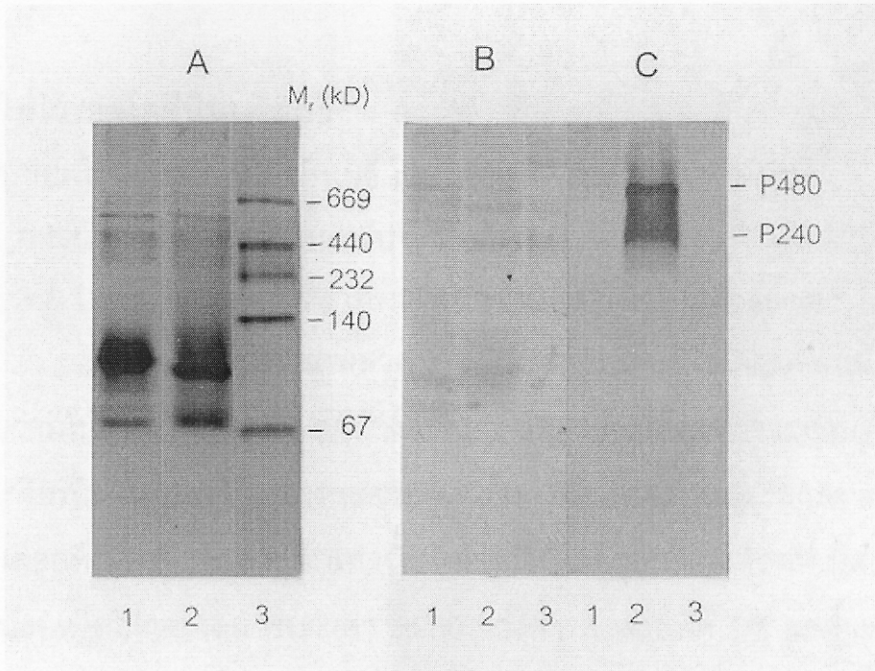


3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 พลาสมาไวเทลโลจีนิน

เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลากระบอกดำเพศเมียใน nondenaturing PAGE พบว่าแบบแผนโปรตีนของพลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่และไม่มีไข่คล้ายกันมาก ดังแสดงผลในรูปที่ 2 แถวที่ 1 และ 2 ถึงแม้โปรตีนบางแถบติดสีคูมาซีบลู มีความเข้มและคมชัดแตกต่างกัน แต่แบบแผนโปรตีนโดยรวมคล้ายกันมาก บ่งชี้ความแตกต่างได้ยาก ในการติดตามแถบไวเทลโลจีนินของปลากระวัง พบว่าปลาจะตอบสนองต่อการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล โดยสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินในพลาสมาได้เพิ่มขึ้นซึ่งปรากฏแถบไวเทลโลจีนินติดสีย้อมเข้มขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีด (ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, 2537) ทำให้ทราบได้ว่าโปรตีนแถบใดเป็นไวเทลโลจีนิน แต่ในกรณีของปลากระบอกดำพบว่าปลาที่อ่อนแอ กล่าวคือปลาจะตายภายใน 30 นาที หลังจากถูกจับทำให้ไม่สามารถฉีดฮอร์โมนได้ แต่จากการที่ เจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน บริสุทธิ์ของปลากระวังสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาในวงศ์ใกล้เคียงกันรวมทั้งปลากระบอกดำ งานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระวังมาเป็นตัวติดตามแถบไวเทลโลจีนินในเจลหรือติดตามในชั้นตอนการทำไวเทลโลจีนิน บริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ

จากแบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลากระบอกดำเมื่อขนถ่ายจากเจลไปลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแล้วย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็คบี พบแถบโปรตีนแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 2B แถวที่ 1 และ 2) เมื่อตรวจหาแถบไวเทลโลจีนินในพลาสมาด้วยการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระวัง ปรากฏแถบโปรตีนประมาณ 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480,000 (P480) และ 240,000 (P240) ดัลตัน เฉพาะในพลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่เท่านั้นที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดี (รูปที่ 2C แถวที่ 2) ขณะที่พลาสมาของปลาเพศเมียไม่มีไข่ไม่สามารถตรวจพบปฏิกิริยาดังกล่าว (รูปที่ 2C แถวที่ 1) ด้วยเหตุนี้



รูปที่ 2 แบบแผนโปรตีนของพลาสมาปลากะบอกดำใน Nondenaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (A) จาก Western blot ที่ย้อมด้วย สีอะมิโดแบล็คบี (B) และย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน ของปลากะรัง (C)

แถวที่ 1 พลาสมาปลาเทศเมี่ยงไม่มีไข่

แถวที่ 2 พลาสมาปลาเทศเมี่ยงมีไข่

แถวที่ 3 โปรตีนมาตรฐาน

ปริมาณโปรตีนแถวละ 12-15 ไมโครกรัม

งานวิทยานิพนธ์นี้จึงทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลาเพศเมียที่มีไข่เท่านั้น และได้กำหนดชื่อโปรตีนทั้ง 2 แถบ เป็น P480 และ P240 (รูปที่ 2B) ซึ่งเป็นแถบของไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากระบอกดำ

3.2 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

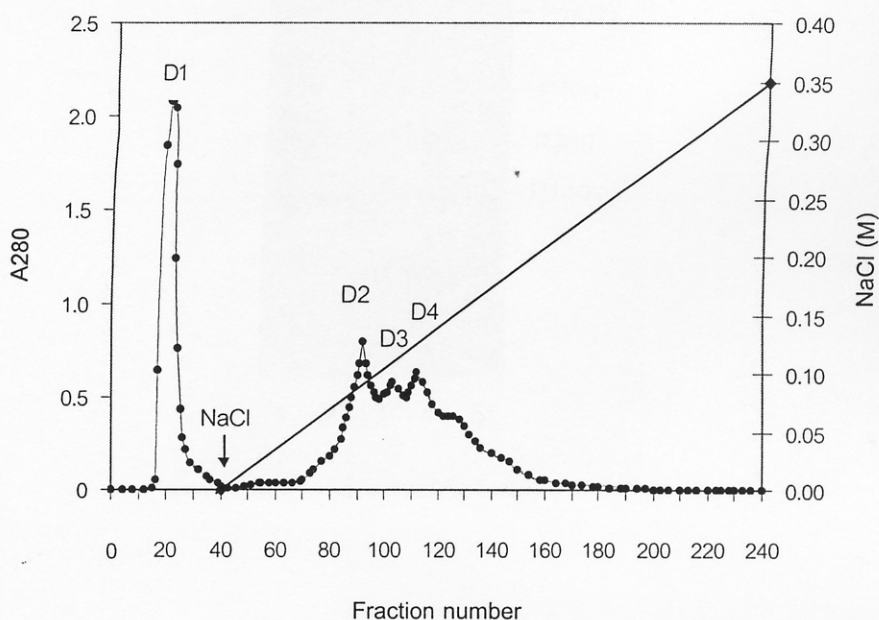
ได้ทำการแยกไวเทลโลจีนินให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคต่างกัน 2 แบบดังนี้

3.2.1 การแยกไวเทลโลจีนินแบบที่ 1

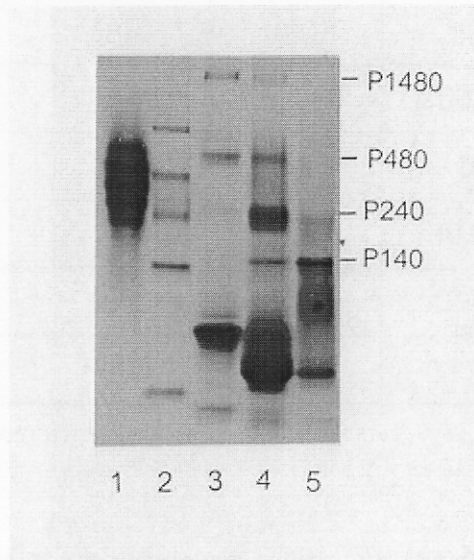
3.2.1.1 การแยกพลาสมาโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

จากการแยกพลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่ามีโปรตีน 1 พีก (D1) ถูกล้างออกมาจากคอลัมน์ก่อนการชะด้วย NaCl (รูปที่ 3) เป็นโปรตีนที่ไม่จับกับเรซิน สารละลายพีก D1 มีสีแดงคล้ำพบเฉพาะจากการแยกพลาสมาจากเลือดที่เม็ดเลือดแดงแตกเท่านั้น สำหรับพลาสมาของเลือดที่เม็ดเลือดแดงแตกเพียงเล็กน้อยหรือไม่แตกเลย พบว่าค่า A280 ของสารละลายพีก D1 ลดต่ำลง เมื่อนำสารละลายพีก D1 ไปทำ nondenaturing PAGE ปรากฏแบบแผนโปรตีนของสารละลายพีก D1 จากพลาสมาที่มีเม็ดเลือดแดงแตก ดังแสดงในรูปที่ 4 แถวที่ 1 แต่ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวในพลาสมาที่เม็ดเลือดแดงไม่แตก แสดงว่าสารละลายพีก D1 เป็นโปรตีนที่มาจากเม็ดเลือดแดงแตก

หลังการชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่อง พบโปรตีนถูกชะออกมา 3 พีก คือ พีก D2, D3 และ D4 โดยถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของ NaCl ต่าง ๆ กัน (รูปที่ 3) เมื่อนำไปทำ nondenaturing PAGE ปรากฏแถบโปรตีนในแผ่นเจลเคลื่อนที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4 แถวที่ 3-5) เมื่อนำพลาสมาและสารละลายหลังการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ไปหาปริมาณโปรตีนและฟอสเฟต พบว่าสารละลายพีก D3 มีปริมาณฟอสเฟตสูงที่สุด (3.15 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน) ส่วนสารละลายพีก D2 และ D4 มีปริมาณฟอสเฟตใกล้เคียงกัน คือ 2.50 และ 2.44 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ขณะที่พลาสมาเริ่มต้นมีปริมาณฟอสเฟต 2.04 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน แต่ไม่พบฟอสเฟตในสารละลายพีก D1 (ตารางที่ 3)



รูปที่ 3 การแยกไวเทเลโลจีนินจากพลาสมาด้วยคอลัมน์ DEAE-Sepharcel
แยกไวเทเลโลจีนินจากพลาสมาของปลาเทศเมื่อยมีไข่ 10 มิลลิลิตร
(ปริมาณโปรตีน 127 มิลลิกรัม) โดยคอลัมน์ DEAE-Sepharcel
(2.6 X 17 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF เก็บสารละลาย
หลอดละ 4 มิลลิลิตร จน A280 เป็นศูนย์ แล้วชะด้วย NaCl ที่มีความ
เข้มข้นต่อเนื่องจาก 0-0.35 M ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง
เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร



รูปที่ 4 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลาย
พืค D1-D4 ที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

แถวที่ 1 สารละลายพืค D1

แถวที่ 2 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 3 สารละลายพืค D2

แถวที่ 4 สารละลายพืค D3

แถวที่ 5 สารละลายพืค D4

ปริมาณโปรตีนแถวละ 15 ไมโครกรัม

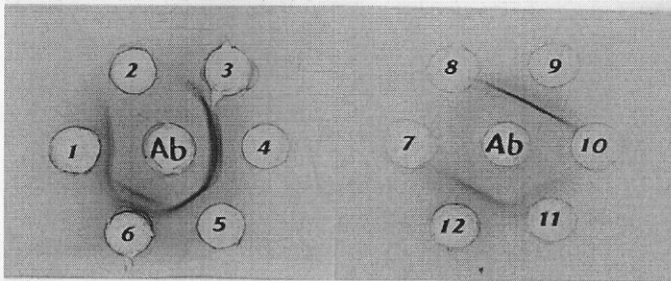
ตารางที่ 3 ปริมาณฟอสเฟตของพลาสมาของปลาเทศเมียมี่ไข่และสารละลาย
ที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

Samples	Volume (ml)	Protein (mg)	Phosphate	
			µg	µg/mg protein
Plasma	10.00	127.40	260.00	2.04
Peak D1 (No. 18-23)	1.35	24.68	0	0
Peak D2 (No. 80-96)	1.50	15.57	39.00	2.50
Peak D3 (No. 97-106)	0.80	13.46	42.40	3.15
Peak D4 (No.109-120)	1.35	12.69	31.05	2.44

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด 2 ครั้ง

เมื่อนำสารละลายพีค D1, D2, D3, D4 และพลาสมาไปทดสอบกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรัง โดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับพลาสมาของปลากะรังบอการค้าเทศเมียมี่ไข่และสารละลายพีค D2, D3 และ D4 โดยสารละลายพีค D3 มีแถบการตกตะกอนเห็นชัดเจนมากที่สุด ตามด้วยพีค D4 และ D2 มีความเข้มของแถบการตกตะกอนลดลงตามลำดับ ขณะที่พลาสมาของปลาเทศเมียมี่ไข่และสารละลายพีค D1 ไม่พบปฏิกิริยาดังกล่าว (รูปที่ 5) แสดงว่าไวเทลโลจีนินของปลากะรังบอการค้าถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของ NaCl ในช่วงกว้างและสารละลายพีค D3 มีโปรตีนคิดเป็น 13.5% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 4)

