

4. สรุป

จากการวิเคราะห์สมบัติของไวเทลโลจีนินและตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำในงานวิทยานิพนธ์นี้ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. แบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่และไม่มีไข่ใน nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลูคล้ายกันมากไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างได้

2. แอบบวเทลโลจีนินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 480,000 และ 240,000 ดัลตัน เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระรัง และพบเฉพาะในพลาสมาของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่เท่านั้น จึงใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระรังเป็นตัวติดตามแอบบวเทลโลจีนินในเจลหรือติดตามในขั้นตอนการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ

3. การแยกพลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และแยกสารละลายพีค D3 ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 หรือโดย preparative PAGE ไม่สามารถแยกให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ได้ เนื่องจากยังมีโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ไวเทลโลจีนินปนเปื้อนอยู่

4. การแยกพลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่ด้วย ultracentrifugation ครั้งที่ 1 พบว่าไวเทลโลจีนินถูกแยกออกมาใน KBr ที่ $d=1.23$ มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 367 ไมโครกรัม คิดเป็น 3.7% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น แต่ยังมีสารปนเปื้อนของโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ไวเทลโลจีนิน

5. เมื่อนำสารละลาย $d=1.23$ ที่ได้จากการทำ ultracentrifuge ครั้งที่ 1 ไปแยกต่อโดย ultracentrifugation ครั้งที่ 2, preparative PAGE หรือโดยคอลัมน์ Superdex 200 แยกได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ปริมาณ 195, 140 และ 95 ไมโครกรัม ตามลำดับ คิดเป็น 2.0, 1.4 และ 1.0% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น ตามลำดับ

6. ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 480,000 และ 240,000 ดัลตัน ซึ่งคาดว่าป็นชนิดไดเมอร์และโมโนเมอร์ตามลำดับ และจากการทำ SDS-PAGE พบว่า

ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวนมาก

7. การแยกสารละลาย $d=1.23$ ที่ได้จากการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 1 ต่อด้วย ultracentrifugation ครั้งที่ 2 หรือโดย preparative PAGE พบโปรตีนขนาด 400,000 และ 160,000 ดัลตัน ด้วย ขณะที่ไม่พบโปรตีนเหล่านี้เมื่อแยกโดยคอลัมน์ Superdex 200 ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 แถบ น่าจะเกิดจากการแตกออกของหน่วยย่อยไวเทลโลจีนิบรี

8. ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีมีคาร์โบไฮเดรต ไขมันและฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ เพราะย้อมติดสีย้อมไกลโคโปรตีน สีซูดานแบล็คบีและสีเมธิลกรีน

9. การฉีดไวเทลโลจีนิบรีปริมาณครั้งละ 20 ไมโครกรัม เข้าในผิวหนังและใต้ผิวหนังกระต่ายหลาย ๆ จุด สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีได้ เมื่อแยกแอนติบอดีด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีถูกชะออกมาในพีคแรกมีปริมาณ 8.55 มิลลิกรัม คิดเป็น 3.04% ของซีรัมโปรตีนทั้งหมด

10. แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลากระบอกดำเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนใน Ouchterlony double immunodiffusion กับไวเทลโลจีนิบรีสุทรีพลาสมา สารสกัดรังไข่และสารสกัดตับของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่ รวมทั้งพลาสมาปลากระบอกเพศเมียมีไข่หลายชนิด ได้แก่ ปลากระบอกหัวสี ปลากระบอกท่อนใต้ ปลากระบอกขาว และปลากระบอกปีกเหลือง บ่งชี้ว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีของปลากระบอกดำสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลากระบอกข้ามชนิดได้

11. แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลากระบอกดำไม่เกิดปฏิกิริยากับสารสกัดรังไข่และสารสกัดตับของปลากระบอกดำเพศเมียไม่มีไข่ รวมทั้งพลาสมาของปลาทะเลเพศเมียที่เจริญพันธุ์ซึ่งมาจากวงศ์อื่น ได้แก่ ปลากระรังและปลาตุกทะเล รวมทั้งพลาสมาของปลากะพงแดงที่ไม่เจริญพันธุ์

12. การทำ Western blot ของไวเทลโลจีนิบรีสุทรีแล้วย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลากระบอกดำ ปรากฏแถบไวเทลโลจีนิบรี 4 แถบคือ P480, P400, P240 และ P160 แต่ปรากฏโปรตีนหลัก 2 แถบ เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีของปลากระรัง คือแถบ P480 และ P240

13. จากการติดตามแถบไวเทลโลจีนิใน Western blot โดยย้อมเปรียบเทียบระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะรังและแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะบอกดำ พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนิในพลาสมาของปลากะรังและของปลากะบอกดำเพศเมียมีไข่ รวมทั้งไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ของปลากะบอกดำ โดยมีความไวของการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะบอกดำมาก แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะบอกดำเพศเมียไม่มีไข่ ขณะที่แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะบอกดำไม่เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนิในพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์

14. สามารถตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนิของปลากะบอกดำจากสารสกัดเมมเบรนของเซลล์โอโอไซม์ที่สกัดด้วย Triton X-100 ได้โดยวิธี Western blot ร่วมกับความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะบอกดำ หลังการย้อมเปรียบเทียบด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะบอกดำที่ผ่านการบ่มและไม่บ่มกับไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดัลตัน (P55) เฉพาะในสารสกัดเมมเบรนที่บ่มด้วยไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ แต่ไม่พบแถบโปรตีนนี้ในสารสกัดเมมเบรนชุดควบคุม แสดงว่าแถบโปรตีนนี้ควรเป็นตัวรับไวเทลโลจีนิที่อยู่บนเมมเบรนของเซลล์โอโอไซม์ของปลากะบอกดำ