

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ไวเทลโลจีนิ (vitellogenin) เป็นโปรตีนที่มีฟอสเฟต (phosphate) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไขมัน (lipid) แคลเซียมและเหล็กเป็นองค์ประกอบ ไวเทลโลจีนิ จึงจัดเป็นฟอสโฟลิพิดโกลโคโปรตีน (phospholipoglycoprotein) ซึ่งเป็นพลาสมาโปรตีน ที่ถูกสังเคราะห์โดยตับภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol) ในสัตว์ มีกระดูกสันหลังหรือฮอร์โมนจูวีไนล์ (juvenile hormone) ในแมลง ไวเทลโลจีนิถูกเติม ฟอสเฟตและคาร์โบไฮเดรต แล้วเชื่อมกับไขมันก่อนที่จะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด เมื่อ ถูกรับเข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ (oocyte) จะเปลี่ยนเป็นไวเทลลิน (vitellin) หรือโปรตีนโอล์ค (yolk protein) ซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (embryo)

ไวเทลโลจีนิเป็นโปรตีนเชิงซ้อนขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000-600,000 ดัลตัน (Dalton) มีสมบัติเป็นแอนติเจน (antigen) ที่ดีต่อการสังเคราะห์ แอนติบอดี (antibody) ในกระต่าย พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์มีความ จำเพาะต่อไวเทลโลจีนิในพลาสมา และสามารถเกิด cross reactivity กับไวเทลโลจีนิ ในสารสกัดตับและไวเทลลินของรังไข่ (ovary) ของปลาเทศเมี่ยงที่เจริญพันธุ์ได้ นอกจากนี้ แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลาบางชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนิของปลา ชนิดอื่นได้ จึงนำความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิไปประยุกต์ใช้ศึกษาสมบัติ ของไวเทลโลจีนิในปลาชนิดต่าง ๆ

ปลากระบอก (mullet) เป็นปลาในวงศ์ (family) Mugilidae ที่พบในประเทศไทย มีหลายชนิด โดยเฉพาะปลากระบอกดำเป็นปลาน้ำกร่อยที่มีรสชาติดีและนิยมบริโภค ปลา กระบอกอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยเฉพาะบริเวณชายฝั่งปากแม่น้ำ อยู่รวมกันเป็น ฝูง มีการผสมพันธุ์และวางไข่ในน้ำเค็ม การศึกษาด้านการสืบพันธุ์ของปลากระบอกมี น้อยมาก เจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากระบัง

(grouper, *Epinephelus malabaricus*) สามารถเกิด cross reactivity กับไวเทลโลจีนิในปลาสมอปลากระบอกดำได้ แต่ยังไม่มียางานการทำให้ไวเทลโลจีนิของปลากระบอกดำบริสุทธิ์และสมบัติทางชีวเคมีของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ไวเทลโลจีนิจากกระแสเลือดถูกรับเข้าสู่เซลล์โอโอไซท์โดยตัวรับไวเทลโลจีนิ (vitellogenin receptor) ที่อยู่บนผิวเซลล์โอโอไซท์โดยกระบวนการ receptor-mediated endocytosis (Opresko and Wiley, 1987a, b) ซึ่งพบได้ทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ยุง กบ ไก่ และปลา การศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนิในปลาใช้วิธี ligand blot โดยติดฉลากไวเทลโลจีนิด้วยสารกัมมันตรังสี ^3H หรือ ^{125}I ซึ่งเป็นสารที่เป็นอันตรายต่อผู้ทดลอง (Lancaster and Tyler, 1994) งานวิทยานิพนธ์นี้จึงประยุกต์ใช้วิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ของปลากระบอกดำในการตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนิจากสารสกัดเมมเบรน (membrane) ของโอโอไซท์ปลากระบอกดำ

ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงต้องการทำให้ไวเทลโลจีนิของปลากระบอกดำบริสุทธิ์โดยวิธีทางชีวเคมี และศึกษาสมบัติของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ ตลอดจนเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ เพื่อตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนิบนผิวเซลล์โอโอไซท์ของปลากระบอกดำ รวมทั้งศึกษา cross reactivity ระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลากระบอกดำกับปลาสมอปลากระบอกดำชนิด (species) ต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาพัฒนาการเจริญพันธุ์ของปลากระบอกดำและปลากระดุกแฉ่งชนิดอื่น ๆ ต่อไป เช่น การวัดระดับไวเทลโลจีนิในปลาที่มีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่ระยะต่าง ๆ หรือการศึกษากลไกการทำงานของตัวรับไวเทลโลจีนิระดับลึกต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 ชีววิทยาของปลากระบอกดำ

ปลากระบอกดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Lisa subviridis* หรือ *Mugil dussumieri* มีชื่อสามัญว่า greenback mullet เป็นปลาน้ำกร่อยชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณปากแม่น้ำหรือแหล่งน้ำกร่อยและสามารถอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดได้ มักอยู่รวมกัน

เป็นฝูงว่ายไปตามผิวน้ำ มีขนาดลำตัว 10-40 เซนติเมตร เพศเมียมีขนาดโตกว่าเพศผู้ รูปร่างเรียวยาวทรงกระบอก ขอบครีบหางมีสีคล้ำและเว้าเล็กน้อย มีครีบหลังแยกเป็น 2 ครีบ มีพื้นที่ขนาดเล็กและสั้น ตามีเยื่อไขมันคลุมปิดม่านตา บริเวณหลังมีสีเทาเข้มหรือเขียวคล้ำ ด้านท้องและด้านข้างลำตัวเป็นสีขาวเงินวาว มีแถบสีเทา 4-5 แถบ พาดไปตามความยาวของลำตัวแนวเดียวกับเกล็ด แต่ไม่ปรากฏว่ามีเส้นข้างลำตัวที่แท้จริงเหมือนปลาชนิดอื่น (รูปที่ 1) ปลากระบอกเป็นปลาที่มีลำไส้ยาวและเยื่อช่องท้องเป็นสีดำ อาหารของปลากระบอกเป็นแพลงก์ตอน (plankton) สาหร่าย พืชทะเล สัตว์ทะเลเล็ก ๆ ตัวอ่อนของแมลงและหอย (Chan and Chua, 1979)

ปลากระบอกแต่ละฝูงเป็นปลาเพศเดียวกัน แต่ปลาทั้งสองเพศจะอยู่รวมกันเมื่อเข้าฤดูผสมพันธุ์ ปลากระบอกเพศเมียที่ไข่แก่จะมีปลาตัวผู้เข้าผสม 4-5 ตัว ปลากระบอกวางไข่เวลากลางคืน ซึ่งพบได้ตลอดทั้งปีแต่ระยะที่ปลาวางไข่มากที่สุด คือ ระหว่างเดือนมิถุนายน-ตุลาคม จำนวนไข่ต่อแม่ปลาขึ้นกับขนาดของแม่ปลา โดยทั่วไปประมาณ 100,000-400,000 ฟอง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.73 มิลลิเมตร และใช้เวลาฟักออกมาเป็นตัว 17-21 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27-30 °C ระดับความเค็ม 29-32 ppt ลูกปลาเริ่มกินอาหารเมื่ออายุได้ 3 วัน และทนต่อสภาวะความเค็มที่แตกต่างกันได้ ลูกปลาจะเข้าสู่ปลาวัยเยาว์ (juvenile) เมื่ออายุได้ 30 วัน สามารถเจริญที่ความเค็มต่ำได้และหลังจากนั้นค่อย ๆ ปรับสภาพจนสามารถเจริญในน้ำจืดได้ ปลากระบอกจะมีขนาด 28 เซนติเมตร ภายใน 1 ปี (สมชาติ สุขวงศ์ และ นริศ ธนะคุ้มชีพ, 2520; นิเวศน์ เรื่องพานิช และคณะ, 2536; ชูสินธุ์ ชนะสิทธิ์ และคณะ, 2541)