จากผลการทดลองพบว่าไวเทลโลจีนินของปลากะรังบอการค้าถูกชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.1 M NaCl ซึ่งแตกต่างจากไวเทลโลจีนินของปลาชนิดอื่น เช่นไวเทลโลจีนินของปลา gag ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ DEAE-agarose ที่ความเข้มข้น 0.25-0.30 M NaCl (Heppell and Sullivan, 1999) ซึ่งใกล้เคียงกับไวเทลโลจีนินของปลากะรังที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้น



รูปที่ 5 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังกับไวเทลโลจีนินของปลากะบอกดำที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-200

- | | |
|------|--|
| Ab | แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรัง |
| 1 | พลาสมาปลากะบอกดำเพศเมียมีไข่ |
| 2 | สารละลายพีค D1 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel |
| 3,11 | สารละลายพีค D2 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel |
| 4,12 | สารละลายพีค D3 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel |
| 5 | สารละลายพีค D4 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel |
| 6 | สารสกัดรังไข่ปลากะรัง |
| 7 | พลาสมาปลากะบอกดำเพศเมียไม่มีไข่ |
| 8 | สารละลายพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-200 |
| 9 | สารละลายพีค S2 จากคอลัมน์ Sephadex G-200 |
| 10 | สารละลายพีค S3 จากคอลัมน์ Sephadex G-200 |

ปริมาณโปรตีนหลุมละ 80-150 ไมโครกรัม

0.25 M NaCl (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) ขณะที่ไวเทลโลจีนิบรีสุทซ์ของปลาเรนโบว์เทราท์และปลาซีเทราท์ ถูกชะออกมาด้วย 0.2 M NaCl จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel (Norberg and Haux, 1985) จากการแยกไวเทลโลจีนิบรีสุทซ์ของปลาทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบไวเทลโลจีนิบรีสุทซ์ถูกชะออกมาอยู่ในสารละลายเพียงพีคเดียวเท่านั้น พบไวเทลโลจีนิบรีสุทซ์ปนในสารละลายพีคอื่นน้อยมาก แตกต่างจากการแยกไวเทลโลจีนิบรีสุทซ์ของปลากระบอกดำด้วยคอลัมน์ชนิดนี้ที่ถูกชะออกมาด้วยความเข้มข้น NaCl ช่วงกว้าง ดังนั้นคอลัมน์ DEAE-Sephacel จึงไม่เหมาะสำหรับการแยกไวเทลโลจีนิบรีสุทซ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ จึงควรเลือกใช้โครมาโทกราฟีแบบอื่น

ตารางที่ 4 การทำให้ไวเทลโลจีนิบรีสุทซ์จากพลาสมา

Samples	Protein	
	µg	%
Separation type 1		
Plasma	10,000	100.0
DEAE-Sephacel eluate (peak D3)	1,346	13.5
Sephadex G-200 eluate (peak S2)	300	3.0
Separation type 2		
Plasma	10,000	100.0
Ultracentrifugation (pool d=1.23)	367	3.7
Double ultracentrifugation (pool d=1.23)	195	2.0
** Preparative PAGE	140	1.4
** Superdex 200 eluate (peak S ₄₆₋₅₂)	95	1.0

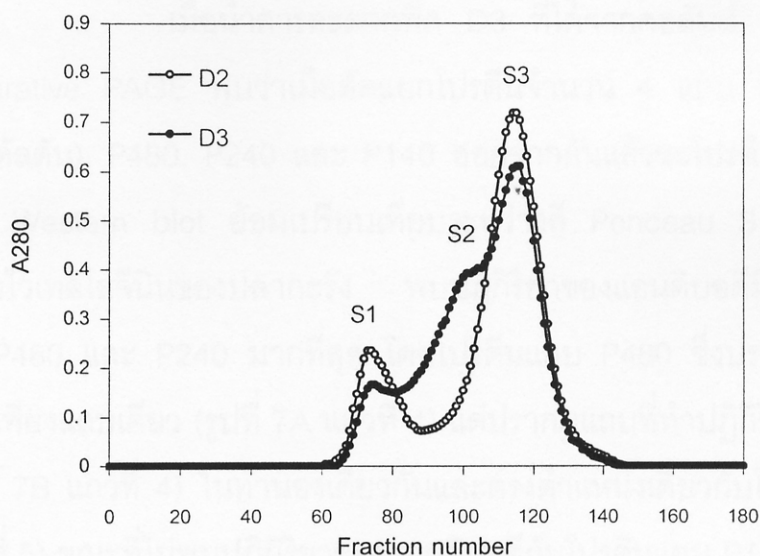
* สารละลายเริ่มต้นเป็นสารละลายพีค D3

** สารละลายเริ่มต้นเป็นสารละลาย d=1.23 จากการทำให้ Ultracentrifugation ครั้งที่ 1

3.2.1.2 การแยกสารละลายพีด D2 หรือ D3 ต่อโดยคอลัมน์ Sephadex G-200

เมื่อนำสารละลายพีด D2 หรือ D3 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ที่ทำให้เข้มข้นไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ในทำนองเดียวกัน เมื่อล้างคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF พบว่าสารละลายพีด D2 มีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีด คือ พีด S1 และ S3 ส่วนสารละลายพีด D3 มีโปรตีนถูกชะออกมา 3 พีด คือ พีด S1, S2 และ S3 (รูปที่ 6) สารละลายพีดแรก (S1) มีค่า A280 ต่ำกว่าพีด S3 เมื่อนำสารละลายทั้ง 3 พีด ไปทดสอบกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรัง พบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับสารละลายพีด S2 เท่านั้น (รูปที่ 5 หลุมที่ 9) บ่งชี้ว่าไวเทลโลจีนินถูกชะออกมาในสารละลายพีด S2 ซึ่งคิดเป็น 3.0% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 4)

เมื่อนำสารละลายพีด S2 ที่แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ไปทำ nondenaturing PAGE พบโปรตีนแถบ P480 และ P240 ชัดเจนและปรากฏแถบบาง ๆ ของโปรตีนแถบ P140 (140,000 ดัลตัน) ด้วย แสดงว่าไม่สามารถแยกโปรตีนแถบ P140 ที่ปนเปื้อนออกจากไวเทลโลจีนินได้ทั้งหมด แต่คอลัมน์นี้สามารถกำจัดโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าโปรตีนแถบ P140 ออกจากไวเทลโลจีนินได้ (ผลรูปเจลไม่ได้แสดงไว้เพราะทำแผ่นเจลหาย) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Emmersen และ Petersen (1976) และของ Idler *et al.* (1979) ที่พบว่าการใช้คอลัมน์แบบเจลฟิลเทรชันไม่สามารถแยกไวเทลโลจีนินของปลาแซลมอนออกจากโปรตีนอื่นได้หมด แตกต่างจากของปลากะรังที่สามารถทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาโปรตีนอื่น ๆ ได้โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) เช่นเดียวกับคอลัมน์ Sephacryl S-300 ที่สามารถแยกไวเทลโลจีนินของปลากะพงแดงได้ (พอจิต วิโนทพรรษ์, 2539) และได้มีการทำให้ไวเทลโลจีนินของปลา *Oreochromis aureus* บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sepharose CL-6B เพียงขั้นตอนเดียว (Ding *et al.*, 1989) ซึ่งแตกต่างจากไวเทลโลจีนินของปลากะบอกดำที่พบว่าไม่สามารถทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากสารละลายพีด D3 ด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันได้ ถึงแม้ว่าจะเปลี่ยนเป็นเรซินชนิดอื่น เช่น Sephadex G-150, Sepharose CL-6B



รูปที่ 6 การแยกไวเทลโลจีนินจากสารละลายพีค D2 และ D3 ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200

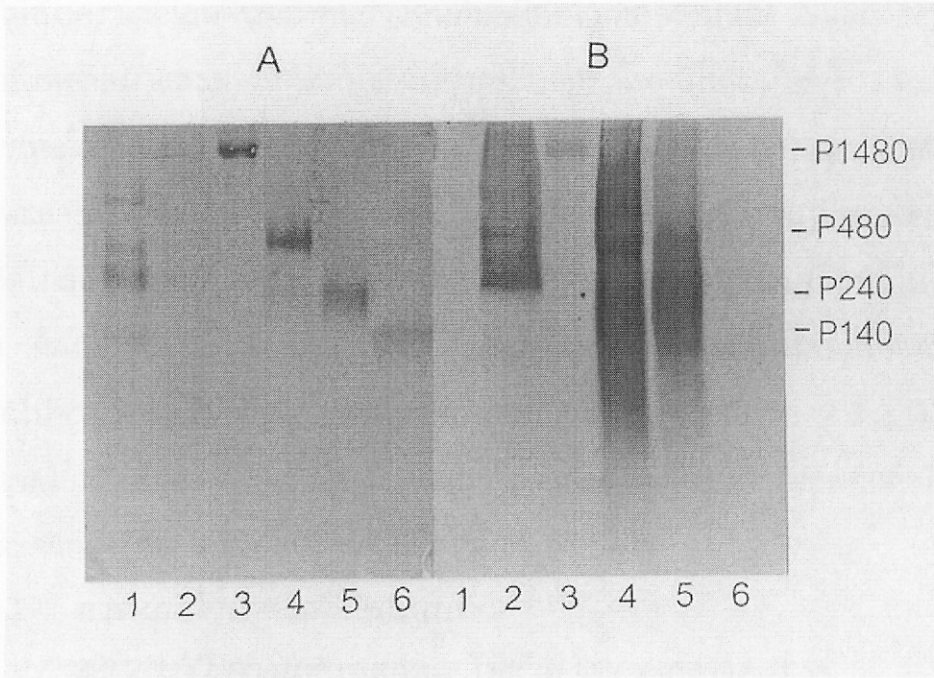
นำสารละลายพีค D2 และ D3 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ปริมาณโปรตีนพีคละ 12 มิลลิกรัม ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.6X90 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จน A280 เป็นศูนย์

และ Sephacryl S-300 (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ดังนั้นการแยกไวเทลโลจีนินจาก สารละลายฟีด D3 ต่อด้วยวิธีการนี้จึงยังไม่ได้ไวเทลโลจีนินที่บริสุทธิ์

3.2.1.3 การแยกสารละลายฟีด D2 หรือ D3 ด้วย Preparative PAGE

เมื่อนำสารละลายฟีด D3 ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ไปทำ preparative PAGE พบว่าเมื่อตัดแยกโปรตีนจำนวน 4 แถบ คือ แถบ P1480 (1,480,000 ดัลตัน), P480, P240 และ P140 ออกจากกันแล้วชะโปรตีนออกจากเนื้อเจล แล้วนำไปทำ Western blot ย้อมเปรียบเทียบระหว่างสี Ponceau S กับการย้อมด้วย แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรัง พบปฏิกิริยาของแอนติบอดีมีความจำเพาะกับ โปรตีนแถบ P480 และ P240 มากที่สุด โดยโปรตีนแถบ P480 ซึ่งปรากฏการติดสีย้อม Ponceau S เพียงแถบเดียว (รูปที่ 7A แถวที่ 4) แต่ปรากฏแถบที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี 3 แถบ (รูปที่ 7B แถวที่ 4) ในทำนองเดียวกันและตรงตำแหน่งเดียวกับโปรตีนแถบ P240 (รูปที่ 7 แถวที่ 5) ขณะที่ไม่พบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับโปรตีนแถบ P140 (รูปที่ 7 แถวที่ 6) บ่งชี้ว่าโปรตีนแถบ P140 น่าจะไม่ใช่ไวเทลโลจีนิน และพบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับ โปรตีนแถบ P1480 เล็กน้อย (รูปที่ 7 แถวที่ 3) อาจเป็นได้ว่าโปรตีนแถบ P1480 อาจเป็น ไวเทลโลจีนินที่รวมตัวกันมีขนาดใหญ่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ ซึ่งคล้ายกับการ พบแถบโปรตีนขนาด 1,170,000 ดัลตัน ในพลาสมาของปลา winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) ซึ่งพบเฉพาะในพลาสมาของปลาที่ถูกกระตุ้นด้วย เอสตราไดออลเท่านั้น (Nagler and Idler, 1987)

