

591.293

ด554ก

7.3

การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัลเกล็ดและการตรวจ
วัดไวรัลเกล็ดโลหิตในเลือดกึ่งตะกาศ

ปริญญานิพนธ์

ของ

ศิวาพร ลงยันต์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

มีนาคม 2537

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

190087

26 ก.ย. 2537

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปัญหานี้อย่างถี่ถ้วนแล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน
(รศ.ดร.ไพศาล สัทธีกรกุล)

.....กรรมการ
(รศ.จินดา นัยเนตร)

.....กรรมการ
(ดร.วีระวราภ สัทธีกรกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน
(รศ.ดร.ไพศาล สัทธีกรกุล)

.....กรรมการ
(รศ.จินดา นัยเนตร)

.....กรรมการ
(ดร.วีระวราภ สัทธีกรกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร.สาธิตสนม ธรรมนิกข์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปัญหานี้อย่างถี่ถ้วน เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ดร.ศิริภา พูลสุวรรณ)

วันที่.....4.....เดือน.....มิถุนายน.....พ.ศ.....25๖๑.....

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและแนะนำอย่างดียิ่งจาก รศ.ดร.ไพศาล
สิทธิกรกุล รศ.จินดา นัยเนตร และ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล รวมทั้ง ดร.สาธิตสม ธรรมพิทักษ์
ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล อ่างศิลา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการให้ใช้สถานที่ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการให้ใช้
เครื่องอ่านภาค ELISA (microplate reader)

ขอขอบคุณ คุณสุวิสา แสงมงคลพิพัฒน์ ที่ช่วยพิมพ์และแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จนเรียบร้อย
สมบูรณ์

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้
วิจัยด้วยดีตลอดมาและขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนามในที่นี้ ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ
ในด้านต่าง ๆ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ศิวาพร ลงยันต์

สารบัญ

บทที่

หน้า

1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	ชีววิทยาของกิ้งคตา	7
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	13
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	13
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	13
	นิยามศัพท์เฉพาะ	14
2	วิธีการวิจัย	15
	สัตว์ทดลอง	15
	อุปกรณ์และสารเคมี	15
	วิธีดำเนินการทดลอง	17
	การเตรียมสารสกัดไวเทอลินจากรังไข่ของกิ้งคตา	18
	การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทอลินในหนูขาว	19
	การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้	20
	การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทอลโลเจนนินในเลือด ของกิ้งคตา	22
	การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของรังไข่กับระดับ ไวเทอลโลเจนนินในเลือด	23

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ได้ ในการตรวจหา	
ไวเทกลินหรือไวเทกลโกลเจนจากกิ้งก่า <i>M. ensis</i>	
โดยวิธี competitive ELISA	24
การวิเคราะห์ข้อมูล	24
3 ผลการวิจัย	27
4 สรุปผลการทดลอง	47
ข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม	52
ภาคผนวก	57
ภาคผนวก ก	58
ภาคผนวก ข	64
ประวัติย่อของผู้วิจัย	67

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	แสดงภาพกุ้งตะกาด <i>Metapenaeus affinis</i>	9
2	แสดงลักษณะการเจริญของรังไข่ในระยะที่ I ถึงระยะที่ IV ของกุ้งกุลาดำ	11
3	แสดงขั้นตอนการทดลองการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและ การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน เพื่อใช้ในการ ตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกุ้งตะกาดที่มีรังไข่เจริญ ในระยะต่าง ๆ โดยวิธี competitive ELISA	26
4	แสดงภาพดับเบิลอิมมูโนดิฟฟูชัน (double immunodiffusion) ระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจนต่าง ๆ	33
5	แสดงภาพอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส (immunoelectrophoresis) ของ แอนติซีรัมกับเลือดกุ้งตะกาดตัวเมียและสารสกัดจากรังไข่ของกุ้งตะกาด <i>M. affinis</i>	34
6	กราฟแสดง competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและ ตัวอย่างเลือดกุ้งตะกาด (<i>M. affinis</i>) ตัวเมียและตัวผู้ที่ระดับ เจือจางต่าง ๆ โดยใช้ mouse anti-vitellin antiserum เจือจาง 1:80,000	35
7	กราฟแสดง competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและ ตัวอย่างเลือดกุ้งตะกาด (<i>M. affinis</i>) ตัวเมียและตัวผู้ที่ระดับ เจือจางต่าง ๆ โดยใช้ mouse anti-vitellogenin antiserum คู่กับตัวอย่างเลือดกุ้งตัวผู้เจือจาง 1:20,000	36

- 8 แสดงการกระจายของค่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกึ่งตะกาด *M. affinis* เทียบกับดัชนีของรังไข่ ในระยะการเจริญต่าง ๆ และหลังจากวางไข่ประมาณ 1 วัน 37
- 9 กราฟแสดงปริมาณไวเทลโลเจนิน (ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ในเลือดของกึ่งตะกาด (*M. affinis*) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะ II-III และระยะที่ IV ในวันที่ 0 (จากทะเล) และหลังจากนำมาเลี้ยง 1 วัน 38
- 10 กราฟแสดงปริมาณไวเทลโลเจนิน (ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ในเลือดของกึ่งตะกาด (*M. affinis*) ที่อยู่ในระยะหลังจากการวางไข่ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 วันตามลำดับ 39
- 11 กราฟแสดง competitive ELISA ของสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานของกึ่งตะกาด (*M. affinis*) และสารสกัดหยาบมาตรฐานจากรังไข่ของกึ่งตะกาดชนิดที่ 2 (*M. ensis*) โดยใช้สารสกัดจากรังไข่ของกึ่งตะกาด *M. affinis* ครึ่งที่หลุมของถาด ELISA และใช้ mouse anti-vitellogenin antiserum เจือจาง 1:20,000 40
- 12 กราฟแสดง competitive ELISA ของสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานของกึ่งตะกาด (*M. affinis*) และสารสกัดหยาบมาตรฐานจากรังไข่ของกึ่งตะกาดชนิดที่ 2 (*M. ensis*) โดยใช้สารสกัดหยาบจากรังไข่ของกึ่งตะกาด *M. ensis* ครึ่งที่หลุมของถาด ELISA และใช้ mouse anti-vitellogenin antiserum เจือจาง 1:20,000 41

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

- 1 แสดงปริมาณไวเทรโกลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในเลือดของกิ้งคกาด (*M. affinis*) ตัวเมียที่คำนวณได้จากการตรวจวัดโดยวิธี competitive ELISA เทียบกับไวเทรลินมาตรฐาน โดยใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรลิน และแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรโกลเจนินเปรียบเทียบกัน 42
- 2 แสดงปริมาณไวเทรโกลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เทียบกับดัชนีรังไข่ (OI-ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ของกิ้งคกาด (*M. affinis*) ที่มีพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ คือ ระยะที่ I ถึงระยะที่ IV และระยะหลังวางไข่ 1 วัน 43
- 3 แสดงลักษณะของรังไข่และปริมาณไวเทรโกลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของกิ้งคกาด (*M. affinis*) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ II และ III และหลังจากนำมาเลี้ยง 1 วัน 44
- 4 แสดงลักษณะของรังไข่และปริมาณไวเทรโกลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในเลือดของกิ้งคกาด (*M. affinis*) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ IV และหลังจากนำมาเลี้ยง 1 วัน 45
- 5 แสดงปริมาณไวเทรโกลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในเลือดของกิ้งคกาด (*M. affinis*) หลังจากวางไข่ 1, 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ 46
- 6 แสดงข้อมูลดิบของลักษณะของรังไข่และปริมาณไวเทรโกลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของตัวอย่างกิ้งคกาด *M. affinis* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ คือระยะที่ I ถึง IV และระยะหลังจากวางไข่ 1 วัน 59

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในวงการสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสเตเชีย (crustacean) เช่นพวกกุ้งและปูชนิดต่าง ๆ พัฒนาการของเซลล์ไข่ในรังไข่จะมีการสะสมของโปรตีนต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ ไวเทลลิน (vitellin) หรือไลโปไวเทลลิน (lipovitellin) ในส่วนของไข่แดง (yolk) ไวเทลลินเป็นโปรตีนขนาดใหญ่อยู่ร่วมกับไขมัน คาร์โบไฮเดรตและคาร์ตีนอยด์ในรูปของ lipoglyco-carotenoprotein น้ำหนักโมเลกุลของไวเทลลินในสัตว์พวกครัสเตเชียส่วนมากจะอยู่ระหว่าง 290-560 กิโลดาลตัน (KD) ซึ่งจำนวนของหน่วยย่อย (subunit) ของไวเทลลินที่แยกบริสุทธิ์โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS polyacrylamide gel electrophoresis) ภายใตสภาวะที่เสียสภาพธรรมชาติ (denature) พบว่า มีจำนวนต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 2-11 หน่วยย่อยซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 40-200 กิโลดาลตัน (Lui and O'Connor. 1977; Eastman-Reks and Fingerma. 1985; Zagalsky. 1985; Tom, Goren and Ovadia. 1987; Quinitio and others. 1989) การมีคาร์ตีนอยด์เป็นส่วนประกอบทำให้ไวเทลลินจากรังไข่มีสีที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นกับชนิดของสัตว์ เช่น สีม่วงในปูเสฉวน (hermit crab) *Eupagurus bernhardus* L. (Cheesman and Prebble. 1966) สีเขียวในกุ้งล็อบสเตอร์ (lobster) *Homarus* sp. สีเหลืองในปูม้า (blue crab) *Callinectes sapidus* (Kerr. 1969) สีเขียวในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Quinitio and others. 1990) ส่วนใน penaeid ชนิดอื่น ๆ ไวเทลลินในรังไข่จะมีสีเขียวเข้ม (Zagalsky, Cheesman and Ceccaldi. 1967)

ไวเทลลินเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในรังไข่ที่กำลังเจริญเท่านั้น (Wolin, Laufer and Albertini. 1973) การสะสมของไวเทลลินภายในรังไข่ของสัตว์พวกครัสเตเชียนี้อาจจะอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนหลายชนิด เช่น ฮอร์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ (Gonad Inhibiting Hormone-GIH หรือ Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH)