1.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลาเพศเมีย

การสืบพันธุ์ของปลามีหลายแบบแตกต่างกัน ทั้งแยกเพศ ไม่แยกเพศและแบบไม่ผสมเชื้อ (parthenogenesis) ซึ่งมีผลให้อวัยวะสืบพันธุ์มีความแตกต่างกันไป แต่ลักษณะพื้นฐานเช่น เซลล์ต่าง ๆ ที่ประกอบเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เหล่านั้นยังคงคล้ายกันและทำหน้าที่สำคัญคือสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) (Nagahama, 1983)



รูปที่ 1 ปลากระบอกดำ (*Lisa subviridis*)

1.2.1 กำเนิดของรังไข่

รังไข่ของปลากระดูกแข็ง เจริญมาจากเซลล์ส่วนผิวของผนังช่องท้อง (peritoneal wall) เจริญหนาเป็นชั้นตามยาวเรียกว่า (cortex) รังไข่ของปลามีลักษณะเป็น 2 พู ทอดยาวไปตามความยาวของช่องท้องโดยมีเยื่อยึดติดกับผนังช่องท้อง พูทั้งสองเชื่อมต่อกันที่ปลายด้านหนึ่งติดกับท่อนำไข่ (oviduct) รังไข่ของปลาเกือบทุกชนิดมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ผนังรังไข่ด้านนอกมีชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) หุ้มไว้โดยรอบเรียกว่าทูนิกาอัลบูจินีเย (tunica albuginea)

ภายในรังไข่มีชั้นเยอร์มินัลอีพิทีเลียม (germinal epithelium) บุโดยรอบมีลักษณะเป็นหีบยื่นออกจากผนังมาสู่กึ่งกลางรังไข่เรียกว่า โอวิเจอร์สโฟลด์ (ovigerous fold) ภายในหีบนี้มีเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น (primordial germ cell) ซึ่งจะเจริญเป็นโอโอโกเนีย (oogonia) ต่อไป และเมื่อกระบวนการสร้างไข่เริ่มเกิดขึ้นเซลล์ของเยอร์มินัลอีพิทีเลียม จะเจริญมาล้อมรอบโอโอโกเนีย กลายเป็นโครงสร้างของฟอลลิเคิล (follicle)

1.2.2 การสร้างไข่ (Oogenesis)

ไข่ปลามีลักษณะแตกต่างกันทั้งขนาด รูปร่างและสี แต่มีส่วนประกอบหลักภายในไข่แบบเดียวกัน 3 ส่วน ได้แก่ นิวเคลียส (nucleus) ไซโทพลาซึม (cytoplasm) และ

เปลือกไข่หรือครีออน (chorion) ไชโทพลาซึมแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่จะแบ่งเซลล์เจริญไปเป็นเอมบริโอ อีกส่วนคือโปรตีนโอล์คซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำหรับพัฒนาการเจริญของเอมบริโอและตัวอ่อน โปรตีนโอล์คในไข่ได้มาจากไวเทลโลจินิกินในเลือดซึ่งถูกสังเคราะห์โดยตับเมื่อมีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดสูง

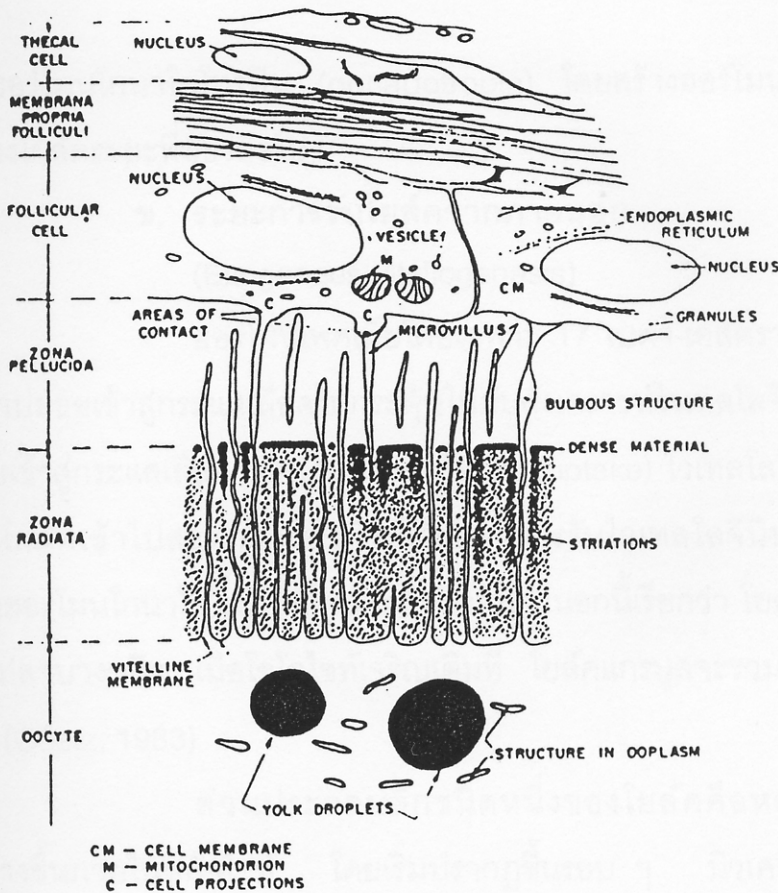
Wallace และ Selman (1981) ได้อธิบายถึงพัฒนาการเจริญพันธุ์ของโอโอไซท์ของปลา ซึ่งกลไกพัฒนาการเจริญพันธุ์ของโอโอไซท์มีลักษณะคล้ายคลึงกันในปลาทุกชนิด ดังนี้

1.2.2.1 การเพิ่มจำนวนโอโอโกเนีย (Oogonial proliferation)

โอโอโกเนียซึ่งเจริญมาจากเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้นมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ และขนาดของนิวเคลียส โอโอโกเนียกลายเป็นไพรมารีโอโอไซท์ (primary oocyte) เมื่อนิวเคลียสมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะดิพลอทีน (diplotene) ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นที่ 1 (meiosis I)

1.2.2.2 การสร้างและสะสมโอล์ค (Vitellogenesis)

โอโอไซท์ในระยะนี้มีการเพิ่มขนาดโดยการสะสมโปรตีนโอล์คภายในเซลล์ ขั้นตอนนี้เริ่มจากเยอร์มินัลอิพิทีเลียมเจริญมาล้อมรอบโอโอไซท์ เรียกเซลล์ชั้นนี้ว่า ฟอลลิเคิล ซึ่งฟอลลิเคิลจะค่อย ๆ เจริญแบ่งเป็น 3 ชั้น ชั้นนอกสุดเรียกธีคาเซลล์ (theca cell) ถัดเข้ามาคือชั้นแกรนูโลซาเซลล์ (granulosa cell) ระหว่างแกรนูโลซาเซลล์กับโอโอไซท์ มีชั้นโซนาราดิเอตา (zona radiata) หรือ โซนาเพลลูซิดา (zona pellucida) คั่นอยู่ นอกจากนี้ฟอลลิเคิลมีท่อเล็ก ๆ ทอดผ่านโซนาราดิเอตาไปสู่ไซโทพลาซึมของโอโอไซท์ ซึ่งคาดว่าจะผ่านทางผ่านของสารอาหารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ ชั้นธีคาและแกรนูโลซามีเบสเมมเบรน (basement membrane) กั้นกลาง (Guraya, 1979) ทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมนเพศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งมีหน้าที่โดยตรงต่อกระบวนการสร้างและสะสมโอล์ค (Goetz, 1983)



ภาพวาด องค์ประกอบของชั้นเซลล์ที่มีการพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่ปลาเทราท์ (trout)

การสังเคราะห์และสะสมโวลค แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

ก. ระยะการสร้างโวลคภายในเซลล์โอโอไซท์

(Endogenous vitellogenesis)