Preparative PAGE สามารถแยกแถบโปรตีนของสารละลายฟีด D3 ออกจากกันได้ แต่การแยกไวเทลโลจีนินของปลากะรังด้วยวิธีนี้ พบว่าสารละลาย โปรตีนแถบ P480 ที่เตรียมได้ ซึ่งติดสีย้อม Ponceau S เพียง 1 แถบ ปรากฏโปรตีน 4 แถบ ได้แก่ P480, P400 (400,000 ดัลตัน), P240 และ P160 (160,000 ดัลตัน) ที่ย้อมได้ด้วย แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรัง แสดงว่าไวเทลโลจีนินแถบ P480 น่าจะมีการ แยกย่อยออกเป็นหน่วยย่อยขนาดต่าง ๆ กัน เช่นเดียวกับการแยกไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์แถบ I และ II ของปลากะรังออกจากกันด้วยวิธีเดียวกันนี้ ที่พบว่ามีโปรตีนแถบ X แยกย่อย



รูปที่ 7 การทำ Western blot เปรียบเทียบระหว่างการย้อมสี Ponceau S (A) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระรัง (B) ของ แลบบรตีนที่ได้จาก Preparative PAGE ของสารละลายฟีด D3

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 พลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่

แถวที่ 3 โปรตีนแถบ P1480

แถวที่ 4 โปรตีนแถบ P480

แถวที่ 5 โปรตีนแถบ P240

แถวที่ 6 โปรตีนแถบ P140

ปริมาณโปรตีนแถวละ 8-15 ไมโครกรัม

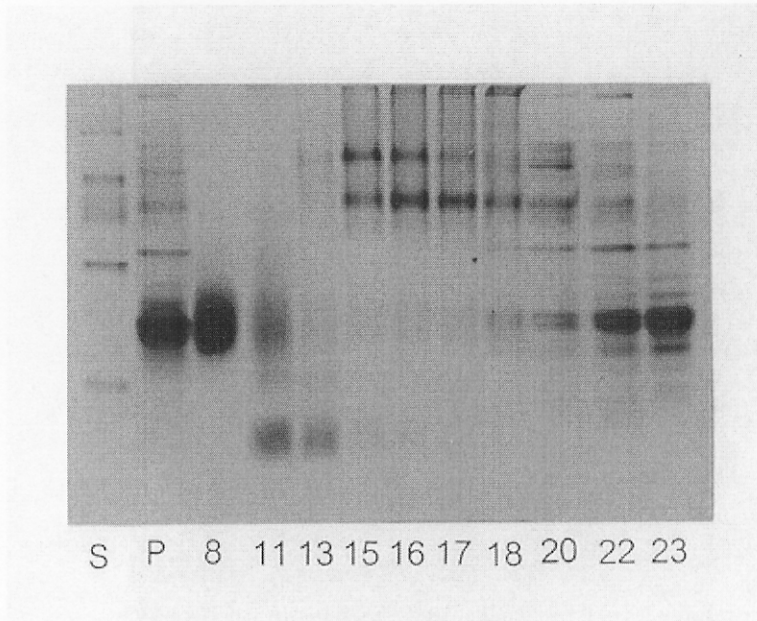
ออกมาและพบอยู่ร่วมกับไวเทลโลจีนินแถบ I เสมอ (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) และเมื่อนำไวเทลโลจีนินแถบ P480 และ P240 ของปลากะบอกดำไปฉีดกระตุ้น กระจกตาให้สังเคราะห์แอนติบอดี พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินทั้ง 2 แถบ สามารถเกิด ปฏิกริยากับพลาสมาและสารสกัดตับของปลากะบอกดำเพศเมียไม่มีไข่ได้ ขณะที่แอนติ บอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังไม่เกิดปฏิกริยาดังกล่าว (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) บ่งชี้ว่า สารละลายโปรตีนแถบ P480 และ P420 ที่ได้จากการตัดเจลมีแถบโปรตีนอื่นที่มีขนาด และสมบัติใกล้เคียงไวเทลโลจีนินแถบ P480 และ P240 ที่สามารถเคลื่อนที่ใน nonde- naturing PAGE ได้ในตำแหน่งเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน และโปรตีนปนเปื้อนเหล่านี้ถูก กำจัดออกไปจากไวเทลโลจีนินได้จากการทำ ultracentrifugation (ข้อ 3.2.2.1) ซึ่งไม่ได้ แสดงผลเจลไว้ ด้วยเหตุนี้จึงไม่สามารถแยกไวเทลโลจีนินของปลากะบอกดำให้บริสุทธิ์ จากสารละลายพีค D3 โดยวิธี preparative PAGE ได้

3.2.2 การแยกไวเทลโลจีนินแบบที่ 2

3.2.2.1 การแยกพลาสมาโดยวิธี Ultracentrifugation

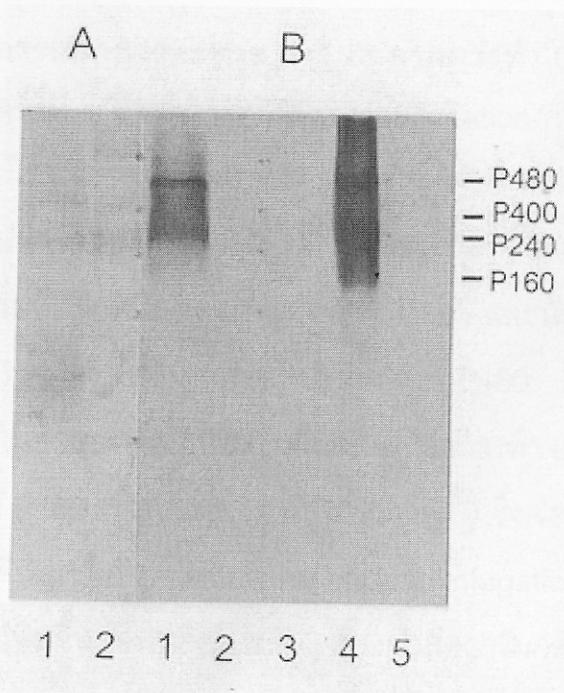
ในการแยกพลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่ด้วยวิธี ultra- centrifugation เมื่อนำสารละลายแต่ละหลอดที่แยกได้ไปทำ nondenaturing PAGE พบ ว่าแบบแผนโปรตีนแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างสารละลายที่มีความหนาแน่นของ KBr แตกต่างกัน (รูปที่ 8) โดยจะพบโปรตีนแถบ P480 และ P240 มากในสารละลายหลอดที่ 15-17 ซึ่งมีค่า $d=1.23$

เมื่อนำสารละลายหลอดที่ 8, 16 และ 20 ที่มีค่าความหนาแน่น ของ KBr เป็น 1.15, 1.23 และ 1.29 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ไปตรวจหาแถบไวเทลโล จีนินด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรัง โดย Western blot พบปฏิกริยาของ แอนติบอดีกับเฉพาะสารละลายหลอดที่ 16 (รูปที่ 9B แถวที่ 4) เท่านั้น ซึ่งปรากฏปฏิกริยา ของโปรตีน 4 แถบ คือแถบ P480, P400, P240 และ P160 แต่ไม่ตรวจพบปฏิกริยาดัง กล่าว ในสารละลายหลอดที่ 8 ($d=1.15$) หรือพบเล็กน้อยมากในสารละลายหลอดที่ 20 ($d=1.29$) (รูปที่ 8B แถวที่ 3 และ 5 ตามลำดับ)



รูปที่ 8 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของพลาสมาหลังการแยกโดย Ultracentrifugation ครั้งที่ 1

S	โปรตีนมาตรฐาน	P	พลาสมา
หมายเลขที่แสดงเป็นหลอดที่ของสารละลายดังนี้			
8	หลอดที่ 8 (d=1.15)	17	หลอดที่ 17 (d=1.23)
11	หลอดที่ 11 (d=1.15)	18	หลอดที่ 18 (d=1.23)
13	หลอดที่ 13 (d=1.23)	20	หลอดที่ 20 (d=1.29)
15	หลอดที่ 15 (d=1.23)	22	หลอดที่ 22 (d=1.29)
16	หลอดที่ 16 (d=1.23)	23	หลอดที่ 23 (d=1.29)
ปริมาณโปรตีนแวลวละ 8-10 ไมโครกรัม			



รูปที่ 9 การทำ Western blot ของพลาสมาที่แยกโดย Ultracentrifugation ครั้งที่ 1 และย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็คบี (A) หรือย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะรัง (B)

- แถวที่ 1 พลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่
- แถวที่ 2 โปรตีนมาตรฐาน
- แถวที่ 3 สารละลายหลอดที่ 8 ($d=1.15$)
- แถวที่ 4 สารละลายหลอดที่ 16 ($d=1.23$)
- แถวที่ 5 สารละลายหลอดที่ 20 ($d=1.29$)

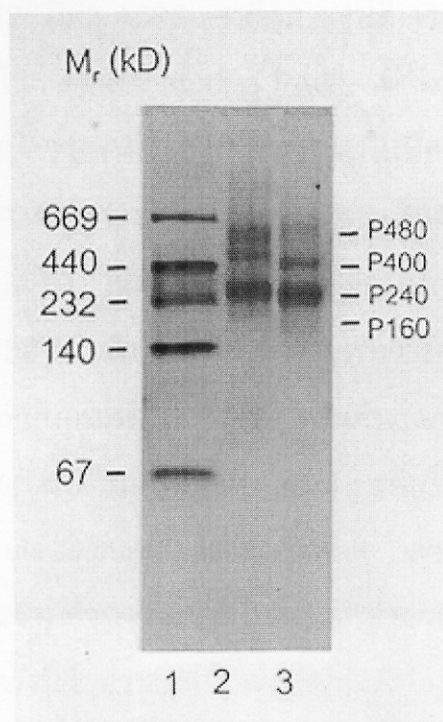
ปริมาณโปรตีนแถวละ 10 ไมโครกรัม

เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ 14-16 ($d=1.23$) เข้าด้วยกันทำให้เข้มข้น พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 367 ไมโครกรัม คิดเป็น 3.7% เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 4)

3.2.2.2 การแยกสารละลาย $d=1.23$ จากการทำ Ultracentrifugation ครั้งที่ 1 โดยการทำให้ Ultracentrifugation ครั้งที่ 2

เมื่อนำสารละลาย $d=1.23$ ที่ได้จากการแยกด้วย ultracentrifugation ครั้งที่ 1 ไปทำให้เข้มข้นแล้วนำไปทำ ultracentrifugation อีกครั้ง พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนบางแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า P480 และน้อยกว่า P160 ออกไปได้ (รูปที่ 10 แถวที่ 3) ซึ่งจะปรากฏเฉพาะโปรตีนแถบ P480, P400 และ P240 ใน *nondenaturing PAGE* ในทำนองเดียวกับการตัดเจล พบว่าการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 2 กลับพบโปรตีนแถบ P160 เพิ่มขึ้นมา (รูปที่ 10 แถวที่ 3) ซึ่งคงจะเกิดจากการแตกออกของหน่วยย่อยไวเทลโลจีนินเช่นกัน การแยกโดย ultracentrifugation ครั้งที่ 2 นี้ ทำให้ไวเทลโลจีนินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ซึ่งเหลือโปรตีน 195 ไมโครกรัม คิดเป็น 2.0% เมื่อเทียบกับพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 4)

จากการแยกไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำด้วย ultracentrifugation พบว่าไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ถูกแยกออกมาใน KBr ที่ $d=1.23$ ซึ่งแตกต่างจากไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลาเรนโบว์เทราท์ที่ถูกแยกออกมาใน KBr ที่ $d=1.28$ (Riazi and Fremont, 1988) โดยที่ไวเทลโลจีนินของปลาทั้ง 2 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 500,000 ดัลตัน อาจเป็นเพราะองค์ประกอบไขมันของไวเทลโลจีนินอาจแตกต่างกัน ในการแยก VLDL และ HDL (high density lipoprotein) จากพลาสมาของเต่า (*turtle, Chrysemys picta*) โดย ultracentrifugation พบว่าสารละลาย $d=1.21$ ของเต่าเพศผู้และเพศเมียที่เจริญพันธุ์มีความแตกต่างกัน และได้สรุปว่าโปรตีนในสารละลาย $d=1.21$ นี้ ที่พบเฉพาะในพลาสมาของเต่าเพศเมียที่เจริญพันธุ์เป็นไวเทลโลจีนิน (Paolucci and Callard, 1995) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับไวเทลโลจีนินของเต่าที่พบโดย Gapp *et al.* (1979) จะเห็นว่าไวเทลโลจีนินของเต่ามีค่าความหนาแน่นในการลอยตัวใกล้เคียงกับไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ



รูปที่ 10 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของพลาสมาที่แยกด้วย Ultracentrifugation

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 สารละลาย $d=1.23$ จาก ultracentrifugation ครั้งที่ 1