ฮอร์โมนที่กระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนิ (Vitellogenesis Stimulating Hormone หรือ VSH) ฮอร์โมนจากรังไข่ที่กระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนิ (Vitellogenesis Stimulating Ovarian Hormone หรือ VSOH) methyl farnesoate และ Ecdysteroid (Fingerman. 1987; Charniaux-Cotton and Payen. 1988; Hasegawa, Hirose, and Katakura. 1993) แต่ฮอร์โมนที่มีบทบาทเด่นชัดได้แก่ VIH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่ยับยั้งการเจริญของรังไข่ แหล่งสร้างและเก็บสะสมของฮอร์โมนนี้คาดว่าจะเป็นในก้านตา (eyestalk) (Soyez, Deijnen and Martin. 1987) ดังนั้นเมื่อกำลายก้านตาโดยวิธีการบีบตาหรือตัดก้านตาทั้งจึงมีผลชักนำให้เกิดการเจริญของรังไข่ได้ เช่น ในกุ้งทะเล *Penaeus vannamei* ที่อยู่ตามธรรมชาติ พบว่ารังไข่จะมีการเจริญเติบโตเต็มที่ภายใน 1-2 เดือน แต่เมื่อตัดก้านตาของกุ้งชนิดนี้ออก รังไข่จะสามารถเจริญเต็มที่ในระยะเวลา 14 วัน ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ ทำให้รังไข่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วกว่าปกติ (Quackenbush. 1989) แต่วิธีการทำลายก้านตานอกจากผลที่ได้จะไม่แน่นอนเพราะเป็นการทำลายสมดุลของฮอร์โมนอื่น ๆ ภายในก้านตาก็ด้วย เช่นฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (Molting Inhibiting Hormone หรือ MIH) (Webster and Keller. 1986) ฮอร์โมนที่ควบคุมการเพิ่มของระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone หรือ CHH) (Huberman and Aquilar. 1988) ฮอร์โมนที่ควบคุมสีตัวคือ ฮอร์โมนที่ช่วยในการรวมตัวของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์ (Red Pigment Concentrating Hormone หรือ RPCH) (Fernelund and Josefsson. 1972) และฮอร์โมนที่ช่วยในการกระจายตัวของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์ (Pigment Dispersing Hormone หรือ PDH) (Rao and others. 1985) และฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางสรีระอีกหลายกระบวนการ นอกจากนี้วิธีการทำลายก้านตาก็ยังผลทำให้การผลิตไข่ไม่สมบูรณ์ อัตราการผสม อัตราการอยู่รอดของลูกกุ้งลดลง และยังทำให้แม่พันธุ์ที่ใช้ตายด้วย ทำให้ต้องหาแม่พันธุ์มาทดแทนตลอดเวลาซึ่งเป็นผลให้ต้องเพิ่มต้นทุนในการผลิตและขาดแคลนแม่พันธุ์อยู่เสมอ ดังนั้นถ้าสามารถแยกฮอร์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ออกจากฮอร์โมนอื่น ๆ ที่อยู่ภายในก้านตาได้ ก็จะสามารถนำฮอร์โมนนี้มาสร้างแอนติบอดี (antibody) เพื่อนำไปใช้ในการลดอิทธิพลหรือหยุดยั้งการทำงานของฮอร์โมนชนิดนี้ได้และอาจสามารถชักนำพัฒนาการของรังไข่ในสัตว์พวกนี้ได้โดยไม่ต้องทำลายก้านตา ซึ่งก็จะมีผลทำให้ไม่กระทบกระเทือนต่อการทำงานของฮอร์โมนอื่น ๆ ในขณะที่รังไข่กำลังพัฒนา

ได้ต่อไป

กุ้งและสัตว์ครัสตาเซียชนิดอื่น ๆ ที่มีรังไข่กำลังพัฒนาจะพบโปรตีนอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า ไวเทโลโลเจนิน (vitellogenin) ซึ่งเป็นโปรตีนในเลือดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับไวเทลลินที่อยู่ในรังไข่ (Quinitio and others. 1990) ไวเทโลโลเจนินจะมีการสร้างมาจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ตับ-ตับอ่อน (hepatopancreas) (Paulus and Laufer. 1987; Yano and Chinzei. 1987) หรือสร้างมาจาก fat body เช่นในสัตว์พวก amphipods และ isopods แล้วจะถูกลำเลียงมายังรังไข่ทางระบบหมุนเวียนโลหิตเข้าสู่รังไข่ จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นไวเทลลินหรือไลโปไวเทลลิน ซึ่งการสร้างไวเทลลินจะสัมพันธ์กับพัฒนาการของไข่ (Charniaux-Cotton. 1985; Suzuki, Yamazaki and Katakura. 1987; Tom, Goren and Ovadia. 1987) ดังนั้นระดับไวเทโลโลเจนินในเลือดอาจมีความสัมพันธ์โดยตรงกับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ ของวงจรการสืบพันธุ์ของสัตว์ในพวกครัสตาเซีย และอาจใช้เป็นดัชนีสำหรับการเจริญของรังไข่ เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบฮอร์โมนที่ยับยั้งการเจริญของรังไข่เพื่อการแยกสัณฐานวิทยาที่เกี่ยข้องกับพัฒนาการของรังไข่และศึกษาชีววิทยาของการสืบพันธุ์ในสัตว์พวกครัสตาเซีย

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับไวเทลลินจากรังไข่ และไวเทโลโลเจนินในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียชนิดต่าง ๆ ได้มีผู้ทำการศึกษาบ้างแล้วดังนี้

วอลล์, วอล์คเกอร์และฮอสชกา (Wallace, Walker and Hauschka. 1967) ได้แยกไลโปไวเทลลินจากรังไข่ของ decapod 6 ชนิด ได้แก่ ปูเสฉวน (hermit crab) *Pagurus pollicaris* ปูก้ามดาบ (fiddler crab) *Uca pugilator* ปูแสม *Sesarma reticulatum* ปูแมงมุม (spider crab) *Libinia emarginata* กุ้งล็อบสเตอร์ (lobster) *Homarus americanus* และปูหิน (rock crab) *Cancer irroratus* โดยใช่วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และจากการตรวจสอบค่าสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอน (sedimentation coefficient) ของไลโปไวเทลลินจากสัตว์ทั้ง 6 ชนิด พบว่าไลโปไวเทลลินมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 330,000-350,000 ดาลตัน

ในการตรวจหาโปรตีนในเลือดที่มีลักษณะเหมือนไลโปโวกเทลิน วอลิน, ลัฟเฟอร์และอัลเบอร์ติน (Wolin, Laufer and Albertini. 1973) ได้สร้างแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโปรตีนในเลือด (hemolymph) ของปูก้ามดาบ (*Uca pugilator*) ตัวเมีย และจากการใช้แอนติซีรัมนี้ในวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion) พบว่าในเลือดของปูก้ามดาบและปูแมงมุม (*Libinia emarginata*) ในระยะที่มีการสะสมของไข่แดงจะพบโปรตีนที่มีลักษณะเหมือนกับไลโปโวกเทลิน แต่จะไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในเลือดของปูตัวผู้หรือปูตัวเมียที่รังไข่ยังไม่เจริญเต็มที่ และจากการใช้สี trypan blue หรือใช้ไลโปโวกเทลินเชื่อมต่อกับสารเรืองแสงบ่มกับรังไข่ของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ 3 ชนิดคือ ปูก้ามดาบ ปูแมงมุม และกุ้ง crayfish *Cambarus clarki* สรุปได้ว่ากระบวนการไพโนไซโทซิส (pinocytosis) ของไลโปโวกเทลินจากเลือดจะมีบทบาทสำคัญในการสะสมของไข่แดงโดยเซลล์ไข่ (oocyte) สำหรับโปรตีนชนิดอื่น ๆ อาจสร้างภายในเซลล์ไข่เอง

ส่วนฟิปป์และโอคอนเนอร์ (Fyffe and O'Connor. 1974) ได้ศึกษาไลโปโวกเทลินในกุ้ง crayfish *Procambarus* sp. โดยใช้อันติซีรัมที่จำเพาะต่อโปรตีนในเลือดของกุ้ง-ตัวเมียทำปฏิกิริยากับไลโปโวกเทลินโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (immunodiffusion) และอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส (immunoelectrophoresis) พบว่า โปรตีนในเลือดของกุ้งชนิดนี้มีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสตรี้ (immunochemistry) หรือลักษณะทางเคมีที่ตรวจสอบโดยการใช้อันติบอดีเหมือนกับไลโปโวกเทลิน และจากการศึกษาลักษณะทางเคมีของไลโปโวกเทลิน พบว่าเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 500,000 คาลตัน ประกอบด้วยไขมัน (lipid) 35% ซึ่งการสะสมของไลโปโวกเทลินในเซลล์ไข่จะเพิ่มขึ้นถึง 1,000 เท่าจากเซลล์ไข่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.35 มิลลิเมตรและเพิ่มขึ้นเป็น 2.0 มิลลิเมตร

ลูและโอคอนเนอร์ (Lui and O'Connor. 1976) ได้ศึกษาส่วนประกอบของกรดอะมิโนของไลโปโวกเทลินหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยจากทั้งหมด 5 หน่วยย่อยในกุ้ง crayfish *Procambarus* sp. และจากการบ่มรังไข่ด้วย tritiated leucine (^3H leucine) พบว่ากรดอะมิโนที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีนี้จะถูกนำเข้าสู่ไลโปโวกเทลินหน่วยย่อย 3 หน่วย แสดงว่ารังไข่ระยะที่มีการสะสมของไข่แดงสามารถสังเคราะห์ไลโปโวกเทลินได้เอง และต่อมาในปี 1977 ลูและโอคอนเนอร์ยังได้ทำการแยกสกัดและตรวจหาส่วนประกอบของกรดอะมิโนจากไลโปโวกเทลินในปูแสม

Pachygrapsus crassipes และศึกษาในท่านองเดียวกันพบว่ารังไข่ของปูสมสามารถสังเคราะห์ไลโปโปรตีนได้ โดยสามารถนำ tritiated-leucine เข้าสู่หน่วยย่อยหลัก 2 หน่วยย่อยของไลโปโปรตีนเช่นกัน

ในปี 1984 ไบเอ็ดและไอเคน (Byard and Aiken, 1984) ได้ใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไลโปโปรตีนของกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* ในวิธีอิมมูโนคิฟิเวชัน พบว่าโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมีย (female specific protein-FSP) ในเลือดของกุ้งระยะที่มีการสะสมไข่แดง จะมีลักษณะคล้ายกับไลโปโปรตีนจากเซลล์ไข่ ซึ่งระดับของ FSP นี้ในเลือดจะเพิ่มขึ้นในระหว่างที่มีการสะสมของไข่แดง และเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุดก่อนการวางไข่ แต่ไม่พบ FSP ในกุ้งที่วางไข่อยู่ในระยะพักหรือในกุ้งตัวเมื่อก่อนการลอกคราบ ระดับของ FSP ในเลือดนี้อาจเป็นดัชนีที่ดีสำหรับการสะสมไข่แดงในรังไข่ เนื่องจากสารต้นกำเนิด (precursor) ของไลโปโปรตีนสร้างจากภายนอกรังไข่แล้วนำเข้าสู่เซลล์ไข่