โวลคที่สร้างขึ้นในระยะแรก มีลักษณะเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) หรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เรียกว่า โวลคเวสิเคิล (yolk vesicle) ซึ่งจะเริ่มปรากฏใกล้ ๆ ขอบเซลล์ก่อนแล้วจึงค่อย ๆ แผ่ไปทั่วไซโทพลาซึมของโอโอไซท์ โวลคเวสิเคิลจะค่อย ๆ เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ และในที่สุดเมื่อโอโอไซท์เจริญเต็มที่โวลคเหล่านี้จะไปรวมอยู่บริเวณขอบของโอโอไซท์เรียก คอร์ทิคัลแอลวีโอล (cortical alveoli) ซึ่งมีบทบาทในการผสมของตัวอสุจิ (sperm) กับไข่ ในตอนเริ่มต้นของการสร้างโวลคภายในโอโอไซท์นี้ โชนาเรติเอดายังไม่เจริญเต็มที่ เมื่อการสร้างโวลคระยะนี้สิ้นสุดลง โชนาเรติเอดาจึงจะเจริญเต็มที่ โดยมีลักษณะเช่นเดียวกับธิดาและแกรนูโลซาซึ่งเจริญเต็มที่และเริ่ม

ตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) โดยสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างโวล์ครระยะที่สองต่อไป

ข. ระยะการรับโวล์คจากภายนอก

(Exogenous vitellogenesis)

ฮอร์โมนเพศเมียโดยเฉพาะ 17 เบตา-เอสตราไดออล (17β -estradiol) ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดไปกระตุ้นให้ตับสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน ไวเทลโลจีนินจะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นโอโอไซท์จะรับ (uptake) ไวเทลโลจีนินแล้วเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนโวล์คเข้าไปสะสมในโอโอไซท์ต่อไป การรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่โอโอไซท์ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน โวล์คที่รับจากภายนอกนี้เรียกว่า โวล์คแกรนูล (yolk granule) ในปลาบางชนิด เมื่อโอโอไซท์เจริญเต็มที่ โวล์คแกรนูลจะรวมตัวกันทำให้ไข่มีลักษณะใสขึ้น (Goetz, 1983)

ส่วนประกอบอีกชนิดหนึ่งของโวล์คคือหยดน้ำมัน (oil droplet) ที่สร้างขึ้นภายในโอโอไซท์ โดยเริ่มปรากฏขึ้นรอบ ๆ นิวเคลียสแล้วค่อย ๆ กระจายออกสู่ภายนอก การสร้างหยดน้ำมันในปลาบางชนิดพบว่าสร้างพร้อม ๆ กับโวล์คเวซิเคิล แต่ในบางชนิดพบว่าสร้างขึ้นภายหลังการสร้างโวล์คแกรนูล (Goetz, 1983)

โอโอไซท์ที่สิ้นสุดการสะสมโวล์คแล้วจะอยู่ในระยะพักรอการกระตุ้นจากฮอร์โมนเพื่อให้เกิดการเจริญขั้นสุดท้ายและเกิดการตกไข่

1.2.2.3 การเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์

(Oocyte final maturation)

เมื่อโอโอไซท์สิ้นสุดการสะสมโวล์คจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นที่ 1 ในระยะนี้โอโอไซท์จะมีนิวเคลียสหรือเรียกว่าเยอร์มินัลเวซิเคิล (germinal vesicle) ขนาดใหญ่อยู่กึ่งกลางเซลล์หรืออยู่กึ่งกลางระหว่างจุดศูนย์กลางกับขอบเซลล์ ในระยะนี้ช่องไมโครไพล์ (micropyle) จะเกิดขึ้นทางแอนิมัลโพล (animal pole) ขณะที่เยอร์มินัลเวซิเคิลจะค่อย ๆ เคลื่อนที่ไปทางแอนิมัลโพล และในที่สุดผนังของนิวเคลียสจะสลายไปเนื่องจากสิ้นสุดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นที่ 1 เรียกกระแสนี้ว่า การสลายของเยอร์มินัลเวซิเคิล (germinal vesicle breakdown) เป็นการสิ้นสุดการเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ซึ่งได้กลายเป็นไข่ (ovum) อย่างสมบูรณ์ (Craik and Harvey, 1984a)

1.2.3 การตกไข่ (Ovulation)

เมื่อสิ้นสุดการพัฒนาระดับสุดท้าย โอโอไซต์จะเปลี่ยนเป็นไข่สุกอย่างสมบูรณ์พร้อมที่จะปฏิสนธิ (fertilize) กับตัวอสุจิ การตกไข่อาศัย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกขั้นของฟอลลิเคิลแยกตัวออกจากไข่ ขั้นตอนที่สองฟอลลิเคิลเกิดการบีบตัวทำให้ไข่หลุดออกจากฟอลลิเคิล สำหรับโอโอไซต์ที่กำลังพัฒนา บางเซลล์อาจไม่สามารถพัฒนาจนถึงขั้นตกไข่ โอโอไซต์ดังกล่าวจะสลายตัวไป (atresia) เป็นโอโอไซต์ที่เสื่อมสลาย (atretic oocyte) กระบวนการสลายตัวของโอโอไซต์เหล่านี้ถูกเซลล์ของฟอลลิเคิลและธีคาเซลล์ทำลายโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เหลือเพียงเศษของเซลล์อยู่ในฟอลลิเคิล เมื่อสิ้นสุดฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ ทั้งฟอลลิเคิลที่ว่างเปล่าและโอโอไซต์ที่เหลืออยู่ก็จะสลายตัว เพื่อเริ่มต้นการเจริญพันธุ์ของรังไข่ในฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ต่อไป

1.3 ฮอโมนที่ควบคุมกระบวนการสร้างไวเทลโลจีนิน

ฮอโมนที่มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ คือ โภนาโดโทรปิน เอสโตรเจนและโปรเจสติน (progestin) โภนาโดโทรปินเป็นฮอโมนที่สร้างจากต่อมใต้สมองมีบทบาทสำคัญต่อการสืบพันธุ์ของปลา ทั้งในขั้นตอนการสังเคราะห์และสะสมไวเทลโลจีนิน การเจริญสูงสุดท้ายของโอโอไซต์ การตกไข่และการวางไข่ Fostier *et al.* (1983) พบว่าปลาเทราท์ (trout) ที่ยังไม่เจริญพันธุ์และปลาเพศเมียที่กำลังเจริญพันธุ์มีระดับโภนาโดโทรปินต่ำ แต่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยขณะที่มีการสะสมโปรตีนโยลค์ในรังไข่ และเพิ่มมากขึ้นในระยาะที่โอโอไซต์พัฒนาระดับสุดท้ายและมีการตกไข่ หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลง

การสังเคราะห์สเตอรอยด์ (steroid) ในรังไข่เป็นผลมาจากการกระตุ้นของฮอโมนโภนาโดโทรปิน ภายในรังไข่มีการสังเคราะห์สเตอรอยด์ที่ชั้นเซลล์ของฟอลลิเคิล ซึ่งได้แก่ แกรนูโลซาเซลล์ และที่ธีคาเซลล์ชนิดพิเศษ (special theca cell) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (Fostier *et al.*, 1983) ในปลาเทราท์พบระดับของ 17 เบตา-เอสตราไดออล สูงขึ้นเล็กน้อยในระหว่างที่มีการสะสมโยลค์ในโอโอไซต์ (Ng and Idler, 1983) การสร้างโยลค์เวซีเคิลภายในโอโอไซต์ถูกกระตุ้นโดยเอสตราไดออล เอสโตรน (estrone) หรือเอสไตรออล (estriol)

