

639.543

76637

8.2

การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสเอดส์เพื่อใช้ทดสอบผลของ
ฮอร์โมนยับยั้งการระสมไซโตของรังไข่
นางกัมภาราม

23 ส.ค. 2539

ปริญญาโท
ของ
วิมล สุขตั้งมั่น

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
ตุลาคม 2538
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

197137

การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสเอดส์เพื่อใช้ทดสอบผลของ
ยารักษาต้านยังการสะสมไขมันของร่างกาย
ในกรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ
ของ
วิมล สุขตั้งมั่น

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก เคมีชีวภาพ
ตุลาคม 2538

แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินผลิตโดยการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยสารสกัด
จากกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต
จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อแอนติเจนจากกุ้งชนิดต่าง ๆ โดยวิธีคัปเปิลอิมมูโน
คิฟิเวชัน พบว่าแอนติเจนจากสารสกัดจากกุ้งหรือจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งทั้งสองชนิดคือ
กุ้งก้ามกราม และกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก
กว่าแอนติเจนจากสารสกัดจากกุ้งหรือจากตัวอย่างเลือดของกุ้งฝอยน้ำเค็มเพศเมีย (*Palaemon
serrifer*) แต่จะไม่พบปฏิกิริยาของแอนติซีรัมกับสารสกัดจากกุ้งหรือจากเลือดของกุ้งทะเล
เพศเมีย 2 ชนิด (*Metapenaeus affinis* และ *Metapenaeus ensis*) สารสกัดจากอวัยวะ
และตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ จากการทดสอบโดยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรเฟสิส พบว่า
แอนติเจนจากสารสกัดจากกุ้งและจากเลือดเพศเมียของกุ้งก้ามกราม มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า
คล้ายคลึงกัน แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่ผลิตได้นี้มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนประกอบอื่น ๆ
ในกุ้งปะปนอยู่ด้วย แต่สามารถกำจัดแอนติบอดีที่ปะปนมาโดยการดูดซับซีรัมด้วยเลือดกุ้งก้ามกราม
เพศผู้ และสารสกัดจากตับ-คัปออน

การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี พบว่าแอนติบอดีจะจับ
แอนติเจน (ไวเทลลิน) ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไซโตที่มีการสะสมของไข่แดงระยะคั่นขึ้นไข่
ไม่พบปฏิกิริยาของแอนติซีรัมกับแอนติเจนในเซลล์ไซโตในระยะก่อนการสะสมไข่เทลลินและเซลล์ชนิดอื่น ๆ

จากการใช้วิธี competitive ELISA ตรวจสอบระดับปริมาณของไวเทลลินเจนนินในเลือด
ของกุ้งก้ามกรามหลังวางไข่ในเวลาต่าง ๆ พบว่าปริมาณไวเทลลินเจนนินจะอยู่ในระดับต่ำและค่อนข้าง
คงที่ในช่วง 4-10 วันหลังจากวางไข่ และในช่วงต่อมา 12-26 วัน ระดับปริมาณของไวเทลลินเจนนิน
ของกุ้งบางส่วนจะเพิ่มขึ้นในอัตราต่าง ๆ กัน สำหรับในกุ้งที่คัดคตาออกทั้งสองช่วงหลังจากวางไข่
4 วัน ปริมาณไวเทลลินเจนนินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูงสุดประมาณ 18 วันหลังจากวางไข่
หลังจากนั้นระดับปริมาณของไวเทลลินเจนนินก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว และกุ้งวางไข่อีกครั้งในวันที่ 23
และ 24 หลังจากวางไข่ครั้งแรก

ผลของการฉีดสารสกัดจากก้านตา 2 ครั้ง (0 และ 12 ชั่วโมง : 1 ก้านตา/ตัว/ครั้ง)
นางุ้งหลังจากตัดตาได้ 7 วัน ปริมาณไวเทรอลเจนนีจะค่อย ๆ ลดลงถึงระดับต่ำสุดประมาณชั่วโมง
ที่ 28 และหลังจากนั้นระดับไวเทรอลเจนนีจะเพิ่มสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับระดับไวเทรอลเจนนี
เมื่อเริ่มต้นทดลองที่เวลา 44 ชั่วโมง ซึ่งต่างจากนางุ้งที่ฉีดด้วยน้ำเกลือที่ระดับของไวเทรอลเจนนี
นั้นเลือกเพิ่มขึ้นตลอดเวลาที่ทดลอง

PRODUCTION OF ANTIBODY AGAINST VITELLIN
FOR VITELLOGENESIS INHIBITING HORMONE ASSAY
IN THE GIANT FRESHWATER PRAWN
Macrobrachium rosenbergii

AN ABSTRACT

BY

VIMOL SUKTANGMAN

Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University

October 1995

The vitellin specific antisera were obtained from mice immunized with ammonium sulfate precipitated ovarian extracts of the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Specificity of antisera was determined by double immunodiffusion against antigens from various shrimps species. The antigens from ovarian extracts or from female hemolymph of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* and *Macrobrachium lanchesteri* show higher degree of similarity than the antigens from the ovarian extract and from female hemolymph of *Palaemon serrifer*. The cross-reactivity of antisera to the antigens from ovarian extracts or from female hemolymph of *Metapenaeus affinis* and *Metapenaeus ensis*, and from testicular extract and male hemolymph of *M. rosenbergii* was not observed. On immunoelectrophoresis, at least two antigens from the ovarian extract and female hemolymph of *M. rosenbergii* showed similar mobility. The anti-vitellin antiserum also contain antibodies against other components in the ovarian extract. However, those contaminant antibodies in the anti-vitellogenin antiserum could be eliminated by absorption of the antiserum with the male hemolymph and hepatopancreas extract.

Specificity of antisera was also shown by immunocytochemistry. The antiserum recognize only the primary vitellogenesis and older oocytes but did not recognize earlier stage oocytes and other cells.

The vitellogenin levels in the hemolymph of *M. rosenbergii* was determined by competitive ELISA. In post-spawn prawn, the hemolymph vitellogenin levels were low and remained unchange during 4 to 10 days after spawn, then increased at variable rates and times in some prawns

during 12-26 days after spawn. In eye-ablated prawns (4 days after spawn), the vitellogenin levels increased rapidly until reaching the highest level on day 18, then decreased rapidly during the next pre-spawn period. All of the prawns in this group respawned on day 23 and 24.

The effect of eyestalk extract on the haemolymph vitellogenin levels was performed by twice injections of crude eyestalk extract (at 0 and 12 hours approximately about 1 eyestalk/prawn/injection) into the eye-ablated prawns on day 11 after spawn. The vitellogenin levels of the prawns gradually decreased to the lowest levels at 28 hours then gradually increased to the original level at 44 hours. In the parallel experiment the prawns injected with saline, the vitellogenin levels was gradually increased through the experimental period.

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาบริญานีพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควร
รับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน

(รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(ผศ.ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน

(รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(ผศ.ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผศ.ดร.ธารารัตน์ สุขศิริ)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้บริญานีพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ดร.ศิริยุภา พูลสุวรรณ)

วันที่ 10 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2538

ประกาศคุณูปการ

บริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและแนะนำอย่างดียิ่งจาก รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล และ ผศ.ดร.วิระวรรณ สิทธิกรกุล รวมทั้ง ผศ.ดร.ธารารัตน์ สุภศิริ ที่กรุณาร่วมเป็น กรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณศิวาพร ลงยันต์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาตลอดจนทำให้บริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณพัชรีย์ แยกโคกสูง เจ้าหน้าที่ธุรการพยาบาล สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการให้ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ ตลอดจนช่วยพิมพ์และแก้ไขบริญญานิพนธ์ ฉบับนี้จนเรียบร้อยสมบูรณ์

ขอโน้มกราบสักถึงพระคุณบิดา มารดา และพี่ ๆ ที่ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษา แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอ และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวนามานี้ที่นี้ ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนบริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

วิมล สุขทั้งมัน

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ชีววิทยาของกุ้ง	10
กุ้งก้ามกราม	10
กุ้งฝอยน้ำจืด	13
กุ้งฝอยน้ำเค็ม	15
กุ้งตะกาด	16
การผสมไข่แดงของรังไข่	18
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	19
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	20
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	20
นิยามศัพท์เฉพาะ	21
2 วิธีการวิจัย	22
สัตว์ทดลอง	22
อุปกรณ์และสารเคมี	22
วิธีดำเนินการทดลอง	25

การเตรียมสารสกัดไวรัลจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม	26
การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวรัลในหนูขาว	27
การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว	28
การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการวัดปริมาณไวรัลในเงิน	
ด้วยวิธี competitive ELISA	31
การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณของไวรัลในเงินในเลือด	
กับพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามเพศเมียหลังวางไข่	
ในกุ้งปกติ (ไม่ติดเชื้อ) และกุ้งที่ถูกติดเชื้อ	32
การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม	33
การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากก้านตาในการยับยั้งพัฒนาของรังไข่	
โดยตรวจดูจากระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวรัลในเงิน	34
3 ผลการวิจัย	38
4 สรุปผลการทดลอง	55
ข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก	69
ประวัติย่อของผู้วิจัย	73

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

- 1 แสดงปริมาณไวเทรลเจนนินในเลือดของกึ่งกำมารามปกติหลังจากวางไข่
 ที่เวลาต่าง ๆ 51
- 2 แสดงปริมาณไวเทรลเจนนินในเลือดของกึ่งกำมารามที่ตัดตาออกทั้งสองข้าง
 ในวันที่ 4 หลังจากวางไข่ 52
- 3 แสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงของไวเทรลเจนนินในเลือดของกึ่งกำมารามที่ตัดตา
 และฉีดด้วยน้ำเกลือ 53
- 4 แสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงของไวเทรลเจนนินในเลือดของกึ่งกำมารามที่ตัดตา
 และฉีดด้วยสารสกัดจากก้านตา 54

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	แสดงภาพกุ้งก้ามกราม (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	12
2	แสดงลักษณะการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 ของกุ้งก้ามกราม	13
3	แสดงภาพกุ้งฝอยน้ำจืด (<i>Macrobrachium lanchesteri</i>)	14
4	แสดงภาพกุ้งฝอยน้ำเค็ม (<i>Palaemon serrifer</i>)	15
5	แสดงภาพกุ้งตะกาด (<i>Metapenaeus affinis</i>)	17
6	แสดงภาพกุ้งตะกาด (<i>Metapenaeus ensis</i>)	18
7	แสดงขั้นตอนการผลิตและทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินจากกุ้งไข่ เพื่อใช้ตรวจสอบวัดระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกราม โดยวิธี competitive ELISA	35
8	แสดงปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยวิธีอินไดเรกต์อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method)	36
9	แสดงหลักการของ ELISA (indirect immunoperoxidase method)	37
10	แสดงหลักการของ competitive ELISA	37
11	แสดงดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion) ระหว่างแอนติซีรั่มกับแอนติเจนต่าง ๆ	44
12	แสดงอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส (immunoelectrophoresis) ของแอนติซีรั่ม กับตัวอย่างเลือดของกุ้ง เพศเมียและสารสกัดจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม.....	45
13	ภาพทางแสงของเซลล์ภายในรังไข่ระยะที่ 2 ของกุ้งก้ามกรามที่ย้อมด้วยแอนติ ไวเทลลิน (anti-vitellin) โดยวิธีอินไดเรกต์อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส.....	46

- 14 ภาพทางซ้ายของเซลล์ภายในรังไข่ระยะที่ 2 ของกึ่งกำกรามที่ย้อมด้วยแอนติ
ไวเทลลิน (anti-vitellin) โดยวิธีอินโคเรคทีฟอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส 47
- 15 แสดง competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐาน และตัวอย่างเลือด
กึ่งกำกรามเพศเมียและเพศผู้ที่ระดับเจือจางต่าง ๆ 48
- 16 แสดงปริมาณของไวเทลโลเจนิน (ค่าเฉลี่ย (X) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD))
ในเลือดของกึ่งกำกรามระยะหลังจากวางไข่ 49
- 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนิน (ค่าเฉลี่ย (X) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบน
มาตรฐาน (SD)) ในเลือดกึ่งกำกรามเพศเมียที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง หลังจาก
ฉีดด้วยน้ำเกลือ หรือสารสกัดจากก้านตาสองครั้ง 50

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กุ้งน้ำจืด และกุ้งทะเลนั้นเคยมีอยู่อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ของประเทศไทย ซึ่งชาวไทยได้อาศัยกุ้งเหล่านี้เป็นอาหารมานาน อีกทั้งยังเป็นสินค้าออกที่ทำเงินตราให้กับประเทศปีละมาก ๆ อีกด้วย แต่เมื่อกาลเวลาล่วงจนสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้เปลี่ยนแปลงไปทำให้ปริมาณกุ้งที่พบในธรรมชาติลดน้อยลงไปมาก ในขณะที่ความต้องการของผู้บริโภคกลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนทำให้มีผู้สนใจที่จะเพาะเลี้ยงกุ้งแทนการจับจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว ซึ่งนักวิชาการและเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งต่างก็พยายามศึกษาวิธีการต่าง ๆ ที่จะช่วยให้การเลี้ยงกุ้งได้ผลดียิ่งขึ้น แต่การเลี้ยงกุ้งทะเลเช่น กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ประสบปัญหาที่สำคัญคือการขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพดีสำหรับเพาะพันธุ์กุ้งวัยอ่อน การเพาะพันธุ์กุ้งวัยอ่อนหาได้ยากทั้งขนาดโตเต็มวัยมาบิตาหรือคัดก้านตา เพื่อชักนำให้รังไข่เจริญ ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญหรือพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนที่ยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH) (Anilkumar and Adiyodi. 1980; Emmerson. 1983) แต่ผลที่ได้นอกจากจะนับแน่นอนแล้วยังเป็นการทำลายสมดุลของฮอร์โมนอื่น ๆ ในตัวกุ้งด้วย ดังนั้นจึงควรหาวิธีการอื่นมาแทนการบิตาหรือคัดก้านตาเพื่อลดอิทธิพลของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่

ในก้านตา (eyestalk) ของสัตว์พวกครัสเตเชีย (crustacean) ประกอบด้วย neuroendocrine cell และ neurohemal organ เช่น sinus gland (Josefsson. 1983) ซึ่งเป็นแหล่งสร้างและเก็บสะสมฮอร์โมนที่สำคัญหลายชนิด เช่น ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (Molt Inhibiting Hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb. 1987) ฮอร์โมนควบคุมการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) (Huberman and Aguilar. 1988) ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของเมือกในโครมาโทฟอร์

(Pigment Dispersing Hormone-PDH) (Rao and Riehm. 1988) ฮอโมนที่ช่วยในการรวมตัวของเม็ดสีภายในตาประกอบของสัตว์ที่มืด (Red Pigment Concentrating Hormone-RPCH) (Fenlund and Josefsson. 1972) และฮอโมนที่มีหน้าที่ยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH or Gonad Inhibiting Hormone-GIH) (Soyez and others. 1987) ในช่วงที่มีการเจริญหรือพัฒนาการของรังไข่ พบว่าจะมีการสะสมไวเทลลิน (vitellin) ภายในรังไข่ (ovary) ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอโมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ เช่น ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* (Soyez and others. 1987) กุ้ง *Procambarus bouvieri* (Aguilar and others. 1992) และจากการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่าในสัตว์จำพวกครัสเตเชีย เช่น กุ้ง และปูชนิดต่าง ๆ มีฮอโมนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ภายในก้ามตา เมื่อทำลายก้ามตาโดยวิธีบีบตาหรือวิธีการอื่น ๆ จะมีผลชักนำให้เกิดพัฒนาการของรังไข่ (Anilkumar and Adiyodi. 1980; Emmerson. 1983) และเมื่อฉีดสารสกัดจากก้ามตาลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกทำลายก้ามตาจะมีผลยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ เช่น ในกุ้ง *Parapenaeopsis hardwickii* (Kulkarni and Nagabhushanam. 1980) กุ้งมังกร (*Panulirus argus*) (Quackenbush and Herrnkind. 1981) ปู้ามดาบ (fiddler crab) *Uca pugilator* (Quackenbush and Keeley. 1988) ส่วนในกุ้ง *Palaemon serratus* ตัวเมียจะไม่มีสารสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) ในช่วงระยะพักการสืบพันธุ์ แต่ถ้าตัดก้ามตาออกซึ่งเป็นแหล่งของฮอโมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ก็จะกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน และยังพบว่าฮอโมนนี้จะยับยั้งกระบวนการสร้างไวเทลโลเจนินระยะที่ 2 (secondary vitellogenesis) ระหว่างฤดูการสืบพันธุ์ (Charniaux-Cotton. 1980) ส่วนฮอโมนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของรังไข่อาจจะพบในแหล่งอื่น ๆ ซึ่งยังไม่มีรายงานหรือหลักฐานแน่ชัดว่ามีอยู่ที่ชนิดและสร้างจากส่วนใดของระบบประสาท แต่วิธีการทำลายก้ามตานี้ผลที่ได้จะไม่แน่นอน เพราะเป็นการทำลายสมดุลของฮอโมนต่าง ๆ ในตัวกุ้งทำให้การผลิตฮอร์โมนไม่สมดุล อัตราการผสม อัตราการอยู่รอดของลูกกุ้งลดลงและแม่พันธุ์ที่ใส่คาย ทำให้ต้องหาแม่พันธุ์มาทดแทนอยู่เสมอ จึงเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต ฉะนั้นถ้าสามารถแยกฮอโมนที่ยับยั้งการสะสมไข่แดง

ออกจากฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในก้านตาได้ก็จะสามารถนำฮอร์โมนชนิดนี้มาสร้างแอนติบอดี (antibody) ทั้งนี้อาจนำไปใช้ในการลดอิทธิพลการทำงานของฮอร์โมนชนิดนี้ได้ เพื่อเป็นการ ชักนำพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งได้โดยไม่ต้องทำลายก้านตา ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ ในขณะที่รังไข่กำลังพัฒนาหรือเจริญ

ไวเทลลิน (vitellin) หรือไลโปไวเทลลิน (lipovitellin) จัดเป็นโปรตีนที่จำเพาะซึ่งสะสมอยู่ในไข่แดง (yolk) ระหว่างที่มีการเจริญหรือพัฒนาการของรังไข่ในวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสตาเซียน ไวเทลลินเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่น้ำหนักโมเลกุลสูง โดยอยู่รวมกันกับไขมัน (lipid) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และคาร์โรทีนอยด์ (carotenoid) ในรูป lipo-glyco-carotenoprotein น้ำหนักโมเลกุลของไวเทลลินส่วนมากจะอยู่ระหว่าง 300-500 กิโลดาลตัน (kD) (Zagalsky, 1985; Chang and others, 1993a) ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) ที่มีจำนวนตั้งแต่ 2-11 หน่วยย่อยจัดเป็นสารจำพวกเปปไทด์ (peptide) (Lui and Connor, 1977; Eastman-Reks and Fingerman, 1985) ซึ่งคาร์โรทีนอยด์จะเป็นส่วนประกอบที่ทำให้ไวเทลลินจากรังไข่มีสีแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์นั้น ๆ เช่น สีเหลืองในปูม้า (blue crab) *Callinectes sapidus* (Kerr, 1969) สีม่วงในปูเสฉวน (hermit crab) *Eupagurus bernhardus* L. (Cheesman and Prebble, 1966) สีเขียวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Quinitio and others, 1990) สีส้ม หรือส้มแดงในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Chang and others, 1993b) และยังพบโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายโปรตีนชนิดนี้ในเลือดของสัตว์เพศเมียขณะที่มีการเจริญ หรือพัฒนาการของรังไข่ในรูปของไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) ซึ่งระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นในขณะที่รังไข่กำลังเจริญ แต่ไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียนเพศผู้ และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่เจริญ เมื่อศึกษาด้วยกระบวนการทางอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส (immunoelectrophoresis) และอิมมูโนดิฟฟิวชัน (immunodiffusion) พบว่าไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับไวเทลลินจากรังไข่ (Wollin, Laufer and Albertini, 1973; Quinitio and others, 1990) ดังนั้นไวเทลโลเจนินจึงเป็นโปรตีนที่จำเพาะในเลือดซึ่งพบในกุ้ง เพศเมียที่มีการเจริญของ

รังไข่ ซึ่งระดับไวเทลอเจนินจะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดในระยะช่วงก่อนการลอกคราบ และลดลงทันทีที่หุ้มวางไข่ เช่นในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Derelle and others. 1986) กุ้ง *Pandalus kessleri* (Quinitio and others. 1989) ไวเทลอเจนินอาจสร้างมาจากแหล่งต่างกันได้แก่ ตับ-ตับอ่อน (hepatopancreas) เช่นในปูแมงมุม (spider crab) *Libinia emarginata* และ *Carcinus maenas* (Paulus and Laufer. 1987) และในกุ้ง *Penaeus japonicus* (Yano and Chinzei. 1987) หรือสร้างมาจาก fatbody เช่นในสัตว์พวก amphipod และ isopods ไวเทลอเจนินจะถูกกลาเลียงมายังรังไข่โดยทางระบบหมุนเวียนของโลหิตแล้วเปลี่ยนรูปเป็นไวเทลลีน ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับพัฒนาการของรังไข่ (Charniaux-Cotton. 1985; Tom Goren and Ovadia. 1987; Suzuki, Yamazaki and Katakura. 1989)

ดังนั้นระดับไวเทลอเจนินในเลือดจึงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับพัฒนาการของรังไข่หรือการเจริญของรังไข่ระยะต่าง ๆ ในวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสตาเซีย ซึ่งอาจจะใช้เป็นดัชนีสำหรับการเจริญหรือพัฒนาการของรังไข่ เพื่อใช้สำหรับทดสอบ (bioassay) ฮอโมนยับยั้งการผสมไข่แดงของรังไข่ ทั้งนี้เพื่อการแยกสกัดฮอโมนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของรังไข่ และยังใช้ศึกษาถึงชีววิทยาเกี่ยวกับวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสตาเซีย

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับฮอโมนยับยั้งการผสมไข่แดงของรังไข่ที่อยู่ในก้ามตา ไวเทลลีนจากรังไข่ และไวเทลอเจนินในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซีย เช่น กุ้งและปูชนิดต่าง ๆ นั้นได้มีผู้ทำการศึกษามาแล้วแล้ว ดังนี้

การศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของฮอโมนยับยั้งการผสมไข่แดงของรังไข่ ในปี 1981 Bomirski และคนอื่น ๆ (Bomirski and others. 1981) ได้ทำการแยกสกัดฮอโมนยับยั้งการผสมไข่แดงของรังไข่จากก้ามตาของปู *Cancer magister* เพศเมียโดยการต้ม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ชนิด Sephadex G-25

และทดสอบสารสกัดที่ได้ในกุ้ง *Crangon crangon* เพศเมียที่ตัดตา โดยตรวจหาดัชนีของรังไข่ (ovarian index-OI) เปรียบเทียบกับกุ้งที่นำได้ตัดตาและกุ้งที่ตัดตาที่นำได้ฉีดสารสกัด พบว่าฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่เป็นสารจำพวก เบตาเทค มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,000 คาลตัน

ในการศึกษาคุณลักษณะของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่นั้น แควก เคนบุชและ เอิร์นคาช (Quackenbush and Herrnkind. 1983) ได้แยกสกัดฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้ามตากุ้งมังกร (*Panulirus argus*) ด้วยวิธีการ 2 ขั้นตอนโดยใช้ Sephadex gel chromatography และ polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเป็นสารจำพวก เบตาเทค มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 คาลตัน โดยทดสอบผลการยับยั้งของฮอร์โมนนี้ในปู้ามคาบ (*Uca pugilator*) ที่ตัดก้ามตา และต่อมาในปี 1989 แควก เคนบุช (Quackenbush. 1989) ได้แยกสกัดฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้ามตาของกุ้ง *Penaeus vannamei* โดยใช้ Sephadex gel chromatography (Sephadex G-25) พบว่าเป็นเบตาเทคที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,300 คาลตัน โดยทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนในรังไข่และในตับ-ตับอ่อนของกุ้ง *Penaeus vannamei* พบว่ามีประสิทธิภาพการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในรังไข่ได้ 37% และในตับ-ตับอ่อนได้ 39% โดยใช้สารสกัดจำนวน 0.025 ก้ามตา

โซเยสและคนอื่น ๆ (Soyez and others. 1987) ได้แยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้ามตาลอบสเตอร์ *Homarus americanus* ด้วยวิธีการ 2 ขั้นตอน คือ reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) และ sodium dodecyl sulfate-urea-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-urea-PAGE) และทดสอบสารสกัดที่ได้ในกุ้ง *Palaemonetes varians* เพศเมียที่ตัดตา โดยตรวจดูประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ (oocyte) เทียบกับกุ้งที่นำตัดตา และกุ้งที่ตัดตาที่นำได้ฉีดสารสกัด พบว่าฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่เป็นสารจำพวก เบตาเทคมีน้ำหนักโมเลกุล 7,000-8,000 คาลตัน ต่อมาในปี 1991 โซเยสและคนอื่น ๆ (Soyez and others.