เดอเรลและคนอื่น ๆ (Derelle and others, 1986) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไลโปโปรตีนจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* และได้ใช้วิธี sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ในการตรวจหาระดับไลโปโปรตีนในเลือดของกุ้งในช่วงต่าง ๆ ของวงจรการสืบพันธุ์และการลอกคราบ พบว่าระดับไลโปโปรตีนอยู่ในระดับต่ำในตอนต้นของวงจรการสืบพันธุ์และการลอกคราบ และจะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดในระยะช่วงก่อนการลอกคราบช่วงต้นจนถึงก่อนการลอกคราบช่วงกลาง (D_0-D_1') และลดลงอย่างรวดเร็วก่อนการลอกคราบช่วงปลายและวางไข่ ($D_1''-D_2$)

ต่อมาทอม, กอเรนและโอวาเดีย (Tom, Goren and Ovadia, 1987 a, b) ได้สร้างแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไลโปโปรตีนจากรังไข่ของกุ้งทะเล *Parapenaeus longirostris* ซึ่งจากการใช้แอนติซีรัมนี้ในวิธีอิมมูโนคิฟิเวชัน อิมมูโนอิเล็กโตรฟอเรซิสและอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (immunofluorescence) พบสารคล้ายไลโปโปรตีนในก้อนไข่แดงของเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนา แต่จะไม่พบสารคล้ายไลโปโปรตีนดังกล่าวนี้ในรังไข่ที่อยู่ในระยะแรกของการพัฒนา สารคล้ายไลโปโปรตีนนี้ยังพบในส่วนอื่น ๆ ได้แก่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง (subepidermal adipose tissue) และในเลือด ซึ่งเป็นเครื่องชี้ว่าไลโปโปรตีนในรังไข่มาจากแหล่งอื่นนอกรังไข่

ส่วนความพยายามที่จะแยกบริสุทธิ์ไลโปโปรตีนนั้น ควินิติโอและคนอื่น ๆ (Quinitio and

others. 1989) ได้แยกบริสุทธิ์ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งน้ำจืด (*Pandalus kessleri*) โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี 3 ชั้นตอน คือ hydroxylapatite, DEAE (diethylamino-ethyl) cellulose และ sepharose 6B ตามลำดับ และรายงานว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 560,000 คาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยมีน้ำหนักโมเลกุล 81,000 และ 110,000 คาลตัน ตามลำดับ และยังพบว่าโปรตีนที่จำเพาะสำหรับตัวเมียในเลือดของกุ้งชนิดนี้ จะมีลักษณะเหมือนกับไวเทลลินที่ได้จากรังไข่โดยการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิสและอิมมูโนดิฟฟิวชันและพบว่าความเข้มข้นของไวเทลโลเจนินในเลือดจะเพิ่มขึ้นขณะมีการสะสมไข่แดงในรังไข่ และจะลดลงหลังจากกุ้งวางไข่แล้ว

และในปี 1990 ควินิติโอและคนอื่น ๆ (Quinitio and others. 1990) ได้แยกบริสุทธิ์ไวเทลลินจากรังไข่กุ้งกุลาค่า (*Penaeus monodon*) ด้วยวิธีการ 2 ชั้นตอนคือ ion exchange chromatography กับ gel filtration chromatography และได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบไวเทลลินของกุ้งกุลาค่ากับไวเทลลินจากกุ้งทะเลชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชันโดยใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งกุลาค่า พบว่าแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับไวเทลลินจากกุ้งกุลาค่า ไวเทลลินจากกุ้งแปบียาค่า (*Penaeus indicus*) ไวเทลลินจากกุ้งแปบิวขาว (*Penaeus merguensis*) และไวเทลลินจากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus semisulcatus*) แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับไวเทลลินของกุ้งน้ำจืด (*Pandalus kessleri*) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของไวเทลลินของกุ้งในวงศ์ (family) Penaeidae แต่อาจแตกต่างจากไวเทลลินของกุ้งต่างวงศ์

จากรายงานการศึกษาไวเทลลินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียชนิดต่าง ๆ นั้น พบว่า ในเลือดของสัตว์เพศเมียกลุ่มนี้จะมีไวเทลโลเจนินซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมีย โดยจะมีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสรีเหมือนกับไวเทลลินในรังไข่ ซึ่งระดับของโปรตีนนี้ในเลือดจะสัมพันธ์กับวงจรการสืบพันธุ์และการลอกคราบ จึงคาดว่าในกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* น่าจะมีโปรตีนจำเพาะสำหรับเพศเมียที่คล้ายกับไวเทลลินในรังไข่และมีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนในเลือดสัมพันธ์กับวงจรการสืบพันธุ์ของกุ้งชนิดนี้เช่นกัน

ในการศึกษารังไข่ได้เลือกศึกษาในกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* เนื่องจากเป็นกุ้งอยู่ในวงศ์เดียวกับในกุ้งกุลาค่า *Penaeus monodon* ซึ่งเป็นกุ้งทะเลที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรม

กรรมการเลี้ยงกุ้งในปัจจุบัน แต่การศึกษาในกุ้งกุลาดำโดยตรงมีอุปสรรคตรงที่กุ้งกุลาดำขนาดโตเต็มวัย มีขนาดใหญ่และราคาสูง ต้องจับจากธรรมชาติซึ่งมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอ ในขณะที่กุ้งตะกาดมีขนาดเล็กเหมาะสมสำหรับการดูแลรักษา สามารถจัดหาตัวเต็มวัยได้มากเพียงพอในราคาที่ไม่แพง ดังนั้นจึงคาดว่าผลการศึกษาจากกุ้งตะกาดสามารถประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำและกุ้งทะเลชนิดอื่น ๆ ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจได้ เนื่องจากในแง่วิวัฒนาการและการดำรงชีวิตของกุ้งในวงศ์นี้มีความแตกต่างกันไม่มาก

ชีววิทยาของกุ้งตะกาด

กุ้งตะกาด เป็นกุ้งทะเลซึ่งมีการจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานดังนี้ (Holthuis, 1980)

คือ

Phylum Arthropoda

Subphylum Mandibulata

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Infraorder Penaeidea

Family Penaeidae

Genus Metapenaeus

ลักษณะทั่วไปของกุ้งตะกาด

กุ้งตะกาดเป็นกุ้งขนาดเล็กขนาดความยาวลำตัวประมาณ 70-150 มิลลิเมตร เปลือกตัวแข็ง มีสีน้ำตาลเข้ม มีเส้นกรวยาวจรดขอบหลังของเปลือกส่วนหัว ที่สันกรีบมีฟันกรืออยู่ 7-8 อัน ส่วนที่สันกรีล่างไม่มีฟันกรือ ขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีหนามตรงโคนขา ส่วนขาเดินคู่ที่ 1 มีหนามบนปล้องที่ 5 โคนขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์ยื่นนอกและที่ขอบหางไม่มีหนาม กุ้งตะกาดมีถิ่นอาศัยในแถบอินโดแปซิฟิก ตั้งแต่ชายฝั่งของออสเตรเลียไปจนถึงญี่ปุ่นและช่องแคบมะละกา เป็นกุ้งที่วางไข่ตลอดทั้งปี

พบทุกชุมตลอดทั้งปีในบริเวณชายฝั่งและในบริเวณน้ำกร่อย (ปิยะพงศ์ รัชติพันธุ์. 2529) กุ้งตะกาดที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิด (ประจวบ หล้าอุบล. 2525, สุภาวดี จุลละสรา. 2525) เช่น

1. *Metapenaeus brevicornis* (Yellow shrimp) หรือกุ้งหัวมัน กุ้งตะกาดกริต้า
2. *M. conjunctus*
3. *M. lysianassa* (Bird shrimp) หรือกุ้งตะกาด
4. *M. tenuipes*
5. *M. intermedius*
6. *M. affinis*
7. *M. elegans*
8. *M. ensis* (Greasyback shrimp) หรือกุ้งตะกาด
9. *M. moyebi*
10. *M. anchistus*
11. *M. toloensis* (Tolo velvet shrimp) หรือกุ้งตะกาด
12. *M. monoceros* หรือกุ้งตะกาดกริจุล

ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างกุ้งตะกาดตัวผู้และตัวเมีย

กุ้งตะกาดเป็นสัตว์ที่มีเพศแยกกัน โดยกุ้งตัวผู้จะมีท่อส่งน้ำเชื้อไปเปิดออกบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 และตรงบริเวณโคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 จะมีอวัยวะตัวผู้เป็นแผ่นเชื่อมติดกัน ซึ่งเรียกว่าปีแอสมา (petasma) ส่วนกุ้งตัวเมียจะมีท่อนำไข่ไปเปิดออกบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 และตรงบริเวณระหว่างโคนขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 นั้น จะมีถุงเก็บน้ำเชื้อที่ได้รับจากตัวผู้หลังจากการผสมพันธุ์แล้ว เรียกว่าทีโลกัม (thelycum) ลักษณะของทีโลกัมในกุ้งแต่ละชนิดจะมีรูปร่างแตกต่างกันออกไป ซึ่งใช้ในการจำแนกชนิดของกุ้งได้ด้วย (ปิยะพงศ์ รัชติพันธุ์. 2529)

กุ้งตะกาด (*M. affinis*)

กุ้งตะกาดที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นกุ้งตะกาด *M. affinis* (ภาพประกอบ 1) ซึ่งมีลักษณะจำเพาะดังนี้คือ กริตรง ปลายกริงอนสั้นเล็กน้อย สันที่ต่อจากโคนกริไม่มนเด่นชัดและขาว