ส่วนระยะการรับโวลต์แกรนูลจากภายนอกนั้น 17 เบตา-เอสตราไดออลมีบทบาทในการกระตุ้นให้ตัวสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน Nagahama (1983) ได้สรุปว่า การสังเคราะห์ 17 เบตา-เอสตราไดออล น่าจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของชั้นรีติคูลาและแกรนูโลซา โดยรีติคูลาทำหน้าที่สังเคราะห์เริ่มต้น ซึ่งอาจเป็นเทสโทสเตอโรน (testosterone) แล้วส่งไปยังแกรนูโลซา เพื่อเปลี่ยนไปเป็น 17 เบตา-เอสตราไดออล กระบวนการเหล่านี้ขึ้นอยู่กับภาวะควบคุมของโกนาโดโทรปิน

การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเกิดขึ้นในตัวของสัตว์มีกระดูกสันหลังและถูกเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน (Wallace, 1978; Perterson and Common, 1972; Craik, 1978) ในแมลงถูกควบคุมโดยฮอร์โมนจูวีไนล์ ซึ่งเป็นระบบที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene) ด้วยฮอร์โมน (Wahli *et al.*, 1981) มีการศึกษากระบวนการสร้างไวเทลโลจีนินกันมาก ซึ่งสรุปโดย Wahli *et al.* (1981), Tata และ Smith (1979), Follett และ Redshaw (1974) และ Clemens (1974) ซึ่งกล่าวว่า ยีนที่สร้างไวเทลโลจีนินอยู่ในเซลล์ตับของสัตว์เพศผู้และเพศเมีย และถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน อาจมีเพียงหนึ่งยีนหรือหลายยีนที่เป็นโฮโมโลกัส (homologous gene) ซึ่งมีรหัสที่สร้างโพลีเปปไทด์ (polypeptide) สายเดี่ยว คือไวเทลโลจีนิน แล้วถูกตัดแปลงเป็นโพลีเปปไทด์หลายสาย ซึ่งพบในโวลต์เชิงซ้อน (yolk complex) (Wallace and Jared, 1968; Wallace *et al.*, 1970; Wallace and Begovac, 1985) ตัวอย่างเช่น ในกบ (*Xenopus laevis*) มียีน 4 ยีนที่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนตั้งต้น ยีนทั้ง 4 นี้เป็นยีนที่เหมือนกัน 2 คู่ (Wahli *et al.*, 1981) การแสดงออกของยีนเหล่านี้ถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือฮอร์โมนจูวีไนล์ มีผลทำให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเป็นจำนวนมาก ตามปกติในกบเพศผู้จะไม่มี การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน แต่ทำให้กบเพศผู้สังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้โดยการฉีดหรือฝังฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล (Follett and Redshaw, 1974; Wallace and Jared, 1968) แต่กบเพศผู้ไม่มีรังไข่ที่จะรับไวเทลโลจีนินที่สังเคราะห์ขึ้นได้ เช่นเดียวกับการกระตุ้นการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินด้วยเอสตราไดออลในปลาเพศผู้ เช่นในปลาเทราท์ (Ding *et al.*, 1989) และปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) (*Oncorhynchus mykiss*) (Bieberstein *et al.*, 1999) จากการทดลองใช้สเตอรอยด์ฮอร์โมนชนิดอื่นที่ไม่ใช่กลุ่มเอสโตรเจน เช่น เทสโทสเตอโรน โพรเจสเตอโรน

(progesterone) คอร์ติซอล (cortisol) และเด็กซาเมธาโซน (dexamethasone) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน ปรากฏว่าไม่สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้

นอกเหนือจากฮอร์โมนเอสโตรเจนแล้ว พบว่ากลุ่มสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนหรือสารแปลกปลอมทางชีวภาพที่เปลี่ยนแปลงกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนที่เรียกว่าซีนีโอเอสโตรเจน (xenoestrogen) และซีนีโอไบโอติก (xenobiotic) ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่ทำหน้าที่เหมือนเอสโตรเจนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ สารเคมีกลุ่มยาปราบศัตรูพืช ยารักษาโรค สารซักล้าง (detergent) พลาสติก (plastic) อัลคิลฟีนอล (alkylphenol) ไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) และน้ำมันเชื้อเพลิง สามารถชักนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้ ตัวอย่างเช่น การทดสอบการแย่งจับระหว่างเอสโตรเจนและสารกลุ่มซีนีโอเอสโตรเจนจำนวน 49 ชนิด กับตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) พบว่าสารกลุ่มซีนีโอเอสโตรเจน 50% สามารถยับยั้งการจับของเอสโตรเจนได้ (Petit *et al.*, 1997) และจากการทดลองกับปลาทอง (goldfish, *Carassius auratus*) โดย Ishibashi *et al.* (2001) พบว่าปลาทองเพศผู้ที่ได้รับสาร bisphenol-A ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 28 วัน ปลาทองเพศผู้สามารถสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้ 201 ± 90 และ $104,552 \pm 24,920$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเหมือนกับการทดลองในปลาเมดากา (*medaka*, *Oryzias latipes*) (Tabata *et al.*, 2000) ปัจจุบันมีการวัดระดับไวเทลโลจีนินในปลาเพศผู้เพื่อบ่งบอกการปนเปื้อนของแหล่งน้ำ (Arukwe *et al.*, 1999) เนื่องจากในภาวะปกติปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Atlantic salmon*, *Salmo salar*) และปลาเรนโบว์เทราท์เพศผู้ไม่มีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน และเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในสัตว์เพศเมีย (female specific protein) (Gronen *et al.*, 1999)

1.4 ไวเทลโลจีนิน

ไวเทลโลจีนินเป็นฟอสโฟลิโฟไกลโคโปรตีน ซึ่งเป็นพลาสมาโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์โดยตับ (Mommsen and Walsh, 1988) ภายใต้การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล (Hara and Hirai, 1978) ไวเทลโลจีนินในพลาสมาโดยทั่วไปประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตที่จับอยู่กับ

กรดอะมิโนซีรีน (serine) ในสายโพลีเปปไทด์ ไวเทลโลจีนินมีไขมันเป็นองค์ประกอบและพบว่าไวเทลโลจีนินในสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีคาร์โบไฮเดรตจับอยู่ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ดังนั้นสายโพลีเปปไทด์ของไวเทลโลจีนินจะถูกเติมด้วยฟอสเฟตและคาร์โบไฮเดรต (Ansari *et al.*, 1971; Emmersen and Petersen, 1979; Korsgaard and Peterson, 1979) แล้วเชื่อมกับไขมันก่อนที่จะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด ไวเทลโลจีนินเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของโปรตีนโยลด์ โดยไวเทลโลจีนินซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์สายยาวจะถูกตัดแบบจำเพาะหลายตำแหน่งภายหลังถูกรับเข้าสู่เซลล์โอโอไซต์ ทำให้กลายเป็น 2 ส่วน คือ ลิโปไวเทลลิน (lipovitellin) และฟอสไวทิน (phosvitin) โปรตีนทั้ง 2 ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หลายสาย (McCollum *et al.*, 1986) ทั้งลิโปไวเทลลินและฟอสไวทินถูกใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Korsgaard and Peterson, 1979; Byrne *et al.*, 1989) ดังนั้นโปรตีนโยลด์จึงเกิด cross reactivity กับแอนติบอดีต่อพลาสมาไวเทลโลจีนินได้ (Wallace and Begovac, 1985) และพบว่าไวเทลโลจีนินมีสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีมาก สามารถนำแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินมาประยุกต์ใช้โดยอาศัยหลักการทาง immunoassay

ไวเทลโลจีนินจากกระแสเลือดถูกรับเข้าสู่เซลล์โอโอไซต์โดยตัวรับที่จำเพาะ (specific receptor) ของไวเทลโลจีนิน จากการศึกษาในกบ พบว่าเนื้อเยื่อในรังไข่ของกบเลือกรับพลาสมาไวเทลโลจีนินได้เร็วกว่าพลาสมาโปรตีนอื่นถึง 5-6 เท่า (Wallace *et al.*, 1972) แสดงว่าบนผิวเซลล์ของโอโอไซต์มีตัวช่วยรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่เซลล์โอโอไซต์โดยอาศัยกระบวนการ receptor-mediated endocytosis (Opresko and Wiley, 1987a, b)

