

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	25
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ	26
อุปกรณ์	29
วิธีการ	30
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	46
4. สรุป	89
เอกสารอ้างอิง	92
ภาคผนวก	106
ประวัติผู้เขียน	107

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การทำให้ไวเทลดิจีนบริสุทธิ์จากพลาสมา	49
2	การวัดปริมาณไวเทลดิจีนในพลาสมาโดย ELISA	63
3	ค่า $B_{max}$ และ $K_d$ ของปลาบางชนิด	87

## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	องค์ประกอบของไข่ในปลาชนิดต่าง ๆ	7
2	องค์ประกอบของชั้นเซลล์ที่มีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่ปลาเทราท์	8
3	ขั้นตอนการเจริญพันธุ์ของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของปลากระบอกดำ ( <i>Lisa subviridis</i> )	10
4	กระบวนการควบคุมพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่และการสร้าง ไวเทลโลจีนินโดยฮอร์โมน	12
5	แบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลากระบอกดำจากการทำ Nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (A) และจาก Western blot ที่ย้อมด้วย สีอะมิโดแบล็คบี (B) หรือย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ ของปลากระบอกดำ (C)	47
6	แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลูของ พลาสมาหลังการแยกโดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง	48
7	แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลาย $d = 1.24$ จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงและสารละลายพีค S1 ที่ได้จาก คอลัมน์ Superdex 200 HR ซึ่งย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (A) และทำ Western blot (B) ซึ่งย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์	50
8	การแยกไวเทลโลจีนินจากสารละลายรวม $d = 1.24$ ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR	51
9	แบบแผนโปรตีนของสารละลายซึ่งได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR ใน Nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู	52
10	การทำ Dot blot ของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ในซีรัมกระต่าย	54
11	การเจือจางที่เหมาะสมของ $1^\circ\text{Ab}$ ใน ELISA	57
12	การเจือจางที่เหมาะสมของ $2^\circ\text{Ab}$ ใน ELISA	58

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
13	ภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของแอนไชม์เปอร์ออกซิเดส ใน ELISA	59
14	ผลของการขัดขวาง 1°Ab และ 2°Ab ในการจับเพลทด้วย 3% BSA, 3% treated BSA หรือ superbloc (Pierce)	61
15	กราฟมาตรฐานของไวเทลโลจีนิบรีสุทรีใน ELISA	62
16	กราฟมาตรฐานของไวเทลโลจีนิบรีสุทรีในการวัดปริมาณ ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีในพลาสมาโดย ELISA	64
17	การทำ Western blot ของสารสกัดเมมเบรนและสารสกัดรังไข่ เปรียบเทียบระหว่างการย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (A) และสี Ponceau S (B) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรี (C) และการบ่มด้วย ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีแล้วย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรี (D)	67
18	การหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเมมเบรนที่เหมาะสมในการหา ปริมาณของตัวรับไวเทลโลจีนิบรีสุทรี	69
19	การแยก VPC ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR	70
20	การวัดแอกทิวิตีของแอนไชม์เปอร์ออกซิเดสหลังแยก VPC ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR	71
21	กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของ VPC โดยวิธีเจลฟิลเทรชัน	73
22	ปริมาณของ VPC ที่เหมาะสมสำหรับวิธี ELVBA	75
23	ภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของแอนไชม์เปอร์ออกซิเดส ใน VPC สำหรับวิธี ELVBA	76
24	กราฟมาตรฐานของ VPC สำหรับวิธี ELVBA	77
25	ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มในการวัดปริมาณตัวรับ ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA	79

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
26 ผลของ pH ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนิบบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA	81
27 ผลของความเข้มข้นของ $\text{Ca}^{2+}$ ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนิบบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA	82
28 ผลของความเข้มข้นของ $\text{Mg}^{2+}$ ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนิบบนเมมเบรนโดยวิธี ELVBA	83
29 วัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนิบบนเมมเบรนของโอโอไซท์โดยวิธี ELVBA	84
30 Scatchard plot ของการจับระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนิบบนเมมเบรนกับ VPC	86

## ตัวย่อและสัญลักษณ์

$\text{Ab}^{\circ}$	=	องศาเซลเซียส
1 $\text{Ab}^{\circ}$	=	antivitellogenin antibody
2 $\text{Ab}^{\circ}$	=	anti-rabbit Immunoglobulin G (whole molecule) peroxidase conjugate
A	=	absorbance
ACD	=	acid citrate dextrose
$B_{\text{max}}$	=	maximum binding
BSA	=	bovine serum albumin
d	=	density
DAB	=	3,3'-diaminobenzidine
DEAE-agarose	=	diethylaminoethyl-agarose
DEAE-cellulose	=	diethylaminoethyl-cellulose
DEAE-Sephacel	=	diethylaminoethyl-Sephacel
DMSO	=	dimethylsulphoxide
DOC	=	sodium deoxycholate
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
ELVBA	=	enzyme-linked vitellogenin binding assay
FPLC	=	fast protein liquid chromatography
FSH	=	follicle stimulating hormone
$K_{\text{av}}$	=	distribution coefficient
$K_{\text{d}}$	=	dissociation constant

## ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

LDL	=	low density lipoprotein
LDLR	=	low density lipoprotein receptor
LH	=	luteinizing hormone
M	=	molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
$M_r$	=	apparent molecular weight
ng	=	nanogram
nM	=	nanomolar
nondenaturing-PAGE	=	nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis
OPD	=	<i>o</i> -phenylenediamine dihydrochloride
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	=	phosphate buffer saline
pg	=	picogram
pH	=	- log hydrogen ion concentration
PMSF	=	phenylmethylsulphonylfluoride
ppt	=	part per thousand
RIA	=	radioimmunoassay
RIE	=	rocket immunoelectrophoresis

## ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

SDS	=	sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis
TB	=	Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5)
TB-NaCl	=	Tris buffer – 0.5 M NaCl
TB-PMSF	=	Tris buffer- 1 mM PMSF
TBS	=	Tris buffer saline (25 mM Tris-HCl, pH 7.5 – 0.15 M NaCl)
TBS-T20	=	Tris buffer saline - 0.05% Tween 20
TEMED	=	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris	=	tris(hydroxymethyl)aminomethane
$V_e$	=	elution volume
VLDLR	=	very low -density lipoprotein receptor
$V_o$	=	void volume
VPC	=	vitellogenin peroxidase conjugate
$V_t$	=	total volume
x g	=	acceleration ( $\text{cm}/\text{sec}^2$ )
$\mu\text{g}$	=	microgram
$\mu\text{l}$	=	microliter
$\mu\text{M}$	=	micromolar
%	=	percent
$\beta$	=	beta