ไม่ถึงขอบหลังของเปลือกส่วนหัว ฟันกรรมีเฉพาะด้านบน เปลือกหัวทางด้านข้างมีหนามบริเวณโคน
 หนวดและหนามบนส่วนของเฮพาทิค (hepatic spine) ร่องข้างแก้มโค้งแต่ไม่เป็นรูปตัว C
 ด้านบนปล้องท้องที่ 2 ถึง 6 ยกขึ้นเป็นสัน เปลือกส่วนหัวและเปลือกส่วนท้องมีขนละเอียดสั้น ๆ
 กระจายอยู่ตามแอ่งทั่วไป ขาเดินคู่ที่ 1 ไม่มีหนามที่อิสเชียม (ischial spine) ลำตัวมีสี
 น้ำตาลอ่อน ขาวาสน้ำมีสีน้ำตาลปนเหลือง แพนหางมีสีเขียวปนเหลืองชนที่ขอบแพนหางมีสีน้ำเงิน
 ปนเหลือง ความยาวตัวประมาณ 70-150 มิลลิเมตร (ชูศิลป์ อัครชู. 2526, ศุภผล เทพเฉลิม.
 2527)

ลักษณะของกุ้งตะกาด (*M. affinis*) ตัวผู้และตัวเมีย ที่ขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้งตะกาด
 ตัวผู้ จะมีหนามไม่ยาวและที่เมอร์ส (merus) ของขาเดินคู่ที่ 5 จะมีปุ่ม 1 อัน ปิตัสมาตอน
 ปลายจะมีแผ่นบางคล้ายฝาปิด และบางส่วนที่ยื่นออกไปจะเรียบแบน ส่วนที่โค้งมนแผ่นหน้าจะนูนโค้ง
 คล้ายลิ้น มีร่องตามยาวและด้านหน้ามีแผ่นกลม ๆ ยื่นออก 2 ข้าง (ประจวบ หล้าอุบล. 2525)



ภาพประกอบ 1 แสดงภาพกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis*

รูปบน ตัวเมีย

รูปล่าง ตัวผู้

ลักษณะการเจริญของรังไข่ในกระดาง ๆ ของกุ้งตะกาด

การแบ่งระยะการเจริญของรังไข่ในกุ้งตะกาด (*M. affinis*) จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับในกุ้งทะเลชนิดอื่น ๆ ไพรมาวีลา (Primavera, 1983) ได้แบ่งลักษณะการเจริญของรังไข่ของกุ้งกุลาล่า (*Penaeus monodon*) ในกระดาง ๆ ไว้ดังนี้ (ภาพประกอบ 2)

ระยะที่ 1 เป็นระยะที่รังไข่ยังไม่พัฒนา (immature) รังไข่มีลักษณะบาง โปร่งแสง และมองไม่เห็นตลอดความยาวของเปลือกแข็งด้านหลัง (dorsal exoskeleton) และเมื่อผ่าตัดพบว่าเนื้อเยื่อรังไข่มีลักษณะเป็นเส้น ไม่มีสีและไม่เห็นเซลล์ไข่

ระยะที่ 2 เป็นระยะที่รังไข่กำลังพัฒนาในช่วงต้น ๆ (early maturing) รังไข่มีลักษณะบางและเห็นเป็นแถบเส้นตรงตลอดความยาวของเปลือกแข็งด้านหลัง รังไข่ระยะนี้จะเริ่มต้นของการเพิ่มขนาดโดยเฉพาะที่บริเวณด้านหน้าและตรงกลาง (anterior and middle lobes) รังไข่ในระยะนี้จะมีสีขาวขุ่นจนถึงสีน้ำตาลอ่อนและสีเขียวเทาอ่อน ๆ

ระยะที่ 3 เป็นระยะที่รังไข่มีการพัฒนาในช่วงท้าย (late maturing) ระยะนี้รังไข่จะมีลักษณะเป็นเนื้อนุ่มอยู่ตัวโดยจะเห็นเป็นแถบเส้นตรงตลอดความยาวของเปลือกแข็ง และจะแผ่ขยายออกจากส่วนอก (anterior thoracic region) จนถึงบริเวณส่วนท้ายของปล้องท้อง (posterior abdominal region) นอกจากนั้นที่บริเวณปล้องท้อง (abdominal segment) ปล้องแรกจะเห็นเป็นรูปสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด (diamond หรือ butterfly) เล็กน้อย รังไข่ในระยะนี้จะมีสีเขียวอ่อนและจะเห็นเม็ดเล็ก ๆ ของเซลล์ไข่ด้วย

ระยะที่ 4 เป็นระยะที่รังไข่เจริญเต็มที่หรือระยะที่ไข่สุก (mature or ripe) ระยะนี้พบว่าที่บริเวณส่วนท้องปล้องแรกจะเห็นรังไข่รูปสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น และรังไข่สามารถมองเห็นเป็นแถบเส้นตรงหนา ระยะนี้รังไข่จะมีสีเขียวเข้มและขยายออกเต็มช่องว่างของส่วนหลัง

ระยะที่ 5 เป็นระยะที่เกิดหลังจากการวางไข่ (spent) พบว่ารังไข่จะมีลักษณะอ่อนนุ่มและบางไม่อยู่ตัว โดยลักษณะภายนอกจะคล้ายคลึงกับรังไข่ระยะที่ 1 ถ้ากุ้งวางไข่ไม่สมบูรณ์หรือไม่หมดจะเห็นส่วนของไข่เป็นสีเหลืองกระจายอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของรังไข่



ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะการเจริญของรังไข่ในระยะที่ I ถึงระยะที่ IV ของกึ่งกลาค่า
(จากซ้ายไปขวา)

ขั้นตอนของการสร้างไข่ (oogenesis)

เริ่มต้นจากโอโอโทโกเนีย (oogonia) ที่อยู่ในบริเวณตรงกลางของรังไข่ (germinative zone) มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) โดยโอโอโทโกเนียที่มีการแบ่งเซลล์นี้ แต่ละเซลล์จะถูกล้อมรอบด้วยมีโซเดอร์มัลเซลล์ (mesodermal cell) จากนั้นโอโอโทโกเนียจะหลุดออกจากบริเวณตรงกลางของรังไข่ แล้วเข้าสู่การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ระยะต่าง ๆ ตั้งแต่ระยะโปรเฟส (prophase) จนถึงระยะไดอะคิเนซิส (diakinesis) จนกระทั่งกลายเป็นเซลล์ไข่ระยะแรก (primary oocytes) ระยะต่อมาเป็นระยะก่อนมีการสะสมของโปรตีนของไข่แดง เรียกว่า previtellogenesis ซึ่งในระยะนี้จะมีอัตรากาการสร้างและสะสมของไรโบโซม (ribosome) และ rough endoplasmic reticulum (RER) สูง ซึ่งจะพัฒนาเป็นเซลล์ไข่ระยะแรก โดยจะเห็นนิวคลีโอลัสชัดเจนและเซลล์บางเซลล์เริ่มมีฟอลลิคิวลาร์เซลล์ระยะแรก (primary follicular cell) ล้อมรอบ ระยะต่อมาจะเป็นระยะที่เซลล์ไข่มีการสะสมไข่แดง ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ระยะคือระยะการสะสมไข่แดงระยะแรก (primary vitellogenesis) พบว่าจะมี RER vesicle จำนวนมากโดยจะมีการสะสมของไกลโคโปรตีน (endogenous glycoprotein) ใน RER ทำให้เซลล์ไข่ระยะนี้เต็มไปด้วยสารที่อยู่ในแกรนูล (granular material) ส่วนการสะสมไข่แดงระยะที่ 2 (secondary vitellogenesis) จะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ภายในรังไข่จนกระทั่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของไวเทลโลเจนีนมากขึ้น ในระยะนี้เซลล์ไข่จะมี RER ซึ่งเป็นแหล่งสร้างไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสตรี้ แตกต่างจากไวเทลโลเจนีน พบว่าจะมีก้อนไขมัน (lipid droplets) เกิดขึ้นที่ผิวรอบนอกของโอโอพลาสมา (ooplasma) และจะแพร่กระจายไปทั่ว นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ไข่ในระยะนี้จะถูกล้อมรอบด้วยฟอลลิคิวลาร์เซลล์ระยะที่ 2 (secondary follicular cell) โดยจะเรียงตัวเป็นชั้นเดียวและมีท่อร่างแห (tubular network) เป็นเส้นทางลำเลียงไวเทลโลเจนีนจากเลือดเพื่อเข้าไปยังเซลล์ไข่ ซึ่งมีผลทำให้มีการสะสมของไวเทลโลเจนีนในเซลล์ไข่เพิ่มมากขึ้น (Charniaux-Cotton, 1985)

สำหรับการศึกษารังไข่นี้เป็นการศึกษาการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนไวเทลลินที่แยกได้จากรังไข่ แล้วใช้แอนติบอดีดังกล่าวในการตรวจวัดระดับของไวเทลโลเจนีนในเลือดของกิ้งก่าเทศที่มีพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ทั้งนี้เพื่อจะศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ

ไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบผลของฮอว์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ให้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้นในระหว่างการแยกบริสุทธิ์ฮอว์โมนชนิดนี้จากก้านตาต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินจากรังไข่ของกิ้งก่า
2. เพื่อพัฒนาการตรวจหาและวัดปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดกิ้งก่าโดยใช้วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ในกิ้งก่า

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของกิ้งก่า
2. ทราบถึงวิธีการตรวจหาและประสิทธิภาพในการตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนินในกิ้งก่าด้วยวิธี enzyme immunoassay
3. ทราบความสัมพันธ์ของระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ ของกิ้งก่า
4. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ (bioassay) ฮอว์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone หรือ VIH)
5. สามารถใช้ตรวจสอบลักษณะทางอิมมูโนเคมีสตรีของไวเทลลินจากกิ้งก่าชนิดต่าง ๆ

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. แยกสกัดไวเทลลินจากรังไข่และไวเทลโลเจนินจากเลือดกิ้งก่า (*H. affinis*)
2. ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินจากรังไข่และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากเลือด

3. ตรวจคุณภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธีอิมมูโนลอฟฟิชั่น อิมมูโน-อิเล็กโตรโฟเรซิส และ competitive ELISA

4. ตรวจวัดระดับของไวเทอลโลเจนนในเลือดของกึ่งตะกาดโดยวิธี competitive ELISA เทียบกับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ไวเทอลิน หมายถึงโปรตีนของไข่แดงที่พบอยู่ในรังไข่ของสัตว์พวกครัสตาเซีย
2. ไวเทอลโลเจนน หมายถึงโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมีย โดยพบอยู่ในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียที่มีรังไข่กำลังพัฒนา ซึ่งจะมีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสตรีกคล้ายกับไวเทอลินจากรังไข่