1991) ได้แยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนชนิดนี้จากก้ามตากุ้งชนิดเดียวกัน เพื่อศึกษาถึงลักษณะโครงสร้าง ส่วนประกอบ และลำดับของกรดอะมิโน (amino acid) โดยใช้ gas-phase microsequencing และ fast-atom bombardment mass spectrometry พบว่าฮอร์โมนนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 9135 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 77 หน่วย ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) และฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบของกุ้ง (MIH)

ปี 1992 อาเกวาลาร์และคนอื่น ๆ (Aguilar and others. 1992) ได้ทำการแยกบริสุทธิ์ ฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้ามตาของกุ้ง Mexican crayfish (*Procambarus bouvieri*) ด้วยวิธีการขั้นตอนเดียวโดยใช้ RP-HPLC พบว่าเป็นสารจากพวก เปปไทด์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8388 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72-74 หน่วย ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด และจากการทดสอบในหลอดทดลองเกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนภายในรังไข่ของกุ้ง *Penaeus vannamei* พบว่าฮอร์โมนนี้สามารถที่จะยับยั้งได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้สารสกัดจำนวน 10 ก้ามตา

ไบเย็คและไอเคน (Byard and Aiken. 1984) ได้ศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนในเลือดโดย ไข่แอนติซีรัม (antiserum) ที่จำเพาะต่อไข่เทสลินของกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* ด้วยวิธีอิมมูโนอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมีย (Female Specific Protein-FSP) ในเลือดของกุ้งระยะที่มีการสะสมของไข่แดงจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันกับไข่เทสลินจากเซลล์ไข่ ซึ่งระดับ FSP นี้ในเลือดจะเพิ่มขึ้นในระหว่างที่มีการสะสมของไข่แดง และจะเพิ่มถึงจุดสูงสุดก่อนการวางไข่ แต่ไม่พบ FSP ในกุ้งที่รังไข่อยู่ในระยะพัก ดังนั้นระดับ FSP ในเลือดนี้อาจเป็นดัชนี ที่ดีสำหรับการเจริญของรังไข่ เนื่องจากเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของไข่เทสลินที่สร้างจาก ภายนอกรังไข่แล้วนำเข้าสู่เซลล์ไข่

ในการศึกษาถึงวิธีการแยกบริสุทธิ์ไข่เทสลินจากรังไข่ของกุ้ง ครินนิติโอและคนอื่น ๆ (Quinitio and others. 1989) ได้แยกบริสุทธิ์ไข่เทสลินจากรังไข่ของกุ้ง *Pandalus kessleri* ด้วยการใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี 3 ขั้นตอนคือ hydroxylapatite, DEAE (diethylamino ethyl) cellulose และ Sepharose 6B ตามลำดับ พบว่าไข่เทสลิน

ที่ได้น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 560 กิโลดาลตัน (kD) ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunits) โดยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 81 และ 110 กิโลดาลตันตามลำดับ และยังพบว่าโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพสเมียนเลือดหรือวเทรลเจนินของกุ้ง *Pandalus kessleri* เพสเมียนจะมีลักษณะคล้ายกับวเทรลลินที่สกัดมาจากรังไข่โดยศึกษาด้วยวิธีทางอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส (immunoelectrophoresis) และอิมมูโนดิฟฟิวชัน นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของวเทรลเจนินในเลือดจะเพิ่มขึ้นในขณะที่มีการสะสมไข่แดงในรังไข่และจะลดลงหลังจากกุ้งวางไข่แล้ว ต่อมาในปี 1990 ควินิติโอและคนอื่น ๆ (Quinitio and others. 1990) ได้แยกบริสุทธิ์วเทรลลินจากรังไข่ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี hydroxylapatite และ Sepharose 6B พบว่าวเทรลลินที่แยกได้นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 540 กิโลดาลตันประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ 4 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 74, 83, 104 และ 168 กิโลดาลตันตามลำดับ และยังประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดเล็ก 1 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 90 กิโลดาลตันซึ่งเป็นโปรตีนชนิด glycolipoprotein เมื่อศึกษาวเทรลเจนินของกุ้งกุลาดำเพสเมียนด้วยกระบวนการทางอิเล็กโตรโฟรีซิส และอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่ามีลักษณะคล้ายกับวเทรลลินและโปรตีนชนิดนี้พบในกุ้งกุลาดำเพศผู้ และยังได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบวเทรลลินของกุ้งกุลาดำกับวเทรลลินจากรังไข่ของกุ้งทะเลชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่าแอนติซีรั่มหาบิฏริยากับสารสกัดวเทรลลินจากรังไข่ของกุ้งกุลาดำ สารสกัดวเทรลลินจากรังไข่ของกุ้งแชบ๊วยดำ (*Penaeus indicus*) กุ้งแชบ๊วยขาว (*Penaeus merguensis*) และกุ้งกุลาลาย (*Penaeus semisulcatus*) แต่ไม่หาบิฏริยากับสารสกัดวเทรลลินจากรังไข่ของกุ้ง *Pandalus kessleri* จากการทดสอบครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของวเทรลลินจากรังไข่ของกุ้งในวงศ์ (Family) Penaeidae แต่อาจแตกต่างจากวเทรลลินในรังไข่ของกุ้งที่ต่างวงศ์กัน

ในปี 1993 ชางและคนอื่น ๆ (Chang and others., 1993a) ได้แยกบริสุทธิ์วเทรลลินจากรังไข่ที่เจริญเต็มที่ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ด้วยวิธีการ 4 ขั้นตอน โดยจะใช้เจลฟิลเทชัน (gel filtration), hydroxylapatite, DEAE-Sephacel และ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) พบว่าวเทรลลินมีน้ำหนักโมเลกุล 492 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย

โพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ 8 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 91, 82, 68, 64, 58, 49, 45 และ 35 กิโลดาลตันตามลำดับ ซึ่งจัดเป็นโปรตีนในรูป lipo-glyco-carotenoprotein ในปัสสาวะของชาวและคนอื่น ๆ (Chang and others. 1993b) ก็ได้แยกบริสุทธิ์โวลูเทลินจากรังไข่ที่เจริญเต็มที่ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) โดยวิธีเจลฟิลเทรชัน DEAE-Sephacel, HPLC และ PAGE พบว่ามีโวลูเทลิน 3 กลุ่ม (โวลูเทลิน 1 เป็นโปรตีนหลัก โวลูเทลิน 2 และโวลูเทลิน 3) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีน้ำหนักโมเลกุล 240, 450 และ 780 กิโลดาลตันตามลำดับ และแต่ละกลุ่มนั้นประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 90 และ 104 กิโลดาลตัน อยู่ในรูปของ lipo-glyco-carotenoprotein เมื่อทดสอบด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชันพบว่าแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโวลูเทลิน 1 และแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโวลูเทลินรวม (โวลูเทลิน 1 + โวลูเทลิน 2 + โวลูเทลิน 3) ทำปฏิกิริยากับเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศเมียที่ฉีดเต็มวัย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมียที่ยังไม่ฉีดเต็มวัย โดยให้เนวตะกอนที่เชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันกับเนวตะกอนที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโวลูเทลินรวมกับโวลูเทลิน 1 และกับโวลูเทลินรวมก็ให้เนวตะกอนที่เชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์เช่นกัน

ต่อมาในปี 1994 ชาวและคนอื่น ๆ (Chang and others. 1994) ได้แยกบริสุทธิ์โปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมียหรือโวลูเทโรเจนินในเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เพศเมียที่ฉีดเต็มวัยโดยการย้อมสี Sudan Black B (SBB) และแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดความเร็วสูง (ultracentrifuge) หลังจากนั้นทดสอบด้วยวิธี Western blotting และ SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมีย หรือโวลูเทโรเจนินประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 2 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 170 และ 82 กิโลดาลตันตามลำดับ จัดอยู่ในรูป lipo-glyco-phosphoprotein ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะไม่พบในเลือดของกุ้งเพศผู้ และเพศเมียที่ยังไม่ฉีดเต็มวัยหรือที่รังไข่ยังไม่เจริญ

ส่วนรายงานเกี่ยวกับการตรวจวัดระดับของโวลูเทโรเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี ELISA นั้น เคอเรลและคนอื่น ๆ (Derelle and others. 1986) ได้ผลิตแอนติบอดีนอสมอนอคไลน์ (monoclonal antibody) และแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโวลูเทลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) และได้ใช้วิธี sandwich ELISA ในการตรวจวัด

ระดับไอเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามตัวเมียในช่วงต่าง ๆ ของวงจรสืบพันธุ์ และการลอกคราบว่าระดับไอเทลโลเจนินอยู่ในระดับค่าประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเริ่มต้นของวงจรสืบพันธุ์ และระดับไอเทลโลเจนินนี้จะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดประมาณ 10-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงกุ้งใกล้ที่จะลอกคราบ ต่อจากนั้นระดับไอเทลโลเจนินจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากกุ้งวางไข่ และยังพบว่าไอเทลโลเจนินในรังไข่ของกุ้งก้ามกรามมีน้ำหนักโมเลกุล 330 กิโลดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเทชันชนิด Sephadex G-200 เมื่อแยกสกัดไอเทลโลเจนินและไอเทลโลเจนินของกุ้งนี้ด้วย SDS-PAGE electrophoresis พบว่าเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 84 และ 92 กิโลดาลตันตามลำดับ

จากรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับไอเทลโลเจนิน ไอเทลโลเจนิน และฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ในวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสเตเชียอื่น พบว่าในเลือดของสัตว์พวกนี้เพศเมียจะมีไอเทลโลเจนินซึ่งจัดเป็นโปรตีนที่จำเพาะในเลือดของเพศเมีย และจากการศึกษารายกระบวนการทางอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส และอิมมูโนดิฟฟิวชัน จะมีลักษณะเหมือนกับไอเทลโลเจนินในรังไข่ และระดับไอเทลโลเจนินนี้มีความสัมพันธ์กับฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ในวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสเตเชีย ดังนั้นกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) น่าจะมีโปรตีนที่จำเพาะในเลือดของเพศเมียที่มีลักษณะเหมือนกับไอเทลโลเจนินในรังไข่ และการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนในเลือดก็สัมพันธ์กับวงจรสืบพันธุ์ ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ที่อยู่ในก้านตาของกุ้งชนิดนี้เช่นกัน

การศึกษานครั้งนี้จึงเลือกเอากุ้งก้ามกราม เป็นต้นแบบเพราะว่ากุ้งก้ามกรามมีลักษณะได้เปรียบกว่ากุ้งชนิดอื่น ๆ คือ มีขนาดใหญ่ สะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดและการฉีดสารสกัด และเป็นกุ้งที่เจริญเติบโตจนน่าจับจ้องหาให้สะดวกในการเลี้ยงดู อีกทั้งยังมีข้อมูลค่อนข้างพร้อมในการเลี้ยง และยังสามารถวางไข่ได้เองตามธรรมชาติ จึงหาตัวอย่างได้ทุกระยะการเจริญ นอกจากนี้กุ้งตัวเมียยังมีราคาถูก เพราะว่าการทดลองแต่ละครั้งต้องใช้กุ้งตัวเมียเป็นจำนวนมาก เพื่อแยกสกัด วิเคราะห์ และทดสอบ

ชีววิทยาของกุ้ง

กุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืด ซึ่งมีการจัดลำดับหมวดหมู่ (Classification) ทางอนุกรมวิธานดังนี้ (Holthuis. 1980)

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Infraorder	Caridea
Family	Palaemonidae
Genus	<i>Macrobrachium</i>
Species	<i>rosenbergii</i>

ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

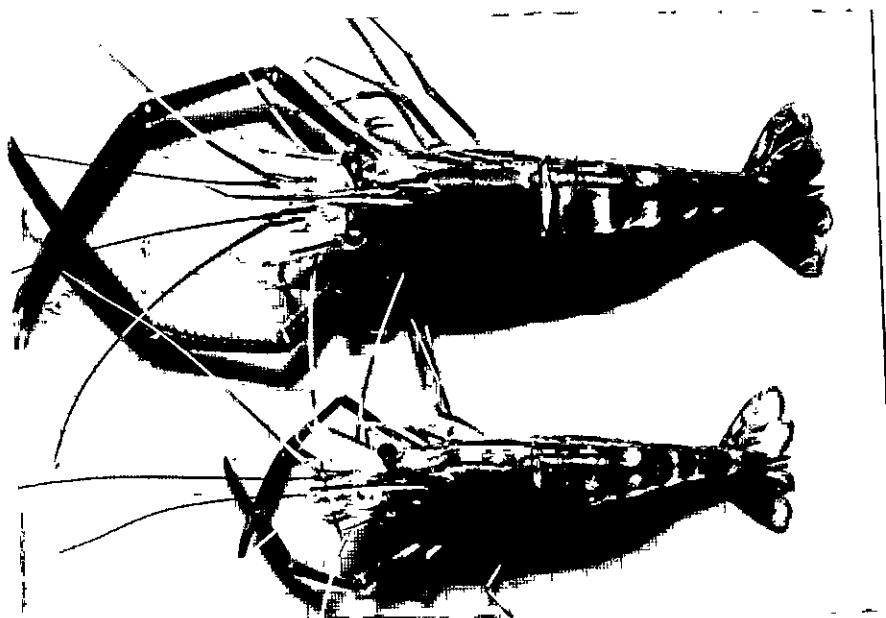
กุ้งก้ามกราม เป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เคยพบว่ามีความยาวมากกว่า 30 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 380-400 กรัม กุ้งก้ามกรามในแต่ละท้องถิ่นจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น กุ้งใหญ่ แม่งุ้ง กุ้งนาง หรือกุ้งหลวง เป็นต้น กุ้งก้ามกรามอาศัยตามแม่น้ำลำคลอง ธารน้ำ ทะเลสาบ รวมทั้งแหล่งน้ำจืดที่มีทางติดต่อกับทะเล และแหล่งน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำลำคลอง และทะเลสาบ (ชูศิลป์ อัครชู. 2526; ปิยะพงศ์ รัชคินทร์. 2529)

กุ้งก้ามกรามมีลักษณะสำคัญ คือเปลือกหัวมีหนามแหลม 2 อัน มีร่องอยู่ด้านข้างกรีแบนยาว เรียว โคนกรีนานูน ตรงกลางแอ่นลง ส่วนปลายงอนขึ้น มีหนามลักษณะ เป็นฟันเลื่อยบนสันกรีก้านบน

8-13 ซี่ และบนสันกรัก้านล่าง 13 ซี่ ปลายหางแหลมมีหนาม 4 คู่ ปลายหางยาวจรดด้านข้างของ
 แพนหาง มีหนาม 2 คู่ ขาเดิน 5 คู่ และขาว่ายน้ำ 5 คู่ ซึ่งขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 มีลักษณะเป็นก้าม
 คู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่มากกว่าคู่ที่ 1 กุ้งที่โตเต็มวัย ขาเดินคู่ที่ 2 ของเพศผู้จะมีขนาดใหญ่มากกว่าของเพศเมีย
 มาก ช่วงใต้ท้องของกุ้งเพศผู้แคบกว่าของเพศเมีย วนอกกว้างใช้ขาว่ายน้ำ 3 คู่แรกจะมีขนละเอียด
 เกิดขึ้นมากมายสำหรับเป็นที่ยึดเกาะของไข่ขณะพัก ช่องปล่อยน้ำเชื้อของเพศผู้อยู่บริเวณโคนขาเดิน
 คู่ที่ 5 เพศเมียมีช่องปล่อยน้ำเชื้อบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ส่วนขาเดินคู่ที่ 3, 4 และ 5 มีลักษณะเป็น
 ปลายแหลมธรรมดา (ปิยะพงศ์ รัชติพันธุ์. 2529; ยนต์ มุสิก. 2529)

ลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันระหว่างกุ้งเพศผู้ และเพศเมีย คือกุ้งที่โตเต็มวัยเพศผู้จะมี
 ขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย ก้ามของเพศผู้จะมีขนาดใหญ่ ก้ามของเพศเมียจะมีขนาดเล็ก เปลือกหัวตัว
 ส่วนท้องของเพศผู้จะแคบกว่าของเพศเมียจะกว้าง สำหรับกุ้งที่ยังไม่โตเต็มที่อาจจะใช้ลักษณะอื่น
 เข้าช่วยซึ่งจะต้องดูละเอียดขึ้น ลักษณะที่สามารถใช้แยกตัวกุ้งตั้งแต่ตัวเล็กถึงตัวโต คือลักษณะของ
 ขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย กุ้งเพศเมียตรงปลายขาว่ายน้ำ
 คู่ที่ 2 ตรงปล้องสุดท้ายจะแยกออกเป็นแขนง 3 อัน โดยอันเล็กสุดอยู่ด้านใน ส่วนกุ้งเพศผู้ปลายขา
 ว่ายน้ำคู่ที่ 2 จะแยกเป็นแขนง 4 อัน โดยมีเพิ่มเข้ามาอีก 1 อัน ระหว่างอันที่ 2 และ 3 ส่วนที่
 เจริญขึ้นมาเรียกว่าแอฟเพนดิก มีสกุลลิน่า (appendix masculina) พบเฉพาะในกุ้งเพศผู้ ซึ่งจะ
 แทรกอยู่ระหว่างแขนงอันที่ 2 คือ เอ็นโดพอด (endopod) และแขนงอันที่ 3 คือ แอฟเพนดิก
 อินเทอร์นา (appendix interna) สำหรับแขนงอันที่ 1 มีชื่อเฉพาะว่าเอ็กโซพอด (exopod)
 การแยกเพศกุ้งโดยวิธีดูปลายขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 นี้ ถ้าเป็นกุ้งขนาดโตก็สามารถแยกได้ง่าย แต่ถ้าเป็น
 กุ้งขนาดเล็กต้องใช้แว่นขยายหรือกล้องจุลทรรศน์ช่วยจึงจะเห็นได้ชัด ลักษณะอื่น ๆ ที่สามารถจะใช้
 แยกเพศกุ้งขนาดปานกลางหรือขนาดใหญ่ ได้แก่ช่องเปิดสำหรับเชื้อเพศผู้และช่องเปิดสำหรับไข่
 รอกในเพศผู้ช่องเปิดจะอยู่ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ส่วนเพศเมียช่องเปิดจะอยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 3
 ลักษณะอีกอย่างหนึ่งที่สามารถช่วยในการแยกเพศ กุ้ง คือ ปล้องที่ 1 ของส่วนท้องของกุ้งเพศผู้ ตรงกลาง
 ด้านท้องจะเป็นปุ่มเล็ก ๆ สามารถรู้สึได้ที่โดยใช้นิ้วสัมผัสซึ่งในกุ้งเพศเมียจะไม่มีพบ (ฐศิศิลป์ อัครฐ.
 2526; ยนต์ มุสิก. 2529)

ลูกกุ้งวัยอ่อนจะเจริญเติบโตในน้ำจืด บริเวณปากแม่น้ำที่มีความเค็ม ตั้งแต่ 9-15 ส่วน
ใน 1000 (ppt) จะไม่สามารถเจริญเติบโตในน้ำจืดสนิท เมื่อลูกกุ้งเข้าสู่วัยรุ่นจะอาศัยอยู่ใน
บริเวณที่มีน้ำจืดสนิท หลังจากผสมพันธุ์แล้วแม่กุ้งจะอพยพออกสู่ปากน้ำเพื่อไข่ในบริเวณน้ำจืด
บางปีหนึ่ง ๆ กุ้งมักจะวางไข่ในเดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายน แต่จะพบกุ้งเพศเมียที่มีไข่ติดหน้าท้อง
ตลอดปี กุ้งในทะเลสาบสงขลาตรงบริเวณปากอ่าวจะพบเพศเมียที่มีไข่ติดหน้าท้องในเดือนพฤศจิกายน
ถึงเดือนมกราคม กุ้งเพศเมียที่มีไข่แก่พร้อมที่จะผสมพันธุ์จะสังเกตได้จากส่วนหัว จะปรากฏเป็นสี
ส้มแก่เป็นก้อนบริเวณกลางหัวซึ่งเป็นรังไข่ของกุ้ง และกุ้งจะลอกคราบก่อนการผสมพันธุ์หนึ่งครั้ง
(ปิยะพงศ์ รัชติพันธุ์. 2529)