1.4.1 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

Norberg และ Haux (1985) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ (*Salmo gairdneri*) และปลาซีเทราท์ (sea trout, *Salmo trutta*) บริสุทธิ์ด้วย 0.5 M MgCl₂ โดยการตกตะกอนด้วย 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), pH 7 และละลายตะกอนแล้วแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลาเทราท์ทั้งสองชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 440,000 ดัลตัน ขณะที่ Riazzi และ Fremont (1988) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์ (*S. gairdneri*) บริสุทธิ์โดย

การเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง (ultracentrifugation) ที่ความเร็ว 150,000 x g นาน 24 และ 72 ชั่วโมง พบไวเทลโลจีนินมีค่าความหนาแน่นในการลอยตัว (density of floatation) เท่ากับ 1.28 กรัม/มิลลิลิตร

Utarabhand และ Bunlipatanon (1996) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินของปลากะรัง ที่ถูกกระตุ้นด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จากการชะด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นแบบต่อเนื่อง (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*) ซึ่งเป็นปลาวงศ์เดียวกับปลากะรังให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียว โดยคอลัมน์ DEAE-agarose ซึ่งไวเทลโลจีนินถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 0.25-0.30 M NaCl

Silversand *et al.* (1993) แยกไวเทลโลจีนินจากปลากะตุกแข็ง (teleost fish) 4 ชนิด คือปลาคอด (cod, *Gadus morhua*) ปลาเรนโบว์เทราท์ ปลาเทอร์บอท (turbot, *Scophthalmus maximus*) และปลาวูล์ฟฟิช (wolf fish, *Anarhichas lopus*) โดยนำพลาสมาปลาไปตกตะกอนด้วย $MgCl_2$ และ EDTA จากนั้นทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Mono Q ขณะที่ Brion *et al.* (2000) ได้แยกไวเทลโลจีนินของปลากะตุกแข็ง 3 ชนิด คือปลาเรนโบว์เทราท์ ปลา gudgeon (*Gobio gobio*) และ ปลา chub (*Leuciscus cephalus*) ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) 2 ขั้นตอนคือ แบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography) ด้วยคอลัมน์ Resource Q พบว่าไวเทลโลจีนินถูกชะออกมาที่ความเข้มข้น 0.37 M NaCl (ปลาเรนโบว์เทราท์) และ 0.35 M NaCl (ปลา gudgeon และปลา chub) จากนั้นนำไปแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน (gel filtration chromatography) ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 แยกได้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลาเรนโบว์เทราท์ ปลา gudgeon และปลา chub ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 442,000, 435,000 และ 424,000 ดัลตัน ตามลำดับ

1.4.2 สมบัติทางชีวเคมีของไวเทลโลจีนิน

สมบัติทางชีวเคมีของไวเทลโลจีนินสามารถแบ่งได้ดังนี้

1.4.2.1 น้ำหนักโมเลกุล

ไวเทลโลจีนินของปลาเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หลายสายหรือหน่วยย่อย (subunit) รวมกันเป็นโปรตีนเชิงซ้อน (complex protein) มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างมาก อาทิเช่น ปลาทองมี 3 หน่วยย่อย (de Vlaming *et al.*, 1980) และปลากะรังมี 2 หน่วยย่อย (Utarabhand and Bulipatanon, 1996) เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 1

1.4.2.2 องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลโลจีนิน

การศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในไวเทลโลจีนินของปู (crab, *Cyprinus carpio*) (Tyler and Sumpter, 1990) กบ (Redshaw and Follett, 1971) และของปลาหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 พบกรดอะมิโนอะลานีน (alanine) กลูตามีน (glutamine) ลูซีน (leucine) และไลซีน (lysine) มีปริมาณมากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ

1.4.2.3 คาร์โบไฮเดรต ไขมันและฟอสเฟส

ไวเทลโลจีนินของปลามีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ จากการย้อมสีไกลโคโปรตีนพบว่าไวเทลโลจีนินของปลากะรัง (ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, 2537) และปลากะพงแดง (red sea bass, *Lutjanus argentimaculatus*) (พอจิต วิโนทพรรษ์, 2539) ย้อมติดสี periodic acid Schiff's ซึ่งเป็นการย้อมส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต

การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในไวเทลโลจีนินของปลาชนิดต่าง ๆ พบว่ามีปริมาณแตกต่างกัน ไวเทลโลจีนินของปลาเมดากามีคาร์โบไฮเดรต 132 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน (Hamasaki *et al.*, 1987) ส่วนไวเทลโลจีนินของปลาตึกเคิลแบค (stickleback, *Spinachia spinachia*) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 17.3-37.4 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน และประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส (mannose) และกลูโคส (glucose) เป็นจำนวนมาก (Covens *et al.*, 1987) เช่นเดียวไวเทลโลจีนินของปลากะรังมีน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส 20.7 ± 1.3 และ 8.1 ± 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538)

ตารางที่ 1 น้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลจีนของปลาชนิดต่าง ๆ

ชนิดของปลา	น้ำหนักโมเลกุล (ดัลตัน)	น้ำหนักหน่วยย่อย (ดัลตัน)	วิธีการหา	ที่มา
ปลาเมดากา (medaka, <i>Oryzias latipes</i>)	420,000	200,000	SDS-PAGE	Hamazaki <i>et al.</i> , 1987
ปลาทอง (goldfish, <i>Carassius auratus</i>)	380,000	147,000; 142,000	SDS-PAGE	de Vlaming <i>et al.</i> , 1980
ปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout, <i>Salmo gairdneri</i>)	455,000	140,000 220,000	Nondenaturing-PAGE Gel filtration	Hara and Hirai, 1978
ปลานิล (tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>)	300,000	-	Nondenaturing-PAGE	Chan <i>et al.</i> , 1991
ปลาไหลญี่ปุ่น (Japanese eel, <i>Anguilla japonica</i>)	350,000	85,000 31,000; 25,000	Gel filtration	Hara <i>et al.</i> , 1980
ปลาเทราท์ทะเลจุด (spotted seatrout, <i>Cynoscion nebulosus</i>)	220,000	-	Gel filtration	Copeland and Thomas, 1988
ปลาแอตแลนติกแชลมอน (landlocked atlantic salmon, <i>Salmo salar</i>)	520,000	176,000; 127,000	Gel filtration	So <i>et al.</i> , 1985
ปลาลังจิชโซล (English sole, <i>Pleuronectes vetulus</i>)	330,000; 320,000	130,000	SDS-PAGE Sephrose 6B	Roubal <i>et al.</i> , 1997
ปลากะรัง (grouper, <i>Epinephelus malabaricus</i>)	525,000; 260,000	140,000; 113,000	Non denaturing-PAGE	Utarabhand and Bunlipatanon, 1996
ปลา gag (<i>Mycteroperca microlepis</i>)	439,000	183,000	SDS-PAGE	Heppell and Sullivan, 1999