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

1. กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) ที่มีการเจริญของรังไข่ในระยะต่าง ๆ (I-IV) น้ำหนักประมาณ 15-25 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
2. กุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) ที่มีการเจริญของรังไข่ในระยะต่าง ๆ (I-IV) น้ำหนักประมาณ 15-25 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
3. กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ตัวเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 80-120 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
4. กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ตัวเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 13-40 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
5. หนูขาว (Swiss mouse) จากศูนย์สัตว์ทดลองสาธาณฯ จังหวัดนครปฐม

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. อ่างเลี้ยงกุ้ง และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการเลี้ยงกุ้ง
2. เครื่องบดทำให้เนื้อเยื่อเซลล์แตก (homogenizer, Janke & Kunkel)
3. เครื่องปั่นชนิดอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge, Beckman model J2-21)
4. กุ้งไตอะไลซิส (dialysis tube)
5. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, Shimadzu UV-visible recording spectrophotometer UV-240)

6. ถาด ELISA ชนิด 96 หลุม (ELISA microtiter plate, Maxisorp Nunc 442404)
7. เครื่องอ่านถาด ELISA (microplate reader, Titertek Multiskan MCC/340 MK II)
8. เครื่องเจาะวัน (gel puncher)
9. อิเล็กโตรโฟรีติกแชมเบอร์ (electrophoretic chamber, EP chamber)
10. เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (power supply)
11. ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง (ultrafreezer) -70 องศาเซลเซียส และ -25 องศาเซลเซียส
12. ออโตไพเปตและไพเปตทิน (autopipette and pipettetip)
13. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

สารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2
(Phosphate Buffer Saline-PBS) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
2. 0.5 mM EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma)
3. แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (saturated ammonium sulfate- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
4. Complete Freund's adjuvant (Sigma)
5. Incomplete Freund's adjuvant (Sigma)
6. เมอร์ไธโอเลต 1% (merthiolate, Sigma)
7. วุ้น 1.2% (agar, Difco) ใน PBS
8. สีย้อม (staining solution, 0.1% Coomassie blue R 250 (Sigma), เมทานอล 50% , กรดอะซิติก 10%)
9. น้ำยาล้างสี (destaining solution)
 - น้ำยาล้างสี 1 (destain 1, เมทานอล 50% , กรดอะซิติก 10%)
 - น้ำยาล้างสี 2 (destain 2, เมทานอล 5% , กรดอะซิติก 7%)

10. Bradford solution (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
11. กลูตาวัลดีไฮด์ 25% (glutaraldehyde, Sigma)
12. นมผงพร่องมันเนย 5% (Carnation non-fat dry milk)
13. Triton X-100 (Sigma)
14. Goat antimouse IgG H and L chain horseradish-peroxidase conjugate (GAM-HRP, Biorad)
15. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% (H_2O_2 , Sigma)
16. O-Phenylenediamine-dihydrochloride (OPD, Sigma)
17. ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 (Citrate buffer)
(วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
18. กรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล (H_2SO_4)
19. โบเรตบัฟเฟอร์ซาลิน พีเอช 8.6 (Borate buffer saline)
(วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
20. ฟีนอลเรด (phenol red)
21. น้ำแข็งแห้ง (dry ice)

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกิ้งคตา (*M. affinis*)
2. การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินในหนูขาว
3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้
4. การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิในเลือดของกิ้งคตา (*M. affinis*)
5. การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของรังไข่กับระดับไวเทลโลเจนิในเลือด
6. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ได้ ในการตรวจหาไวเทลลินหรือไวเทลโลเจนิจากกิ้งคตาชนิดที่สอง (*M. ensis*)

1. การเตรียมสารสกัดไวเทอลินจากรังไข่กึ่งตกค้าง

1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากรังไข่ (ovarian crude extract)

นำรังไข่กึ่งตกค้าง (*M. affinis*) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ III หรือ IV (รังไข่มีลักษณะสีเขียวเข้ม) มาล้างในน้ำเย็นจัด ผ่าตัดเอารังไข่ออกมาทำให้แห้งอย่างรวดเร็วด้วยน้ำแข็งแห้งและเก็บรวบรวมไว้ในตู้เย็นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำรังไข่มาบดใน PBS ที่มี 0.5 mM EDTA (อัตราส่วน 1 กรัมต่อ 2 มิลลิกรัม) ด้วยเครื่องบดทำให้เนื้อเยื่อเซลล์แตก แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นไขมันด้านบน (สีส้ม) และตะกอน (pellet) ออก นำส่วนของสารละลายสีเขียวเข้มหรือสารสกัดหยาบจากรังไข่มาวัดปริมาตร จากนั้นนำไปแยกต่อในข้อ 1.2

1.2 การแยกไวเทอลินโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายสีเขียวเข้ม (จากข้อ 1.1) มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 45% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (อัตราส่วน 9:11) นำสารละลายที่ได้ไปปั่นที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนตะกอนทิ้ง ส่วนสารละลายที่ได้นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 65% อีกครั้ง นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็วเท่าเดิมเป็นเวลา 40 นาที แยกเอาส่วนตะกอนออก ส่วนสารละลายที่ได้นำไปปั่นอีกครั้งเพื่อแยกเอาตะกอนที่ยังเหลืออยู่ออก นำเอาส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่น 2 ครั้งหลังมาละลายใน PBS และทำไดอะไลซิส (dialysis) ใน PBS 3 ครั้งนาน 48 ชั่วโมง สารละลายที่ได้จะเป็นสารสกัดไวเทอลิน แบ่งสารสกัดไวเทอลินที่ได้เก็บในหลอดปิดฝา (microcentrifuge tube) หลอดละ 1 มิลลิกรัม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -25°C องศาเซลเซียสจนกระทั่งใช้

นำสารสกัดไวเทอลินที่ได้มาตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976) เทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ซึ่งการตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford มีรายละเอียดดังนี้คือ

ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง (test tube) ปริมาตร 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วเติมน้ำกลั่น (double distilled water) ลงทุกหลอดจนมีปริมาตรเท่ากับ

100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลาย Bradford ลงไปในแต่ละหลอดปริมาตร 3 มิลลิลิตร เทย่า ทิ้งไว้เป็นเวลา 5-10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟเทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ใช้

ส่วนสารสกัดไวเทลลินที่ใช้ตรวจหาปริมาณโปรตีนจะทำเช่นเดียวกัน โดยใช้สารสกัดไวเทลลินที่เจือจางอยู่ในช่วงเดียวกับกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดไวเทลลินที่ได้

ส่วนการเตรียมสารสกัดหนาสจากอัณฑะ (testis) ของกิ้งก่า (M. affinis) ตัวผู้และจากรังไข่ของกิ้งก่าชนิดอื่นคือ กิ้งก่าชนิดที่สอง (M. ensis) กิ้งก่าดำ (P. monodon) และกิ้งก่ากรม (M. rosenbergii) เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมต่อไวเทลลินจะเตรียมตามวิธีในข้อ 1.1

การเก็บเลือดของกิ้งก่าต่าง ๆ เพื่อทดสอบปฏิกิริยาของแอนติซีรัม เก็บโดยใช้เข็มฉีดยาดูดเลือดจากบริเวณขาเค้นคู่ที่ 4 หรือ 5 ใส่ไว้ในหลอดปิดฝา เก็บเลือดไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้

2. การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินในหนูขาว (mouse anti-vitellin antiserum)

นำสารสกัดไวเทลลินที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ผสมกับ complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 นำสารสกัดไวเทลลินที่ผสมแล้วมาฉีดในหนูขาวประมาณ 1.5-2 มิลลิกรัมต่อตัว จากนั้นฉีดหนูลำตัวอีก 2 ครั้งทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยการฉีดในครั้งที่ 2 จะผสมกับ incomplete Freund's adjuvant และการฉีดครั้งที่ 3 หรือก่อนเก็บซีรัมจะไม่ผสมแอดจูแวนท์ (adjuvant) หลังจากการฉีดสารสกัดไวเทลลินครั้งที่ 3 แล้ว 1 สัปดาห์ จะเก็บรวบรวมซีรัมจากหนู โดยการเจาะเลือดทางเข้าตา เลือดที่ได้ทิ้งไว้ให้แข็งตัวนำไปปั่นที่ 5,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนของซีรัมแบ่งเก็บเป็นส่วนใหญ่ ๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งจะนำไปทดลองต่อไป

การเก็บเลือดของหนูในครั้งต่อมาจะเก็บทุก ๆ 1-2 เดือน โดยก่อนเก็บจะฉีดสารสกัดไวเทลลิน 1 สัปดาห์ก่อนเก็บเลือด

3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้

3.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน

(double immunodiffusion)

เทวุ้น 1.2% ที่ละลายใน PBS ปริมาตร 4.5-5 มิลลิลิตรลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเจาะรูให้เป็นหลุมกลม ๆ จากนั้นหยดแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบลงหลุมตรงกลางและแอนติเจนชนิดต่าง ๆ คือ สารสกัดหยาบจากอวัยวะและเลือดของกิ้งคกาด (*M. affinis*) ตัวผู้หรือสารสกัดหยาบจากรังไข่ของกิ้งกั้ง 4 ชนิดคือ กิ้งคกาด *M. affinis* และ *M. ensis* กิ้งกูดล่าและกิ้งก้านกราม หรือตัวอย่างเลือดตัวเมียของกิ้งคกาด *M. affinis* และ *M. ensis* กิ้งกูดล่าและกิ้งก้านกรามที่ต้องการทดสอบลงในหลุมรอบ ๆ แต่ละหลุม หลังจากนั้นบ่ม (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในกล่องขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจผลโดยดูลักษณะแนวตะกอนที่เกิดขึ้น จากนั้นล้างโปรตีนส่วนที่ไม่เกิดแนวตะกอนออกโดยแช่ใน PBS หลาย ๆ ครั้ง เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วนำไปย้อมด้วยสีย้อมเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ล้างสีออกด้วยน้ำยาล้างสี 1 เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำยาล้างสี 2 จนกระทั่งวันใส แล้วนำไปตากให้แห้ง

3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส

(immunoelectrophoresis)