แถวที่ 3 สารละลาย $d=1.23$ จาก ultracentrifugation ครั้งที่ 2

ปริมาณโปรตีนแถวละ 10 ไมโครกรัม

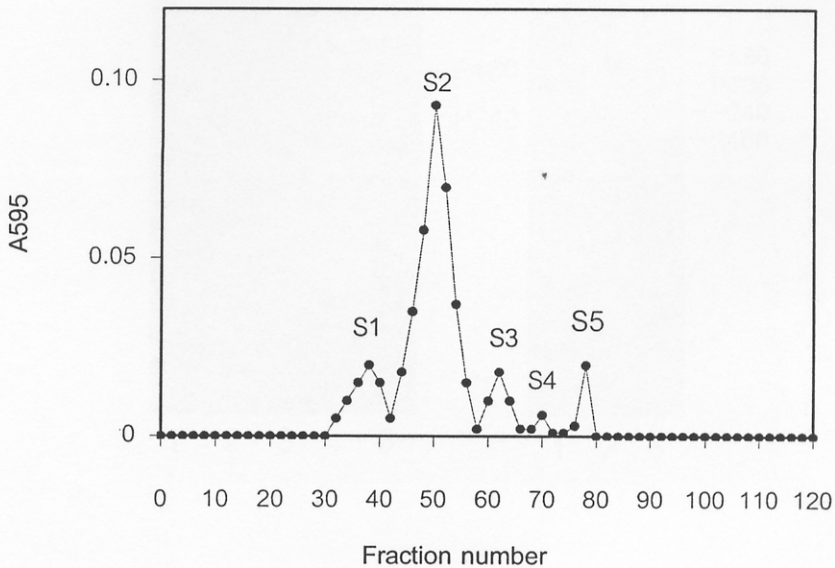
3.2.2.3 การแยกสารละลาย d=1.23 จากการทำ Ultracentrifugation ครั้งที่ 1 ด้วยคอลัมน์ Superdex 200

เมื่อนำสารละลาย d=1.23 ที่แยกโดย ultracentrifugation ครั้ง

ที่ 1 ไปแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 200 พบว่าแยกโปรตีนออกมา 5 พีค โดยสารละลายหลอดที่ 50 ของพีค S2 มีค่า A595 สูงที่สุด (รูปที่ 11) และปรากฏโปรตีนเพียง 2 แถบ (P480 และ P240) ใน nondenaturing PAGE ที่ย้อมแบบซิลเวอร์ (รูปที่ 12A แถวที่ 4) โปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า P480 ถูกชะออกมาในพีค S1 (รูปที่ 12A แถวที่ 3) ส่วนโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า P240 ถูกชะออกมาในพีค S3 เป็นต้นไป (รูปที่ 12A แถวที่ 5) สารละลายหลอดที่ 46-52 (รูปที่ 11) ไม่พบการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ไวเทลโลจีนิน จึงรวมสารละลายหลอดที่ 46-52 แล้วนำไปทำให้เข้มข้น พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 95 ไมโครกรัม คิดเป็น 1.0% เมื่อเทียบกับพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 4)

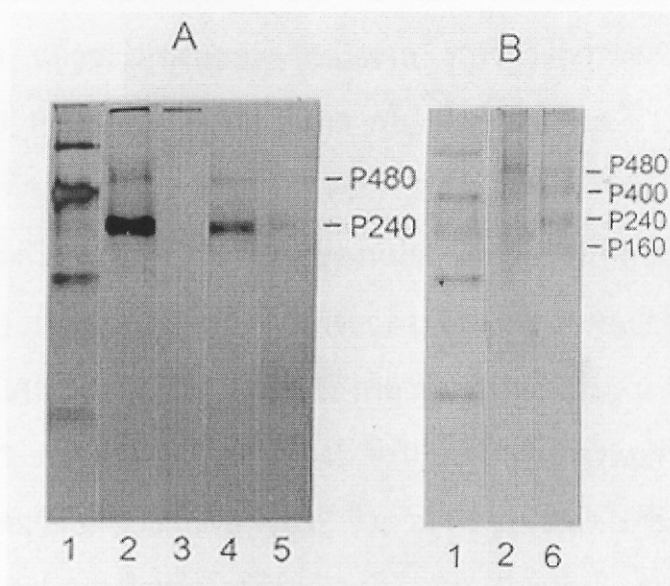
จากการเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนใน nondenaturing PAGE ของสารละลาย d=1.23 จาก ultracentrifugation ครั้งที่ 1 ในรูปที่ 10 แถวที่ 2 และ รูปที่ 12A และ B แถวที่ 2 จะเห็นว่ามีจำนวนแถบโปรตีนแตกต่างกัน ทั้งนี้เพราะพลาสมาของปลาที่นำมาทำการแยกแต่ละครั้งมีจำนวนแถบไวเทลโลจีนินไม่คงที่ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวหรือแตกออกของหน่วยย่อยทำให้มีแถบไวเทลโลจีนินปรากฏได้ต่างกัน

ในการทดลองครั้งนี้สามารถทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ได้จากสารละลาย d=1.23 ที่ได้จากการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 1 โดยคอลัมน์ Superdex 200 ซึ่งสอดคล้องกับการทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ ปลา gudgeon และ ปลา chub บริสุทธิ์ได้ (Brion *et al.*, 2000) ข้อดีของการแยกไวเทลโลจีนินด้วยคอลัมน์ Superdex 200 คือ ทำได้รวดเร็ว และการแยกไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำด้วยวิธีนี้ไม่พบไวเทลโลจีนินแถบ P160 ปรากฏอยู่ (รูปที่ 12A แถวที่ 4) ซึ่งแตกต่างจากการแยกไวเทลโลจีนินด้วย ultracentrifugation ครั้งที่ 2 และ preparative PAGE ในการแยกแบบที่ 1 ที่พบไวเทลโลจีนินแถบ P160 ปรากฏอยู่เสมอ



รูปที่ 11 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากสารละลาย $d=1.23$ ที่ได้จากการทำ Ultracentrifugation ครั้งที่ 1 โดยคอลัมน์ Superdex 200

แยกสารละลาย $d=1.23$ ที่ได้จากการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 1 และผ่านการทำให้เข้มข้นปริมาตร 150 ไมโครลิตร (153 ไมโครกรัม) ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 (1x30 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF ด้วยอัตราไหล 15 มิลลิลิตร/ชั่วโมง จนมีค่า A595 เป็น 0 เก็บสารละลายหลอดละ 0.2 มิลลิลิตร



รูปที่ 12 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลาย $d=1.23$ ที่ได้จากการทำ Ultracentrifugation ครั้งที่ 1 ซึ่งทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยคอลัมน์ Superdex 200 และย้อมแบบซิลเวอร์ (A) หรือโดย Preparative PAGE และย้อมด้วยสีคумаซีบลู (B)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 สารละลาย $d=1.23$ จาก ultracentrifugation ครั้งที่ 1

แถวที่ 3 สารละลายหลอดที่ 38 (S1)

แถวที่ 4 สารละลายหลอดที่ 50 (S2)

แถวที่ 5 สารละลายหลอดที่ 58 (S3)

แถวที่ 6 ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จาก preparative PAGE

ปริมาณโปรตีนแถวละ 1-12 ไมโครกรัม

3.2.2.4 การแยกสารละลาย d=1.23 โดย Preparative PAGE

เมื่อนำสารละลาย d=1.23 ที่ได้จากการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 1 ไปแยกต่อโดย preparative PAGE โดยตัดเฉพาะแถบโปรตีนในช่วง P480-P240 ออกไปเป็นชิ้นเดียว แล้วชะโปรตีนออกจากเนื้อเจล พบว่าวิธีการนี้สามารถแยกโปรตีนในช่วงดังกล่าว (P480, P400 และ P240) ออกจากโปรตีนอื่นได้ (รูปที่ 12B แถวที่ 6) แต่ในทำนองเดียวกับการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 2 ที่พบโปรตีนแถบ P160 เพิ่มขึ้นจากการตัดเจลครั้งนี้ ซึ่งน่าจะเกิดจากการแตกของหน่วยย่อยของไวเทลโลจีนินออกมาเช่นกัน (รูปที่ 12B แถวที่ 6) การแยกไวเทลโลจีนินด้วยวิธี preparative PAGE แยกได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 140 ไมโครกรัม คิดเป็น 1.4% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น และ 38.15% ของสารละลาย d=1.23 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งใกล้เคียงกับการแยกไวเทลโลจีนินหน่วยย่อยของปลากะรังโดยวิธี preparative PAGE ซึ่งสามารถชะไวเทลโลจีนินออกจากเจลด้วยกระแสไฟฟ้าได้ 37.1% ของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์เริ่มต้น (ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, 2537) แสดงว่าการแยกไวเทลโลจีนินด้วยวิธีดังกล่าวไม่สามารถชะไวเทลโลจีนินบางส่วนออกจากเจลได้แต่การชะไวเทลโลจีนินของปลากะรังบอดำออกจากเจลด้วยกระแสไฟฟ้าสามารถชะได้ ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 1.4% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น ซึ่งมากกว่าการแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 200 (1.0% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น) แต่น้อยกว่าการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 2 (2.0% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น) (ตารางที่ 4)

การแยกไวเทลโลจีนินของปลากะรังบอดำให้บริสุทธิ์ในแบบที่ 2 โดยวิธี preparative PAGE พบไวเทลโลจีนินแถบ P160 เช่นเดียวกับการแยกโดย ultracentrifugation ครั้งที่ 2 ซึ่งอาจเกิดจากการแตกออกของไวเทลโลจีนินแถบ P480 จากผลของการทดลองเองหรือโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ดังเช่นการแตกของไวเทลโลจีนินของปลากะรังแถบ X อาจมาจากการย่อยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) ดังนั้นในขั้นตอนการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จึงต้องใส่สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น PMSF, aprotinin และ leupeptin เช่นเดียวกับของปลาเรนโบว์เทราท์ และปลาซีเทราท์ (Norberg and Huax, 1985)

3.3 สมบัติของไวเทลโลจีนิบรีสุทรี

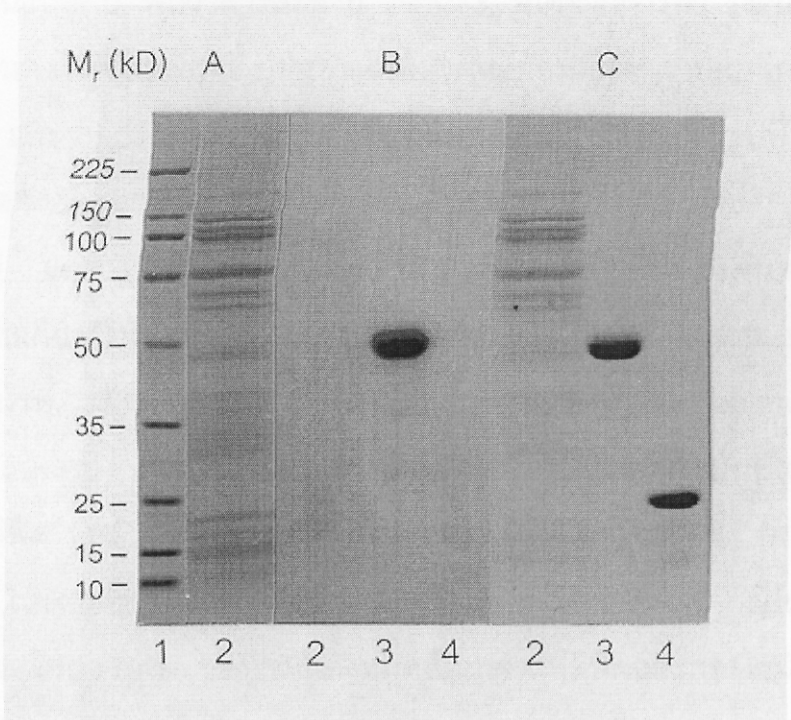
3.3.1 แบบแผนใน SDS-PAGE

ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2.4 ปรากฏไวเทลโลจีนิบรี 4 แถบใน nondenaturing PAGE (รูปที่ 12B แถวที่ 6) แต่ปรากฏแถบโปรตีนใน SDS-PAGE สภาพรีดิวซ์มากกว่า 10 แถบ ดังแสดงผลในรูปที่ 13 แถวที่ 2 จึงไม่สามารถใช้ SDS-PAGE เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีนิบรีในขั้นตอนการแยกไวเทลโลจีนิบรีจากพลาสมาปลากระบอกดำได้ ทั้งนี้เพราะไวเทลโลจีนิบรีของปลากระบอกดำประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์จำนวนมากเช่นเดียวกับไวเทลโลจีนิบรีของปลากะรัง (ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, 2537)