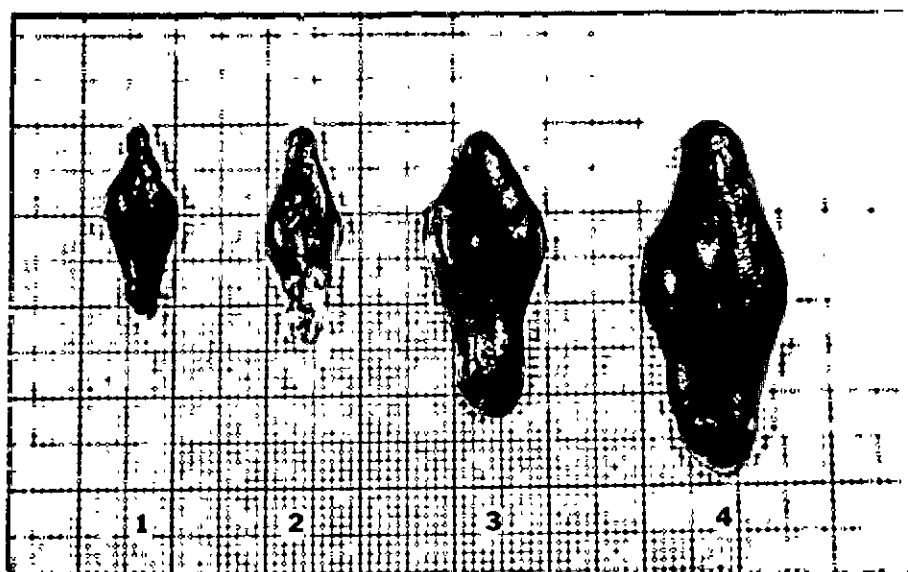


ภาพประกอบ 1 แสดงภาพกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

ลักษณะภายนอกของรังไข่ในกุ้งก้ามกราม

รังไข่มีลักษณะเป็นพู 2 พู เชื่อมติดกันตรงกลาง ด้านหน้าของพูจะสั้นและแบนกว่าด้านหลัง เมื่อรังไข่มีการพัฒนาเต็มที่แล้ว ส่วนหน้าจะยื่นยาวออกจนถึงส่วนที่เป็นกระเพาะอาหารและส่วนหลังจะยื่นเข้าไปในส่วนของบอลล่งแรกในท่อนหาง ในรังไข่ที่เริ่มมีการพัฒนาพบว่าถุงหุ้มรังไข่ด้านบนและด้านข้างของรังไข่จะมีเมือกสีขาวปกคลุมทั่วใบ เมื่อรังไข่เริ่มพัฒนาตัวเนื้อรังไข่จะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงเหลืองส้มเมื่อไข่สุก และเมือกสีจะกระจายห่างออกจากกันจนมองไม่เห็นอีกต่อไป พบได้ในรังไข่ที่เจริญเต็มที่ (ไพศาล สิทธิกรกุล และคนอื่น ๆ. 2532)



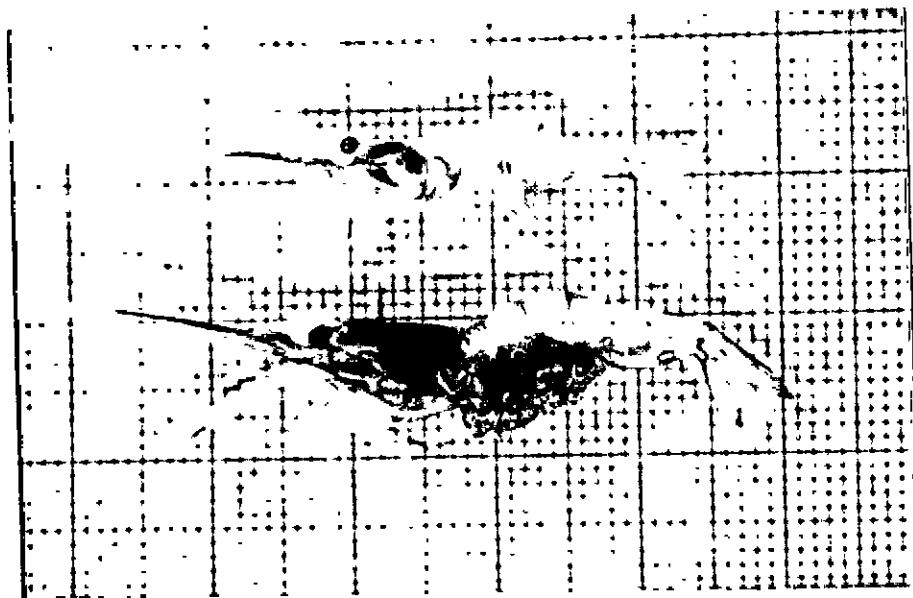
ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 ของกุ้งก้ามกราม (จากซ้ายไปขวา)

กุ้งฝอยน้ำจืด

กุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) เป็นกุ้งน้ำจืดจัดอยู่ในวงศ์ (family) Palaemonidae และสกุล (genus) *Macrobrachium* เช่นเดียวกับกุ้งก้ามกราม (สุภาวดี จุลละสร. 2525; ประจวบ หล้าอุบล. 2527)

ลักษณะทั่วไปของกุ้งฝอยน้ำจืด

กุ้งฝอยน้ำจืดเป็นกุ้งน้ำจืดชนิดเล็ก มีความยาวของลำตัวประมาณ 2-7 เซนติเมตร เปลือกแข็งห่อหุ้มตัว มีขา 10 คู่ แบ่งแยกหน้าที่กันออกไปเป็นขาสำหรับจับอาหาร ขาเดินและขาย้ำน้ำ ขาเดินคู่ที่ 2 มีขนาดเล็กลงกับขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ข้อปลายมีลักษณะเป็นก้ามหนีบ ลักษณะสำคัญคือ มีกรรตง ขาเดิน 3 คู่ ยาวเท่ากัน ซึ่งแตกต่างจากลูกกุ้งก้ามกรามที่มีขนาดเท่ากันจะมีกรรตงบลาวยาว รัดสูงชัน ขอบอาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำตามชายริมตลิ่ง ซึ่งเป็นแหล่งน้ำนิ่งที่มีรากหญ้าและรากพันธุ์ไม้ต่างๆ รวบรวมกลุ่มอยู่กันอย่างชุกชุมในหนอง บ่อ บึง หรือตามบริเวณแหล่งน้ำ ซึ่งมีกระแสน้ำขึ้นลงไหลเอื่อย ๆ (สุภาวดี จุลละสร. 2525; กรมประมง. 2530)



ภาพประกอบ 3 แสดงภาพกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*)

รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

กุ้งฝอยน้ำเค็ม

กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) เป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่งจัดอยู่ในวงศ์เดียวกันกับ กุ้งก้ามกราม คือวงศ์ Palaemonidae แต่อยู่ต่างสกุลกัน คือสกุล *Palaemon* (พินลพรรณ สีสละ- วัฒนากุล. 2518; สุภาวดี จุลละสร. 2525)

ลักษณะทั่วไปของกุ้งฝอยน้ำเค็ม

กุ้งฝอยน้ำเค็มเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดเล็ก ความยาวของลำตัวโดยเฉลี่ย 27 มิลลิเมตร ลำตัวสีน้ำตาล มีสี กริตตรงตอนปลายของชิ้นเล็กน้อย และยาวกว่าแผ่นก้ามบังหนวดของหนวดคู่ที่ 2 ด้านบนมี แฉกยื่นแบบฟันเลื่อย 11 อันซึ่งเรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของคาราเปส (carapace) 3 อัน อยู่ถัดไปทาง ปลายกรี 8 อัน และด้านล่างมี 4 อัน ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกกลมมนเรียวยาวเท่ากัน ผิวขรุขระรอบมีลายประสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 กับตรงกลางของข้อที่ 5 ของขาเดินคู่ที่ 3 คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 มีสีส้มแกมเหลืองคาดอยู่รอบ ปลายแพนหางคู่ในสมร แต่ปลายของแพนหางคู่นอกสมร กุ้งฝอยนี้ชอบอาศัยอยู่ตามซอกหินของแอ่งน้ำในบริเวณชายฝั่ง ทะเลที่มีน้ำขึ้นถึงและอยู่ในแหล่งน้ำที่มีทางติดต่อกับทะเล (พินลพรรณ สีสละ- วัฒนากุล. 2518)



ภาพประกอบ 4 แสดงภาพกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*)

รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

กุ้งตะกาด

กุ้งตะกาดเป็นกุ้งทะเล จัดอยู่ใน Infraorder Penaeidea วงศ์ Penaeidae และสกุล *Metapenaeus* ซึ่งอยู่ต่างจากกุ้งก้ามกราม (Holthuis, 1980)

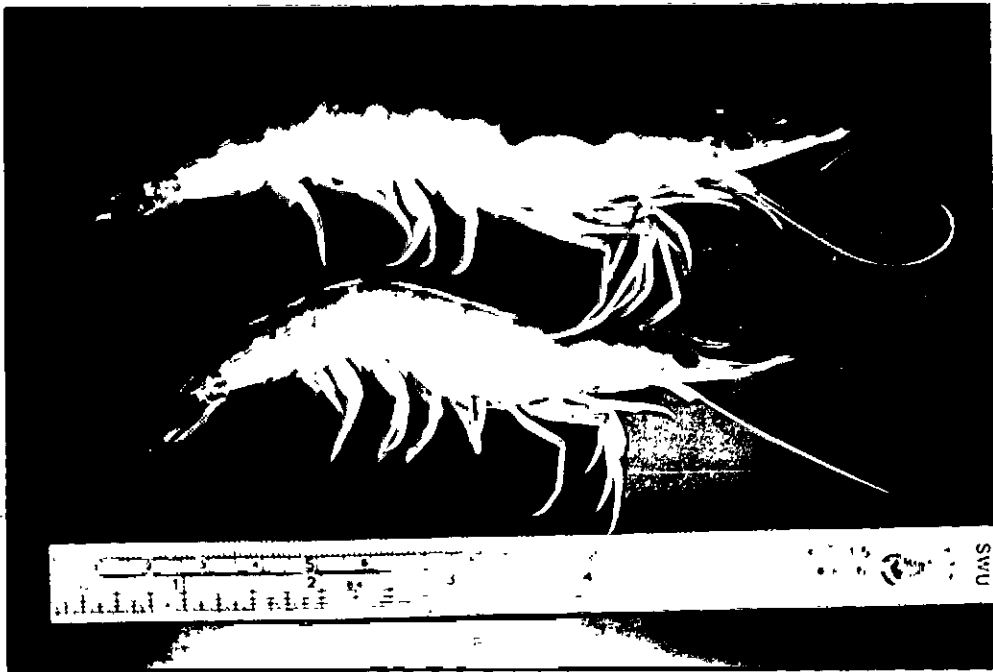
ลักษณะทั่วไปของกุ้งตะกาด

กุ้งตะกาดเป็นกุ้งทะเลขนาดเล็ก ความยาวลำตัวประมาณ 70-150 มิลลิเมตร เปลือกหุ้มแข็ง มีสีน้ำตาลเข้ม สันกริยาวจรดขอบหลังของเปลือกส่วนหัว ที่สันกริมีหนามอยู่ 7-8 ซี่ ส่วนที่สันกริล่างไม่มีหนาม ขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีหนามตรงโคนขา ส่วนขาเดินคู่ที่ 1 มีหนามบนปล้องที่ 5 โคนขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก และที่ขอบหางไม่มีหนาม อาศัยตามพื้นโคลนในท้องทะเลระดับความลึกตั้งแต่ 5 เมตรขึ้นไป แพร่กระจายทั่วไปในอ่าวไทยและคาบสมุทรอินโดจีนตั้งแต่ชายฝั่งของออสเตรเลียไปจนถึงญี่ปุ่นและช่องแคบมะละกา (ชูศิลป์ อัครฐ. 2526, ปิยะพงศ์ รัชติพันธุ์. 2529) กุ้งตะกาดที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิด (สุภาวดี จุลละสร. 2525) เช่น

1. *Metapenaeus affinis* (ใช้ในการทดลองนี้)
2. *M. ensis* (Greasy-back shrimp) (ใช้ในการทดลองนี้)
3. *M. brevicornis* (Yellow shrimp) หรือกุ้งหัวมัน กุ้งตะกาดกฐิศา
4. *M. conjunctus*
5. *M. lysianassa* (Bird shrimp)
6. *M. tenuipes*
7. *M. intermedius*
8. *M. elegans*
9. *M. moyebi*
10. *M. anchistus*
11. *M. toloensis* (Tolo velvet shrimp)
12. *M. monoceros* หรือกุ้งตะกาดกฐิจุค

กุ้งตะกาด (*M. affinis*)

ลักษณะจำเพาะของกุ้งตะกาดชนิดนี้มีดังนี้คือ กริตรง ปลาขรุขระขึ้นเล็กน้อย สันที่ต่อจากโคนฐานมนเด่นชัดและยาวไปถึงขอบหลังของ เปลือกส่วนหัว หันกริมเฉพาะด้านบน เปลือกหัวทางด้านข้างมีหนามบริเวณโคนหนวดและหนามบนส่วนของเซฟาติค (hepatic spine) ร่องข้างแก้มกว้างแต่ไม่เป็นรูปตัว C ด้านบนปล้องท้องที่ 2 ถึง 6 ยกขึ้นเป็นสัน เปลือกส่วนหัวและเปลือกส่วนท้องมีขนละเอียดสั้น ๆ กระจายอยู่ตามแอ่งทั่วไป ขาเดินคู่ที่ 1 ไม่มีหนามที่อิสเซียม (ischial spine) ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ขาวายน้ำมีสีน้ำตาลปนเหลือง แพนหางมีสีเขียวปนเหลือง ขนที่ขอบแพนหางมีสีน้ำตาลปนเหลือง ความยาวลำตัวประมาณ 70-150 มิลลิเมตร (ชูศิลป์ อัครฐ. 2526)

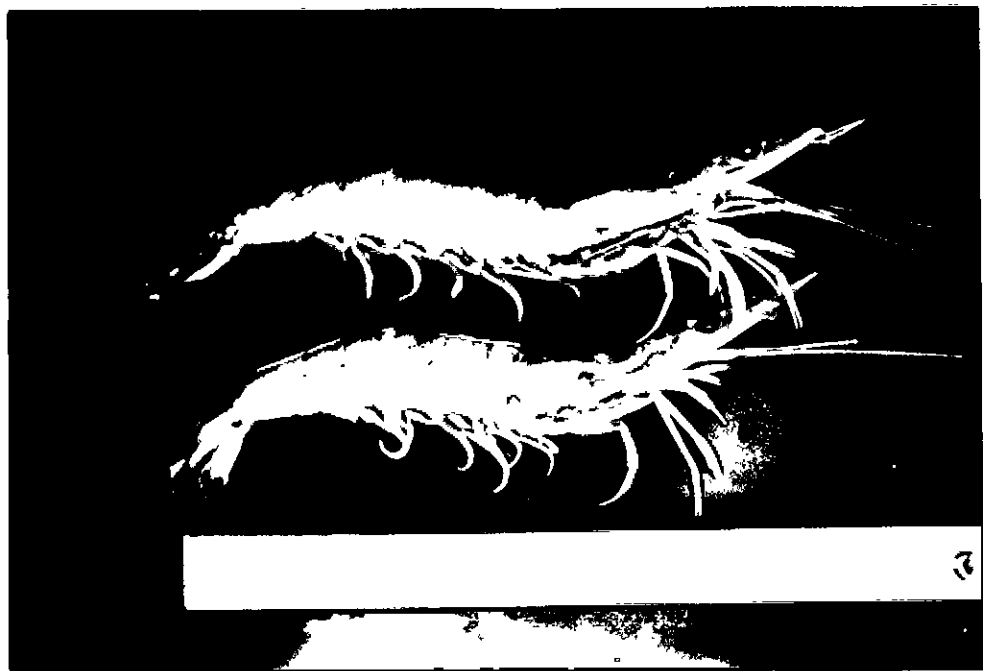


ภาพประกอบ 5 แสดงภาพกุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*)

รูปบน เพศเมีย รูปล่าง เพศผู้

กุ้งตะกาด (Greasy-back shrimp) *M. ensis*

กุ้งตะกาดชนิดนี้มีลักษณะจำเพาะดังนี้คือ กุ้งเรียวยาวเชิดขึ้นเล็กน้อย ด้านบนของกร้ามมีฟัน 8-10 ซี่ ด้านล่างเรียบ และสันที่อยู่จากกร้ามกรือจะเป็นสีขาวจรดขอบหลัง ทางในมีหนามมีสีฟ้าเขียวปนแดง ลำตัวยาวประมาณ 70-200 มิลลิเมตรมีสีเทาอ่อน มีจุดสีน้ำตาลกระจายอยู่ข้างตัว (กรมประมง. 2530)



ภาพประกอบ 6 แสดงภาพกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*)

รูปร่าง เพศเมีย รูปร่าง เพศผู้

การสะสมไข่แดงของรังไข่ (Vitellogenesis)

การสะสมไข่แดงของรังไข่ จะมีอยู่ 2 ระยะ เริ่มต้นจากการสร้างไข่ (oogenesis) จากโอโอโกเนีย (oogonia) ที่อยู่ในบริเวณตรงกลางของรังไข่ (germinative zone) โดยโอโอโกเนีย แต่ละเซลล์จะถูกล้อมรอบด้วยมีโซเดอรัลเซลล์ (mesodermal cell) และมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ผ่านระยะต่าง ๆ จนได้เซลล์ไข่ระยะแรก (primary

oocytes) ระยะต่อมาเป็นระยะก่อนมีการสะสมโปรตีนไข่แดง (pre-vitellogenesis) มีอัตราการสร้างไรโบโซม (ribosome) และ rough endoplasmic reticulum (RER) อัตราสูง ซึ่งจะพัฒนาเป็นเซลล์ในระยะแรกโดยจะเห็นนิวคลีโอลัส (nucleolus) ชัดเจน และมีเซลล์บางเซลล์เริ่มมี follicular cell ระยะแรกล้อมรอบ ระยะต่อมาจะเป็นระยะที่เซลล์ไข่ (oocytes) มีการสะสมไข่แดงโดยแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะการสะสมไข่แดงระยะแรก (primary vitellogenesis) พบว่ามี RER vesicle จำนวนมากและเต็มไปด้วยสารที่อยู่ภายในแกรนูล (granular material) ส่วนการสะสมไข่แดงระยะที่ 2 (secondary vitellogenesis) จะเกิดขึ้นในเวลาเดียวกันกับการเจริญเติบโตของไข่ภายในรังไข่จนกระทั่งมีขนาดใหญ่มาก เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของไข่เทสโทเจนีนมากขึ้น ซึ่งระยะนี้เซลล์ไข่จะถูกล้อมรอบด้วย follicular cells ระยะที่ 2 โดยจะมีท่อร่างแห (tubular network) เป็นเส้นทางลำเลียงไข่เทสโทเจนีนจากเลือดเข้ามายังเซลล์ไข่ จึงทำให้มีการสะสมไข่เทสโทเจนีนในเซลล์ไข่เพิ่มมากขึ้น (Charniaux-Cotton, 1985)

การศึกษครั้งนี้จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะต่อไข่เทสโทเจนีน ที่สกัดจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม แล้วใช้แอนติบอดีนี้ตรวจวัดระดับปริมาณของไข่เทสโทเจนีนในเลือดของกุ้งที่มีพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ทั้งนี้ก็เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไข่เทสโทเจนีนในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับพัฒนาวิธีทดสอบผลของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH) ในระหว่างการแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนกลุ่มนี้จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไข่เทสโทเจนีน (vitellin) ที่สกัดได้จากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)
2. เพื่อพัฒนาการตรวจหาและวัดปริมาณของไข่เทสโทเจนีน (vitellogenin) ในเลือดของกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณของไวเทรลเจนนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ของกึ่งกำมาราม

4. เพื่อศึกษาถึงผลของสารสกัดจากก้านตากุ้งต่อระดับของไวเทรลเจนนินในเลือดของกึ่งกำมาราม

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. สามารถผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรลเจนนินจากรังไข่ของกึ่งกำมารามได้
2. สามารถใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรลเจนนินในการตรวจหาปริมาณของไวเทรลเจนนินในเลือดของกึ่งกำมารามด้วยวิธีทาง enzyme immunoassay
3. ทราบถึงความสัมพันธ์ของระดับไวเทรลเจนนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่
4. เพื่อใช้เป็นวิธีตรวจสอบฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ เพื่อการแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของรังไข่ต่อไป

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. แยกสกัดไวเทรลเจนนินจากรังไข่ของกึ่งกำมาราม
2. ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทรลเจนนินจากรังไข่ของกึ่งกำมาราม
3. ตรวจสอบคุณภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน อิมมูโน-อีเล็กโตรเฟรสิส อิมมูโนไบโอดเคมีสทรี และ competitive ELISA
4. ตรวจวัดระดับของไวเทรลเจนนินในเลือดของกึ่งกำมาราม โดยวิธี competitive ELISA เปรียบกับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ
5. ตรวจหาผลของสารสกัดจากก้านตากุ้ง ซึ่งทำให้ระดับของไวเทรลเจนนินในเลือดของกึ่งกำมารามเปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลาต่าง ๆ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ไวเทลลิน หมายถึงบริเวณที่จำเพาะของไข่แดงที่พบอยู่ในรังไข่ของสัตว์ของสัตว์พวกครัสตาเซียน
2. ไวเทลโลเจนิน หมายถึงบริเวณที่จำเพาะสำหรับเพศเมีย โดยพบระดับสูงอยู่ในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียนเพศเมียที่รังไข่กำลังเจริญ ซึ่งจะมีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสตรีกคล้ายกับไวเทลลิน
3. ฮอรัณนัยยังการสะสมไข่แดงของรังไข่ หมายถึง ฮอรัณนัยที่เป็นตัวหลักในการควบคุมพัฒนาการ หรือการเจริญของรังไข่ซึ่งอยู่ในก้านตาของสัตว์พวกครัสตาเซียน

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

1. กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-40 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
2. กุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
3. กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
4. กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-25 กรัม และ กุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-25 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
5. หนูขาว (Swiss mouse) จากศูนย์สัตว์ทดลองสาละวิน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. เครื่องบดเนื้อเยื่อ (homogenizer, Janke & Kunkel) และหลอดแก้วบดเนื้อเยื่อ (glass homogenizer)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge, Beckman model J2-21)
4. เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
5. ตู้อบ (hot air oven, Memmert model 600)

6. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome, AO.) พร้อมแม่มีด
7. เครื่องวัดดูดกลืนแสง (spectrophotometer, Shimadzu UV-visible model UV-240)
8. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope)
9. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ
10. ตู้เย็นและ ultrafreezer (-20, -40, -70 องศาเซลเซียส)
11. เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (power supply)
12. Immunoelctrophoresis chamber (EP. chamber)
13. ELISA microtiter plate 96 หลุม (Maxisorp. Nunc 442404)
14. เครื่องอ่านค่า ELISA (Microplate reader, BIO-TEK instruments EL 312 e)
15. อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงกุ้ง
16. สไลด์แก้ว พร้อมอุปกรณ์ในการย้อมสีสไลด์
17. กระบอกฉีดยา (syringe) พร้อมเข็มฉีดยา
18. เครื่องมือสำหรับเจาะรูเจล (gel puncher)
19. Pasteur pipette และ pipette ขนาดต่าง ๆ
20. ภาชนะละลาย (dialysis tube)
21. หลอดปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube)
22. เครื่องชั่ง (balance)