ตารางที่ 2 องค์ประกอบกรดอะมิโนของไมโทคอนเดรียในปลา กบ และปลาชนิดต่าง ๆ

Amino acids	Mole% of total amino acid										
	Crab ¹	Xenopus ²	Japanese eel ³	Medaka ⁴	Gold fish ⁵	Turbot ⁶	English sole ⁷	Striped bass ⁸	Rainbow trout ⁹	Gag ¹⁰	Grouper ¹¹
Asparagine	6.7	8.4	7.3	8.0	6.5	7.8	8.0	7.6	8.4	7.9	6.5
Threonine	5.4	5.5	5.3	4.7	5.5	5.2	5.0	5.2	5.0	4.9	4.7
Serine	7.6	11.7	5.8	10.3	6.9	7.5	5.4	7.2	7.5	4.0	5.5
Glutamine	11.8	13.2	11.8	10.6	11.9	10.1	12.6	8.3	11.8	11.1	12.0
Proline	5.9	4.8	4.7	4.2	5.5	4.5	5.1	4.3	5.2	5.3	4.0
Glycine	5.1	5.1	5.6	4.4	4.6	4.6	2.5	4.2	4.2	5.2	5.5
Alanine	12.6	8.5	18.0	10.4	12.8	12.0	7.9	11.9	11.7	13.4	10.2
Valine	6.3	4.6	6.1	6.8	6.9	7.6	6.8	7.8	7.1	7.8	7.6
Methionine	1.9	2.3	2.8	2.4	2.0	2.8	2.6	2.8	2.6	0.3	2.0
Isoleucine	5.4	3.6	4.9	5.7	6.6	6.3	7.2	7.0	5.5	7.4	6.5
Leucine	10.5	8.1	7.8	9.7	10.8	10.2	12.0	10.8	9.5	11.8	10.3
Tyrosine	2.8	3.0	2.8	3.6	2.6	2.9	4.4	3.4	3.0	3.0	2.6
Phenylalanine	2.8	3.6	3.8	3.4	2.9	3.0	3.6	3.4	4.0	3.2	2.8
Histidine	2.2	2.9	2.0	2.4	2.3	2.2	2.2	3.1	2.1	2.2	2.4
Lysine	6.3	7.9	5.9	7.6	7.0	7.1	9.2	7.3	7.1	8.7	7.0
Arginine	5.0	5.3	4.8	5.0	4.9	4.9	6.3	4.9	4.5	4.0	5.5
Cysteine	0.1	-	0.6	-	-	1.0	-	1.0	1.2	-	0.8

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Crab ¹ (<i>Cyprinus carpio</i>)	ที่ม่า	Tyler and Sumpter (1990)
Xenopus ² (<i>Xenopus laevis</i>)	ที่ม่า	Redshaw and Follett (1971)
Janpanase eel ³ (<i>Anguilla japonica</i>)	ที่ม่า	Hara <i>et al.</i> (1980)
Medaka ⁴ (<i>Oryzias latipes</i>)	ที่ม่า	Hamazaki <i>et al.</i> (1987)
Gold fish ⁵ (<i>Carassius auratus</i>)	ที่ม่า	de Vlaming <i>et al.</i> (1980)
Turbot ⁶ (<i>Scophthalmus maximus</i>)	ที่ม่า	Siversand and Haux (1989)
English sole ⁷ (<i>Pleuronectes vetulus</i>)	ที่ม่า	Roubal <i>et al.</i> (1997)
Striped bass ⁸ (<i>Morone saxatilis</i>)	ที่ม่า	Tao <i>et al.</i> (1993)
Rainbow trout ⁹ (<i>Salmo gairdneri</i>)	ที่ม่า	Hara and Hirai (1978)
Gag ¹⁰ (<i>Mycterperca microlepis</i>)	ที่ม่า	Heppell and Sullivan (1999)
Grouper ¹¹ (<i>Epinephelus malabaricus</i>)	ที่ม่า	Utarabhand and Bunlipatanon (1996)

จากการศึกษาองค์ประกอบไขมันในไวเทลโลเจีนินของปลากะพงแดง พบแถบไวเทลโลเจีนิน 3 แถบย่อยติดสีซูดานแบล็คบี (sudan black B) ในโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis) เช่นเดียวกับแถบอะโพลิโพรตีน (apolipoprotein) ซึ่งใช้เป็นลิโปโปรตีนมาตรฐาน (พอลิจิต วิโนทพรรษ์, 2539) ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537) ได้แยกและศึกษาองค์ประกอบไขมันในไวเทลโลเจีนินของปลากะรัง พบว่าแถบไวเทลโลเจีนินทุกแถบย่อยติดสีซูดานแบล็คบีเช่นกัน และมีคอเลสเตอรอล (cholesterol) $1.3 \pm 0.6\%$ และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) $2.0 \pm 1.0\%$ (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) จากรายงานเหล่านี้แสดงว่าไวเทลโลเจีนินของปลากะรังและปลากะพงแดงมีไขมันเป็นองค์ประกอบเหมือนกับไวเทลโลเจีนินของปลาชนิดอื่น ๆ

ไวเทลโลเจีนินของปลาเรนโบว์เทราท์มีไขมันเป็นองค์ประกอบถึง 18% ซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด (phospholipid) 11% , ไตรกลีเซอไรด์ 4% และคอเลสเตอรอล 2% ขณะที่ปลาซีเทราท์มีไขมัน 19% ซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด, ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอล (13.9%, 2.7% และ 2.0% ตามลำดับ) (Norberg and Haux, 1985) ขณะที่ ปลาคอด ปลาเทอร์บอท และปลาวูล์ฟฟิช มีไขมัน 16-18% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นฟอสโฟลิพิด 70% และไขมันที่เป็นกลาง (neutral lipid) 15-20% ของปริมาณไขมันทั้งหมด และยังพบว่า 50% ของกรดไขมัน (fatty acid) ในไขมันทั้งหมดเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Silversand and Haux, 1991)

ไวเทลโลเจีนินของปลามีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบอยู่จำนวนหนึ่งในพลาสมาปลาเพศเมียมีฟอสฟอรัส (phosphorus) ที่จับอยู่กับโปรตีนปริมาณ 20-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรของพลาสมา ขณะที่พบน้อยมากในปลาเพศผู้ (5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรของพลาสมา) (Craik and Harvey, 1984a, b) และพบฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) ในพลาสมาและไข่ของปลาน้ำจืดสูงกว่าปลาทะเล เช่น พลาสมาปลาแซลมอนน้ำจืด ในฤดูวางไข่มีฟอสเฟต 47 ± 13.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่พลาสมาของปลาเทอร์บอทซึ่งเป็นปลาทะเล มีฟอสเฟต 20.7 ± 6.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนพลาสมาของปลาดุก (catfish, *Heteropneustes fossilis*) เพศเมื่อก่อนการผสมไวเทลโลเจีนินมีฟอสเฟต

248.3 ± 20.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล (924.0 ± 222.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนพลาสมาปลาเพศผู้มีฟอสเฟตเพียง 10.8 ± 1.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น (Nath and Sundararaj, 1981)

จากการติดตามไวเทลโลจีนิของปลา gag โดยใช้วิธีวัดฟอสฟอรัสในโปรตีนที่ไม่เสถียรในด่าง (alkali-labile protein phosphorus assay) ในขั้นตอนการแยกไวเทลโลจีนิจากพลาสมาปลาด้วยคอลัมน์ DEAE-agarose พบปริมาณฟอสฟอรัสสัมพันธ์กับปริมาณไวเทลโลจีนิ (Heppell and Sullivan, 1999) ขณะที่ Utarabhand และ Bunlipatanon (1996) ได้หาปริมาณฟอสเฟตในไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ของปลากะรังซึ่งเป็นปลาวงศ์เดียวกับปลา gag พบว่ามีฟอสเฟต 6.8 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน สำหรับไวเทลโลจีนิในพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงมีฟอสเฟต 0.13 และ 0.11% ตามลำดับ นอกจากนี้ไวเทลโลจีนิของปลากะพงแดงย้อมติดสีเมธิลกรีน (methyl green) ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพได้ (พอลจิต วิโนทพรรษ์, 2539)

การที่ไวเทลโลจีนิมีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบอาจทำให้โมเลกุลของไวเทลโลจีนิสามารถจับกับไอออน (ion) ได้สูง ไวเทลโลจีนิของปลาทั่วไปสามารถจับกับไอออนต่าง ๆ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Fe^{2+} ได้ดี (Hara, 1976; Hara and Hirai, 1978) จึงอาจทำหน้าที่เป็นตัวนำแร่ธาตุต่าง ๆ เข้าไปในโอโอไซท์ด้วย สามารถใช้การแข่งขันการจับระหว่างไวเทลโลจีนิกับสารดักจับไอออน (chelating agent) เพื่อแยกไวเทลโลจีนิออกจากโปรตีนชนิดอื่น ๆ ได้ (Ng and Idler, 1983)