3.3.2 ไกลโคโปรตีน

เมื่อนำไวเทลโลจีนิบรีสุทรีในเจลจากการทำ SDS-PAGE สภาพรีดิวซ์ไปย้อมด้วยชุดย้อมไกลโคโปรตีน ซึ่งเป็นการย้อมติดสีส่วนคาร์โบไฮเดรต ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเท่านั้นที่ย้อมติดสีคาร์โบไฮเดรต (รูปที่ 13B แถวที่ 2) โดยมี horseradish peroxidase เป็นไกลโคโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 13B แถวที่ 3) และมี soybean trypsin inhibitor ซึ่งไม่มีไกลโคโปรตีนเป็นโปรตีนควบคุม (รูปที่ 13B แถวที่ 4) เมื่อนำเจลที่ผ่านการย้อมสีไกลโคโปรตีนไปย้อมทับด้วยสีบลู (รูปที่ 13C) พบแบบแผนแถบโปรตีนเช่นเดียวกับการย้อมสีคумаซีบลู (รูปที่ 13A)

ไวเทลโลจีนิบรีของปลากระบอกดำย้อมติดสีย้อมไกลโคโปรตีนเช่นเดียวกับของปลากะพงแดง (พอจิต วิโนทพรรษ์, 2539) และปลากะรัง (ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, 2537) แสดงว่าไวเทลโลจีนิบรีของปลากระบอกดำมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับรายงานการพบคาร์โบไฮเดรตในไวเทลโลจีนิบรีของปลาสติกเคิลแบค (17.3-37.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสเป็นจำนวนมาก (Covens *et al.*, 1987) หรือไวเทลโลจีนิบรีของปลากะรังซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส (20.8 ± 1.3 และ 8.1 ± 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ) เป็นองค์ประกอบ (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996)



รูปที่ 13 แบบแผนของไวเทลโลจีนิบรีสุทธีใน SDS-PAGE สภาพรีดิวิซ์
 ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (A) ย้อมด้วยชุดย้อมไกลโคโปรตีน (B) และ
 ย้อมทับด้วยสีบลู (C)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 ไวเทลโลจีนิบรีสุทธีจาก preparative PAGE

แถวที่ 3 horseradish peroxidase

แถวที่ 4 soybean trypsin inhibitor

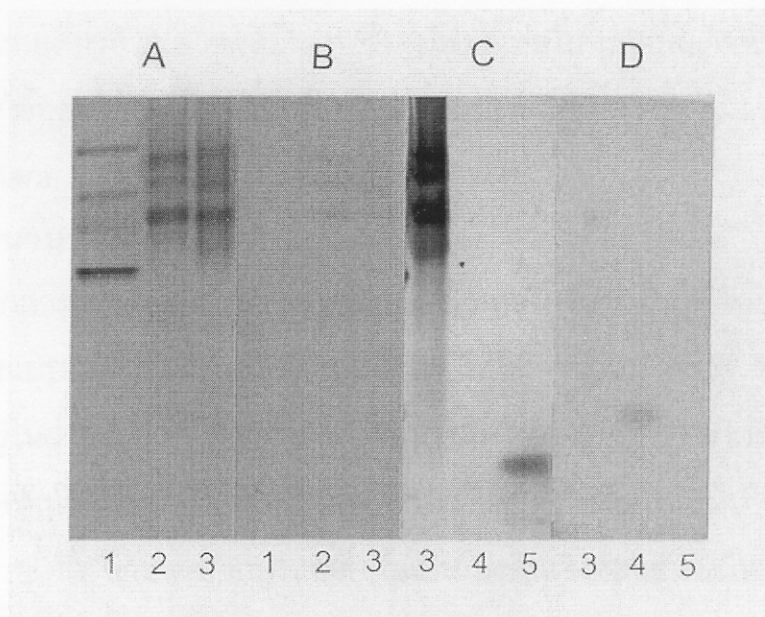
ปริมาณโปรตีนแถวละ 2-10 ไมโครกรัม

3.3.3 ลิโปโปรตีน

ในการศึกษาไวเทลโลจันินที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ โดยการย่อยไขมันในเจลด้วยสี่ซูดานแบล็คบี พบว่าสารละลาย $d=1.23$ ที่ได้จากการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 1 และไวเทลโลจันินบริสุทธิ์ ปรากฏแถบโปรตีนที่ย้อมติดสี่ซูดานแบล็คบี 3 แถบ (รูปที่ 14B แถวที่ 2 และ 3) ขณะที่ โปรตีนมาตรฐานไม่ติดสี่ซูดานแบล็คบี (รูปที่ 14B แถวที่ 1) เมื่อย่อยกับเจลด้วยสี่คูมาซีบลู พบว่าโปรตีนแถบ P480, P400 และ P240 ที่ย้อมติดสี่ซูดานแบล็คบี แสดงว่าไวเทลโลจันินทั้ง 3 แถบ มีสมบัติเป็นลิโปโปรตีนหรือมีไขมันเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับไวเทลโลจันินของปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ เช่น ปลากะพงแดง (พอลจิต วิโนทพรรษ์, 2539) และปลากะรัง (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) ที่ย้อมติดสี่ซูดานแบล็คบี ส่วนไวเทลโลจันินของปลาเรนโบว์เทราท์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ 18% (ฟอสโฟลิพิด 11%, ไตรกลีเซอไรด์ 4% และคอเลสเตอรอล 2%) (Norberg and Haux, 1985) ในขณะที่ของปลาคอด ปลาเทอร็อบทและปลาวูล์ฟฟิช มีไขมัน 10-18% ของน้ำหนักแห้ง โดย 70% ของไขมันทั้งหมดเป็นฟอสโฟลิพิดและกรดไขมันซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบบไม่อิ่มตัว (Silversand and Haux, 1991)

3.3.4 ฟอสโฟโปรตีน

จากการย่อยไวเทลโลจันินบริสุทธิ์ด้วยชุดย่อยฟอสโฟโปรตีนเพื่อตรวจหาองค์ประกอบฟอสเฟต พบไวเทลโลจันินเฉพาะแถบ P240 เท่านั้นที่ย้อมติดสี่เมธิลกรีน (รูปที่ 14D แถวที่ 3) ซึ่งตรงกับไวเทลโลจันินแถบ P240 เมื่อย่อยแบบซิลเวอร์ (รูปที่ 14C แถวที่ 3) โดยใช้ฟอสไวทินเป็นฟอสโฟโปรตีนมาตรฐานและ soybean trypsin inhibitor เป็นโปรตีนควบคุมที่ไม่มีฟอสเฟต (รูปที่ 14D แถวที่ 4 และ 5 ตามลำดับ) เช่นเดียวกับไวเทลโลจันินจากปลาสมากและไข่ของปลากะพงแดงที่ย้อมติดสี่เมธิลกรีน (พอลจิต วิโนทพรรษ์, 2539) แสดงว่าไวเทลโลจันินแถบ P240 ของปลากะบอกดำเป็นฟอสโฟโปรตีน เช่นเดียวกับไวเทลโลจันินของปลาเรนโบว์เทราท์ ปลาเทอร็อบท และปลาวูล์ฟฟิช (Silversand and Haux, 1991; Norberg and Haux, 1985) แต่ปริมาณฟอสฟอรัสในไวเทลโลจันินของปลากะบอกดำอาจจะมีน้อยกว่าปลาน้ำจืด เช่น ปลาแซลมอนน้ำจืด ที่มีฟอสฟอรัสสูงกว่าปลาเทอร็อบทประมาณ 2 เท่า (Craik and Harvey, 1984a, b) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ



รูปที่ 14 แบบแผนของไวเทลโลจีนิบรีสุทธีใน Nondenaturing PAGE
 ย้อมด้วยสีซูดานแบล็คบี (B) แล้วย้อมทับด้วยสีคูมาซีบลู (A) และ
 ย้อมแบบซิลเวอร์ (C) หรือย้อมด้วยชุดย้อมฟอสโฟโปรตีน (D)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 สารละลาย $d=1.23$ จาก ultracentrifugation ครั้งที่ 1

แถวที่ 3 ไวเทลโลจีนิบรีสุทธีจาก preparative PAGE

แถวที่ 4 phosvitin

แถวที่ 5 soybean trypsin inhibitor

ปริมาณโปรตีนแถวละ 2-15 ไมโครกรัม

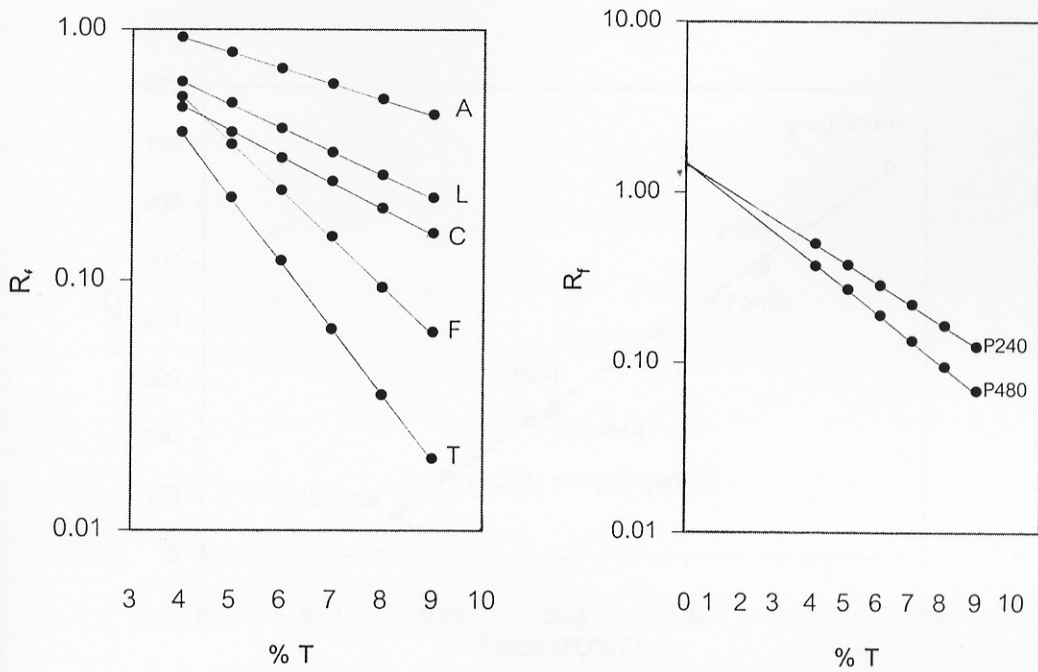
ฟอสเฟตในพลาสมาของปลาตุ๊กเทศเมื่อก่อนการสะสมไวเทลโลจีนิในโอโอไซต์ (248.3 ± 20.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่เพิ่มขึ้นหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล (924.0 ± 22.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แสดงว่าไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จากปลากระบอกดำมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับปลาชนิดอื่น ๆ ซึ่งหมู่ฟอสเฟตในโมเลกุลอาจทำให้ไวเทลโลจีนิสามารถจับกับไอออนได้สูง ทำหน้าที่เป็นตัวนำแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Fe^{2+} เข้าในโอโอไซต์ (Hara, 1976; Hara and Hirai, 1978)

3.3.5 จำนวนหน่วยย่อย

จากการศึกษาจำนวนหน่วยย่อยของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ใน SDS-PAGE สภาพรีดิคท์ พบแบบแผนโปรตีนของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จำนวนมากกว่า 10 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5,000-225,000 ดัลตัน (รูปที่ 13A แถวที่ 2) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจีนิของปลากระบอกดำประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หรือหน่วยย่อยที่มีขนาดต่าง ๆ กัน จำนวนมากประกอบกันเป็นโปรตีนเชิงซ้อนขนาดใหญ่ สมบัติของไวเทลโลจีนิเช่นนี้พบในปลาหลายชนิด เช่น ปลาเรนโบว์เทราท์ (Wiley *et al.*, 1979) ปลาทอง (de Vlaming *et al.*, 1980) ปลากระวัง (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) เป็นต้น