สารเคมี

1. 70%, 90% และ 95% Ethyl alcohol
2. n-Butyl alcohol
3. Xylene (Merck)

4. Gelatin (Difco)
5. Paraplast (Oxford Labware)
6. Chrome alum (Chromium potassium sulfate)
7. 0.15 M Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2

(Hudson and Hay. 1976) (วิธีเตรียมจุลภาคผนวก)

8. น้ำเกลือสำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* isotonic-physiological saline, Nagamine and others. 1980) (วิธีเตรียมจุลภาคผนวก)

9. 0.5 mM EDTA (disodium ethylenediamine tetraacetic acid, Sigma)
10. Saturated ammonium sulfate- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
11. Complete Freund's adjuvant (Sigma)
12. Incomplete Freund's adjuvant (Sigma)
13. 1% Merthiolate (Sigma)
14. 1.2% Agar (Difco) ใน PBS
15. Staining solution (0.1% Coomassie blue R 250 (Sigma) ใน 10% acetic acid และ 50% Methanol)
16. 0.02% Eosin ใน 95% ethyl alcohol
17. 40% Formaldehyde
18. Picric acid (saturated aqueous solution)
19. Destaining solution
 - Destain I (50% methanol, 10% acetic acid)
 - Destain II (5% methanol, 7% acetic acid)
20. Bradford solution (Bradford. 1976) (วิธีเตรียมจุลภาคผนวก)
21. 25% Glutaraldehyde (Sigma)
22. 30% Hydrogenperoxide- H_2O_2 (Sigma)

23. Calf serum (Sigma)
24. 5% Blotto (5% Carnation non-fat dry milk, 0.1% triton X-100, 0.01% merthiolate ใน PBS) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
25. Goat antimouse IgG Heavy and Light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP, Biorad)
26. O-phenylenediamine-dihydrochloride-OPD (Sigma)
27. Diaminobenzidine-DAB (Sigma)
28. 0.1 M Citrate buffer pH 4.5 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
29. 1 N H₂SO₄
30. Borate buffered saline (0.05 M borate, 0.04 M NaCl, pH 8.6) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
31. Phenol red

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ (สรุปแผนผังการทดลองดังภาพประกอบ 7)

1. การเตรียมสารสกัดไอเทลลีนจากรังไข่ของกิ้งก่ามาราม
2. การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไอเทลลีนในหนูขาว
3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว
4. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการวัดปริมาณไอเทลลีนเจนน ด้วยวิธี competitive ELISA
5. การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณของไอเทลลีนเจนนในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ ของกิ้งก่ามารามตัวเมียหลังวางไข่ ในกึ่งปกติ (ไม่ตัดคา) และกึ่งที่ถูกตัดคา

6. การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

7. การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากก้านตาในการยับยั้งพัฒนาการของรังไข่

โดยตรวจสอบจากระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนิน

1. การเตรียมสารสกัดไวเทลลีนจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม

1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากรังไข่ (ovarian crude extract)

นำกุ้งก้ามกรามที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3 และที่ 4 (โดยสังเกตดูบริเวณส่วนหัวของกุ้งจะพบว่ารังไข่จะมีสีเหลืองส้ม) มาสลบในน้ำเย็นจัด จากนั้นผ่าตัดรังไข่ออกมาแช่แข็งทันทีบนน้ำแข็งแห้ง และเก็บรวบรวมไว้จนตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70°C องศาเซลเซียส นำรังไข่ที่ได้มาบดใน 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 ที่มี 0.5 mM EDTA ในอัตราส่วน รังไข่หนัก 1 กรัมต่อสารละลาย PBS 2 มิลลิลิตรด้วยเครื่อง homogenizer (Janke and Kunkel) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนที่เป็นไขมันและตะกอน (pellet) ทิ้งไป เก็บส่วนที่เป็นสารละลายสีส้มเข้ม (สารสกัดหยาบจากรังไข่) มาวัดปริมาตรที่ได้ และนำไปสกัดต่อในข้อ 1.2

1.2 การสกัดไวเทลลีนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

นำสารละลายสีส้มเข้มที่สกัดได้จากข้อ 1.1 มาตกตะกอนด้วย 45% ของสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที แยกส่วนที่เป็นสารละลายสีส้มใสไปตกตะกอนต่อด้วย 65% ของสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นอีกครั้งที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 40 นาที แยกส่วนที่เป็นตะกอนเก็บไว้ สำหรับส่วนที่เป็นสารละลายสีส้มใสนำไปปั่นซ้ำอีกครั้ง ทั้งนี้เพื่อแยกตะกอนที่หลงเหลืออยู่ออก แล้วละลายส่วนที่เป็นตะกอนที่ได้จากการปั่น 2-3 ครั้งมาละลายใน PBS และนำมาทำ dialysis ใน PBS 3 ครั้งนานเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งสารสกัดไวเทลลีนที่ได้เก็บไว้ในหลอดที่มีมาปิดหลอด

1 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

นำสารสกัดไวเทลลินที่ได้มาตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976) เทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) การตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford (1976) มีรายละเอียดดังนี้คือ

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (test tube) ปริมาตร 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วเติมน้ำกลั่น (double distilled water) ลงทุกหลอดจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลาย Bradford ลงไปในแต่ละหลอดปริมาณ 3 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 5-10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟเทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ใช้

ส่วนสารสกัดไวเทลลินที่ใช้ตรวจหาปริมาณโปรตีนจะทำเช่นเดียวกัน โดยนำสารสกัดไวเทลลินที่เจือจางอยู่ในช่วงเกี่ยวกับกราฟมาตรฐาน BSA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดไวเทลลินที่ได้

การเตรียมสารสกัดหยาบจากอัณฑะ (testis) ของกุ้งก้ามกรามและจากรังไข่ของกุ้งชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) และกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) เพื่อใช้ตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมต่อไวเทลลิน เตรียมตามวิธีในข้อ 1.1 และการเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งชนิดต่าง ๆ เพื่อการทดสอบปฏิกิริยาแอนติซีรัม เก็บโดยการใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 22-26 ถูดเลือดจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 หรือ คู่ที่ 5 เก็บไว้ในหลอดปิดฝา แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

2. การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินในหนูขาว (mouse antivitellin antiserum)

นำสารสกัดไวเทลลินที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ผสมกับ complete Freund's

adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 แล้วฉีดเข้าในช่องท้องของหนูขาวในปริมาณ 100-150 ไมโครลิตร (ประมาณ 3 มิลลิกรัม/ตัว) ค่อ 1 ตัว หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีก 2 ครั้งทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยการฉีดครั้งที่ 2 จะผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดครั้งที่ 3 หนูขาวไม่ต้องผสม adjuvant ในปริมาณเท่าเดิมกับการฉีดครั้งแรก หลังจากฉีดครั้งที่ 3 ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ เก็บรวบรวมซีรัมจากหนูโดยการเจาะเลือดทางเข้าตาใส่หลอดที่มีฝาปิด แล้วนำไปปั่นที่ 5,000 g เป็นเวลานาน 15 นาทีเพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม แบ่งเก็บซีรัมเป็นส่วน ๆ ในหลอดที่มีฝาปิด และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดลอง การเก็บเลือดครั้งต่อไปจะเก็บทุก ๆ 1-2 เดือน ซึ่งก่อนการเก็บเลือดจะฉีดสารสกัดจากข้อ 1.2 หนูขาวไม่ต้องผสม adjuvant 1 สัปดาห์ก่อนจะเก็บเลือด

3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว

3.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธี double immunodiffusion

เทร้น (agar) 1.2% ที่ละลายใน PBS ลงบนแผ่นสไลด์ปริมาณ 4.5-5.0 มิลลิลิตร จากนั้นปล่อยให้แห้งจนทั่วแล้ว เจาะรูเป็นหลุมตามแบบที่ต้องการ หยดแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบลงไปในหลุมกลางปริมาณ 10 ไมโครลิตร และหยดแอนติเจนชนิดต่าง ๆ คือสารสกัดหยาบจากรังไข่ของกุ้ง 5 ชนิดคือ กุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยน้ำจืด กุ้งฝอยน้ำเค็ม กุ้งตะกาด (*M. affinis*) และกุ้งตะกาด (*M. ensis*) หรือตัวอย่างเลือดตัวเมียของ กุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยน้ำจืด กุ้งฝอยน้ำเค็ม กุ้งตะกาด (*M. affinis*) และกุ้งตะกาด (*M. ensis*) หรือสารสกัดหยาบจากอวัยวะ และตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ที่ต้องการทดสอบลงในหลุมที่ล้อมรอบหลุมกลางนั้น ปริมาตรอย่างละ 10 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในกล่องขึ้นที่มีฝาปิดเป็นเวลานาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจดูผลโดยการดูลักษณะของแนวตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจน แล้วล้างบริเวณส่วนที่บ่มเกิดแนวตะกอนออก โดยแช่ในสารละลาย PBS หลาก ๆ ครั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปย้อมสี 0.1% Coomassie brilliant blue ที่ละลายใน 50% methanol และ 10% acetic acid เป็นเวลา

4-6 ชั่วโมง และล้างสีที่มัวต้องการออกด้วย destain I (50% methanol + 10% acetic acid) เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงและล้างครั้งที่ 2 ด้วย destain II (5% methanol + 7% acetic acid) จนกระทั่งน้ำใส และนำไปตากให้แห้งบนแผ่นสไลด์แห้ง

3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (immuno electrophoresis)

เทวุ้น 1.2% ที่ละลายใน borate buffered saline pH 8.6 ปริมาตร 4.5-5.0 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ หึ่งไว้ให้เย็นจนแห้งแล้ว เจาะรูน้ำให้เป็นหลุมกลม ๆ 2 หลุม และเป็นร่องตรงกลางสไลด์ ทูด่วนออกเฉพาะที่หลุมเท่านั้นหยดสารสกัดหยดจากรังไข่ และตัวอย่าง เลือดของกิ้งก่ามารามเพศเมียลงในหลุมแต่ละหลุม แล้วหยดสีฟีนอลเรด (phenol red) ลงไปหยดเล็ก ๆ เพื่อเป็นเครื่องหมายสำหรับการเคลื่อนที่ของโปรตีนลงในหลุมใดหลุมหนึ่ง หลังจากนั้นวางแผ่นสไลด์ลงบนอีเล็กโตรโฟรีซิสแชมเบอร์ (EP chamber) ที่มี borate buffered saline pH 8.6 ปลั๊กกระแสไฟจำนวน 10 มิลลิแอมป์ (10 mA) ต่อสไลด์ 1 แผ่นให้กระแสไฟฟ้าผ่านเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จนกระทั่งพบว่าสีฟีนอลเรดเคลื่อนที่เกือบถึงปลายสไลด์อีกด้านหนึ่ง จากนั้นนำสไลด์ออกจาก EP chamber ทูด่วนออกจากร่องตรงกลางสไลด์ แล้วเติมแอนติซีรั่มที่ต้องการทดสอบลงไปในรางนั้น นำเบมวี่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 48-72 ชั่วโมงในกล่องขึ้นที่ฉนวนปิด หลังจากนั้นดูแนวตะกอนที่เกิดขึ้นแล้วนำไปล้างด้วย PBS หลาย ๆ ครั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เพื่อล้างโปรตีนส่วนที่ใหม่เกิดแนวตะกอนออก นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสีตามขั้นตอนเหมือนกับการย้อมสีในข้อ 3.1

3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มโดยวิธี immunocytochemistry

ผ่าตัดรังไข่ของกิ้งก่ามารามระยะที่ 2 จากกึ่งที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยการสลบน้ำที่เย็นจัด แล้วทำให้รังไข่คงรูปด้วย Bouin's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างน้ำโดยการปล่อยให้น้ำไหลผ่านนาน 24 ชั่วโมง และดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยเริ่มจากความเข้มข้น 70%, 90% และ 95% ethyl alcohol และ n-butyl alcohol ตามลำดับ จากนั้นฝังรังไข่ในพาราพลาสต์ (paraplast) นำรังไข่มาตัดเป็น

ชิ้นบาง ๆ (section) ให้ความหนาขนาด 8 ไมโครเมตรด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) และนำเซกชันที่ได้มาเรียงติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วย gelatin หลังจากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาผ่านกระบวนการทางอิมมูโนไซโตเคมีสทรี (immunocytochemistry) ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase โดยเริ่มต้นจากนำสไลด์มาละลายพาราฟาสต์ออกด้วยไซลีน (xylene) ผ่านแอลกอฮอล์ไล่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจาก n-butyl alcohol, 95%, 90% และ 70% alcohol ตามลำดับ ผ่านน้ำกลั่นและล้างสุดท้ายล้างด้วย PBS จากนั้นหยดด้วย 10% calf serum ที่ละลายใน PBS ลงบนเซกชัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อป้องกันการจับตัวของโปรตีนแบบจำเพาะเนื้อเยื่อ จากนั้นหยด mouse anti-vitellin antiserum (ที่ได้จากข้อ 2) ที่มีความเจือจาง 1 ต่อ 4,000 ใน 10% calf serum ที่รวมกับเลือดของกิ้งก่ามาราเมเทศผู้ และสารสกัดหยาดจากตับ-ตับอ่อนของกิ้งก่ามาราเมเทศผู้ลงบนเนื้อเยื่อสลับกับหยด mouse anti-vitellin antiserum ดังกล่าวที่ถูกล้างเพิ่มเติมด้วยสารสกัดไข่เทลลิน (ความเข้มข้นของสารสกัดไข่เทลลิน 5 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) แล้วนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 4,000 เช่นกัน และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงในจานแก้วขึ้น ล้างด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที หลังจากนั้นหยด GAM-HRP (goat anti-mouse IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate) ที่เจือจาง 1 ต่อ 1,000 ใน 10% calf serum บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงในจานแก้วขึ้น และนำมาล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ผ่าน PBS ก่อนจุ่มลงในสารละลายซับสเตรท (substrate) ซึ่งประกอบด้วย 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2) ที่มี 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ที่ละลายใน PBS เป็นเวลานาน 5 นาทีจากนั้นดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน นำมาย้อมสีด้วย 0.02% eosin ที่ละลายในแอลกอฮอล์ 95% และทำเป็นสไลด์ถาวร (ขั้นตอนของปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 8)

3.4 การตรวจหาไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี ELISA

(indirect immunoperoxidase method)

การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติซีรัมทำใน Nunc Maxisorp microtiter

plate โดยใส่สารสกัดไวรัลจากข้อ 1.2 ที่มีความเข้มข้น 4 ไมครกรัมต่อมิลลิลิตรใน PBS ปริมาตร 50 ไมครลิตรต่อหลุมของ microtiter plate ใส่ทั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมงในกล่องขึ้นที่ปิด ทิ้งให้ไวรัลติดกับก้นหลุมของ plate จากนั้นเติม 0.2% glutaraldehyde ที่ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุมของ plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS ปริมาตร 150 ไมครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง 7 ละ 15 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วย 0.5% blotto ใน PBS ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติมแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวแต่ละตัวซึ่งเจือจางด้วย 5% blotto อัตราส่วน 1:2 ปริมาตร 50 ไมครลิตร ทำ serial dilution ใส่ทั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมงเหมือนกับครั้งแรก เมื่อได้เวลาบ่มออกมาล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง 7 ละ 15 นาที แล้วหยด GAM-HRP ที่เจือจาง 1:1000 ใน 5% blotto ที่ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมครลิตรต่อหลุมทุกหลุม ใส่ทั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมงเหมือนเช่นเดิม จากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง 7 ละ 15 นาที และครั้งสุดท้ายด้วยสารละลาย PBS เติมสารละลาย 0-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) ที่ละลายใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ในอัตราส่วน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มี 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2) ผสมอยู่ลงบ่หลุมละ 70 ไมครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1N sulphuric acid (H_2SO_4) ปริมาตร 70 ไมครลิตรต่อหลุมทันทีเมื่อครบเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader BIO-TEK instruments EL 312 e คำนวณหาไอเตอร์ของแอนติซีรัม (ขั้นตอนของปฏิกิริยา แสดงดังภาพประกอบ 9)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการวัดปริมาณไวรัลเจนนีด้วยวิธี

competitive ELISA

ใส่สารสกัดไวรัลจากข้อ 1.2 ความเข้มข้น 4 ไมครกรัมต่อมิลลิลิตรที่

ละลาย ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของภาค ELISA บนทั้ง 16 ที่อุณหภูมิตั้ง 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมงในกล่องขึ้นที่ปิดสนิท หลังจากนั้นล้างด้วย 0.2% glutaraldehyde และบล็อกด้วย 0.5% blotto ตามกระบวนการเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4 เติมนสารสกัดไวรัลที่เตรียมมาได้จากข้อ 1.2 ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำมาเจือจางให้อยู่ในช่วง 1:10 ไปจนถึง 1:2,500,000 ใน 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม หรือตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าเทศผู้ติดเชื้อเต็มวัย และตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าเทศเมียที่มีรังไข่เจริญระยะที่ 3-4 ของกิ้งก่ามารวมโดยตัวอย่างเลือดทั้ง 2 ชนิดนี้ นำมาเจือจางให้อยู่ในช่วง 1:10 ไปจนถึง 1:2,500,000 เช่นเดียวกัน จากนั้นเติมแอนติซีรัมต่อไวรัลที่เจือจาง 1:80,000 ใน 5% blotto ที่ละลายใน PBS (ซึ่งหาได้จากข้อ 3.4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบนทั้ง 16 ที่อุณหภูมิตั้ง 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผ่านชั้นคอนต่าง ๆ เหมือนข้อ 3.4 เขียนกราฟเปรียบเทียบระหว่างปริมาณไวรัลที่มาตรฐานกับปริมาณไวรัลที่เจือจางในตัวอย่างเลือดของกิ้งก่ามารวมเพศผู้และเพศเมีย (ชั้นคอนของปฏิกิริยาแสดงทั้งภาพประกอบ 10)

5. การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณของไวรัลที่เจือจางในการพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ของกิ้งก่ามารวมตัวเมียหลังวางไข่ในกึ่งปกติ (ไม่ตัดตา) และกึ่งที่ถูกตัดตา

นำกึ่งหลังวางไข่จำนวน 40 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่ตัดตาและกลุ่มที่ตัดตา เก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 50-100 ไมโครลิตรต่อตัวจากกึ่งทั้ง 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกที่ไม่ตัดตา เก็บตัวอย่างเลือดครั้งแรกหลังจากกึ่งวางไข่ได้ 4 วัน และครั้งต่อ ๆ ไปจะเก็บเลือดอีกจำนวน 11 ครั้งติดต่อกันทุก ๆ 2 วัน รวมเวลาได้ 26 วันหลังจากวางไข่ สำหรับกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ตัดตาจะเก็บตัวอย่างเลือดครั้งแรกหลังจากวางไข่ได้ 4 วันเหมือนกับกลุ่มแรก หลังจากนั้นจะตัดตา และครั้งต่อ ๆ ไปจะเก็บตัวอย่างเลือดเหมือนเช่นเดียวกับกลุ่มแรก การเก็บตัวอย่างเลือด ทำโดยเจาะเก็บเลือดจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 หรือคู่ที่ 5 ปริมาณ 50-100 ไมโครลิตร ใส่หลอดที่ปิดสนิทแล้วแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง จากนั้นเก็บรวบรวมไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิตั้ง -70 องศา-

เซลเซียสจนกว่าจะนำมาตรวจสอบ เมื่อเจาะเลือกครบกําหนดเวลาแล้ว นำกุ้งมาสลบในน้ำเย็นจัด เพื่อชั่งน้ำหนักตัว ฝาดัดรังไข่กับตัวอ่อนหน้าท้องออก และชั่งน้ำหนักรังไข่ ตัวอ่อนหน้าท้อง น้ำค่าที่ได้นำมาคำนวณหาดัชนีของรังไข่ (ovarian index-OI) แล้วบันทึกลักษณะสี และระยะการเจริญของรังไข่

น้ำหนักตัวสุทธิ = น้ำหนักตัวทั้งหมด - น้ำหนักตัวอ่อนหน้าท้อง

ดัชนีของรังไข่ = น้ำหนักของรังไข่ / น้ำหนักตัวสุทธิ x 100 เปอร์เซนต์

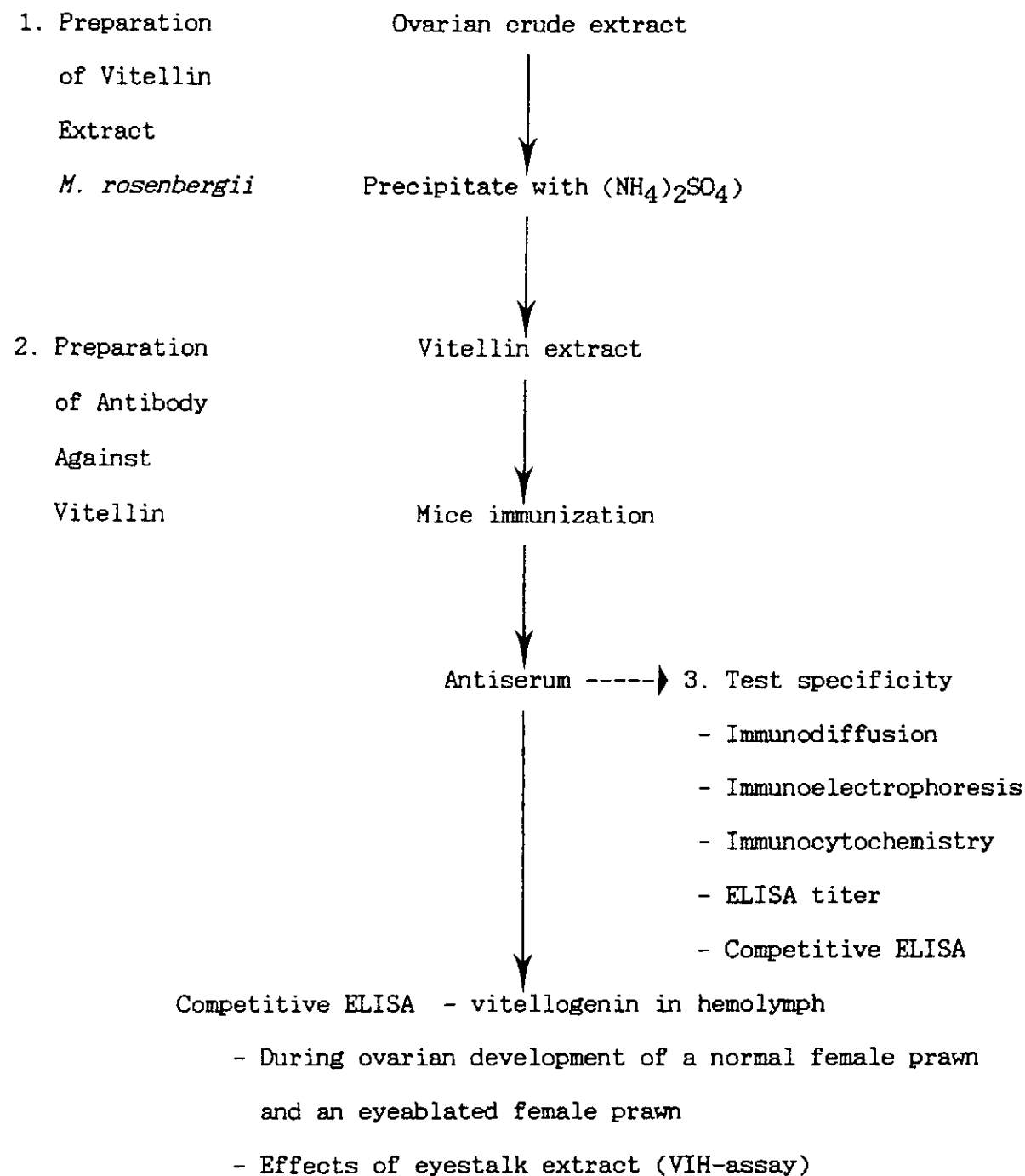
สำหรับตัวอย่างเลือดที่เก็บได้จะนำมาตรวจหาระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA เทียบกับสารสกัดไวเทลโลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเจือจาง 1:10 ถึง 1:2,500,000 เท่า คำนวณหาปริมาณของไวเทลโลเจนินในตัวอย่างเลือดของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม และเขียนกราฟเปรียบเทียบระดับปริมาณของไวเทลโลเจนิน

6. การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้ามตาของกุ้งก้ามกราม

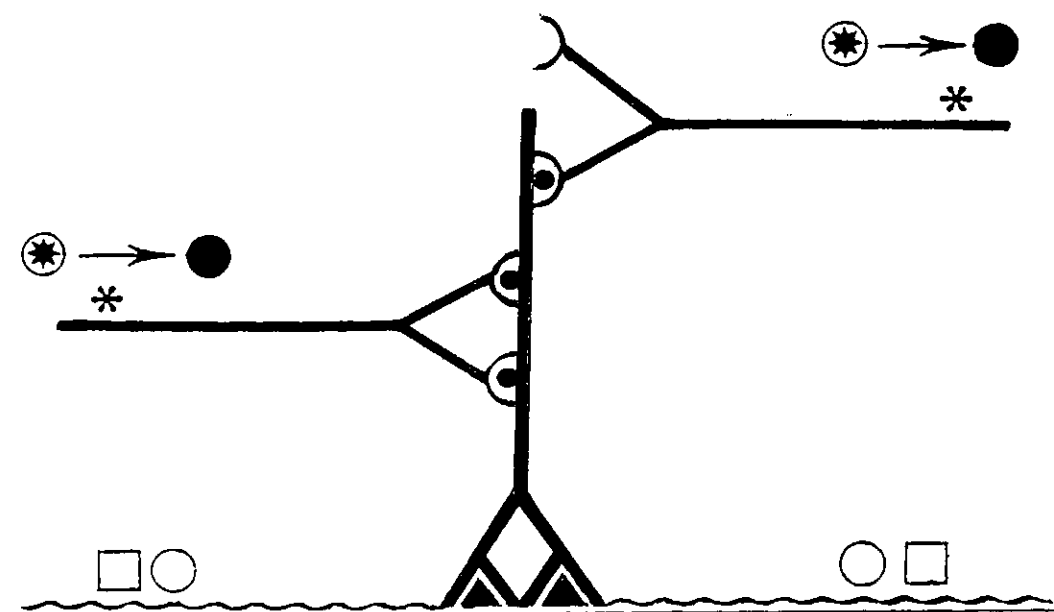
คัดก้ามตากุ้งก้ามกรามตัวเมีย โดยเลือกใช้ครกบดบริเวณโคนของก้ามตากุ้งที่ยังมีชีวิต อยู่แช่แข็งทันทีในน้ำแข็งแห้ง รวบรวมเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำก้ามตาที่คัดได้จำนวน 250 ก้ามตามาฝาดัดเปลือกหุ้มตาออก แล้วนำมาบดในหลอดแก้วบด (glass homogenizer) ในน้ำเกลือสำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*-isotonic physiological saline pH 7.6) ในอัตราส่วน 1 ก้ามตาต่อสารละลายน้ำเกลือ 50 ไมครอลิตร และนำไปปั่นด้วยความเร็วที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำใสเก็บไว้ แล้วสกัดส่วนที่เป็นตะกอนซ้ำด้วยสารละลายน้ำเกลือ และนำไปปั่นเช่นเดียวกันกับตอนแรก แยกส่วนน้ำใสที่ได้มารวมกับส่วนแรกด้วยความเข้มข้นให้เท่ากับ 10 ก้ามตา/มิลลิลิตร และแบ่งออกเป็นส่วยย่อย ๆ ใสหลอดขนาดเล็กที่มีฝาปิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

7. การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากก้านตาในการยับยั้งพัฒนาการของรังไข่โดยตรวจสอบจากระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณวitellogenin

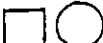
นำกุ้งหลังจากวางไข่ได้ 4 วันมาคัดตางานวน 40 ตัว จากนั้นเลี้ยงต่อไปอีกประมาณ 7 วันแล้วแบ่งกุ้งออกเป็น 2 กลุ่มเท่า ๆ กัน เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตรต่อตัว หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดครั้งแรกเสร็จแล้ว กลุ่มที่ 1 ฉีดสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) จากข้อ 6 ในอัตราส่วน 1 ตาต่อตัว ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว แล้วทิ้งระยะไว้นาน 12 ชั่วโมงจึงเก็บตัวอย่างเลือดอีกครั้ง และฉีดสารสกัดจากก้านตาอีกครั้ง ในปริมาณเท่าเดิม จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือด 4 ครั้งทุก ๆ 4 ชั่วโมง และเก็บอีก 2 ครั้งทุก 8 ชั่วโมง สำหรับกุ้งในกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดน้ำเกลือปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว การฉีดและการเก็บตัวอย่างเลือดทำเหมือนกับกลุ่มที่ 1 หลังการเก็บตัวอย่างเลือดครั้งสุดท้ายจะนำกุ้งมาสลับในน้ำเย็นจัด ชั่งน้ำหนักตัว ผ่าตัด ชั่งน้ำหนักตัวอ่อนที่ติดหน้าท้องและรังไข่ คำนวณหาดัชนีของรังไข่ ตรวจหาปริมาณของวitellogeninในตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ในแต่ละตัวของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม โดยวิธี competitive ELISA เช่นเดียวกับข้อ 5

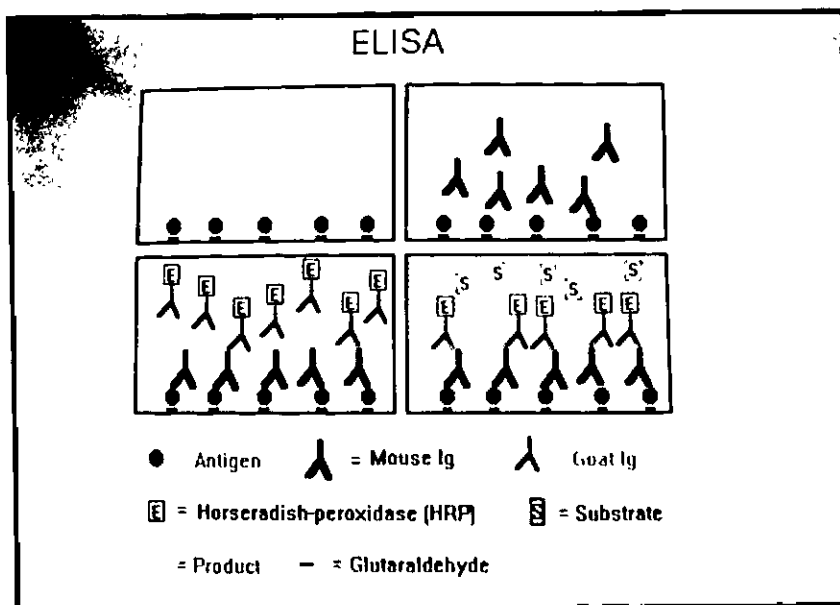


ภาพประกอบ 7 แสดงขั้นตอนการผลิต และทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลิจีนจากกุ้ง
เพื่อใช้ในการตรวจวัดระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกราม โดยวิธี
competitive ELISA

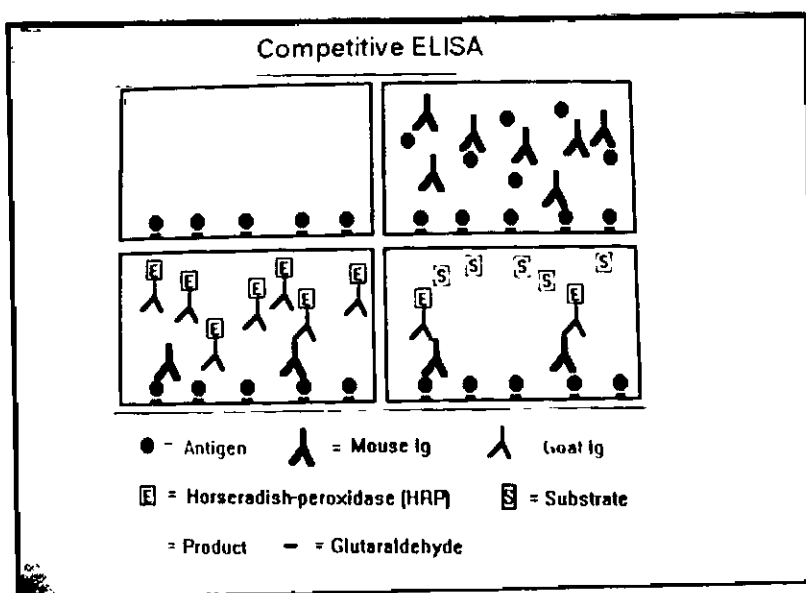


ภาพประกอบ 8 แสดงปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยวิธีอิมมูโนเพอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method) (สนิสา แสงมงคลพิพัฒน์. 2535)

-  mouse immunoglobulin
-  Goat immunoglobulin
-  Horseradish peroxidase
-  Antigen
-  Substrate (Hydrogenperoxide & DAB)
-  Product (Red-Brown precipitation)



ภาพประกอบ 9 แสดงหลักการของ ELISA (indirect immunoperoxidase method) เพื่อตรวจหาแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase ติดกับแอนติบอดีตัวที่ 2 (enzyme-labelled secondary antibody)



ภาพประกอบ 10 แสดงหลักการของ competitive ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจน โดยใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase ติดกับแอนติบอดีตัวที่ 2

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้ในหนูขาว (mouse anti-vitellin antiserum)

1.1 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion)

จากการนำแอนติซีรัมที่ได้จากการปลูกภูมิคุ้มกัน (immunize) ในหนูขาว มาทำปฏิกิริยาคอกเคกอนในวุ้นกับแอนติเจนที่ได้จากสารสกัดชนิดต่าง ๆ คือ สารสกัดหยาบจากรังไข่ของกุ้งชนิดต่าง ๆ หรือจากตัวอย่างเลือดของกุ้งตัวเมีย ได้แก่ กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) กุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) และสารสกัดหยาบจากอวัยวะ หรือจากตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ พบว่าแอนติซีรัมที่ได้จากการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูทั้ง 9 ตัวด้วยสารสกัดไข่เหลืองจากรังไข่ของกุ้งก้ามกรามนั้น แอนติซีรัมจากหนูเพียง 5 ตัวให้แนวตะกอนชัดเจน การทดสอบครั้งนี้จึงเลือกใช้เฉพาะแอนติซีรัมจากหนู 5 ตัวนี้เท่านั้น ซึ่งจะให้แนวตะกอนหลัก เชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ระหว่างแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ หรือจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยน้ำจืด (ภาพประกอบ 11.1) และให้แนวตะกอนเชื่อมต่อกันเพียงบางส่วนระหว่างแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ หรือจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยน้ำเค็ม (ภาพประกอบ 11.1) แต่นำให้แนวตะกอนกับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ และจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งตะกาด (*M. affinis*) กุ้งตะกาด (*M. ensis*) รวมทั้งสารสกัดจากอวัยวะและจากตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ (ภาพประกอบ-11.1) นอกจากแนวตะกอนหลักแล้วแอนติซีรัมนี้ยังให้แนวตะกอนเล็ก ๆ บาง ๆ กับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยน้ำจืด และจากสารสกัดจากอวัยวะของกุ้งก้ามกราม

(ภาพประกอบ 11.1) หรือจากตัวอย่างเลือกของกุ้งก้ามกรามเพศเมีย เพศผู้ และกุ้งฝอยน้ำจืดเพศเมีย (ภาพประกอบ 11.1)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นความคล้ายคลึงกันระหว่างแอนติเจนในสารสกัดจากรังไข่หรือในตัวอย่างเลือกเพศเมียของกุ้งทั้งสองชนิดคือ กุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยน้ำจืด ซึ่งแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อวitelลินนั้นให้แนวตะกอนหลัก เชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ (ภาพประกอบ 11.1) ในขณะที่แนวตะกอนที่เกิดขึ้นจากแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ หรือจากตัวอย่างเลือกของกุ้งฝอยน้ำจืด เชื่อมต่อกันเพียงบางส่วนกับแนวตะกอนที่เกิดขึ้นจากแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ หรือในเลือกของกุ้งก้ามกราม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติเจนจากกุ้งฝอยน้ำจืดมีความคล้ายคลึงเพียงบางส่วนกับแอนติเจนจากกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยน้ำจืด (ภาพประกอบ 11.1) แอนติซีรัมนี้ทำให้เกิดแนวตะกอนกับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่หรือจากตัวอย่างเลือกเพศเมียของกุ้งตะกาด 2 ชนิด (*M. affinis* และ *M. ensis*) ซึ่งแสดงว่าวitelลินในกุ้งทะเล (วงศ์ *Panaeidae*) มีลักษณะแตกต่างจากวitelลินของกุ้งในวงศ์ *Palaemonidae* อย่างมาก และแอนติซีรัมนี้ทำให้เกิดแนวตะกอนกับสารสกัดจากอัลฟะ และตัวอย่างเลือกกุ้งก้ามกรามเพศผู้ เป็นการยืนยันว่าในกุ้งเพศผู้มีการสร้างวitel-ลเจนิเนและวitelลิน (ภาพประกอบ 11.1)

เมื่อถูกชั้นแอนติซีรัมนี้ด้วยตัวอย่างเลือกเพศผู้หรือสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามตัวผู้ พบว่าแนวตะกอนเล็ก ๆ บาง ๆ จะหายไป (ภาพประกอบ 11.2 และ ภาพประกอบ 11.3) และจากการเปรียบเทียบแบบแผนของแนวตะกอนที่เกิดขึ้นจากแอนติซีรัมที่ถูกชั้นด้วยเลือดจะดีกว่าถูกชั้นด้วยสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกราม เพราะว่าให้แนวตะกอนที่ชัดเจนกว่า (ภาพประกอบ 11.2 และ ภาพประกอบ 11.3)

1.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรเฟรีซิส

จากการนำแอนติซีรัมที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีคัมเบลอิมมูโนดิฟฟิวชันมาทดสอบต่อโดยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรเฟรีซิส พบว่าจะให้ผลคล้ายกัน คือ แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อวitelลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกรามจะให้แนวตะกอนหลัก 1 แนวเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ และตัวอย่างเลือกเพศเมียของกุ้งก้ามกราม ซึ่งแนวตะกอนหลักนี้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน (ภาพ-

ประกอบ 12.1) ในขณะที่มีแนวตะกอนเพิ่มขึ้นอีก 4 แนวในสารสกัดจากรังไข่และมีแนวตะกอนบาง ๆ เล็ก ๆ เพิ่มขึ้นอีก 1 แนวในตัวอย่างเลือด (ภาพประกอบ 12.1)

เมื่อถูกชั้นแอนติซีรัมนี้ด้วยตัวอย่างเลือดเพศผู้ และสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อน พบว่าแนวตะกอนที่เพิ่มขึ้นในสารสกัดจากรังไข่นั้นจะหยาบ เหลือเพียงแนวตะกอนหลักและแนวตะกอนบาง ๆ 1 แนว เหมือนกับแนวตะกอนที่พบในเลือดกุ้งเพศเมีย (↑ในภาพประกอบ 12.2 และ ↑ในภาพประกอบ 12.3)

1.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี

การทดสอบวิธีนี้เป็นการทดสอบเพื่อตรวจการจับของแอนติบอดีกับไวเทลลินภายในเซลล์ไข่ของกุ้งก้ามกรามโดยวิธี indirect immunoperoxidase method ซึ่งจากการใช้เซลล์จากรังไข่ของกุ้งก้ามกรามทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินถูกจับด้วยตัวอย่างเลือดเพศผู้ รวมกับสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ พบว่าตำแหน่งที่มีไวเทลลินสะสมอยู่ในเซลล์ไข่ตั้งแต่ระยะที่ 1 (primary vitellogenesis oocyte) ขึ้นไป (ภาพประกอบ 13.1 และ 14.1) แต่จะไม่มีปฏิกิริยาของแอนติซีรัมใน oogonia และ primary oocyte ซึ่งเป็นระยะของเซลล์ไข่ที่ยังไม่มีการสร้างหรือสะสมไวเทลลินในเซลล์

เมื่อใช้แอนติซีรัมที่ถูกจับด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ของรังไข่ที่อยู่ถัดไป พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดจากแอนติซีรัมจำเพาะต่อไวเทลลินในเซลล์ไข่หยาบทั้งหมด (ภาพประกอบ 13.2 และ 14.2) แสดงว่าสารสกัดจากรังไข่สามารถจับแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลลินออกทั้งหมด ดังนั้นปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อเซลล์ไข่ระยะตั้งแต่ ระยะที่มีการสะสมไข่แดงระยะที่ 1 เป็นต้นไป เกิดเนื่องจากการจับตัวอย่างจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลลินกับไวเทลลินในเซลล์ไข่

1.4 การตรวจหาคุณภาพของแอนติซีรัมโดยวิธี ELISA (indirect immunoperoxidase method)

การทดสอบวิธีนี้เป็นการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมจำเพาะต่อไวเทลลินโดยวิธี ELISA พบว่า mouse anti-vitellin antiserum ที่ได้จากหนูทั้ง 9 ตัว ซึ่งปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ ซีรัมจากหนู 5 ตัว มีค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมใกล้เคียงกัน

คือสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสเอดส์ในซีรัมที่เจือจางสูงสุดที่ตรวจพบได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ 0.1 เมื่อเจือจางแอนติซีรัม 10-20 ล้านเท่า และแอนติซีรัมจากหนูเหล่านี้ให้ผลจากการทดสอบด้วยวิธีอิมมูโนคิพิวชันคล้ายคลึงกัน จึงนำมาผสมรวมกันเพื่อใช้ในการทดสอบต่อใบส่วนหนูที่เหลืออีก 4 ตัวนั้น ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 0.1 เมื่อเจือจางน้อยกว่าประมาณ 2.5 ล้านเท่า จึงนำมาใช้ในการทดลอง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการวัดปริมาณของไวรัสเอดส์ในวิธี competitive ELISA

จากการใช้สารสกัดไวรัสเอดส์แทนที่การจับของแอนติบอดีกับไวรัสเอดส์ที่ติดอยู่บนภาค ELISA พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารสกัดไวรัสเอดส์ที่ให้การตอบสนองอยู่ในช่วง 100 นาโนกรัม ถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงนี้เป็นช่วงความเข้มข้นที่สามารถวัดปริมาณไวรัสเอดส์ได้แม่นยำกว่าช่วงที่สูงหรือต่ำกว่านี้ และจากการทดสอบโดยการเพิ่มสารสกัดไวรัสเอดส์มาตรฐานจากรังไข่หรือตัวอย่างเลือดเพศเมีย หรือตัวอย่างเลือดเพศผู้ของกึ่งกำมารามในความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวรัสเอดส์ และโดยไวรัสเอดส์ที่ตรึงอยู่บนภาค ELISA (ภาพประกอบ 10) ตัวอย่างเลือดของกึ่งกำมารามเพศเมียที่ระดับความเข้มข้นสูงจะสามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ติดอยู่บนภาค ELISA ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนตัวอย่างเลือดของกึ่งกำมารามเพศผู้นั้นพบว่าจะมีผลต่อการจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนบนภาค ELISA น้อยกว่าจะใช้เลือดที่ระดับความเข้มข้นสูงเท่าไรก็ตาม (ภาพประกอบ 15) แสดงให้เห็นถึงลักษณะทางอิมมูโนเคมีสทรีของไวรัสเอดส์ในรังไข่กับไวรัสเอดส์ในเลือดกึ่งเพศเมียมีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นแอนติซีรัมนี้จึงสามารถใช้ในการตรวจวัดระดับปริมาณของไวรัสเอดส์ในเลือดของกึ่งกำมารามเพศเมีย โดยเทียบกับปริมาณไวรัสเอดส์มาตรฐานได้

3. การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณของไวรัสเอดส์ในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ของกึ่งกำมารามหลังวางไข่ในกึ่งปกติ (ไม่ตัดตา) และกึ่งที่ตัดตาทั้งสองข้าง

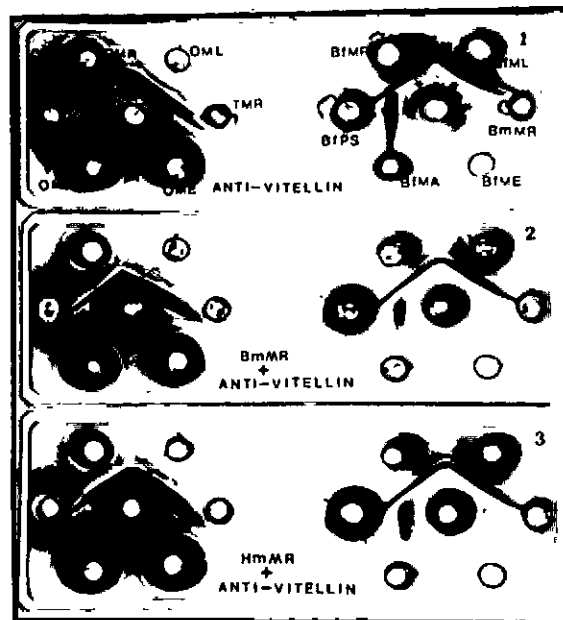
จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดของกิ้งก่ามกราคมเพศเมียจากกลุ่มปกติ และกลุ่มที่ตัดตามาตรวจหาระดับปริมาณของไวเทสโรเจนิน โดยวิธี competitive ELISA พบว่าในกลุ่มของกิ้งก่าหลังจากวางไข่ได้ 4-10 วัน ปริมาณของไวเทสโรเจนินจะอยู่ในระดับต่ำและค่อนข้างคงที่ (น้อยกว่า 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนในช่วงหลังวางไข่ 12-26 วัน ระดับปริมาณของไวเทสโรเจนินมีอัตราการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ภาพประกอบ 16, ตาราง 1) ค่าดัชนีของรังไข่อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งการเจริญของรังไข่อยู่ในระยะที่ 1 และเริ่มต้นของระยะที่ 2 เท่านั้น