เทวุ้น 1.2% ที่ละลายในโบเรตบัฟเฟอร์ชาโลว์ พีเอช 8.6 ปริมาตร 4.5-5 มิลลิลิตรลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเจาะรูให้เป็นหลุมและวางอยู่ตรงกลาง คู่วัสดุเฉพาะที่หลุมเท่านั้น จากนั้นหยดสารสกัดหยาบจากรังไข่หรือเลือดจากกิ้งคกาด (*M. affinis*) ตัวเมียลงในหลุมโดยผสมกับซีเฟโนลเรต วางสไลด์ลงในอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีติกแชมเบอร์ (EP chamber) ปลอ่ยกกระแสไฟฟ้าผ่านนาน 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่งซีเฟโนลเรตเคลื่อนที่เกือบถึงปลายสไลด์ แล้วนำสไลด์ออกจาก chamber คู่วัสดุออกจากราง จากนั้นเติมแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบลงในราง หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในกล่องขึ้นเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงแล้ว ตรวจดูแนวตะกอนที่เกิดขึ้นและนำสไลด์ไปย้อมสีตามขั้นตอนเหมือนกับการย้อมสีสไลด์ในวิธีข้อ 3.1

3.3 การตรวจหาคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี ELISA (indirect immunoperoxidase method)

การตรวจหาคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี ELISA นี้ เพื่อตรวจหาไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัม โดยจะทำใน ภาค ELISA ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ใส่สารสกัดไวเทลลินจากข้อ 1.2 ที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิตร ซึ่งจะละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของภาค ELISA ทิ้งไว้เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไวเทลลินจับกับหลุม แล้วเติมด้วยกลูตาไรล-ดีไฮด์ 0.2% ที่ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/หลุม 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วย 5% blotto (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ๓) ที่เจือจาง 1:10 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมซีรัมจากหนูแต่ละตัวซึ่งเจือจางด้วย 5% blotto เป็น 1:2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจาง 1:2 ติดต่อกันตลอดแถว (ทำ two fold serial dilution) บ่มไว้ 12-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วย 5% blotto ที่เจือจาง 1:10 อีก 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที จากนั้นเติม goat anti-mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางด้วย 5% blotto ให้มีความเข้มข้น 1:1,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วย 5% blotto ที่เจือจาง 1:10 อีก 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วย PBS เติมสารละลาย 0-Phenylenediamine-dihydrochloride (OPD) ในซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 (1 มิลลิกรัม/มิลลิตร) ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล ปริมาตร 70 ไมโครลิตรทันทีเมื่อครบ 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านภาค ELISA คำนวณหาไตเตอร์ของแอนติซีรัม

3.4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี competitive ELISA

ใส่สารสกัดไวเทลลินที่เจือจางใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิตรลงในแต่ละหลุมของภาค ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากตรึง (fix) ด้วย

กลูตาไรลล์ไฮด์ 0.2% และบล็อก (block) ด้วย 5% blotto ที่เจือจาง 1:10 ตามกระบวนการ เช่นเดียวกับในข้อ 3.3 แล้วเติมสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ซึ่งมีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรโดยเจือจางด้วย 5% blotto ให้ความเข้มข้นระหว่าง 1:10 จนถึง 1:2,500,000 หรือตัวอย่างเลือดจากกึ่งตัวผู้ที่โตเต็มวัยและจากกึ่งตัวเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ III และ IV ซึ่งเจือจาง 1:10 จนถึง 1:2,500,000 เช่นกันลงในแต่ละแถวของภาค ELISA อย่างละ 2 ชุ้ด จากนั้นเติมแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบ (แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่เจือจาง 1:80,000) ลงไป และผ่านขั้นตอนตามวิธีการของ indirect immunoperoxidase method เช่นเดียวกับข้อ 3.3 ต่อไป

การทดสอบนี้ทำเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการตรวจหาไวเทลโลเจนิในเลือด โดยจะเขียนกราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของตัวอย่างเลือดกึ่งตัวผู้และตัวเมียบกับกราฟของสารสกัดไวเทลลินมาตรฐาน

4. การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิ (mouse anti-vitellogenin antiserum) ในเลือดของกึ่งตัวผู้ (*M. affinis*)

4.1 การแยกไวเทลโลเจนิจากเลือดของกึ่งตัวผู้เพศเมียโดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอนติบอดี (immunoprecipitation)

นำเอาแอนติซีรัมที่ได้จากข้อ 2 มาผสมกับเลือดของกึ่งตัวผู้ (*M. affinis*) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ III หรือ IV (อัตราส่วน 1:2.5) ทิ้งไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนสารละลายทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ล้าง 5-6 ครั้ง โดยการล้างแต่ละครั้งจะนำไปปั่นที่ความเร็วเท่าเดิมเพื่อแยกสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้มาเติม PBS ปริมาตร 5-7 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้จะเป็นสารละลายไวเทลโลเจนิ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส

4.2 การสร้างแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิในหนูขาว

นำสารละลายไวเทลโลเจนิที่ได้จากข้อ 4.1 มาฉีดให้หนูขาวปริมาณ 100

ไมโครลิตรต่อตัว โดยผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:4 หลังจากนั้นจะฉีดหนูเข้าโดยผสมสารละลายไวเทรโลเจนนับกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:4 เช่นกัน ส่วนขั้นตอนต่อมาจะทำตามวิธีการเตรียมแอนติซีรัมต่อไวเทรลินในข้อ 2

หลังจากเก็บซีรัมจากหนูแล้ว นำแอนติซีรัมที่ได้มาทดสอบความจำเพาะต่อไวเทรโลเจนนับโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชันและอิมมูโนอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยจะทำตามขั้นตอนในข้อ 3.1 และ 3.2 เช่นเดียวกับการทดสอบแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรลิน

4.3 การดัดชั้นแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรโลเจนนับด้วยเลือดกึ่งตะกาด (*M. affinis*) ตัวผู้

จากการทดสอบแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรโลเจนนับด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชันและอิมมูโนอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าแอนติซีรัมที่ได้จะมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนประกอบของเลือดชนิดอื่นนอกจากไวเทรโลเจนนับปะปนอยู่ด้วย จึงกำจัดแอนติบอดีที่ปะปนเหล่านี้โดยการนำแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรโลเจนนับที่ได้มาผสมกับเลือดกึ่งตะกาดตัวผู้ในอัตราส่วน 1:1 บ่มไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นแยกตะกอนทิ้ง ส่วนของสารละลายที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งจะนำไปใช้ทดสอบความจำเพาะและคุณภาพต่อไป

การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธี competitive ELISA จะใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรโลเจนนับที่ดัดชั้นด้วยเลือดกึ่งตะกาดตัวผู้ที่เจือจาง 1:20,000 เท่า โดยทำตามขั้นตอนในข้อ 3.2

5. การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของรังไข่กับระดับไวเทรโลเจนนับในเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดกึ่งตะกาด (*M. affinis*) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ คือระยะที่ I-IV และระยะหลังวางไข่ โดยใช้เข็มฉีดยาดูดเลือดจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 หรือ 5 ปริมาตร 100-200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีฝาปิด แล้วแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งและเก็บรวบรวมไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกระทั่งจะใช้ในการตรวจหาปริมาณไวเทรโลเจนนับโดยวิธี competitive ELISA เทียบกับสารสกัดไวเทรลินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10

มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งเจือจาง 1:10 ถึง 1:2,500,000 เท่า ส่วนตัวกึ่งตะกาศจะนำมาฆ่าในน้ำเย็นจัด ซึ่งน้ำหนักตัว จากนั้นผ่าตัดกึ่งซึ่งน้ำหนักรังไข่ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าดัชนีรังไข่ (ovarian index-OI) แล้วบันทึกลักษณะสีและระยะการเจริญของรังไข่ สำหรับตัวอย่างกึ่งตะกาศที่ใช้ในการหาปริมาณไวเทลอเจนินในเลือดในระยะต่าง ๆ ของการเจริญของรังไข่และระยะหลังวางไข่จะใช้กึ่งตะกาศระยะละประมาณ 10-15 ตัว

$$\text{ดัชนีรังไข่ (OI)} = \frac{\text{น้ำหนักรังไข่}}{\text{น้ำหนักตัวสุก}} \times 100 \quad \text{เปอร์เซ็นต์}$$

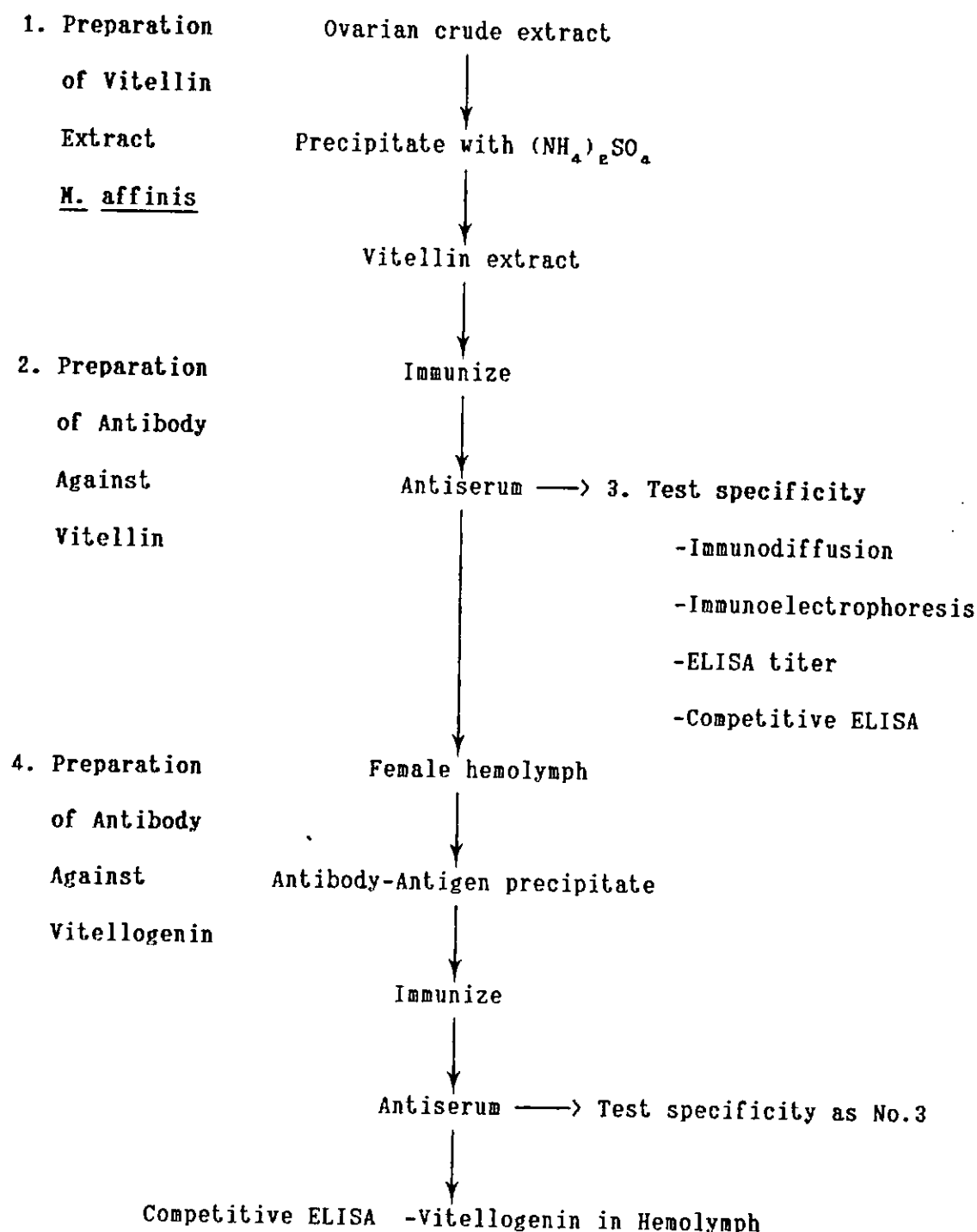
6. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ได้ ในการตรวจหาไวเทอลินหรือไวเทอลเจนินจากกึ่งตะกาศ *M. ensis* โดยวิธี competitive ELISA