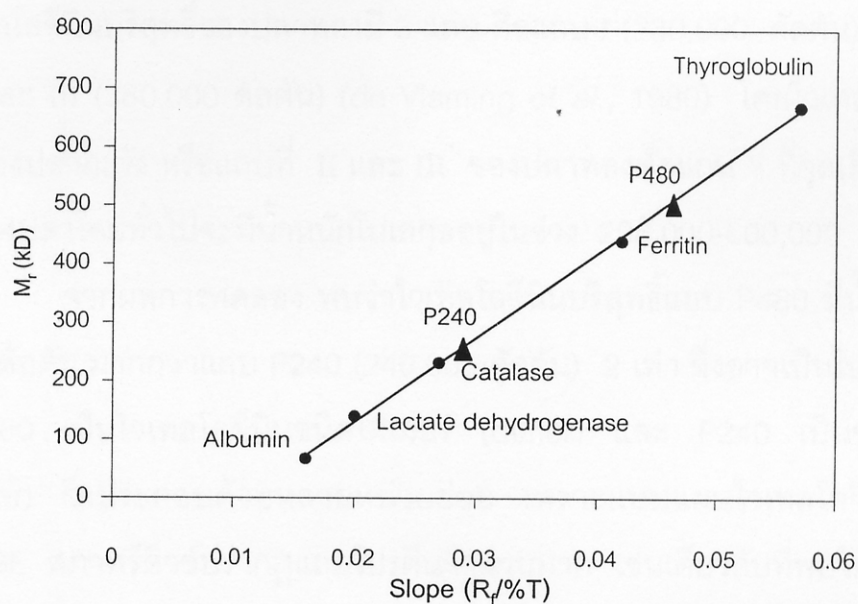
3.3.6 น้ำหนักโมเลกุล

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ ตามวิธีของ Rodbard (1976) และ Ferguson (1964) ที่อ้างโดย de Vlaming *et al.* (1980) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าความสัมพันธ์ของ \log ของการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ($\log R_f$) ของโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (M_r 669,000), เฟอริทิน (M_r 440,000), คาทาเลส (M_r 232,000), แลคเททดีไฮโดรจีเนส (M_r 140,000) และอัลบูมิน (M_r 67,000) มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์เจล (รูปที่ 15A) เช่นเดียวกับของไวเทลโลจีนิแถบ P480 และ P240 (รูปที่ 15B) เมื่อนำความชันของกราฟแต่ละเส้นไปหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจีนิแต่ละแถบจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 16) สามารถคำนวณได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจีนิแถบ P480 เป็น 480,000 ดัลตัน และแถบ P240 เป็น 240,000 ดัลตัน จากน้ำหนักโมเลกุลของ



รูปที่ 15 การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน (A) และไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (B) ใน Nondenaturing PAGE ที่มีความเข้มข้นของเจล 4-9%

- T = Thyroglobulin
- F = Ferritin
- C = Catalase
- L = Lactate dehydrogenase
- A = Albumin
- P480 = ไวเทลโลจีนินแถบ P480
- P240 = ไวเทลโลจีนินแถบ P240



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานระหว่างความชันของการเคลื่อนที่สัมพัทธ์
กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

P480 ไวเทลโลจีนิน แถบ P480

P240 ไวเทลโลจีนิน แถบ P240

โปรตีนทั้ง 2 แถบ โปรตีนแถบ P480 และ P240 น่าจะมีความสัมพันธ์กันเพราะเส้นกราฟในรูปที่ 15B ของโปรตีนทั้ง 2 แถบตัดแกน Y ที่จุดเดียวกัน แสดงว่ามีความหนาแน่นของประจุที่ผิวเท่ากัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน (Ferguson, 1964; Rodbard, 1976) ผลการทดลองนี้คล้ายกับไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลากระวัง ที่ปรากฏโปรตีน 2 แถบ คือแถบ I (525,000 ดัลตัน) และแถบ II (260,000 ดัลตัน) (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) ส่วนไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลาทองมี 3 แถบ คือแถบ I (230,000 ดัลตัน), II (330,000 ดัลตัน) และ III (380,000 ดัลตัน) (de Vlaming *et al.*, 1980) โดยไวเทลโลจีนิบรีสุทรีที่ I และ II ของปลากระวัง หรือแถบที่ II และ III ของปลาทองตัดแกน Y ที่จุดเดียวกัน ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลาโดยทั่วไปจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200,000-600,000 ดัลตัน

จากผลการทดลอง พบว่าไวเทลโลจีนิบรีสุทรีแถบ P480 มีน้ำหนักโมเลกุล 480,000 ดัลตัน มากกว่าแถบ P240 (240,000 ดัลตัน) 2 เท่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไวเทลโลจีนิบรีสุทรี P480 เป็นไวเทลโลจีนิบรีสุทรีชนิดไดเมอร์ (dimer) และ P240 เป็นชนิดโมโนเมอร์ (monomer) ซึ่งประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย เพราะแบบแผนไวเทลโลจีนิบรีสุทรีใน SDS-PAGE สภาพรีดิวิซ์ปรากฏแถบโปรตีนจำนวนมาก เช่นเดียวกับที่พบในไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลาชนิดต่าง ๆ เช่น ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลาทองขนาด 380,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 140,000, 142,000 และ 147,000 ดัลตัน (de Vlaming *et al.*, 1980) ขณะที่ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลาไหลญี่ปุ่นขนาด 350,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 25,000, 31,000 และ 85,000 ดัลตัน (Hara *et al.*, 1980) และไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลากระวังขนาด 525,000 และ 260,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 113,000 และ 140,000 ดัลตัน (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) รวมทั้งไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลาเมดากา (Hmazaki *et al.*, 1987) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Hara and Hirai, 1978) และปลาแซลมอน (So *et al.*, 1985) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000-600,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 85,000-200,000 ดัลตัน

สำหรับไวเทลโลจีนิบรีสุทรีแถบ P400 และ P160 อาจจะมาจากการแตกออกของไวเทลโลจีนิบรีสุทรีแถบ P480 โดยแตกเป็นไวเทลโลจีนิบรีสุทรีที่มีน้ำหนักโมเลกุล 400,000 และ

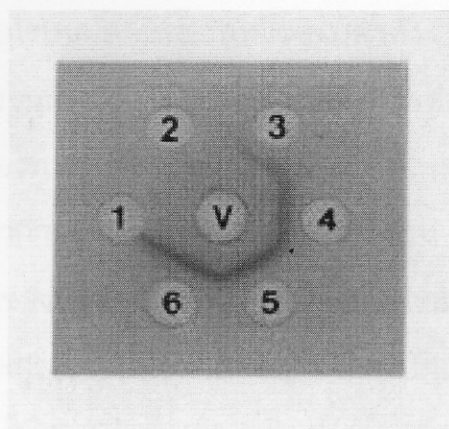
240,000 ดัลตัน เพราะจากการแยกสารละลายพีค D3 ด้วยวิธี preparative PAGE พบว่า ในสารละลายโปรตีนแถบ P480 ปรากฏแถบโปรตีน P480, P400 และ P240 หลังจากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรัง ซึ่งแตกต่างจากการย้อมด้วยสี Ponceau S ที่ปรากฏเฉพาะแถบโปรตีน P480 เท่านั้น (รูปที่ 7 แถวที่ 4) เช่นเดียวกับไวเทลโลจีนินแถบ P160 ปรากฏมากขึ้นจากการแยกไวเทลโลจีนินด้วย ultracentrifugation ครั้งที่ 2 (รูปที่ 10 แถวที่ 3) และวิธี preparative PAGE (รูปที่ 12B แถวที่ 6) ดังนั้นไวเทลโลจีนินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 400,000 (P400), 240,000 (P240) และ 160,000 ดัลตัน (P160) น่าจะ มาจากการแตกออกของไวเทลโลจีนินขนาด 480,000 ดัลตัน (P480) ซึ่งสอดคล้องกับไวเทลโลจีนินของปลากะรัง คือ เมื่อตัดแยกไวเทลโลจีนินแถบ I (525,000 ดัลตัน) จะปรากฏไวเทลโลจีนินแถบ X ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 350,000 ดัลตัน อยู่ร่วมกับไวเทลโลจีนินแถบ I เสมอ ซึ่ง Utarabhand และ Bunlipatanon, (1996) ได้สรุปว่าไวเทลโลจีนินแถบ X มาจากการย่อยของไวเทลโลจีนินแถบ I โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) ซึ่งพบได้เสมอจากการทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากปลาชนิดอื่น ๆ เช่น ปลาทอง ปลาเรนโบว์เทราท์และปลาซีเทราท์ (de Vlaming *et al.*, 1980; Norberg and Haux, 1985)

3.4 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

3.4.1 การสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่าย

จากการฉีดกระตุ้นด้วยไวเทลโลจีนิน พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้ โดยเริ่มสังเคราะห์แอนติบอดีหลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งที่ 2 และสังเคราะห์มากขึ้นตามจำนวนครั้งการฉีด ทั้งนี้ไม่พบแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินในซีรัมกระต่ายก่อนการฉีดแอนติเจน (รูปที่ 17)

ในการเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากปลากระบอกดำโดยฉีดเข้าในผิวหนังร่วมกับฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่ายหลาย ๆ จุด ครั้งละ 20 ไมโครกรัม ซึ่งใช้ปริมาณไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์น้อยกว่าการฉีดไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรัง 1,000 ไมโครกรัม เข้าใต้ผิวหนังเพียงอย่างเดียวถึง 50 เท่า (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีได้ภายใน 2 สัปดาห์ไม่แตกต่างกัน เช่น



รูปที่ 17 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของการสังเคราะห์ แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะบอกดำในซีรัมกระต่าย

- V ไวเทลโลจีนิน (20 μg)
- 1 ซีรัมก่อนฉีดไวเทลโลจีนิน (150 μg)
- 2 ซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนิน ครั้งที่ 1 (150 μg)
- 3 ซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนิน ครั้งที่ 2 (150 μg)
- 4 ซีรัมหลังฉีดไวเทลโลจีนิน ครั้งที่ 3 (150 μg)
- 5 ซีรัมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50% (50 μg)
- 6 แอนติบอดีหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel (50 μg)

เกี่ยวกับการฉีดกระต่ายในผิวหนังเพียงอย่างเดียวด้วยไวเทลโลจีนิบรีสุทรีจากปลาอิงลิชโซลครั้งละ 100 ไมโครกรัม (Roubal *et al.*, 1997) และฉีดไวเทลโลจีนิบรีสุทรีจากปลาเทราท์ทะเลจุดครั้งละ 400, 100 และ 50 ไมโครกรัม ตามลำดับ ด้วยวิธีเดียวกัน พบว่ากระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลาทั้ง 2 ชนิดได้เช่นกัน แสดงว่าการฉีดกระต่ายด้วยวิธีฉีดเข้าในผิวหนังใช้ปริมาณแอนติบอดีครั้งละไม่มากกระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรีได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะไวเทลโลจีนิบรีสุทรีที่ถูกฉีดเข้าในผิวหนังถูกทำลายได้ช้ากว่าการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ฉีดเข้าในเส้นเลือดหรือฉีดเข้าในช่องท้อง ซึ่งพบว่าต้องใช้แอนติเจนปริมาณมาก หรืออาจเป็นเพราะไวเทลโลจีนิบรีสุทรีเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่จึงมีสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีต่อการสังเคราะห์แอนติบอดี แต่ข้อเสียของการฉีดเข้าในผิวหนังคือกระต่ายจะเจ็บมาก และปริมาตรที่ฉีดแต่ละจุดไม่มากและฉีดยากกว่าวิธีอื่น ๆ

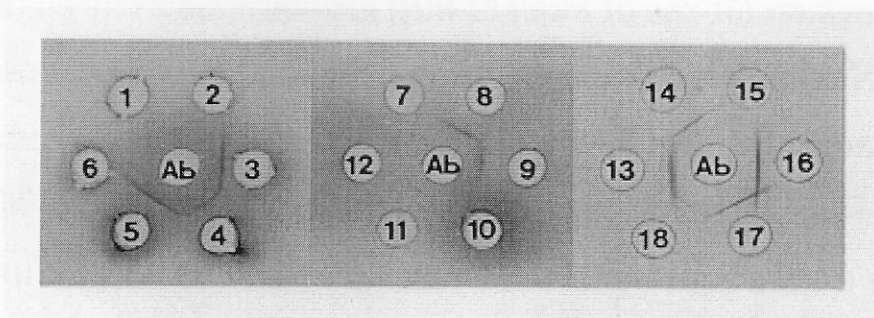
3.4.2 การแยกแอนติบอดีจากซีรัม

เมื่อแยกแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรีจากซีรัมกระต่าย 5 มิลลิลิตร (281 มิลลิกรัมโปรตีน) โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 50% แยกได้โปรตีน 97.44 มิลลิกรัม คิดเป็น 34.68% ของซีรัมโปรตีนเริ่มต้น เมื่อแยกแอนติบอดีต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีถูกชะออกมาในพีคแรก (Wallace, 1965) และมีปริมาณ 8.55 มิลลิกรัม คิดเป็น 3.04% ของซีรัมโปรตีนทั้งหมด แอนติบอดีที่ผ่านการแยกทั้งสองขั้นตอนนี้เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลจีนิบรีสุทรีได้ดีเช่นเดียวกับของซีรัมกระต่ายก่อนผ่านคอลัมน์ดังแสดงผลในรูปที่ 17

3.4.3 การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับพลาสมา

ไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลากระบอกชนิดต่าง ๆ

เมื่อนำแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบรีสุทรีของปลากระบอกดำไปทำ Ouchterlony double immunodiffusion พบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับพลาสมาของปลากระบอกเทศเมื่อยมีไขหลายชนิด ได้แก่ ปลากระบอกดำ ปลากระบอกหัวลิ่ว ปลากระบอกท่อนใต้ ปลากระบอกขาว และปลากระบอกปีกเหลือง (รูปที่ 18 หลุมที่