1.4.2.4 แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิ

ไวเทลโลจีนิเป็นโปรตีนเชิงซ้อนมีขนาดใหญ่ มีสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีต่อการสังเคราะห์แอนติบอดี Copeland และ Thomas (1988) ฉีดไวเทลโลจีนิของปลาเทราท์ทะเลจุด (spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*) ทุก 3 สัปดาห์ ด้วยปริมาณ 400, 100 และ 50 ไมโครกรัม ตามลำดับ โดยฉีดในผิวหนัง (intradermal) บริเวณหลังของกระต่ายหลาย ๆ จุด และเจาะเลือดกระต่ายทุก 10 วัน หลังการฉีดแต่ละครั้ง เพื่อทดสอบการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิ เช่นเดียวกับ Chan *et al.* (1991) ที่ฉีด

ไวเทลโลจีนินจากปลานิล (tilapia, *Oreochromis niloticus*) เข้าในผิวหนังกระต่ายโดยฉีดไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม หลังจากการฉีดครั้งแรก 2 สัปดาห์ ฉีดกระตุ้นด้วยไวเทลโลจีนิน 250 ไมโครกรัม ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน หาไตเตอร์ (titer) ของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินทุกครั้งก่อนการฉีดครั้งต่อไป พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินได้

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลาอิงลิชโซล (English sole, *Pleuronectus vetulus*) ได้จากการฉีดไวเทลโลจีนินประมาณ 100 ไมโครกรัม เข้าในผิวหนังกระต่าย หลังการฉีดครั้งแรก 2 สัปดาห์ ฉีดซ้ำด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 50 ไมโครกรัม ทุก ๆ 2 สัปดาห์ แอนติบอดีที่ได้เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์และพลาสมาปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาปลาเพศผู้ (Roubal *et al.*, 1997) แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (monoclonal antibody) ต่อไวเทลโลจีนินของปลาแอตแลนติกแซลมอนสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาบราวน์เทรท (brown trout, *Salmo trutta*) เรนโบว์เทรท และ อาร์คติกชาร์ (Arctic charr, *Salvelinus alpinus*) รวมทั้งของปลาเทอร์บอท และปลาฮาลิบัท (halibut, *Hippoglossus hippoglossus*) (Nilsen *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลของปลาแซลมอนเกิด cross reactivity กับไวเทลโลจีนินของปลาเรนโบว์เทรท ปลา gudgeon และปลา chub ได้ (Brion *et al.*, 2000)

Utarabhand และ Bunlipatanon (1996) ใช้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรัง ฉีดกระต่ายขาวตาแดง บริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneous) 4-5 จุด เว้นระยะการฉีดครั้งละ 2 สัปดาห์ โดยฉีดไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม 2 ครั้ง และครั้งสุดท้ายฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังหลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งแรก และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีด แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์ พลาสมาปลาเพศผู้ที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ สารสกัดรังไข่ และสารสกัดตับของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาปลาเพศเมียที่ไม่เจริญพันธุ์และของปลาเพศผู้ นอกจากนี้ยังสามารถ

เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนใน Ouchterlony double immunodiffusion กับพลาสมาของปลาชนิดอื่น ๆ ที่เจริญพันธุ์ได้ เช่น ปลากะพงขาว (giant sea perch, *Lutjanus malabaricus*) ปลากะพงแดง ปลาเห็ดโคน (sand whiting, *Sillago sihama*) และปลากะบอกดำ แต่ไม่พบปฏิกิริยาดังกล่าวกับสารสกัดหัวใจ หรือสารสกัดกล้ามเนื้อของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ รวมทั้งสารสกัดตับของปลากะรังที่ไม่เจริญพันธุ์ (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538)

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลา gag เตรียมได้โดยใช้พลาสมาปลาที่ผ่านการฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล ฉีดกระตุ้นทุก 3 สัปดาห์ จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นฉีดกระตุ้นด้วยไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ 1 มิลลิกรัม อีก 2 ครั้ง เจาะเลือดกระตุ้นเพื่อเตรียมซีรัม (serum) แล้วนำไปผสมกับพลาสมาของปลา gag ้วยเยาว์เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่ไวเทลโลจีนิออกไป จากนั้นนำไปทำ Western blot พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะกับไวเทลโลจีนิในพลาสมาและไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาปลาเพศผู้ นอกจากนี้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิของปลา gag สามารถเกิดปฏิกิริยากับปลาวงศ์เดียวกันได้อีก 2 ชนิด คือ ปลา Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) และปลา red hind (*Epinephelus guttatus*) แสดงว่าปลาในวงศ์เดียวกันมีความจำเพาะของแอนติบอดีเหมือนกัน (Heppell and Sullivan, 1999)

1.4.2.5 การวัดระดับไวเทลโลจีนิในพลาสมาของปลา

การวัดปริมาณไวเทลโลจีนิในพลาสมาของปลาสามารถทำได้ 2 ทางดังนี้

ก. การวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิโดยทางอ้อม

เป็นการวัดปริมาณแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) หรือปริมาณฟอสฟอรัสที่จับอยู่กับโปรตีน (protein phosphorus) ในพลาสมาปลาชนิดต่าง ๆ เป็นดัชนีบ่งบอกปริมาณของไวเทลโลจีนิ (Emmersen and Petersen, 1976; Craik, 1982; Sullivan *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1992) มีรายงานว่าฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออลทำให้ระดับของแคลเซียมและไวเทลโลจีนิในพลาสมาของปลาเรนโบว์เทราท์สูงขึ้น (Elliot *et al.*, 1979) Nath และ Sundararaj (1981) หาปริมาณฟอสฟอรัสในไวเทลโลจีนิของปลาดุก เช่นเดียวกับ Heppell และ Sullivan (1999) ใช้วิธีวัดฟอสฟอรัสที่ไม่เสถียรต่อ

ต่างในไวเทลโลจิ้นของปลา gag เพื่อติดตามการทำให้ไวเทลโลจิ้นบริสุทธิ์ แต่วิธีดังกล่าวไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบันเพราะในเลือดปลาอาจมีโปรตีนอื่นที่จับกับฟอสเฟตซึ่งไม่ได้เป็นไวเทลโลจิ้น (Campbell and Idler, 1980)

ข. การวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจิ้นโดยตรง

ได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบทางอิมมูน (immune) ไปใช้ในการตรวจวัดระดับไวเทลโลจิ้นในพลาสมาของปลา อาทิเช่น ใช้วิธี immunoagglutination โดยใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้นในการแยกเพศปลาเรนโบว์เทราท์ได้ในระยะก่อนการวางไข่ 8-9 เดือน และสามารถแยกเพศปลาแซลมอนในระยะของการสะสมโปรตีนโยล์คได้ (Le Bail and Breton, 1981)

มีการวัดระดับไวเทลโลจิ้นในพลาสมาปลาเทราท์โดยวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส (rocket immunoelectrophoresis) พบว่าปลาเพศผู้มีระดับไวเทลโลจิ้นในพลาสมาต่ำมากและไม่พบไวเทลโลจิ้นในเนื้อเยื่ออื่นเช่น ม้ามและกล้ามเนื้อ (Ding *et al.*, 1989) และเป็นวิธีที่ใช้วัดระดับของไวเทลโลจิ้นในพลาสมาปลาเรนโบว์เทราท์ โดยมีความไว (sensitivity) ของการวัดในระดับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Mackay and Lazier, 1993) นอกจากนี้ ได้มีการใช้วิธีนี้ติดตามระดับของไวเทลโลจิ้นในพลาสมาปลากะรังในรอบปีที่ปลามีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่ระยะต่าง ๆ กันโดยมีความไวของการวัดอยู่ในระดับ 1-8 ไมโครกรัม (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538)

radioimmunoassay เป็นวิธีที่มีความไวในการวัดสูงกว่าวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยอาศัยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจิ้นหรือโปรตีนโยล์คที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี So *et al.* (1985) ใช้ไวเทลโลจิ้นที่แยกจากพลาสมาของปลาแอตแลนติกแซลมอนเพื่อพัฒนาวิธี homologous radioimmunoassay ซึ่งทำให้มีความจำเพาะ ความไวในการวัดและได้ค่าที่ถูกต้องสูงขึ้น เช่นเดียวกับ Benfey *et al.* (1989) ที่ใช้วิธีนี้วัดระดับไวเทลโลจิ้นในพลาสมาของปลาแซลมอนในระยะตกไข่หรือใกล้ตกไข่