การทดสอบนี้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการจับกับไวเทอลินจากกึ่งตะกาศชนิดที่สอง (*M. ensis*) โดยใช้สารสกัดหยาบจากรังไข่ของกึ่งตะกาศ *M. ensis* ตรงที่หลุมของภาค ELISA เทียบกับสารสกัดไวเทอลินจากกึ่งตะกาศ *M. affinis* ตรงที่หลุมของภาค ELISA เช่นกันและใช้สารสกัดไวเทอลินมาตรฐานของกึ่ง *M. affinis* และสารสกัดหยาบจากรังไข่ *M. ensis* ในการแข่งจับกับแอนติบอดีโดยวิธี competitive ELISA เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เปรียบเทียบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการฉีดสารสกัดไวเทอลินจากรังไข่และแอนติซีรัมได้จากการฉีดด้วยไวเทอลเจนินจากเลือด โดยตรวจดูตะกอนที่เกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดีกับแอนติเจนจากเลือดกึ่งตะกาศ และสารสกัดหยาบจากรังไข่ของกึ่งชนิดต่าง ๆ คือกึ่งตะกาศ (*M. affinis* และ *M. ensis*) กึ่งก้ามกรามและกึ่งกุลาค้าด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

2. เปรียบเทียบคุณภาพของแอนติซีรัมที่สร้างต่อไวเทลลินกับแอนติซีรัมที่สร้างต่อไวเทลโลเจนินจากการทำอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิสและ competitive ELISA
3. คำนวณหาปริมาณของไวเทลโลเจนินจากตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าแคดแต่ละตัวโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของไวเทลลิน
4. ศึกษความสัมพันธ์ของไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ โดยเทียบกับดัชนีรังไข่ ทั้งนี้จะหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับไวเทลโลเจนินในแต่ละระยะของการเจริญของรังไข่



ภาพประกอบ 3 แสดงขั้นตอนการทดลองการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกิ้งก่าคาบที่มีรังไข่เจริญในระยต่าง ๆ โดยวิธี competitive ELISA

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้ (mouse anti-vitellin antiserum และ mouse anti-vitellogenin antiserum)

1.1 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีดับเบิลอิมมูโนอิเล็กโทรฟอเรซิส

จากการนำ mouse anti-vitellin antiserum มาทำปฏิกิริยาคอกเคอนในหลอดกับแอนติเจนที่ได้จากสารสกัดชนิดต่าง ๆ คือ สารสกัดหยาบจากรังไข่และเลือดของกุ้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กุ้งทะเล (*Metapenaeus affinis* และ *Metapenaeus ensis*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) และสารสกัดหยาบจากอวัยวะและเลือดของกุ้งทะเล (*M. affinis*) พบว่า mouse anti-vitellin antiserum ที่ได้จาก การปลูกภูมิคุ้มกัน (immunize) หนูทั้ง 8 ตัวด้วยสารสกัดไข่เทอลินจากรังไข่ของกุ้งทะเล *M. affinis* จะให้แนวตะกอนหลักที่เชื่อมต่อกันระหว่างแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ของกุ้งทะเล *M. affinis* และ *M. ensis* (ภาพประกอบ 4.1) และเลือดกุ้งทะเล *M. affinis* ตัวเมีย แต่แนวตะกอนนี้จะเชื่อมต่อกับเพียงบางส่วนกับแนวตะกอนของแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (ภาพประกอบ 4.1) ทำนองเดียวกันแอนติซีรัมนี้ก็จะให้แนวตะกอนหลักเชื่อมต่อกันระหว่างแอนติเจนจากเลือดกุ้งตัวเมียของกุ้งทะเล *M. affinis* และ *M. ensis* แต่จะเชื่อมต่อกับเพียงบางส่วนกับเลือดกุ้งตัวเมียของกุ้งกุลาดำ (ภาพประกอบ 4.1) แอนติซีรัมนี้จะไม่ให้แนวตะกอนกับเลือดกุ้งตัวเมียและสารสกัดจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) รวมทั้งเลือดจากกุ้งตัวผู้และสารสกัดจากอวัยวะของกุ้งทะเล *M. affinis* (ภาพประกอบ 4.1) นอกจากนี้แอนติซีรัมนี้ยังให้แนวตะกอนเล็กกับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ของกุ้งทะเล *M. affinis* และ *M. ensis* (ภาพประกอบ 4.1 (*)) แต่ไม่พบแนวตะกอนนี้ (*) เมื่อทำปฏิกิริยากับเลือดจากกุ้งทะเลตัวเมียทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงใช้แอนติซีรัมนี้ไปทำปฏิกิริยากับเลือดกุ้งทะเลตัวเมียเพื่อใช้ตะกอนที่เกิดขึ้นในการปลูกภูมิคุ้มกันในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไข่เทอลิน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันระหว่างแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่และจากเลือดกึ่งตะกาศ *M. affinis* และ *M. ensis* ซึ่งแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไข่เทอลินก่อให้เกิดแนวตะกอนเชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่แอนติซีรัมนี้ให้แนวตะกอนเชื่อมต่อกันเพียงบางส่วนกับสารสกัดจากรังไข่และเลือดของกึ่งกุดาคั่วเนื้อ และไม่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมนี้กับเลือดจากกึ่งตะกาศตัวผู้ สารสกัดจากอวัยวะของกึ่งตะกาศ *M. affinis* เลือดจากกึ่งตัวเนื้อ และสารสกัดจากรังไข่ของกึ่งก้ามกราม (ภาพประกอบ 4.1)

สำหรับ mouse anti-vitellogenin antiserum จากหนู 8 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารละลายไข่เทอลิน พบว่าแอนติซีรัมจากหนูเพียง 1 ตัวจะให้แนวตะกอนชัดเจน การทดลองจึงเลือกใช้เฉพาะแอนติซีรัมจากหนูเพียงตัวเดียว จากการใช้ mouse anti-vitellogenin antiserum ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนต่าง ๆ พบว่าแบบแผนของแนวตะกอนที่เกิดขึ้นมีลักษณะเช่นเดียวกับที่เกิดกับ anti-vitellin antiserum ยกเว้นไม่มีแนวตะกอนขนาดเล็กใกล้หลุม (*) ของสารสกัดจากรังไข่กึ่งตะกาศ *M. affinis* และ *M. ensis* แต่จะมีแนวตะกอนจาง ๆ เกิดขึ้นกับสารสกัดจากอวัยวะและเลือด (สรในภาพประกอบ 4.2) ซึ่งแนวตะกอนนี้จะหายไปเมื่อคูดซับ anti-vitellogenin antiserum ด้วยเลือดของกึ่งตะกาศตัวผู้ *M. affinis* (ภาพประกอบ 4.3)

1.2 การตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัมด้วยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟเรซิส

จากการทำอิมมูโนอิเล็กโตรโฟเรซิสของแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิดคือ แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไข่เทอลินและแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไข่เทอลิน พบว่าจะได้ผลคล้ายกับการทำคูดเบลออิมมูโนดิฟฟิวชัน คือ แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไข่เทอลินจะให้แนวตะกอนหลัก 1 แนวเพื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากรังไข่และเลือดของกึ่งตะกาศ *M. affinis* ตัวเนื้อ (ภาพประกอบ 5.1) และเกิดแนวตะกอนเล็ก ๆ ขึ้นระหว่างแอนติซีรัมกับสารสกัดจากรังไข่ (*)

ส่วนแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไข่เทอลินพบว่า จะให้แนวตะกอนหลักลักษณะเดียวกับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไข่เทอลิน แต่จะให้แนวตะกอนหนา ๆ และบาง ๆ เพิ่มขึ้นอีก 2 แนวกับทั้งสารสกัดจากรังไข่และเลือดกึ่งตัวเนื้อ ซึ่งแนวตะกอนที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีลักษณะคล้ายกันทั้งที่เกิดในสารสกัดจากรังไข่และในเลือด โดยจะเกิดแนวเข้มและชัดเจน (สรในภาพประกอบ 5.2) แต่เมื่อคูดซับ

แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลอเจนินด้วยเลือดของกิ้งตัวผู้แล้ว พบว่าแนวตะกอนที่เพิ่มขึ้นนี้จะหายไปโดยจะเหลือเพียงแนวตะกอนหลักเพียง 1 แนวเท่านั้น (ภาพประกอบ 5.3)