รูปที่ 18 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำเพศเมียกับพลาสมาและสารสกัดเนื้อเยื่อของปลาเพศเมียชนิดต่าง ๆ

- Ab แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (50 μg)
- 1, 7 พลาสมาปลากระบอกดำไม่มีไข่ (150 μg)
- 2 สารสกัดรังไข่ปลากระบอกดำไม่มีไข่ (150 μg)
- 3, 9 สารสกัดรังไข่ปลากระบอกดำมีไข่ (150 μg)
- 4 ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (20 μg)
- 5 สารสกัดตับปลากระบอกดำมีไข่ (150 μg)
- 6, 12 พลาสมาปลากะพงแดงที่ไม่เจริญพันธุ์ (150 μg)
- 8, 13 พลาสมาปลากระบอกดำมีไข่ (150 μg)
- 10 พลาสมาปลากะรังที่เจริญพันธุ์ (150 μg)
- 11 สารสกัดรังไข่ปลากะรัง (150 μg)
- 14 พลาสมาปลากระบอกหัวสีมีไข่ (150 μg)
- 15 พลาสมาปลาตุ๊กทะเลมีไข่ (150 μg)
- 16 พลาสมาปลากระบอกท่อนใต้มีไข่ (150 μg)
- 17 พลาสมาปลากระบอกขาวมีไข่ (150 μg)
- 18 พลาสมาปลากระบอกปีกเหลืองมีไข่ (150 μg)

13-14, 16-18) แต่ไม่เกิดปฏิกริยากับพลาสมาของปลาทะเลเทศเมี่ยงที่เจริญพันธุ์ซึ่งมาจากวงศ์อื่น ได้แก่ ปลากระรังและปลาดุกทะเล (รูปที่ 18 หลุมที่ 10 และ 15) รวมทั้งพลาสมาของปลากระพงแดงที่ไม่เจริญพันธุ์ (รูปที่ 18 หลุมที่ 6,12) แสดงว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำสามารถเกิดปฏิกริยากับไวเทลโลจีนินของปลากระบอกข้ามชนิด (species) ได้ แต่มีความจำเพาะกับไวเทลโลจีนินในกลุ่มปลากระบอกเท่านั้น ซึ่งสมบัติการเป็นแอนติเจนในปลาเหล่านี้ไม่เหมือนกันทั้งหมด เพราะแถบการตกตะกอนของปลากระบอกดำ ปลากระบอกหัวสีและปลากระบอกท่อนใต้คล้ายคลึงกันมาก (รูปที่ 18) แต่แตกต่างบ้างจากของปลากระบอกขาวและปลากระบอกปีกเหลืองซึ่งเป็นปลากระบอกในสกุล (genus) *Valamugil* ขณะที่ปลากระบอกดำ ปลากระบอกหัวสีและปลากระบอกท่อนใต้อยู่ในสกุล *Lisa* (รูปที่ 18) เช่นเดียวกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลา gag สามารถเกิดปฏิกริยากับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลา Nassau grouper และปลา red hind ที่เป็นปลาในวงศ์เดียวกับปลา gag ได้ (Heppell and Sullivan, 1999) แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลต่อไวเทลโลจีนินของปลาแอตแลนติกแซลมอนสามารถเกิดปฏิกริยากับไวเทลโลจีนินของปลาบราวน์เทราท์ เรนโบว์เทราท์และอาร์คติกชาร์ร์ ซึ่งเป็นปลาวงศ์เดียวกับปลาแอตแลนติกแซลมอนและสามารถเกิดปฏิกริยากับไวเทลโลจีนินของปลาต่างวงศ์ เช่น ปลาเทอร์บอท และปลาฮาลิบัท ได้ (Nilsen et al., 1998) ซึ่งแตกต่างจากแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาแซลมอนที่เกิดปฏิกริยาการตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินในพลาสมาและสารสกัดจากรังไข่ของปลาแซลมอนเทศเมี่ยง แต่ไม่เกิดปฏิกริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาเรนโบว์เทราท์และปลาทองเทศเมี่ยง (So et al., 1985) รวมทั้งแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากระรังเกิดปฏิกริยากับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาเทศเมี่ยงต่างวงศ์กับปลากระรังได้ เช่น ปลากระพงขาว ปลากระบอกดำ ปลากระพงแดง และปลาเห็ดโคนได้ (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538)

3.4.4 การเกิดปฏิกริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับสารสกัดเนื้อเยื่อ

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากปลากระบอกดำสามารถเกิดปฏิกริยาการตกตะกอนกับสารสกัดรังไข่และสารสกัดตับของปลากระบอกดำเทศเมี่ยงมีไข่ แต่ไม่เกิด

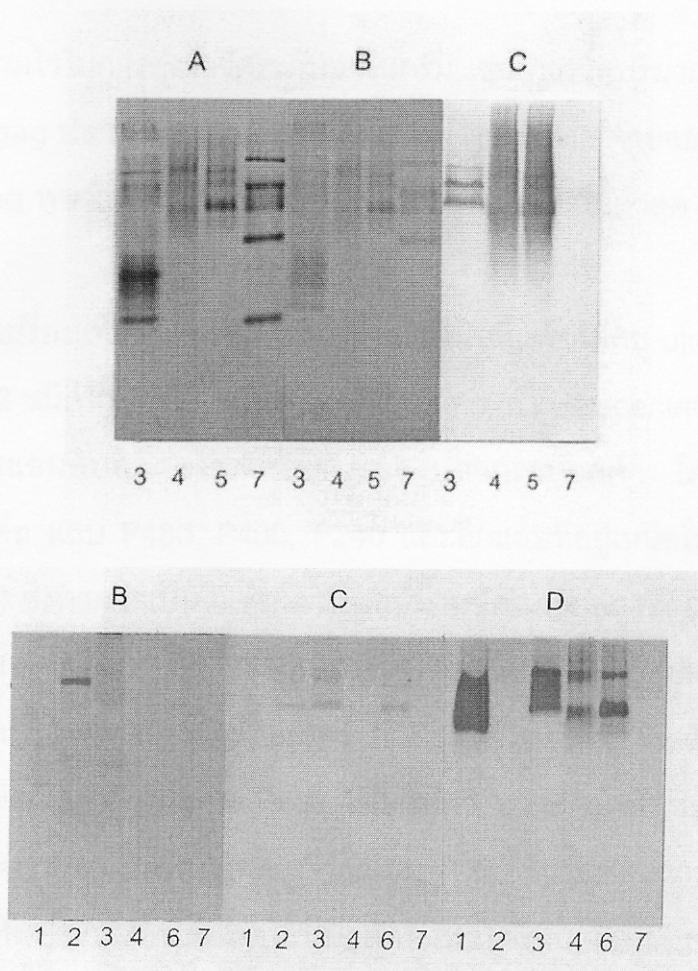
ปฏิกริยากับสารสกัดรังไข่และสารสกัดตับของปลาเพศเมียไม่มีไข่ รวมทั้งสารสกัดรังไข่ของปลากระวังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ด้วย (รูปที่ 18) แสดงว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะกับไวเทลโลจีนินในพลาสมาและไวเทลโลจีนินที่ผลิตในตับหรือที่สะสมอยู่ในรูปของโปรตีนโอล์คของปลากระบอกดำเพศเมียไม่มีไข่ ส่วนของปลากระบอกดำเพศเมียไม่มีไข่อาจมีระดับไวเทลโลจีนินในส่วนต่าง ๆ เหล่านี้ น้อยมากหรือยังไม่มี การสังเคราะห์จึงไม่พบปฏิกริยา บ่งชี้ว่าไวเทลโลจีนินของปลากระบอกเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์ มีความเกี่ยวข้องกันหรืออาจมีโครงสร้างที่คล้ายกับโปรตีนในสารสกัดตับและโปรตีนโอล์คในสารสกัดรังไข่ เช่นเดียวกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากระวังที่เกิดปฏิกริยาการตกตะกอนกับพลาสมาปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์และพลาสมาปลาเพศผู้ที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ สารสกัดรังไข่และสารสกัดตับของปลากระวังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ แต่ไม่ทำปฏิกริยากับพลาสมาปลาเพศเมียที่ไม่เจริญพันธุ์ พลาสมาของปลากระวังเพศผู้ สารสกัดหัวใจ สารสกัดตับของปลากระวังที่ไม่เจริญพันธุ์ (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538) เช่นเดียวกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาไหลญี่ปุ่น ซึ่งเกิดปฏิกริยาการตกตะกอนกับพลาสมาและสารสกัดไข่ของปลาเพศเมีย แต่ไม่เกิดปฏิกริยากับพลาสมาของปลาเพศผู้ (Hara *et al.*, 1980) แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาแซลมอนเกิดปฏิกริยาการตกตะกอนกับพลาสมา สารสกัดตับและสารสกัดรังไข่ของปลาชนิดเดียวกัน แต่ไม่เกิดปฏิกริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาเรนโบว์เทราท์และปลาทอง (So *et al.*, 1985) ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องระหว่างไวเทลโลจีนินในพลาสมา สารสกัดตับและโปรตีนโอล์คในสารสกัดจากไข่หรือรังไข่ บ่งชี้ว่าไวเทลโลจีนินถูกสังเคราะห์จากตับ ส่งออกไปตามกระแสเลือดและถูกรับเข้าไปสะสมเป็นโปรตีนโอล์คในไข่

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินปลากระบอกดำไม่เกิด cross reactivity กับโปรตีนโอล์คหรือสารสกัดรังไข่ของปลากระวังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ (รูปที่ 18 หลุมที่ 18) ในทำนองเดียวกับพลาสมา แสดงให้เห็นความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาต่างวงศ์ว่าเกิดปฏิกริยาไม่ได้

3.5 การทำ Western blot

3.5.1 การติดตามแถบไวเทลโลจีนิน

จากการติดตามแถบไวเทลโลจีนินใน Western blot โดยย้อมเปรียบเทียบระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังและแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ พบว่าความสามารถในการจับของแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดนี้แตกต่างกัน (รูปที่ 19) กล่าวคือแอนติบอดีต่อปลากะรังเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรัง (รูปที่ 19D แถวที่ 1) และในพลาสมาของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่ (รูปที่ 19D แถวที่ 3) รวมทั้งไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากระบอกดำ (รูปที่ 19D แถวที่ 5-6) โดยมีความไวของการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่าแอนติบอดีต่อปลากระบอกดำมากซึ่งเห็นจากแถบที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างไวเทลโลจีนินกับแอนติบอดีต่อปลากะรังเข้มกว่ากับแอนติบอดีต่อปลากระบอกดำ (รูปที่ 19C) มาก รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากระบอกดำเพศเมียไม่มีไข่ (รูปที่ 19D แถวที่ 2) ส่วนแอนติบอดีต่อปลากระบอกดำไม่เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรัง (รูปที่ 19C แถวที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทำ Ouchterlony double immunodiffusion ที่ไม่พบปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิดเช่นกัน (รูปที่ 18) อาจเป็นได้ว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังสามารถจดจำและเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนบางส่วนของไวเทลโลจีนินหรือโปรตีนโพลีของปลากระบอกดำได้ ซึ่งอาจมีส่วนคล้ายกับไวเทลโลจีนินของปลากะรังบ้าง แต่แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำมีความจำเพาะสูงกว่าไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินหรือโปรตีนโพลีของปลากะรังได้ แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำเกิดปฏิกิริยาได้กับพลาสมาไวเทลโลจีนินและไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (รูปที่ 19C แถวที่ 3-6) รวมทั้งกับแถบโปรตีน P240 ของปลาเพศเมียไม่มีไข่ (รูปที่ 19 แถวที่ 2) เป็นไปได้ว่าโปรตีนแถบนี้เป็นไวเทลโลจีนินที่พบในเลือดอยู่บ้างแล้วก่อนที่จะปลามีไข่เพื่อสะสมโปรตีนโพลี แต่อาจมีปริมาณน้อยจนตรวจจับด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion ไม่ได้หรือเป็นเพราะวิธี Western blot มีความไวมากกว่าวิธี double immunodiffusion จึงเห็นปฏิกิริยาของแถบโปรตีนนี้ได้ และอาจพบได้ปริมาณมากขึ้นหากใช้เทคนิค ELISA มาตรวจวัดซึ่งพบ



รูปที่ 19 การย้อม Nondenaturing gel ด้วยสีคумаซีบลู (A) เปรียบเทียบกับการทำ Western blot ระหว่างการย้อมด้วยสี Ponceau S (B) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะบอกดำ (C) และแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากะรัง (D)