สำหรับกิ้งก่ากลุ่มที่ตัดตาหลังจากวางไข่ 4 วัน พบว่าปริมาณของไวเทสโรเจนินเริ่มต้นจะอยู่ในระดับต่ำ มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับกิ้งก่ากลุ่มแรก คือเท่ากับ 0.215 ± 0.133 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นปริมาณของไวเทสโรเจนินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.374 ± 2.611 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหลังจากวางไข่ 18 วัน หลังจากนั้นก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว กิ้งก่าจะลอกคราบในวันที่ 23-24 และวางไข่ครั้งต่อไป (ภาพประกอบ 16, ตาราง 2) เป็นที่น่าสังเกตว่ากิ้งก่าที่ตัดตาออกทั้งสองข้างนั้น ระดับปริมาณของไวเทสโรเจนินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีความแปรปรวนสูงกว่ากิ้งก่าปกติหลังจากวางไข่ เนื่องจากอัตราการเพิ่มขึ้นของไวเทสโรเจนินกิ้งก่าแต่ละตัวมีอัตราต่างกัน (ตาราง 2)

4. การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากก้านตาในการยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ โดยตรวจดูจากระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทสโรเจนิน

จากการตรวจวัดปริมาณของไวเทสโรเจนินในเลือดโดยวิธี competitive ELISA จากตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าเพศเมียที่ตัดตาออกทั้งสองข้างหลังจากวางไข่ 4 วัน พบว่าในกลุ่มที่ฉีดด้วยน้ำเกลือหลังจากตัดตาได้ 7 วัน ปริมาณของไวเทสโรเจนินเริ่มต้น (ที่เวลา 0 ชั่วโมง) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.356 ± 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 3) และเมื่อฉีดด้วยน้ำเกลือในปริมาณ 100 ไมโครลิตร/ตัว 2 ครั้ง พบว่าปริมาณไวเทสโรเจนินในเลือดยังคงเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง (ภาพประกอบ 17, ตาราง 3)

ส่วนในกลุ่มที่ฉีดสารสกัดจากก้านตาหลังจากวางไข่ 11 วัน พบว่าปริมาณของไวเทรลเจนนินในเลือดเมื่อเริ่มทดลอง (ที่ 0 ชั่วโมง) มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับไวเทรลเจนนินของกุ้งกลุ่มแรก คือเท่ากับ 4.748 ± 1.067 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4) เมื่อฉีดสารสกัดจากก้านตาในปริมาณ 1 ก้านตา/ตัว/ครั้ง และเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากฉีดสารสกัด 12 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของไวเทรลเจนนินลดลงจากระดับเริ่มต้นประมาณ 0.584 ± 0.855 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง-4) หลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาครั้งที่ 2 ในปริมาณเท่าเดิม พบว่าปริมาณไวเทรลเจนนินในเลือดจะลดลงถึงระดับต่ำสุดประมาณชั่วโมงที่ 28 ลดลงประมาณ 2.412 ± 1.245 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่เริ่มต้น และหลังจากนั้นระดับไวเทรลเจนนินจะเพิ่มสูงขึ้นจนมีระดับใกล้เคียงกับระดับไวเทรลเจนนินเมื่อเริ่มทำการทดลอง (ภาพประกอบ 17, ตาราง 4)



ภาพประกอบ 11 แสดงดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion) ระหว่างแอนติซีรัม (หลุมกลาง) กับแอนติเจนต่าง ๆ

11.1 anti-vitellin antiserum

11.2 anti-vitellin antiserum ถูกจับด้วยเลือดกุ้งเพศผู้

11.3 anti-vitellin antiserum ถูกจับด้วยสารสกัดจากตับ-คั่นอ่อนของกุ้งเพศผู้

OMR สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

OML สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*)

TMR สารสกัดจากอวัยวะของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

OME สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งทะเล (*Metapenaeus ensis*)

OMA สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งทะเล (*Metapenaeus affinis*)

OPS สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*)

BfMR เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

BfML เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*)

BmMR เลือดจากกุ้งเพศผู้ของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

HmMR สารสกัดจากตับ-คั่นอ่อนจากกุ้งเพศผู้ของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

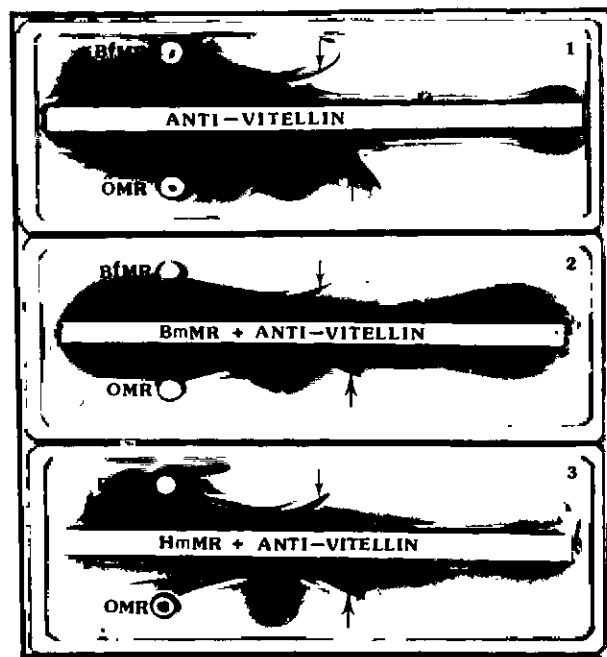
BfME เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งทะเล (*M. ensis*)

BfMA เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งทะเล (*M. affinis*)

BfPS เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*)

สูตร แสดงแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับบรตินชนิดอื่น ๆ จากรังไข่และสารสกัดจากอวัยวะ

* แสดงแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับบรตินชนิดอื่น ๆ ในเลือด



ภาพประกอบ 12 แสดงอิเล็กโตรโฟรีซิส (immuno-electrophoresis) ของแอนติซีรัม (นรอง) กับตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าเหี้ย (BmMR) และสารสกัดจากรังไข่ (OMR) ของกิ้งก่ามกราคม

12.1 Anti-vitellin antiserum

12.2 Anti-vitellin antiserum ถูกจับด้วยเลือดกิ้งก่าเหี้ย

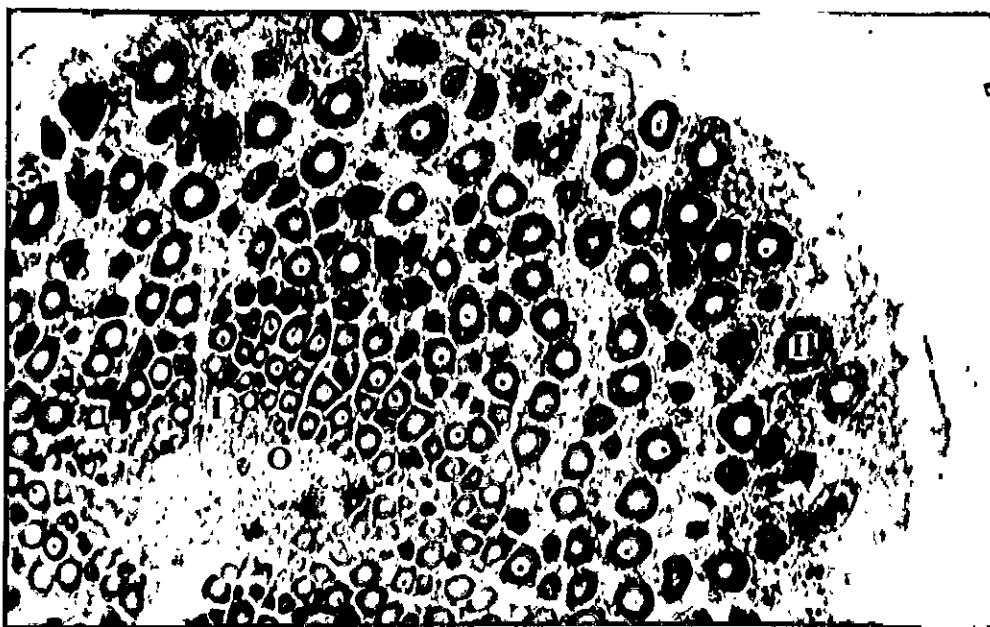
12.3 Anti-vitellin antiserum ถูกจับด้วยสารสกัดหยาบจากตับ-คันท่อนของกิ้งก่าเหี้ย

BmMR เลือดจากกิ้งก่าเหี้ยของกิ้งก่ามกราคม (*M. rosenbergii*)

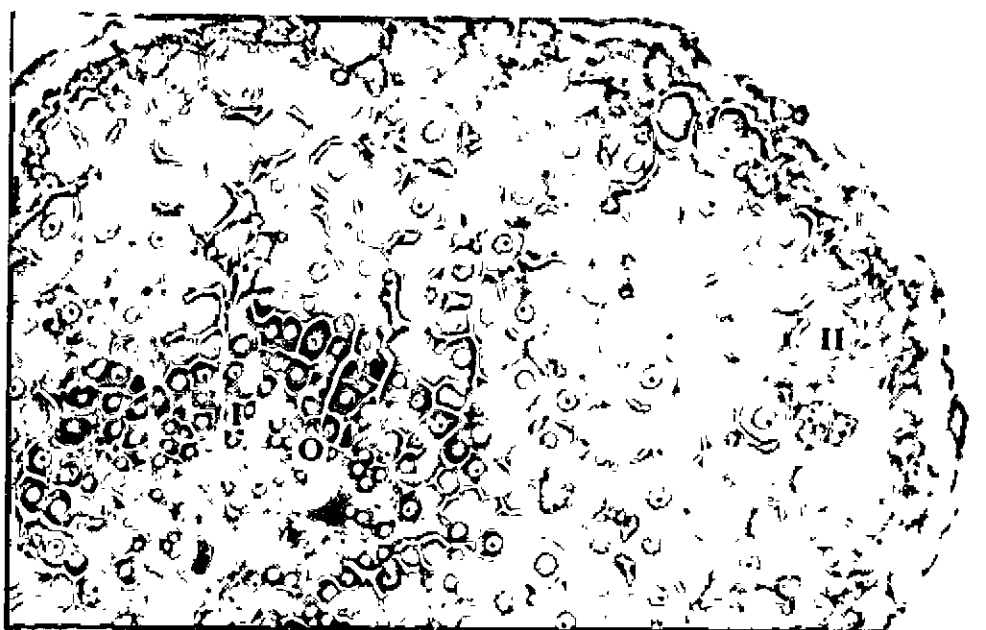
HmMR สารสกัดหยาบจากตับ-คันท่อนจากกิ้งก่าเหี้ยของกิ้งก่ามกราคม (*M. rosenbergii*)

ลูกศร แสดงแนวตะกอนหลักที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับโปรตีนจากรังไข่

และกับโปรตีนเจนนินในเลือดของกิ้งก่ามกราคมเหี้ย



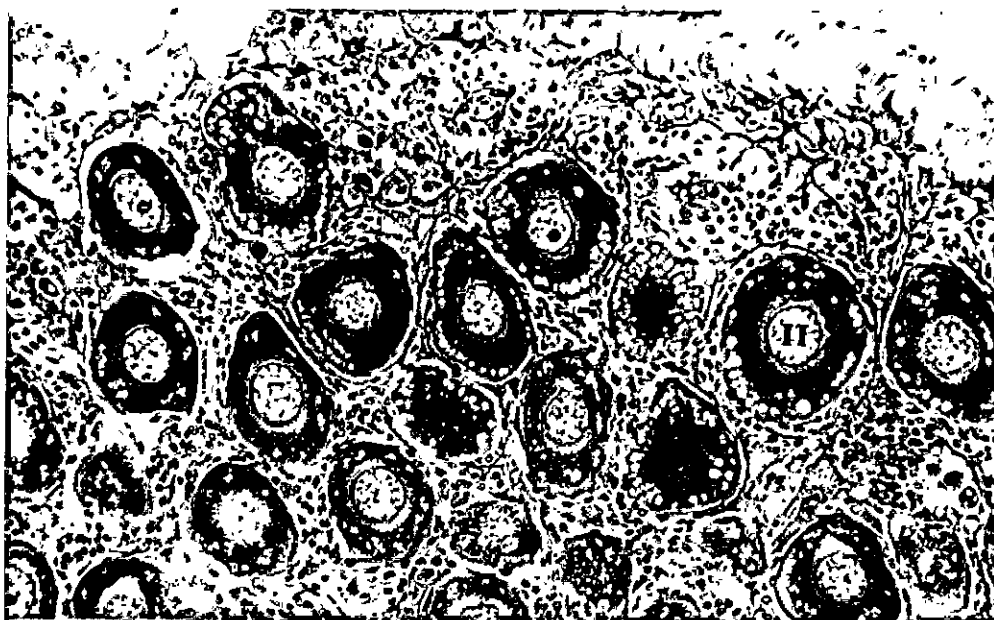
13.1 Anti-vitellin antiserum เจือจาง 1 : 4,000



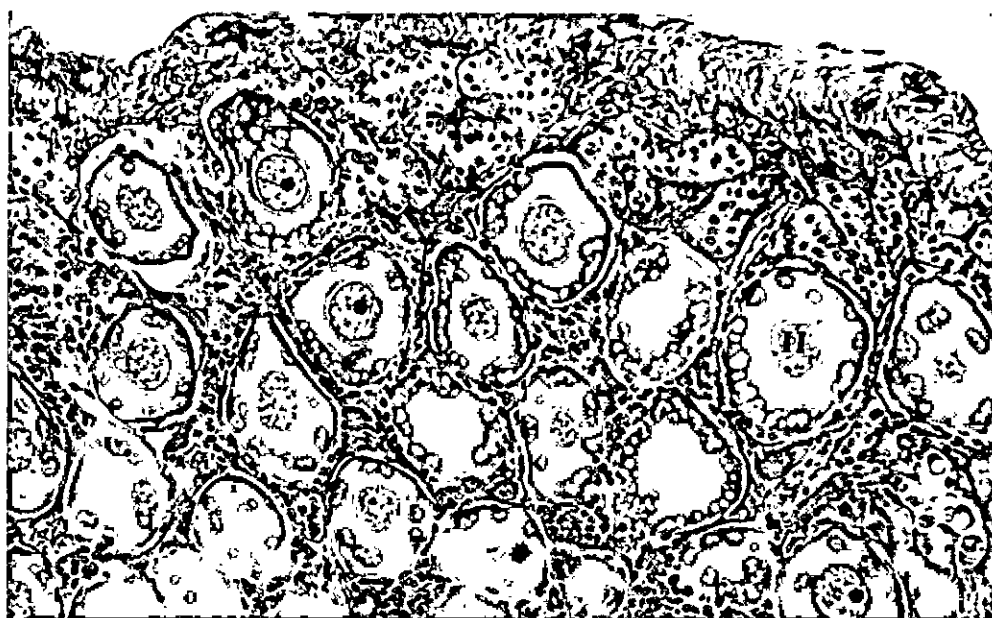
13.2 Anti-vitellin antiserum เจือจาง 1 : 4,000

ดูดซับด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่

ภาพประกอบ 13 ภาพทาลึงขยายตัวของเซลล์ภายในรังไข่ระยะที่ 2 ของกึ่งกำกรามที่เชื่อมด้วย
แอนติไวเทลลิน (anti-vitellin) โดยวิธีอินไดเรกต์อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect
immunoperoxidase method) (O = Oogonia , I = Primary oocyte
II = Secondary oocyte)



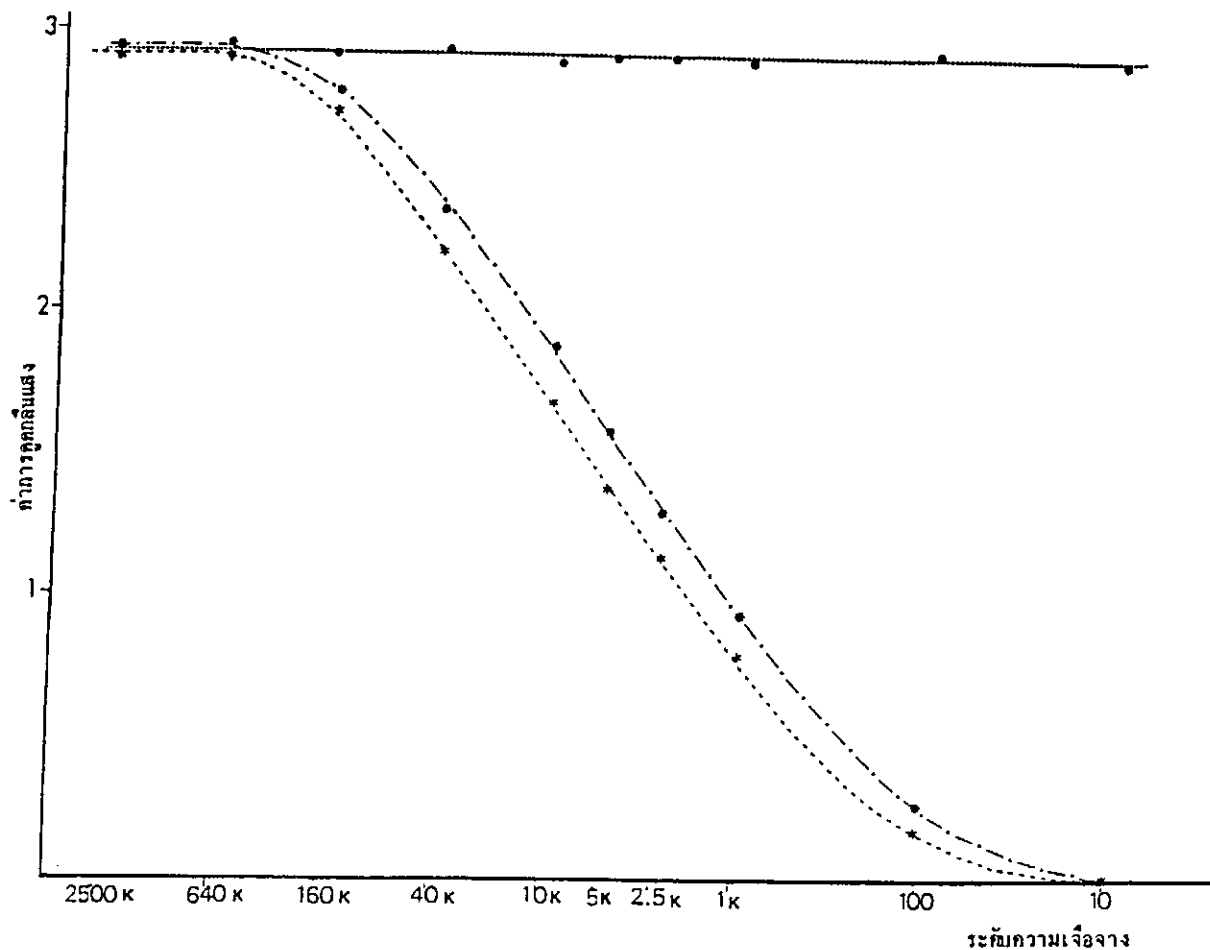
14.1 Anti-vitellin antiserum เจือจาง 1 : 4,000



14.2 Anti-vitellin antiserum เจือจาง 1 : 4,000

ดูดซับด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่

ภาพประกอบ 14 ภาพาลังขยายสูงของเซลล์ภายในรังไข่ระยะที่ 2 ของกึ่งกำภรามที่เชื่อมด้วยแอนติไวเทลลิน (anti-vitellin) โดยวิธีอีนโดเรคติมูโนเปอร์ออกซิเคส (indirect immunoperoxidase method)



ภาพประกอบ 15 แสดง competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและตัวอย่างเลือด

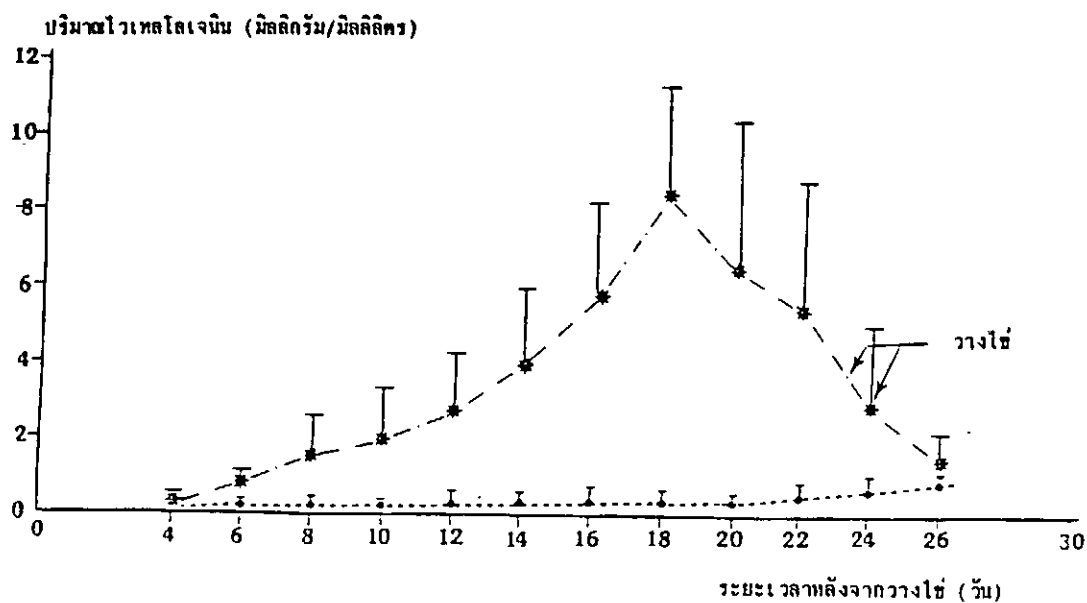
กึ่งก้ามภราม (*M. rosenbergii*) เพศเมียและเพศผู้ที่ระดับเจือจางต่าง ๆ

