวเทลโลจีนินและตัวรับไวเทลโลจีนินของไก่และกบอาจมีสมบัติทางกายภาพที่เหมือนกัน

การศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินในเซลล์โอโอไซท์ของปลาชนิดต่าง ๆ มีดังนี้ Chan และคณะ (1991) ตรวจวัดตัวรับไวเทลโลจีนินจากเมมเบรนของไข่ปลานิลด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ^{125}I โดยวิธี radioimmunoassay พบว่าตัวรับไวเทลโลจีนินจับกับไวเทลโลจีนินอย่างจำเพาะ แต่ไม่จับกับสารสกัดของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้แก่ ตับ สมอง กล้ามเนื้อ ลำไส้ หรืออัณฑะของปลานิล และค่า K_d ระหว่างไวเทลโลจีนินกับตัวรับบนเมมเบรนของโอโอไซท์ระยะก่อนการสะสมไวเทลโลจีนิน ระยะสะสมไวเทลโลจีนิน และระยะก่อนการตกไข่ของปลานิล มีค่า 1.51, 1.07 และ 0.30 μM ตามลำดับ ขณะที่ Lancaster และ Tyler (1994) สกัดเมมเบรนจากโอโอไซท์ของปลาเรนโบว์เทราท์ (*O. mykiss*) ด้วย octyl-β-D-glucopyranoside แล้วทำ ligand blot พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 และ 100 กิโลดัลตัน ที่เกิดปฏิกิริยาของสารกัมมันตรังสี แต่ไม่เกิดกับสารสกัดเนื้อเยื่ออื่น ซึ่งได้สรุปว่าแถบโปรตีนทั้งสองเป็นตัวรับไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ และค่า K_d ระหว่างไวเทลโลจีนินกับตัวรับบนเมมเบรนของโอโอไซท์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 3.0 และ 4.5 มิลลิเมตร มีค่า 1.3, 3.5, 3.2, 2.5, 1.8 และ 1.2 nM ตามลำดับ เช่นเดียวกับของปลา white perch (*M. americana*) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 157 และ 106 กิโลดัลตัน (Tao *et al*., 1996) และมีค่า K_d ระหว่างไวเทลโลจีนินกับตัวรับบนเมมเบรนของโอโอไซท์เท่ากับ 0.4 μM

1.6 การประยุกต์ใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

ได้มีการใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบทาง immunoassay เพื่อใช้ในการตรวจวัดคุณภาพหรือระดับไวเทลโลจีนินและตัวรับไวเทลโลจีนิน อาทิเช่น ใช้วิธี Ouchterlony immunodiffusion ในการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีกับไวเทลโลจีนินของปลาต่างชนิดกัน คือการใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาหมอ (*Oreochromis aureus*) ทดสอบกับไวเทลโลจีนินของปลาไน

(*C. carpio*) ปลาทอง (*C. auratus*) และปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาหมอไม่เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาไนและปลาทองซึ่งเป็นปลาต่างวงศ์กัน แต่เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาหมอเทศซึ่งเป็นปลาในวงศ์เดียวกัน (Ding *et al*., 1989) ขณะที่ Bon และคณะ (1997) ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ (*O. mykiss*) พบว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ พลาสมาของปลาเพศเมียระยะสะสมโปรตีนโยล์ค พลาสมาของปลาเพศผู้ที่ถูกฉีดด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออลและสารสกัดโปรตีนโยล์ค แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลาเพศผู้ปกติ และปลาเพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์ของปลาชนิดเดียวกัน เช่นเดียวกับผลการทดลองของปลากะรัง (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538)

อาจใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินในการวัดระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลาเทราท์โดยวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส (rocket immunoelectrophoresis, RIE) พบว่าปลาเทราท์เพศผู้มีระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาต่ำมากและไม่พบไวเทลโลจีนินในเนื้อเยื่ออื่น เช่น ม้ามและกล้ามเนื้อ (Ding *et al*., 1989) และเป็นวิธีที่ใช้วัดระดับของไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลากะรัง ซึ่งไม่พบไวเทลโลจีนินในปลากะรังเพศผู้หรือในปลาวัยเยาว์ แต่พบเฉพาะในปลากะรังเพศเมียวัยเจริญพันธุ์เท่านั้น (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538)

radioimmunoassay (RIA) เป็นวิธีที่มีความไวสูง โดยอาศัยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินหรือลิโพไวเทลลินที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น So และคณะ (1985) ใช้ไวเทลโลจีนินที่แยกจากพลาสมาของปลาแอตแลนติคแซลมอน (Atlantic salmon)เพื่อพัฒนาวิธี RIA ซึ่งทำให้มีความจำเพาะและความไวในการวัดมากกว่าวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส นอกจากนี้การตรวจหาปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาโดยวิธี chemiluminescent immunoassay พบว่ามีความจำเพาะและความไวสูง ซึ่ง Fukada และคณะ (2003) ทำการวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาไน สามารถวัดได้ในช่วง 1.95-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ELISA เป็นเทคนิคที่มีการวิเคราะห์แบบจับ (binding assay) ซึ่งอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี มีความไวของการวัดในระดับนาโนกรัม (nanogram, ng) และมีความจำเพาะสูง โดยนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีไปติดฉลากด้วยเอนไซม์ (enzyme) แทนการใช้สารกัมมันตรังสี ซึ่งเป็นสารที่มีอันตราย และมีอายุการใช้งานจำกัด หรือติดฉลากกับสารเรืองแสงที่มีความไวสูง แต่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก รวมทั้งสารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพงมาก ดังนั้นเทคนิค ELISA จึงเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณไวเทลโลจีนิน หรือปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนิน เช่น การใช้แอนติบอดีต่อลิโพไวเทลลินของหนอนตัวแบน (tapeworm, *Tenebrio molitor*) วัดปริมาณลิโพไวเทลลินในรังไข่ได้ในระดับไม่เกิน 50 ไมโครกรัม (microgram, μg) เพื่อติดตามการเจริญของไข่พยาธิชนิดนี้ (Webb and Hurd, 1995) และ Tsukimura และคณะ (2000) วัดปริมาณลิโพไวเทลลินในระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ขั้นต่าง ๆ ของกุ้ง ridgeback (*Sicyonia ingentis*) ในช่วง 0-0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ Parks และคณะ (1999) ใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของ fathead minnows วัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาเพศเมียระยะสะสมโปรตีนโยล์ค พลาสมาของปลาเพศผู้ที่ถูกฉีดด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล และสารสกัดโปรตีนโยล์ค พลาสมาของปลาเพศผู้ปกติ และปลาเพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ
2. เพื่อสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ในกระต่าย
3. เพื่อพัฒนาเทคนิค ELISA ที่เหมาะสมในการหาปริมาณไวเทลโลจีนิน
4. เพื่อพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์แบบจับที่เหมาะสมในการศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินในเมมเบรนของเซลล์โอโอไซท์จากปลากระบอกดำ
5. เพื่อศึกษาสมบัติในการจับไวเทลโลจีนินของตัวรับไวเทลโลจีนินในเมมเบรนของโอโอไซท์จากปลากระบอกดำ