- แถวที่ 1 พลาสมาปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ (12 μg)
- แถวที่ 2 พลาสมาปลากะบอกเพศเมียไม่มีไข่ (12 μg)
- แถวที่ 3 พลาสมาปลากะบอกเพศเมียมีไข่ (12 μg)
- แถวที่ 4 สารละลาย $d=1.23$ จาก ultracentrifugation ครั้งที่ 1 (2 μg)
- แถวที่ 5 ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จาก ultracentrifugation ครั้งที่ 2 (3 μg)
- แถวที่ 6 ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จาก preparative PAGE (2 μg)
- แถวที่ 7 โปรตีนมาตรฐาน (12 μg)

ว่าวิธี ELISA มีความไวในการตรวจวัดระดับนาโนกรัม เช่น การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลา gag ปลา Nassu grouper และปลา red hind ด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลา gag พบว่าสามารถวัดไวเทลโลจีนินในพลาสมาได้ต่ำสุด 165 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบการย่อยแถบไวเทลโลจีนินที่เตรียมโดย ultracentrifugation ด้วยแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด พบว่าไวเทลโลจีนินที่ได้จากการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 1 จะเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ โดยปรากฏโปรตีนประมาณ 4 แถบ คือ แถบ P480, P400, P240 และอีกแถบที่อยู่เหนือโปรตีนแถบ P480 (รูปที่ 19C แถวที่ 4) ซึ่งคาดว่าเป็นไวเทลโลจีนินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่ถูกกำจัดไปโดยการทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 2 (รูปที่ 19C แถวที่ 5) และโดยวิธี preparative PAGE (รูปที่ 19C แถวที่ 6) การทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 2 แสดงไวเทลโลจีนินแถบ P480, P400 และ P240 เช่นเดียวกันและยังมีแถบ P160 เพิ่มขึ้นมา อาจเป็นไปได้ที่ไวเทลโลจีนินบางแถบในแถบนี้มีการแตกย่อยไปเป็นไวเทลโลจีนินแถบ P160 ในขั้นตอนการทำ ultracentrifugation คล้ายกับที่พบในปลากระวังที่พบว่าเมื่อตัดไวเทลโลจีนินแถบ I และ II ในเจลออกจากกัน แล้วนำไปทำอเล็กโทรฟอริซิสยังปรากฏแถบ X ในสารละลายส่วนที่เป็นแถบ I ซึ่งเกิดจากการแตกออกของหน่วยย่อย I ไปเป็นแถบ X (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) แต่จากการเตรียมไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative PAGE ไม่พบแถบ P160 (รูปที่ 19C แถวที่ 6) จากการย่อยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ด้วยแอนติบอดีต่อปลากระวัง พบว่าแอนติบอดีจะเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับไวเทลโลจีนินแถบ P480 และ P240 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาหรือเกิดได้น้อยมากกับไวเทลโลจีนินแถบ P400 (รูปที่ 19D แถวที่ 5-6) แต่แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระวังยังไวต่อโปรตีนแถบ P160 และแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าไวเทลโลจีนินแถบ P480 ซึ่งย่อยติดสีคумаซีบลู (รูปที่ 19A) หรือ Ponceau S (รูปที่ 19B) น้อยมากในขณะที่แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนทั้ง 2 แถบนี้ (รูปที่ 19C แถวที่ 5-6) โดยสรุปจากการทำ Western blot ของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ แล้วย่อยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ ปรากฏแถบไวเทล

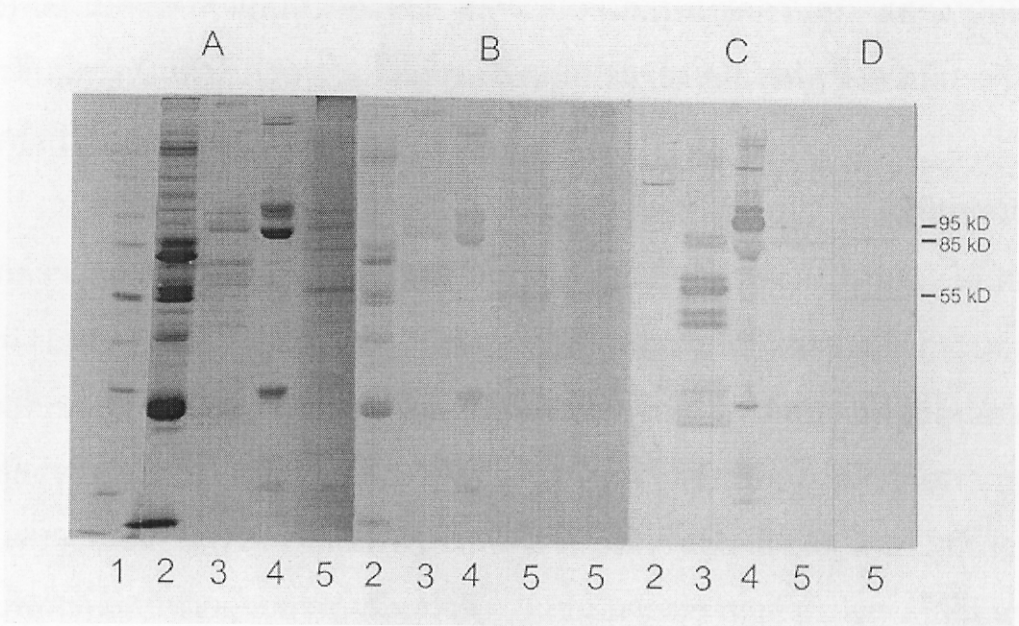
โลจินีหลัก 3 แถบคือ P480, P400 และ P240 (รูปที่ 19C แถวที่ 5-6) แต่แสดง 2 แถบหลักคือ P480 และ P240 เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีต่อปลากะรัง (รูปที่ 19D แถวที่ 5-6) แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดนี้มีความจำเพาะสูงเพราะไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 19C, D แถวที่ 7)

การติดตามไวเทลโลจินีของปลานิลด้วยวิธี Western blot ในพลาสมาปลา นิลที่ผ่านการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล พบโปรตีนแถบ H (480,000 ดัลตัน) ถูกสังเคราะห์มากขึ้นในพลาสมาเช่นเดียวกับแถบไวเทลโลจินี แต่โปรตีนแถบ H เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจินีบริสุทธิ์น้อยมากยากที่จะสังเกตเห็น และพบโปรตีนแถบ H ในพลาสมาของปลานิลเพศผู้ได้เล็กน้อย ซึ่งโปรตีนดังกล่าวไม่ใช่แถบไวเทลโลจินี แต่เป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ (Chan *et al.*, 1991)

3.5.2 การตรวจหาตัวรับไวเทลโลจินีจาสารสกัดเมมเบรนของโอโอไซต์

เมื่อนำสารละลายตัวอย่างต่าง ๆ รวมทั้งสารสกัดเมมเบรนของโอโอไซต์ไปทำ SDS-PAGE และทำ Western blot แล้วนำไปย้อมสีดังแสดงในรูปที่ 20 ปรากฏแถบโปรตีนที่ย้อมแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วยสี Ponceau S คล้ายกับแถบโปรตีนในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (รูปที่ 20A และ B แถวที่ 2-5) แสดงว่าโปรตีนส่วนใหญ่ถูกขนถ่ายลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลส จากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจินีของปลากะรังพบว่ามีโปรตีนเกือบทั้งหมดของไวเทลโลจินีบริสุทธิ์เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ (รูปที่ 20 แถวที่ 3) รวมทั้งโปรตีนส่วนมากของโปรตีนโอล์คในสารสกัดรังไข่ (รูปที่ 20 แถวที่ 4)

เมื่อนำแผ่นไนโทรเซลลูโลสไปตัดแบ่งเพื่อย้อมเปรียบเทียบระหว่างการบ่มและไม่บ่มกับไวเทลโลจินีบริสุทธิ์แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจินีของปลากะรังพบว่ามีสารสกัดเมมเบรนชุดควบคุมซึ่งไม่ผ่านการบ่มกับไวเทลโลจินีบริสุทธิ์ ปรากฏโปรตีนประมาณ 2 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 95,000 ดัลตัน (P95) และ 85,000 ดัลตัน (P85) ที่ย้อมติดสีของแอนติบอดี (รูปที่ 20C แถวที่ 5) บ่งชี้ว่าน่าจะเป็นแถบโปรตีนโอล์คที่อาจปะปนมากับสารสกัดเมมเบรน เพราะพบโปรตีน 2 แถบ นี้ในสารสกัดรังไข่ของปลากะรังด้วยเช่นกัน (รูปที่ 20C แถวที่ 4) ส่วนในสารสกัดเมมเบรนที่



รูปที่ 20 การทำ Western blot ของ SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างการย้อมด้วยสีคูลูมาซีบลู (A) สี Ponceau S (B) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ (C) และการบ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์แล้วย้อมต่อด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ (D)

- แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (12 μg)
- แถวที่ 2 พลาสมาของปลาเพศเมียมีไข่ (12 μg)
- แถวที่ 3 ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (4 μg)
- แถวที่ 4 สารสกัดรังไข่ (2 μg)
- แถวที่ 5 สารสกัดเมมเบรนจากโอโอไซต์ (40 μg)

บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ก่อนการข้อมด้วยแอนติบอดี พบแถบโปรตีน P95, P85 และอีกแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดัลตัน (P55) เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดี (รูปที่ 20D แถวที่ 5) โดยไม่ตรวจพบแถบโปรตีน P55 ในสารสกัดเมมเบรนชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าแถบโปรตีนนี้ควรเป็นตัวรับไวเทลโลจีนินที่พบในเมมเบรนของโอโอไซต์ ซึ่งควรมีการศึกษาสมบัติโดยละเอียดต่อไป

จากผลการทดลอง แสดงว่าสามารถตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำจากสารสกัดเมมเบรนของเซลล์โอโอไซต์ที่สกัดด้วย Triton X-100 ได้โดยวิธี Western blot ร่วมกับความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ และแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับเปอร์ออกซิเดส ซึ่งไม่พบว่ามีรายงานการใช้วิธีนี้เพื่อตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินมาก่อนและเป็นวิธีที่มีข้อดีคือไม่เป็นอันตรายต่อผู้ทดลอง เพราะปกติการตรวจหาแถบตัวรับไวเทลโลจีนินใช้วิธี ligand blot โดยบ่มกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี¹²⁵I เช่น การตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินจากเมมเบรนที่สกัดด้วย octyl- β -D-glucoside จากเซลล์โอโอไซต์ของไก่ (Stifani *et al.*, 1988) หรือจากเมมเบรนที่สกัดด้วย 1% Triton X-100 จากโอโอไซต์ของปลานิล (Chan *et al.*, 1991) และของปลา white perch (Tao *et al.*, 1996) หรือจากเมมเบรนที่สกัดด้วย octyl- β -D-glucopyranosidase ของปลาเรนโบว์เทราท์ (Lancaster and Tyler, 1994)

ตัวรับไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำมีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดัลตัน ซึ่งมีขนาดแตกต่างจากตัวรับไวเทลโลจีนินของงู (205,000 ดัลตัน) ไก่ (96,000 ดัลตัน) กบ (115,000 ดัลตัน) ปลาเรนโบว์เทราท์ (200,000 และ 100,000 ดัลตัน) และปลา white perch (157,000 และ 106,000 ดัลตัน) จึงควรศึกษาสมบัติของตัวรับไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำต่อไป เพราะพบว่าตัวรับไวเทลโลจีนินส่วนใหญ่จับกับไวเทลโลจีนินแบบไม่ถาวรสามารถจับกับไวเทลโลจีนินโมเลกุลใหม่ได้ ความเสถียรลดลงเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและบทบาทของพันธะไดซัลไฟด์ที่อยู่ระหว่างสายเปปไทด์ รวมทั้งความเหมือนและความแตกต่างระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนินกับตัวรับลิโพโปรตีนชนิดอื่น ซึ่งการศึกษาดังกล่าว สามารถระบุได้ว่าเป็นตัวรับไวเทลโลจีนินที่มีอยู่บนผิวเซลล์ของโอโอ

ไซท์ (Snigirevskaya *et al.*, 1997; Opresko and Wiley, 1987a, b; Stifani *et al.*, 1990) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าไวเทลโลจีนิของปลากระบอกดำถูกรับเข้าสู่ภายในโอโอไซท์โดยตัวรับที่อยู่บนเมมเบรนของโอโอไซท์ เช่นเดียวกับการรับไวเทลโลจีนิเข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่นยุง (Sappington *et al.*, 1995) และสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น กบ ไก่ และปลา (Opresko and Wiley, 1987a, b; Stifani *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1991; Lancaster and Tyler, 1994; Tao *et al.*, 1996)