โดยใช้ mouse anti-vitellin antiserum ที่เจือจาง 1 : 80,000

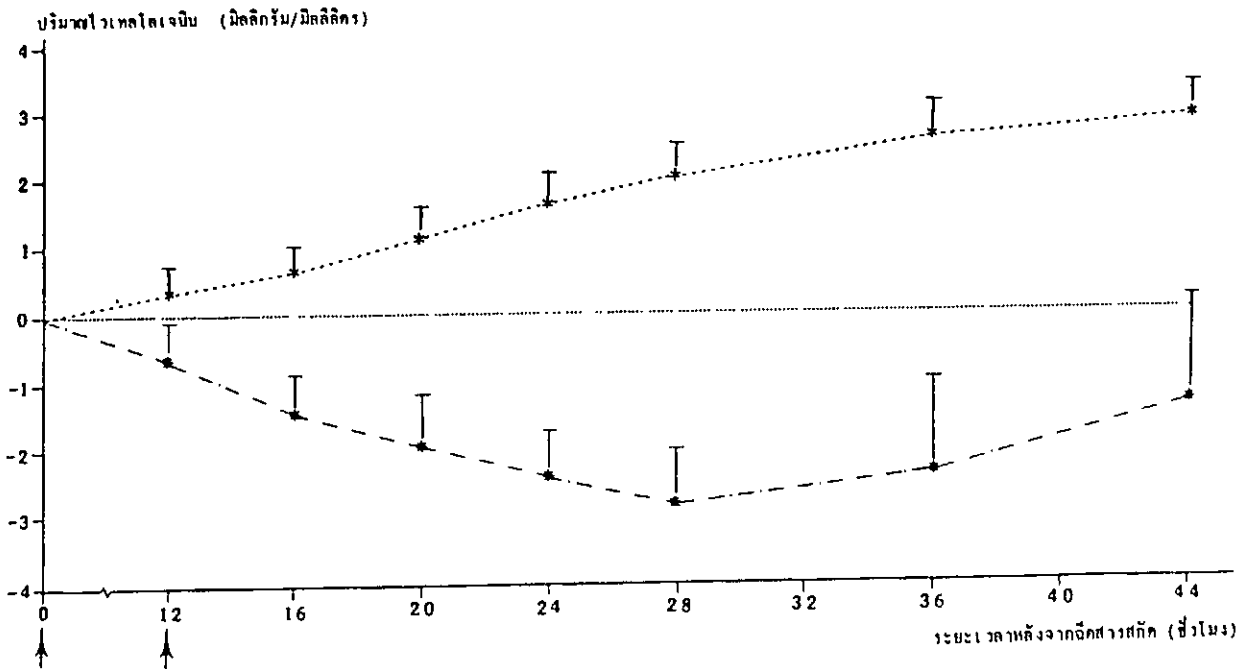
----- ไวเทลลินมาตรฐาน ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

--- ตัวอย่างเลือดกึ่งก้ามภรามเพศเมียที่รังไข่กำลังเจริญ

●.....● ตัวอย่างเลือดกึ่งก้ามภรามเพศผู้



ภาพประกอบ 16 แสดงปริมาณของโพรแลกติน (ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD))
 ในเลือดของกิ้งก่ามารมระยะหลังจากวางไข่ กลุ่มปกติ (●-----●) ($n=15$)
 และกลุ่มที่ตัดตา (※---※) ($n=14$)



ภาพประกอบ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโพรแลคติน (ค่าเฉลี่ย (X) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ในเลือดกึ่งกำมราบเพศเมียที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง หลังจากฉีดด้วยน้ำเกลือ (---*---) (n=15) หรือสารสกัดจากก้านตา (—*—) (n=13) สองครั้ง ($\uparrow$)

ตาราง 1 แสดงปริมาณไวเทรโลเจนินในเลือดของกิ้งก่ามารามปกติหลังจากวางไข่ที่เวลาต่าง ๆ

ตัว ที่	วัน	ปริมาณไวเทรโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)											ดัชนี รังไข่ (OI)	
		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24		26
1		0.143	0.151	0.075	0.050	0.036	0.027	0.126	0.210	0.236	1.135	1.197	1.527	0.389
2		0.238	0.482	0.419	0.393	0.451	0.506	0.322	0.412	0.153	0.349	0.250	0.176	0.438
3		0.066	0.165	0.255	0.230	0.335	0.365	0.352	0.428	0.218	0.211	0.472	0.176	0.255
4		0.242	0.230	0.152	0.158	0.137	0.275	0.325	0.412	0.776	0.914	1.094	1.571	0.494
5		0.170	0.137	0.157	0.054	0.024	0.082	0.019	0.025	0.086	0.200	0.430	0.654	0.685
6		0.153	0.258	0.162	0.238	1.315	1.233	1.745	1.354	1.040	1.096	1.496	1.835	0.838
7		0.158	0.152	0.157	0.041	0.020	0.056	0.542	0.040	0.046	0.066	0.075	0.154	0.276
8		0.040	0.029	0.032	0.020	0.022	0.026	0.072	0.308	0.325	0.473	0.665	0.660	0.513
9		0.160	0.163	0.164	0.138	0.103	0.080	0.043	0.051	0.084	0.078	0.162	0.164	0.148
10		0.140	0.086	0.075	0.076	0.027	0.024	0.022	0.029	0.028	0.093	0.233	0.294	0.450
11		0.165	0.173	0.175	0.134	0.113	0.135	0.197	0.236	0.219	0.463	0.678	0.605	0.373
12		0.210	0.189	0.163	0.097	0.121	0.109	0.214	0.230	0.195	0.266	0.469	0.527	0.325
13		0.553	0.308	0.228	0.235	0.415	0.562	0.529	0.435	0.396	0.630	0.701	1.009	0.649
14		0.093	0.104	0.118	0.101	0.237	0.203	0.281	0.326	0.343	0.631	0.764	0.813	0.451
15		0.197	0.153	0.165	0.133	0.349	0.326	0.319	0.408	0.337	0.430	0.514	0.651	0.537
X		0.181	0.185	0.165	0.140	0.247	0.267	0.308	0.327	0.298	0.462	0.605	0.721	0.437
SD		0.114	0.103	0.087	0.096	0.320	0.308	0.410	0.313	0.226	0.339	0.382	0.528	0.152

ตาราง 2 แสดงปริมาณไวเทรลโลเจนนานเลื้อยของกุ้งก้ามกรามที่คัดตาออกทั้งสองข้างในวันที่ 4 หลังจากวางไข่

ตัว ที่	วัน	ปริมาณไวเทรลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)											
		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
1*		0.209	0.377	0.433	0.617	0.494	2.125	4.545	9.045	9.835	5.808	1.174	0.953
2*		0.438	0.567	0.579	0.795	1.256	1.642	3.374	3.951	6.732	9.583	3.538	1.633
3**		0.467	1.202	1.190	1.252	2.501	2.738	3.468	5.567	4.678	7.322	5.037	2.489
4**		0.039	0.362	1.292	1.427	2.482	5.948	11.21	13.41	15.70	13.12	8.082	2.185
5*		0.300	0.497	0.921	1.147	2.120	3.312	5.162	6.648	2.737	2.600	2.172	1.838
6**		0.115	0.478	1.463	1.892	2.934	6.314	6.515	12.40	5.016	2.510	2.213	1.621
7**		0.046	0.620	0.797	0.366	0.489	1.351	5.002	7.237	4.334	3.475	2.980	1.621
8*		0.317	1.252	3.147	3.645	4.044	4.048	4.464	5.722	3.304	2.857	0.316	0.141
9*		0.145	1.229	3.303	4.475	6.264	7.715	9.688	11.20	9.732	4.534	1.520	0.757
10*		0.081	0.825	2.420	3.566	3.492	4.131	3.057	8.532	2.623	2.147	1.513	0.980
11*		0.135	0.490	0.937	1.118	2.307	2.853	4.991	8.044	8.849	6.974	3.568	1.343
12**		0.252	0.931	1.529	1.947	2.195	4.221	6.903	9.025	5.144	5.015	2.967	1.791
13**		0.136	0.457	1.403	1.525	1.621	3.596	4.135	6.450	4.851	4.709	2.768	1.483
14*		0.323	1.086	2.351	3.055	4.489	5.058	6.751	9.977	7.028	4.886	2.117	1.087
X		0.215	0.741	1.555	1.918	2.653	3.932	5.695	8.374	6.468	5.396	2.855	1.426
SD		0.133	0.324	0.877	1.224	1.474	1.767	2.255	2.611	3.444	2.952	1.839	0.586

หมายเหตุ * ลอกคราบและวางไข่วันที่ 23

** ลอกคราบและวางไข่วันที่ 24

ตาราง 3 แสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงของไวเทลอเงินในเลือดของกุ่มก้ามกรามที่คัดคา
และฉีดด้วยน้ำเกลือ

ตัวที่.	ปริมาณ ไวเทลอ เงินเมื่อ เริ่มการ ทดลอง	ปริมาณไวเทลอเงิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงในเวลาต่าง ๆ (ชม.)							ดัชนี รังไข่ (01)
		12	16	20	24	28	36	44	
1	4.739	0.219	0.634	0.923	1.379	1.950	2.277	2.771	3.412
2	5.436	0.271	0.708	1.085	2.453	2.285	3.038	3.449	4.329
3	4.890	0.073	0.613	1.666	1.954	2.188	2.805	2.914	3.834
4	3.498	0.311	0.519	0.730	1.049	1.738	2.586	2.835	3.556
5	4.299	0.177	0.431	0.987	1.858	2.505	2.701	2.803	3.425
6	4.103	0.650	1.104	1.815	2.213	2.557	2.699	3.041	2.976
7	4.562	0.907	1.380	1.951	1.871	1.871	2.207	2.550	2.639
8	4.256	0.460	0.601	0.802	1.137	1.344	1.523	1.659	2.420
9	4.367	0.250	0.363	0.700	0.851	1.120	1.783	2.068	4.039
10	4.179	0.119	0.347	0.917	2.018	2.501	2.696	2.955	4.226
11	3.585	0.941	1.579	2.226	2.775	3.110	3.365	3.586	3.691
12	4.106	0.440	0.848	1.327	1.941	2.422	2.712	3.130	3.339
13	4.505	0.459	0.711	1.284	1.641	1.952	2.848	2.672	3.277
14	3.866	0.171	0.750	1.275	1.866	2.344	2.637	2.983	3.014
15	4.946	0.539	0.654	1.135	1.516	1.830	2.357	2.537	4.292
X	4.356	0.404	0.749	1.255	1.741	2.137	2.548	2.828	3.418
SD	0.500	0.254	0.343	0.451	0.478	0.485	0.434	0.465	0.596

ตาราง 4 แสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงของไวเทรลเจนนินในเลือดของกุ่มก้ามกรามที่คัดคา
และฉีดด้วยสารสกัดจากก้านคา

ตัวที่.	ปริมาณ ไวเทรล เจนนินเมื่อ เริ่มการ ทดลอง	ปริมาณไวเทรลเจนนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงในเวลาต่าง ๆ (ชม.)							ดัชนี รังไข่ (OI)
		12	16	20	24	28	36	44	
1	6.748	-2.084	-2.394	-3.643	-3.678	-3.800	-4.871	-3.806	3.608
2	5.554	-1.270	-2.212	-2.755	-3.142	-3.364	-2.947	-2.328	2.837
3	4.777	0.121	-0.504	-0.913	-2.903	-3.583	-3.393	-2.161	3.458
4	2.867	-0.198	-0.497	-0.786	-1.424	-1.669	-0.468	0.183	3.200
5	5.436	1.434	-0.186	-1.298	-2.133	-2.689	-1.801	-0.914	3.168
6	3.077	-0.265	-1.005	-1.201	-1.621	-1.468	-0.396	0.733	3.808
7	5.657	-0.803	-1.610	-2.492	-3.277	-4.384	-3.577	-1.902	3.318
8	4.603	-0.630	-1.620	-2.298	-2.167	-1.813	-0.451	1.097	4.086
9	5.079	-0.874	-1.718	-2.012	-2.322	-2.576	-2.266	-1.712	2.967
10	5.159	-1.814	-1.994	-2.078	-2.557	-3.571	-3.825	-2.956	2.611
11	3.266	-0.036	-0.574	-0.696	-0.908	-1.478	-1.381	-0.436	3.153
12	4.653	-0.603	-1.253	-1.634	-2.089	-0.487	-0.164	0.802	3.058
13	4.848	-0.574	-1.473	-2.027	-2.564	-0.407	0.174	1.262	3.491
X	4.748	-0.584	-1.362	-1.833	-2.323	-2.412	-1.952	-0.943	3.296
SD	1.067	0.855	0.616	0.824	0.732	1.245	1.591	1.607	0.386

หมายเหตุ ปริมาณไวเทรลเจนนินที่ติดเครื่องหมายลบ (-) คือปริมาณไวเทรลเจนนินที่ลดลงจาก
ปริมาณไวเทรลเจนนินเมื่อเริ่มการทดลอง

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

จากการนำสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกรามมาปฏิกิริยากันในหนูขาว พบว่าสามารถผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลิน (anti-vitellin antiserum) ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อไวเทลลิน แต่แอนติซีรัมที่ได้นี้ยังมีแอนติบอดีต่อสารอื่น ๆ ในรังไข่และเลือดเจือปนอยู่ (ภาพประกอบ 11.1 และ 12.1) เนื่องจากสารสกัดไวเทลลินที่ใช้ในการปฏิกิริยากันมีความบริสุทธิ์ไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ปะปนมานี้ส่วนใหญ่สามารถกำจัดออกได้โดยการดูดซับด้วยเลือดและสารสกัดหยาบจากตับ-ไตอ่อนของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ (ภาพประกอบ 11.2, 11.3, 12.2 และ 12.3) ในการพิจารณาเจือปนของแอนติบอดีอื่น ๆ ในแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินนี้พบว่าเกิดขึ้นได้ ถึงแม้จะปฏิกิริยากันด้วยสารสกัดไวเทลลินที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์โดยกระบวนการทางโครมาโตกราฟีหลายขั้นตอนก็ตาม (Quinitio and others. 1989, 1990)

การตรวจความจำเพาะของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินของกุ้งก้ามกรามด้วยวิธีอิมมูโน-ดิฟฟิวชัน โดยใช้น้ำแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจาก เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งในวงศ์เดียวกันและต่างวงศ์กัน พบว่าแอนติซีรัมที่ได้แสดงปฏิกิริยาข้ามอย่างสมบูรณ์ระหว่างไวเทลลินจากรังไข่และไวเทลโลเจนนินในเลือด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของไวเทลลินและไวเทลโลเจนนิน ทั้งนี้เนื่องจากไวเทลโลเจนนินเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของไวเทลลิน โดยไวเทลโลเจนนินที่สร้างมาจากแหล่งต่าง ๆ ภายนอกรังไข่จะถูกปล่อยมาทางระบบหมุนเวียนของโลหิตเข้าสู่เซลล์ไข่โดยกระบวนการการดูดซึมของเหลวของเซลล์ (pinocytosis) และเปลี่ยนแปลงเป็นไวเทลลินในรังไข่ (Wolin and others. 1973) ในกุ้งชนิดต่าง ๆ มีรายงานยืนยันความคล้ายคลึงกันของสารทั้งสอง เช่น กุ้งล็อบสเตอร์ (*Homarus americanus*) (Byard and Aiken. 1984) กุ้ง *Parapenaeus longirostris* (Tom and others. 1987) กุ้ง *Pandalus kessleri* (Quinitio and others. 1989) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Quinitio and others. 1990) และ กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Derelle and others. 1986)

แต่ในการใช้ที่ชี้แอนติเจนจากเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้แก่ เนื้อเยื่ออวัยวะและเลือดกุ้งเพศผู้จะนำพบแนวตะกอนหลักที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรั่มกับไอเวเลสหรือไอเวลเจลเจนนี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองชนิดเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในกุ้งเพศเมียเท่านั้น จะนำพบในกุ้งเพศผู้ หรือกุ้งเพศเมียที่รังไข่ยังไม่เจริญเช่นเดียวกับสัตว์จำพวกครัสเตเชียชนิดอื่น ๆ เช่น านูมา *Callinectes sapidus* (Kerr, 1969) กุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* (Nelson, Heyer and Johnson, 1988) กุ้ง *Pandalus kessleri* (Quinitio and others, 1989) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Quinitio and others, 1990) และกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* (คิวาพร ลงยันต์, 2537)

ในการใช้ของแอนติเจนจากกุ้งต่างชนิดกัน พบว่าทั้งไอเวเลสและไอเวลเจลเจนนีจากกุ้งในสกุล (genus) เดียวกันจะหาปฏิกิริยาข้ามอย่างสมบูรณ์ ได้แก่กุ้งฝอยน้ำจืด *Macrobrachium lanchesteri* แต่การใช้ของกุ้งที่อยู่ในวงศ์ (family) เดียวกันแต่ต่างสกุลกันจะแสดงปฏิกิริยาเกิดแนวตะกอนเชื่อมต่อกันไม่สมบูรณ์ เช่นในกุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* และสำหรับกุ้งที่ต่างวงศ์กัน เช่นกุ้งตะกาดทั้งสองชนิดคือ (*Metapenaeus affinis* และ *Metapenaeus ensis*) จะไม่สามารถเห็นปฏิกิริยากับแอนติซีรัมนี้อยู่ ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่าไอเวเลสและไอเวลเจลเจนนีของกุ้งที่อยู่ในกลุ่มที่ใกล้ชิดกันจะมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันและกลุ่มที่ต่างกันจะมีความแตกต่างกันมากขึ้น การทดสอบแอนติซีรั่มต่อไอเวเลสในกุ้งสปีชีส์ (species) ชนิดอื่น ๆ ที่ได้ผลคล้ายคลึงกันเช่นแอนติซีรั่มต่อไอเวเลสของกุ้งกุลาดำ (Quinitio and others, 1990) กุ้งตะกาด *M. affinis* (คิวาพร ลงยันต์, 2537)

เมื่อใช้กระแสไฟฟ้าแยกสารสกัดจากรังไข่และเลือดกุ้งเพศเมียก่อนหาปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อไอเวเลส พบว่าการเคลื่อนของแนวตะกอนหลักสองแนว (เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรั่มต่อไอเวเลสกับไอเวเลสหรือไอเวลเจลเจนนี) ในอัตราความเร็วคล้ายคลึงกัน เป็นการยืนยันถึงความคล้ายคลึงกันของโปรตีนทั้งสองชนิดที่กล่าวมานี้ สำหรับองค์ประกอบของไอเวเลสและไอเวลเจลเจนนีในกุ้งก้ามกรามมีรายงานว่าเมื่อแยกด้วย SDS-PAGE ประกอบด้วยโปรตีนเปปไทด์ 2 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 92.2 และ 84.0 กิโลดาลตัน (Derelle and others, 1986) แต่รายงานการแยกโปรตีนไอเวเลส native-PAGE และ HPLC ด้วย TSKG 3000 SW column

พบว่า ไวเทลลินปรากฏอยู่ 3 รูปแบบ มีน้ำหนักโมเลกุล 240, 450 และ 780 กิโลดาลตันตามลำดับ ซึ่งทุกรูปแบบจะประกอบด้วยยูนิตแบบโพลีเมอร์ 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 90 และ 104 กิโลดาลตัน รูปแบบทั้ง 3 นี้ อาจเกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อยในจำนวนต่าง ๆ กัน (Chang and others. 1993b) แต่อย่างไรก็ตามข้อแตกต่างเล็กน้อยของน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยในไวเทลลิน อาจเนื่องมาจากข้อผิดพลาดในการคำนวณที่เทียบจากโปรตีนมาตรฐาน เนื่องการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าในรุ่นที่ใช้สามารถเห็นไวเทลลินชัดเจนเพียง 2 รูปแบบ ทั้งนี้เนื่องจากในรุ่นมีพรอนขนาดใหญ่และระยะทางที่ใช้แยกสั้น อาจทำให้การแยกองค์ประกอบของไวเทลลินและไวเทลโลเจนนีไม่ชัดเจนเท่าที่ควร

จากการใช้แอนติซีรัมนี้นำไปศึกษากับเนื้อเยื่อของรังไข่โดยกระบวนการทางอิมมูโนไซโตเคมีสทรี พบว่าแอนติซีรัมนี้นำไปศึกษากับเซลล์ที่มีระยะการเจริญตั้งแต่ระยะที่มีการสะสมไข่แดงระยะเริ่มแรก (primary vitellogenesis oocyte) ขึ้นไปเท่านั้น จะไม่พบปฏิกริยาในเซลล์ในระยะต่าง ๆ ก่อนมีการสะสมไข่แดง (previtellogenesis oocyte) ซึ่งเป็นการสนับสนุนความจำเพาะของแอนติซีรัมนี้นี้ที่มีความจำเพาะต่อไวเทลลิน

การใช้กระบวนการวิธี competitive ELISA ในการทดสอบการเปรียบเทียบปฏิกริยาของแอนติซีรัมนี้นี้ต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนนี จะเห็นว่าไวเทลโลเจนนีในเลือดจากกุ้งเพศเมียสามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับไวเทลลินที่ตรึงอยู่บนภาค ELISA ได้อย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกับไวเทลลินในสารสกัดจากรังไข่ ในขณะที่เลือดจากกุ้งเพศผู้ไม่มีผลต่อปฏิกริยาดังกล่าว เป็นการชี้ให้เห็นว่าไวเทลลินและไวเทลโลเจนนีมีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสทรีเหมือนกัน จึงสามารถใช้แอนติซีรัมนี้นี้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของไวเทลโลเจนนีในเลือดได้ ถึงแม้ว่าแอนติซีรัมนี้นี้จะมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อของกุ้งปะปนอยู่บ้างก็ตาม แอนติบอดีที่ปะปนเป็นส่วนน้อยที่สามารถกำจัดโดยการดูดซับด้วยเลือดกุ้งเพศผู้และสารสกัดจากตับ-ตับอ่อนจากกุ้งเพศผู้ เนื่องจากแอนติซีรัมนี้นี้ใช้มีค่าโคเออร์สูง จึงสามารถใช้แอนติซีรัมนี้นี้ในระดับที่เจือจางมากถึง 1:80,000 เท่า ดังนั้นแอนติบอดีที่ปะปนมาในปริมาณต่ำจึงถูกเจือจางถึงระดับต่ำมาก จนไม่มีผลในการวิเคราะห์

ในทำนองเดียวกันนี้การปะปนของโปรตีนอื่น ๆ ในสารสกัดไวเทลลินจะถูกเจือจางไปด้วย เพราะว่าปริมาณไวเทลลินที่ใช้ในการตรึงอยู่บนภาค ELISA และที่ใช้เป็นสารสกัดไวเทลลินมาตรฐาน

ฐานอยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำมากจนถึงระดับนาโนกรัม/มิลลิลิตร กับส่วนอื่น ๆ ที่ปะปนอยู่ในสารสกัด ปริมาณน้อยจึงถูกเจือจางลงไปเช่นกัน จึงเชื่อมั่นว่าวิธี indirect competitive ELISA นี้เป็นวิธีที่มีความแม่นยำพอสมควรในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนิน สำหรับการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินโดยวิธี indirect competitive ELISA มีการศึกษาในเห็บ *Dermacentor variabilis* (Rosell and Coons, 1991) การวัดระดับปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามได้มีการวัดโดยใช้แอนติบอดีต่อไวเทลลิน และ rabbit anti-vitellin antiserum โดยวิธี indirect alkaline phosphatase sandwich ELISA (Derelle and others, 1986) และการวัดไวเทลโลเจนินในกุ้งก้ามกรามโดยวิธี solid phase ELISA โดยใช้ rabbit anti-vitellin antiserum และวิธี indirect alkaline phosphatase (Chang and Shih, 1995) ระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินที่คำนวณมีปริมาณใกล้เคียงกันกับที่วัดด้วยการทดลองนี้ การวัดระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดกุ้งโดยวิธีอื่น ๆ เช่น ในกุ้งกุลาลาย *Penaeus semisulcatus* โดยใช้วิธี rocket immuno-electrophoresis (Shafir and others, 1992) เป็นวิธีที่มีความไวระดับต่ำกว่าวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งวัดได้ในระดับนาโนกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไปและสิ้นเปลืองแอนติซีรัมมากกว่าวิธีนี้มาก

การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามหลังจากวางไข่ พบว่าในกุ้งปกติระดับไวเทลโลเจนินในเลือดจะคงที่ในระดับต่ำกว่า 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในช่วง 10 วันแรก และหลังจากนั้นระดับไวเทลโลเจนินของกุ้งบางตัวยังคงที่ หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระดับต่าง ๆ (ไม่เกิน 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตาราง 1) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการสำรวจพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งก้ามกรามหลังวางไข่โดยการตรวจดูดัชนีของรังไข่ พบว่าในช่วง 10 วันแรกหลังจากวางไข่ ค่าดัชนีของรังไข่ค่อนข้างคงที่ หลังจากนั้นค่าดัชนีของรังไข่ของกุ้งกลุ่มหนึ่ง (ประมาณ 50 %) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่กุ้งอีกกลุ่มมีการเจริญของรังไข่เพิ่มขึ้นในอัตราเร็วต่างกัน และสามารถวางไข่อีกครั้งภายในเวลาเฉลี่ย 30.2 วัน (สันติ เรืองมณีพิศุทธิ์ และคนอื่น ๆ, 2532) แต่จากการทดลองนี้จะเห็นว่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือดเพิ่มขึ้นค่อนข้างช้า และดัชนีรังไข่ในกุ้งส่วนใหญ่ยังคงมีค่าในวันที่ 26 หลังจากวางไข่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทดลอง

มีการเจาะเก็บเลือดทุก ๆ 2 วันตลอดเวลา 26 วัน เป็นการก่อให้เกิดการเสียเลือดและก่อให้เกิดสภาวะกดดันในกุ้งตลอดเวลา จึงทำให้มีผลกระทบต่อการพัฒนาการของรังไข่ ซึ่งผลกระทบนี้คล้ายกับการศึกษานานทอง เดียวกัน ในกุ้งก้ามกรามที่เก็บเลือดทุก ๆ 3 วัน ทำให้วงจรการวางไข่จะแปรปรวนมากอยู่ในช่วงระหว่าง 24-40 วัน (Chang and Shih, 1995)

ในการศึกษาที่กุ้งถูกตัดตาหลังจากวางไข่ได้ 4 วัน ระดับไอเทสโรเจนินของกุ้งทุกตัวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และลดลงในช่วง 2-5 วันก่อนวางไข่อีกครั้งหนึ่ง (ภาพประกอบ 16) ซึ่งช่วงเวลาในการวางไข่ครั้งที่ 2 นี้เรียกว่ากุ้งปกติ ไข่เวลาประมาณ 23-24 วันหลังจากวางไข่ครั้งแรก จะเห็นว่ามีผลมาจากการตัดตากระตุ้นให้เพิ่มการเจริญของรังไข่ และการเจริญของรังไข่ของกุ้งทุกตัวค่อนข้างสม่ำเสมอ ถึงแม้ว่ากุ้งทุกตัวจะอยู่ในสภาวะกดดันเนื่องจากการเสียเลือดตลอดเวลาในการทดลองก็ตาม (ตาราง 1)

สำหรับการใช้สารสกัดจากก้านตา 2 ครั้งนี้ทำให้กุ้งที่ถูกชักนำให้มีการเจริญของรังไข่โดยการตัดตามีผลทำให้ระดับไอเทสโรเจนินในเลือดค่อย ๆ ลดลงในการฉีดแต่ละครั้งของการฉีด สารสกัดเป็นเวลานานถึง 12-14 ชั่วโมง หลังจากนั้นระดับไอเทสโรเจนินจึงค่อย ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งต่างจากกลุ่มที่ฉีดด้วยน้ำเกลือในระดับไอเทสโรเจนินในเลือดมีการเพิ่มขึ้นตลอดเวลาที่ทดลอง เป็นการแสดงให้เห็นว่าพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งก้ามกรามอยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนในก้านตา (ธีระวรรณ สิทธิกรกุล และคนอื่น ๆ, 2532) เช่นเดียวกับกุ้ง *Parapenaeopsis hardwickii* (Kulkarni and Nagabhushanam, 1980) กุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* (Soyez and others, 1987) กุ้ง *Penaeus vannamei* (Quackenbush, 1989) กุ้ง *Procambarus bouvieri* (Aguilar and others, 1992) และปูก้ามดาบ (fiddler crab) *Uca pugilator* (Quackenbush and Keeley, 1988) การที่สารสกัดจากก้านตามีผลทำให้ระดับไอเทสโรเจนินในเลือดลดลง คาดว่าเกิดเนื่องจากฮอร์โมนในสารสกัดจากก้านตาไปยับยั้งการสังเคราะห์ไอเทสโรเจนินในอวัยวะอื่น ๆ นอกจากรังไข่ เช่นตับ-ตับอ่อน หรืออาจยับยั้งการหลั่งของไอเทสโรเจนินเข้าสู่กระแสเลือด จากการทดลองในกุ้งชนิดอื่น ๆ พบว่าสารสกัดจากก้านตาสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ไอเทสโรเจนินในรังไข่ ตับ-ตับอ่อน ในกุ้งทะเล *Penaeus vannamei* และปู *Uca pugilator* (Quackenbush and Keeley,

1988 และ Quackenbush, 1989) สำหรับค่าดัชนีรังไข่ในกุ่มทั้ง 2 กลุ่ม (ฉีดสารสกัดจากก้านตา และฉีดน้ำเกลือ) นั้นไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ทำการทดลองเพียงช่วงสั้น ๆ และได้รับการฉีดสารสกัดเพียง 2 ครั้ง ซึ่งเวลาในการทดลองที่จะเห็นความแตกต่างของดัชนีรังไข่ ต้องใช้เวลาทดลองไม่ต่ำกว่า 5 วัน และต้องฉีดสารสกัดไม่น้อยกว่า 10 ครั้ง (วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคนอื่น ๆ, 2532) ดังนั้นการตรวจผลของสารสกัดจากก้านตาต่อระดับไอเทลโรเจนินจึงเป็นวิธีที่มันสิ้นเปลืองสารสกัด และเวลาทำการทดลองน้อยกว่า ซึ่งการทดลองนี้ใช้เวลาเพียง 21-24 ชั่วโมงเท่านั้น

ฉะนั้นการทดลองครั้งนี้ น่าจะเป็นแนวทางที่ดีสำหรับการตรวจหาฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ (VIH assay) ในก้านตาของสัตว์จำพวกครัสเตเชีย เช่น กุ้ง ด้วยการตรวจวัดระดับปริมาณของไอเทลโรเจนินในเลือดโดยวิธี competitive ELISA เพราะจะทำให้การทดสอบมีความไวสูง ใช้เวลาน้อย และสิ้นเปลืองสารสกัดน้อยลง ทั้งนี้จึงน่าจะเป็นแนวทางในการตรวจหา VIH ระหว่างการแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมน (VIH) ได้ง่าย ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพดีกว่าการตรวจสอบจากดัชนีรังไข่

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถแยกสกัดโปรตีนไอเทลโรเจนินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกรามโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต
2. สามารถสร้างแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะต่อไอเทลโรเจนินของกุ้งก้ามกราม จากสารสกัดข้างต้น
3. สามารถพัฒนาการตรวจวัดปริมาณไอเทลโรเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามโดยวิธี Competitive ELISA จากแอนติซีรัมที่ผลิตได้
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับไอเทลโรเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามที่ชักนำให้มีการพัฒนาการของรังไข่โดยการตัดตา พบว่าระดับไอเทลโรเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามมีความสัมพันธ์โดยตรงกับพัฒนาการของรังไข่

5. ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากก้านตาคู่ระดับไวเทลโรเจนนินในเลือด พบว่าสารในสารสกัดจากก้านตาสามารถชักนำให้ระดับไวเทลโรเจนนินในเลือดลดลงชั่วคราวได้ สารนี้น่าจะเป็นฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาผลของฮอร์โมนที่มีต่อการเจริญหรือพัฒนาการของรังไข่ (VIH) ตัวอย่างรังไข่เริ่มต้นที่นำทดลองควรวางรังไข่ที่อยู่ในระยะพักหลังจากงูวางไข่ 4 วันจึงตัดตา แล้วต่อจากนั้นอีกประมาณ 7 วันจึงเริ่มทำการทดลอง ทั้งนี้เพราะว่ารังไข่ในระยะนี้รังไข่กำลังมีการพัฒนา และปริมาณไวเทลโรเจนนินในเลือดอยู่ในระยะที่กำลังเพิ่มขึ้น ถ้าทำการทดลองในช่วงเวลานี้น้อย หรือมากกว่า 7 วันหลังจากตัดตา อาจจะเป็นช่วงระยะเวลาที่รังไข่ยังไม่พัฒนา หรือพัฒนาเต็มที่แล้ว ซึ่งทำให้ปริมาณไวเทลโรเจนนินในเลือดอาจจะมีน้อย หรือเริ่มลดลงจึงเป็นสาเหตุให้ผลการทดลองผิดพลาดได้
2. การผลิตแอนติซีรัมที่ได้ผลดีนั้น จำต้องแยกบริสุทธิ์สารที่ใช้ปลูกภูมิคุ้มกันนั้น ๆ เพื่อต้องการแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะสูง ถึงแม้ว่าจะมีเอนติบอดีที่บนเยื่อเมือกก็สามารถกำจัดออกได้ง่ายโดยการดูดซับด้วยเลือด หรือสารสกัดหยาดจากตับ-ตับอ่อนของงูเผือก
3. การทดสอบแอนติซีรัม ควรทดสอบโดยวิธี อิมมูโนดิฟฟิวชัน อิมมูโนอีเล็กโทรเฟรีซิส และการตรวจหาโคเเตอร์ด้วยวิธี ELISA

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กรมประมง . ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2530.
- ชูศิลป์ อัครฐ. สัตว์น้ำมีกระดูกสันหลังที่ใช้เป็นอาหารในภาคกลางของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526 อัดสำเนา.
- ประจวบ หล้าอุบล. กุ้ง. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2527.
- นิยะพงษ์ รัชทิพันธุ์. "การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม," การเลี้ยงกุ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 1. โครงการหนังสือคู่มือประกอบอาชีพสำหรับประชาชน. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, 1-5 ; 2529.
- พิมพ์พรณ ลีละวัฒนากุล. อนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2518. อัดสำเนา.
- ไพศาล สิทธิกรกุล และคนอื่น ๆ. รายงานการวิจัยการส่งออกของฮอว์มในระบอบประสาทที่มีต่อรังไข่ในช่วงพัฒนาการระยะต่าง ๆ ในกุ้งก้ามกราม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2532.
- ยนต์ มุสิก. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529.
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคนอื่น ๆ. "ผลของสารสกัดจากก้านตากุ้งที่มีต่อการยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ในกุ้งก้ามกราม," วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5(2) : 106-114 ; 2532.
- ศิวาพร ลงยันต์. การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวโรลลีนและการตรวจวัดไวโรลลีนเงินในเลือดกุ้งตะกาด. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2537. อัดสำเนา.
- สันติ เรืองมนีไพฑูรย์ และคนอื่น ๆ. "พัฒนาการของรังไข่ในกุ้งก้ามกรามหลังวางไข่," วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5(2) : 100-105 ; 2532.

สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์. การตรวจหาพิษเมมตีสเฟอรซึ่งฮอโมนในก้ามของกุ้งก้ามกราม

กุ้งกุลาลำค่า กุ้งตะกาด ด้วยวิธีอิมมูโนแอสเซย์เคมีสทรี. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ ฯ :

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2536. อัดสำเนา.

สุภาวดี จุลละสร. สัณฐานวิทยากระดูกสันหลัง เล่ม 2. กรุงเทพฯ ฯ : บริษัทรุ่งศิลป์การพิมพ์

(1977) จำกัด, 2525.

Aguilar, M.B. and others. "Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann)," Comp. Biochem. Physiol. 102B(3) : 491-498 ; 1992.

Anilkumar, G. and K.G. Adiyodi. "Ovarian growth induced by eyestalk ablation during the prebreeding season is not normal in the crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst)," Inter. J. Invert. Reprod. 2 : 95-105; 1980.

Bradford, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," Anal. Biochem. 72 : 248-254 ; 1976.

Bomirski, A. and others. "Partial characterization of crustacean gonad inhibiting hormone," Inter. J. Invert. Reprod. 3 : 213-219 ; 1981.

Byard, E.H. and D.E. Aiken. "The relationship between molting, reproduction, and a hemolymph female-specific protein in the lobster, *Homarus americanus*," Comp. Biochem. Physiol. 77A(4) : 749-757 ; 1984.

Chang, K.S., M.J. Bruce and R.W. Newcomb. "Purification and amino acid composition of a peptide with molt-inhibiting activity from the lobster, *Homarus americanus*," Gen. Comp. Endocrinol. 65 : 56-64 ; 1987.

Chang, C.F., F.Y. Lee and Y.S. Huang. "Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*," Comp. Biochem. Physiol. 105B : 409-414 ; 1993a.

Chang, C.F., T.W. Shih and H.H. Hong. "Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*," Comp. Biochem. Physiol. 105B : 609-615 ; 1993b.

Chang, C.F. and others. "Purification and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn, *Penaeus monodon*," Invert. Rep. Dev. 25(3) : 185-192 ; 1994.

- Chang, C.F. and T.W. Shih. "Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*," Invert. Rep. Dev. 27(1) : 11-20 ; 1995.
- Charniaux-Cotton, H. "Experimental studies of reproduction in Malacostraca Crustaceans. Description of vitellogenesis and its endocrine control," Adv. Invert. Rep. 177-186 ; 1980.
- Charniaux-Cotton, H. "Vitellogenesis and its control in Malacostracan Crustacea," Amer. Zool. 25 : 197-206 ; 1985.
- Cheesman, D.F. and J. Prebble. "Astaxanthin ester as a prosthetic group : a caroteno-protein from the hermit crab," Comp. Biochem. Physiol. 17 : 929-936 ; 1966.
- Derelle, E. and others. "ELISA titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal antibody," Comp. Biochem. Physiol. 85B(1) : 1-4 ; 1986.
- Eastman-Reks, S.B. and M. Fingerman. "In vitro synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*," J. Exp. Zool. 233 : 111-116 ; 1985.
- Emmerson, W.D. "Maturation and growth of ablated and unablated *Peneaus monodon* Fabricius," Aquaculture. 32 : 235-241 ; 1983.
- Fernlund, P. and L. Josefsson. "Crustacean color change hormone : Amino acid sequence and chemical synthesis," Science. 177 : 173-175 ; 1972.
- Holthuis, L.B. FAO species catalogue Vol. 1-shrimps and prawns of the world. FAO fisheries synopsis No. 125. Volume 1. 1980.
- Huberman, A. and M.B. Aguilar. "A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish (*Procambarus bouvieri*: Ortmann)-II. Structural comparison of two isoforms of the hormone," Comp. Biochem. Physiol. 91B(2) : 345-349 ; 1988.
- Hudson, L. and F. C. Hay. Practical immunology. London : Blackwell Scientific Publication, 1976.
- Humason, G.L. Animal Tissue Techniques. 4 th ed. San Francisco : W.H. Freeman and Company, 1979.
- Josefsson, L. "Invertebrate neuropeptide hormone," Int. J. Pept. Protein Res. 21 : 459-470 ; 1983.

- Kerr, M.S. "The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus*. II. A lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin," Develop. Biol. 20 : 1-17 ; 1969.
- Kulkarni, G.K. and R. Nagabhushanam. "Role of ovary inhibiting hormone from eyestalks of marine penaeid prawns, *Parapenaeopsis hardwickii* during ovarian development cycle," Aquaculture. 19 : 13-19 ; 1980.
- Lui, C.W. and J.D. O'Connor. "Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. III. The incorporation of labelled amino acid in to the purified lipovitellin of the crab, *Pachygrapsus crassipes*," J. Exp. Zool. 199 : 105-108 ; 1977.
- Nagamine, C. and others. "Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapod, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod," Gen. Comp. Endocrinol. 41 : 423-441 ; 1980.
- Nelson, K., B. Heyer and E. Johnson. "Photoperiod-induced changes in hemolymph vitellogenin in female lobsters (*Homarus americanus*)," Comp. Biochem. Physiol. 90B : 809-821 ; 1988.
- Paulus, J.E. and H. Laufer. "Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda Brachyura)," Int. J. Invert. Rep. Dev. 11 : 29-44 ; 1987.
- Quackenbush, L.S. "Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei*: *In Vitro* studies of the isolated hepatopancreas and ovary," Comp. Biochem. Physiol. 94B(2) : 253-261 ; 1989.
- Quackenbush, L.S. and L.L. Keeley. "Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab, *Uca pugilator*," Biol. Bull. 175 : 321-331 ; 1988.
- Quackenbush, L.S. and W.F. Herrnkind. "Partial characterization of eyestalk hormone controlling molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus*," J. Crust. Biol. 3 (1) : 34-44 ; 1983.
- . "Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus* (Crustacea : Palinuridae): effect of eyestalk ablation," Comp. Biochem. Physiol. 69A : 523-527 ; 1981.
- Quinitio, E.T. and others. "Identification and characterization of vitellin in a hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*," Comp. Biochem. Physiol. 94B : 445-451 ; 1989.

- Quinitio, E.T. and others. "Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*," Invert. Rep. Dev. 19(3) : 221-227 ; 1990.
- Rao, K.R. and J.P. Riehm. "Pigment-dispersing hormone : An novel family of neuropeptides from arthropods," Peptides. 9 : 153-159 ; 1988.
- Rosell, R. and L. B. Coons. "Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina:Ixodidae) using an Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay," J. Med. Entomol. 28(1) : 41-44 ; 1991.
- Shafir, S. and others. "Protein vitellogenin and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan)," Biol. Bull. 183 : 394-400 ; 1992.
- Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. "Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus gland of the lobster, *Homarus americanus*," J. Exp. Zool. 244 : 479-484 ; 1987.
- Soyez, D. and others. "Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster, *Homarus americanus*," Neuropeptides. 20 : 25-32 ; 1991.
- Suzuki, S., K. Yamasaki and Y. Katakura. "Vitellogenin synthesis by fat body and ovary in the terrestrial Isopod, *Armadillidium vulgare*," Gen. Comp. Endocrinol. 74 : 120-126 ; 1989.
- Tom, M., M. Goren and M. Ovadia. "Purification and characterization of vitellin from the ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)," Comp. Biochem. Physiol. 87B : 17-23 ; 1987.
- . "Localization of the vitellin and its possible precursors in various organ of *Parapenaeus longirostris* (Crustacean Decapoda, Penaeidae)," Inter. J. Invert. Rep. Dev. 12 : 1-12 ; 1987.
- Wollin, E., H. Laufer and D. Albertini. "Uptake of the yolk protein, lipovitellin by developing crustacean oocytes," Develop. Biol. 35 : 160-170 ; 1973.
- Yano, I. and Y. Chinzei. "Ovary is the site of vitellogenin synthesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*," Comp. Biochem. Physiol. 86B(2) : 213-218 ; 1987.

Zagalsky, P.F. "A study of the astaxanthin lipovitellin ovoverdin isolated from the ovaries of the lobster, *Homarus americanus*," Comp. Biochem. Physiol. 80B : 589-598 ; 1985.

การพัฒนาระบบ

การเตรียมสารเคมี

1. น้ำเกลือสำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* isotonic physiological saline พีเอช 7.6 , Nagamine and others. 1980)

NaCl	11.00	กรัม
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.81	กรัม
KCl	0.52	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.47	กรัม
NaHCO ₃	0.17	กรัม
H ₂ O (distilled)	1,000.00	มิลลิลิตร

2. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffered Saline-PBS) 0.15 โมลาร์
พีเอช 7.2 (Hudson and Hay. 1976)

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
หรือ Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	2.15	กรัม
H ₂ O (distilled)	1,000.00	มิลลิลิตร

3. ซีอีอีซี 0.1% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

ซีอีอีซี	0.1	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	100.0	มิลลิลิตร

4. สารละลาย Blotto 5%

นมพร่องมันเนย	5.0	กรัม
PBS 0.15 นมลาร์ พีเอช 7.2	100.0	มิลลิลิตร
สารละลายเมอร์ไธโอเรด 1%	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100	0.1	มิลลิลิตร

5. ซีเตรตบัฟเฟอร์ (Citrate buffered) 0.1 นมลาร์ พีเอช 4.5

โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate)	29.41	กรัม
สารละลายเมอร์ไธโอเรด 1%	10.0	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นมลาร์ หรือ		
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 นมลาร์		

6. บอเรตบัฟเฟอร์ซาลิน (Borate buffer saline) พีเอช 8.6

โซเดียมเตตระโบเรต (Sodium tetraborate)		
0.05 นมลาร์	19.071	กรัม
NaCl 0.04 นมลาร์	2.434	กรัม
H ₂ O (distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นมลาร์ หรือ		
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 นมลาร์		

7. สารละลาย Calf serum 10% (P₁)

Calf serum	10	มิลลิลิตร
สารละลาย PBS 0.15 นมลาร์ พีเอช 7.2	100	มิลลิลิตร

8. Bouin's fixative (Humason. 1979)

Glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
40% Formaldehyde	25	มิลลิลิตร
Picric acid	75	มิลลิลิตร
(saturated aqueous solution)		

9. สารละลาย Bradford solution (Bradford. 1976)

Coomassie Brilliant Blue G-250	100.0	มิลลิกรัม
เมทานอล	50.0	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก 85 % W/V	100.0	มิลลิลิตร
H ₂ O (double distilled water)	1000.0	มิลลิลิตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นามวิมล ชื่อสกุล สุขตั้งมั่น

เกิดวันที่ 14 เดือนเมษายน พุทธศักราช 2497

สถานที่เกิด จ. สุราษฎร์

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 21 หมู่ 19 ซอยวัดหลวง ถนน วงศ์สว่าง
 แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ
 กรุงเทพมหานคร 10800

ปัจจุบันรับราชการ

ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 6 ว.

งานพยาธิคลินิก กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

สถานที่ทำงาน

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เลขที่ 268/1 ถนน พระรามหก
 แขวงราชเทวี เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400
 โทร. 2460061 ต่อ 237

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2522

ประกาศนียบัตรเชลลวิทยา จากโรงเรียนเชลลวิทยา
 สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2528

ค.บ. (ชีววิทยา) จากสถาบันราชภัฏธนบุรี
 กรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2538

วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
 ประสานมิตร กรุงเทพมหานคร