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่มีความไวของการวัดในระดับนาโนกรัม (nanogram) และมีความจำเพาะเช่นเดียว

กับวิธี radioimmunoassay ได้จากการนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีไปติดฉลากด้วยเอนไซม์ (enzyme) แทนการใช้สารกัมมันตรังสี ซึ่งเป็นสารที่มีอันตราย จึงถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณไวเทลโลจีนินมากมายในปัจจุบัน (Olin and Von der Decken, 1989; Goodwin *et al.*, 1992; Mañanós *et al.*, 1994a, b) ตัวอย่างเช่น การใช้แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลา gag วัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกปลากระวัง 3 ชนิด ได้แก่ ปลา gag ปลา Nassan grouper และปลา red hind (Heppell and Sullivan, 1999) หรือการใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลของปูซึ่งเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินของปลาทอง เพื่อวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกปลาทองที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร bisphenol-A จากอุตสาหกรรมพลาสติก (Ishibashi *et al.*, 2001)

ในปีที่ผ่านมา ได้มีการตรวจหาปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติก โดยวิธี chemiluminescent immunoassay พบว่ามีความจำเพาะและความไวสูงกว่าวิธี ELISA สามารถวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสติกได้ในระดับ 60 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ถึง 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (Fukada *et al.*, 2001) แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือ สารเคมีและเครื่องที่ใช้วัดมีราคาแพง

1.4.3 ตัวรับไวเทลโลจีนิน

การรับไวเทลโลจีนินในพลาสติกเข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ต้องอาศัยตัวรับที่จำเพาะบริเวณผิวเซลล์ของโอโอไซท์ โดยกระบวนการ receptor-mediated endocytosis ซึ่งพบได้ทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง ได้มีการสกัดและทำให้ตัวรับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากเมมเบรนรังไข่ (ovary membrane) ของยุง (mosquito, *Aedes aegypti*) เพื่อศึกษาสมบัติของตัวรับไวเทลโลจีนิน พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 205,000 ดัลตัน และมีค่าความจำเพาะของการจับระหว่างตัวรับกับไวเทลโลจีนิน (K_D) เป็น 15 nM (Sappington *et al.*, 1995) และยังพบว่าการจับระหว่างตัวรับกับไวเทลโลจีนินเป็นแบบ recycle คือตัวรับสามารถปล่อยไวเทลโลจีนินที่จับอยู่ แล้วจับกับไวเทลโลจีนินโมเลกุลใหม่ได้อีก (Snigirevskaya *et al.*, 1997)

สำหรับตัวรับไวเทลโลจีนินที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบว่าในเนื้อเยื่อรังไข่ของกบเลือกรับพลาสติกไวเทลโลจีนินได้ดีกว่าพลาสติกชนิดอื่น ๆ 5-6 เท่า

แสดงให้เห็นว่าในรังไข่มีตัวรับที่จำเพาะกับไวเทลโลจีนิน (Wallace *et al.*, 1972) ต่อมา Opresko และ Wiley (1987a, b) พบว่าการรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่โอโอโทของกบอาศัยตัวรับโดยพบว่าการจับระหว่างไวเทลโลจีนินกับตัวรับเป็นการจับแบบไม่ถาวร เช่นเดียวกับของยูง และความเสถียรของตัวรับไวเทลโลจีนินจะลดลงเมื่อย่อยตัวรับด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ด้วยภาวะที่ไม่รุนแรง (0 °C นาน 35 นาที)

ในการสกัดเมมเบรนจากเซลล์โอโอไซท์ของไก่ด้วย octyl- β -D-glucoside แล้วแยกด้วย sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส) สภาพไม่รีดิวซ์ (nonreduce) หลังการขนถ่ายโปรตีนลงแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ทำการบ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของไก่ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ¹²⁵I ปรากฏแถบของสารกัมมันตรังสีตรงแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 96,000 ดัลตัน ซึ่งเป็นแถบตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนโอโอไซท์ของไก่ (Stifani *et al.*, 1988) เมื่อทำการสกัดเมมเบรนจากเซลล์โอโอไซท์ของไก่ด้วย 1% Triton X-100 แล้วทำต่อวิธีการเดิมแต่บ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของกบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ¹²⁵I แทนไวเทลโลจีนินของไก่ ปรากฏแถบสารกัมมันตรังสีตรงกับแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 96,000 ดัลตัน แต่พบเฉพาะจากการทดลองที่แยกด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอสสภาพไม่รีดิวซ์เท่านั้น คณะผู้ทดลองจึงได้สรุปว่า พันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ที่อยู่ระหว่างสายเปปไทด์มีบทบาทสำคัญต่อการทำหน้าที่ของตัวรับไวเทลโลจีนิน (Stifani *et al.*, 1990) เช่นเดียวกับตัวรับลิโปโปรตีน (lipoprotein receptor) ชนิดอื่น ๆ เช่น ตัวรับ VLDL (very low density lipoprotein) ของไก่ นอกจากนี้พบว่าตัวรับไวเทลโลจีนินของไก่จับกับไวเทลโลจีนินของกบได้ แสดงว่าไวเทลโลจีนินและตัวรับไวเทลโลจีนินของไก่และของกบอาจมีสมบัติทางกายภาพที่เหมือนกัน

การศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินในเซลล์โอโอไซท์ของปลาชนิดต่าง ๆ มีดังนี้ Chan *et al.* (1991) ตรวจวัดตัวรับไวเทลโลจีนินจากเมมเบรนของไข่ปลานิลด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ¹²⁵I โดยวิธี radioimmunoassay พบว่าตัวรับไวเทลโลจีนินจับกับไวเทลโลจีนินอย่างจำเพาะ แต่ไม่จับกับสารสกัดตับ เนื้อเยื่อสมอง

กล้ามเนื้อ ลำไส้ หรืออัณฑะ (testis) ของปลานิล และความจำเพาะในการจับระหว่าง ไวเทลโลจีนิกับตัวรับบนเมมเบรนของไอโอไซท์ระยะก่อนการสะสมไวเทลโลจีนิ ระยะสะสมไวเทลโลจีนิ และระยะก่อนการตกไข่ของปลานิล มีค่า 1.51, 1.07 และ 0.30 μM ตามลำดับ ขณะที่ Lancaster และ Tyler (1994) สกัดเมมเบรนจากเซลล์ไอโอไซท์ของปลาเรนโบว์เทราท์ด้วย octyl- β -D-glucopyranosidase แล้วทำ ligand blot พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 และ 100,000 ดัลตัน ที่เกิดปฏิกิริยาของสารกัมมันตรังสี แต่ไม่เกิดกับสารสกัดเนื้อเยื่ออื่น ซึ่งได้สรุปว่าแถบโปรตีนทั้งสองเป็นตัวรับไวเทลโลจีนิของปลาเรนโบว์เทราท์ เช่นเดียวกับของปลา white perch (*Moron americana*) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 157,000 และ 106,000 ดัลตัน (Tao et al., 1996)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ
2. เพื่อศึกษาสมบัติของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์
3. เพื่อสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ในกระต่าย
4. เพื่อตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนิในสารสกัดเมมเบรนของไอโอไซท์จากปลากระบอกดำ