1.3 การตรวจหาคุณภาพของแอนติซีรัมโดยวิธี ELISA

จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมโดยวิธี ELISA พบว่า mouse anti-vitellin antiserum ที่ได้จากหนูทั้ง 8 ตัวที่ฉีดด้วยสารสกัดไวเทลอเจนินจากวังไข่ จะมีค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมใกล้เคียงกัน คือสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไวเทลอเจนินในซีรัมที่เจือจางจนถึงจุดที่มีค่าดูดกลืนแสง (OD) มากกว่า 0.1 ได้เมื่อเจือจางแอนติซีรัมถึง 1 ต่อ 10-20 ล้านเท่า และแอนติซีรัมจากหนูเหล่านี้มีความจำเพาะคล้ายกัน จึงนำมาผสมรวมกันเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ส่วนในกรณีของ mouse anti-vitellogenin antiserum จากหนูที่ฉีดด้วยสารละลายไวเทลอเจนิน พบว่าหนู 1 ตัวจากทั้งหมด 8 ตัว มีค่าไตเตอร์หลังจากดูดซับด้วยเลือดจากกิ้งตะกาด *M. affinis* ตัวผู้แล้วให้ค่าดูดกลืนแสงมากกว่า 0.1 เมื่อเจือจางแล้วประมาณ 1 ต่อ 2.5 ล้านเท่า ส่วนหนูอีก 7 ตัวที่เหลือพบว่ามีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่ำกว่ามาก จึงไม่นำมาใช้ในการทดลอง

1.4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธี competitive ELISA

จากการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิดคือ mouse anti-vitellin antiserum และ mouse anti-vitellogenin antiserum ที่ดูดซับด้วยเลือดกิ้งตะกาดตัวผู้ โดยการบ่มสารสกัดไวเทลอเจนินมาตรฐานจากวังไข่หรือเลือดจากกิ้งตะกาด *M. affinis* ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับแอนติซีรัมและไวเทลอเจนินที่ตรึงในภาชนะ ELISA พบว่าแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิดจะมีประสิทธิภาพในการตรวจหาปริมาณไวเทลอเจนินในเลือดกิ้งตะกาด *M. affinis* ตัวเมียได้ในกรณีของ mouse anti-vitellin antiserum พบว่าสารสกัดไวเทลอเจนินมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นสูง จะสามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ติดอยู่บนภาชนะ ELISA ได้อย่างสมบูรณ์ แต่เลือดจากกิ้งตะกาด *M. affinis* ตัวเมีย พบว่าไม่สามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนบนภาชนะ ELISA ได้อย่างสมบูรณ์ถึงแม้จะใช้เลือดที่ระดับความเข้มข้นสูง ส่วนเลือดของกิ้งตะกาด *M. affinis* ตัวผู้พบว่า จะไม่มีผลต่อการจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนบนภาชนะไม่ว่าจะใช้ความเข้มข้น

ชั้นของเลือดสูงก็ตาม (ภาพประกอบ 6)

สำหรับ mouse anti-vitellogenin antiserum ที่ดูดซับด้วยเลือดกึ่งตะกาด *M. affinis* ตัวผู้แล้ว พบว่าทั้งสารสกัดไข่เทอลินมาตรฐานและเลือดจากกึ่งตะกาดตัวเมียที่ระดับความเข้มข้นสูง จะสามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับไข่เทอลินที่ติดบนภาควัดได้อย่างสมบูรณ์ และเลือดของกึ่งตะกาดตัวผู้ไม่มีผลต่อการจับของแอนติบอดีกับไข่เทอลินบนภาควัดเช่นเดียวกับการใช้ mouse anti-vitellin antiserum (ภาพประกอบ 7)

2. การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของรังไข่กับระดับไข่เทอลาเจนินในเลือด

2.1 การประเมินความแม่นยำของวิธี competitive ELISA ในการวัดปริมาณไข่เทอลาเจนินในเลือด

จากการสุ่มตัวอย่างเลือดกึ่งตะกาดมาตรวจวัดปริมาณไข่เทอลาเจนินด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้นอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไข่เทอลินหรือนอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไข่เทอลาเจนิน ซึ่งทำในภาควัดที่ต่างกันและในเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าปริมาณไข่เทอลาเจนินที่ตรวจวัดได้ในแต่ละครั้งจะมีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละตัวอย่างที่ใช้ ถึงแม้ว่าจะใช้นอนติซีรัมที่แตกต่างกันก็ตาม (ตาราง 1) ดังนั้นจึงเชื่อว่าวิธีที่ใช้ตรวจหาปริมาณไข่เทอลาเจนินในเลือดโดยใช้นอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิดมีความแม่นยำพอสมควร

2.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของรังไข่กับระดับไข่เทอลาเจนินในเลือด

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดของกึ่งตะกาด *M. affinis* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ คือระยะที่ I ถึง IV และระยะหลังวางไข่และนำมาตรวจหาปริมาณไข่เทอลาเจนินโดยวิธี competitive ELISA เทียบกับสารสกัดไข่เทอลินมาตรฐาน จะเห็นว่าค่าไข่เทอลาเจนินในเลือดเมื่อเทียบกับค่าดัชนีของรังไข่จะมีลักษณะกระจายและมีความแปรปรวนค่อนข้างสูงในแต่ละระยะของการเจริญของรังไข่ โดยจะพบว่าระดับไข่เทอลาเจนินในเลือดนี้จะอยู่ในระดับค่าในระยะต้น ๆ ของการเจริญของรังไข่ คือระยะที่ I ซึ่งจะมีค่าดัชนีของรังไข่ต่ำ และระดับของไข่เทอลาเจนิน

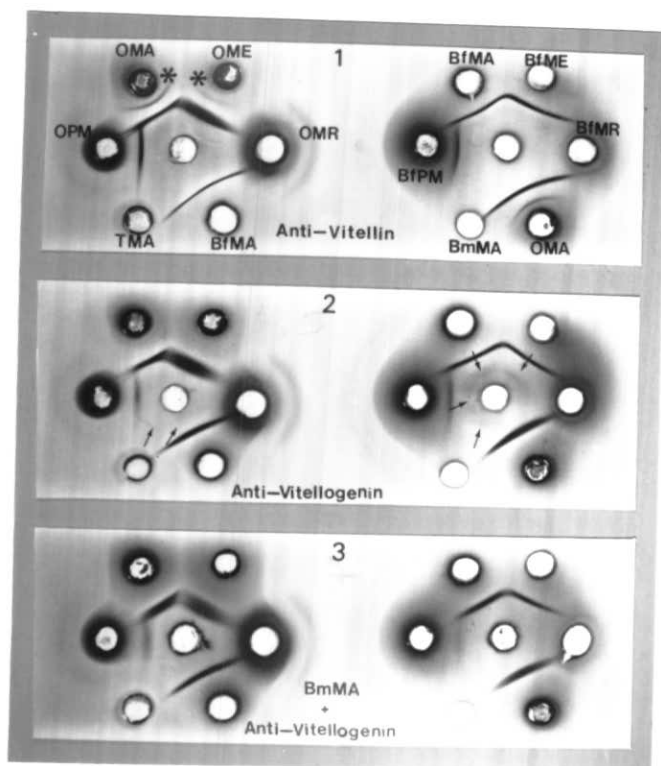
ในเลือดนั้นก็จะเพิ่มสูงขึ้นในกึ่งที่มีรังไข่เจริญในระยะที่ II และ III แต่ในบางตัวอย่างของกึ่งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะนี้ พบว่าปริมาณไวเทโลเจนินในเลือดจะสูงมากผิดปกติ ส่วนในระยะที่ IV หรือระยะที่รังไข่สุก พบว่าระดับของไวเทโลเจนินจะลดลง ในขณะที่ค่าดัชนีของรังไข่จะสูงขึ้น และในระยะหลังวางไข่พบว่าระดับของไวเทโลเจนินจะมีความแปรปรวนสูง ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น (ตาราง 2)

เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างกึ่งบางตัวอย่างที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ II และ III มีระดับไวเทโลเจนินในเลือดสูงมากกว่าปกติ (มากกว่า 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) คาดว่าเนื่องจากในตัวอย่างเหล่านี้อาจมีการเสื่อมสลายของรังไข่เนื่องจากสภาวะกดดันหลังจากถูกจับขึ้นมาจากทะเล ทำให้มีการปล่อยของไวเทโลนจากรังไข่เข้าสู่กระแสเลือดในปริมาณสูง จึงได้ลองศึกษาเพิ่มเติมโดยเก็บเลือดจากตัวอย่างกึ่งที่มีระยะการเจริญของรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ II III และ IV แล้วนำมาเลี้ยงไว้ในที่มืด 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดมาตรวจหาปริมาณไวเทโลเจนิน พบว่าระดับไวเทโลเจนินในเลือดของกึ่งที่มีรังไข่เจริญระยะที่ II และ III เพิ่มขึ้นสูงมากในขณะที่กึ่งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ IV จะมีการวางไข่และมีระดับไวเทโลเจนินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากการเสื่อมสลายของไข่ที่กำลังเจริญในระยะที่ II และ III หรือไข่ที่เหลือหลังจากการวางไข่อยู่ในปริมาณต่าง ๆ กัน (ภาพประกอบ 9, ตาราง 3 และ 4) และจากการผ่าตัดรังไข่เพื่อตรวจหาค่าดัชนีรังไข่ สังเกตพบว่าลักษณะของรังไข่กึ่งตะกาดที่มีระยะการเจริญในระยะที่ II และ III หลังจากเลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง รังไข่ของกึ่งบางตัวอย่างจะมีลักษณะอ่อนตัวเหลวไม่อยู่ตัวเหมือนกับรังไข่ของกึ่งที่ได้จากทะเลในวันแรก

ส่วนระดับไวเทโลเจนินในเลือดของกึ่งตะกาด *M. affinis* หลังจากการวางไข่นั้น จากการทดลองเก็บเลือดกึ่งตะกาด *M. affinis* หลังจากวางไข่แล้ว 1, 3, 5 และ 7 วันตามลำดับ มาตรวจหาปริมาณไวเทโลเจนิน พบว่าปริมาณไวเทโลเจนินในวันที่ 1 หลังจากการวางไข่จะมีความแปรปรวนสูงโดยจะมีค่าอยู่ในระดับที่สูงกว่าวันหลัง ๆ แล้วจะลดลงจนอยู่ในระดับที่ต่ำใกล้เคียงกันในวันที่ 7 ของการทดลอง (ภาพประกอบ 10, ตาราง 5)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ได้ ในการตรวจหาไข่เทอลินหรือไข่เทอลोजเงิน จากกึ่งตะกาด *M. ensis*

จากการใช้สารสกัดไข่เทอลินจากกึ่งตะกาด *M. affinis* ตรึงที่หลุมของถาด ELISA และใช้สารสกัดมาตรฐานจากรังไข่ของกึ่งตะกาด *M. affinis* หรือ *M. ensis* แอ่งการจับของ anti-vitellogenin antiserum พบว่า สารสกัดมาตรฐานจากรังไข่ของกึ่งตะกาด *M. ensis* ไม่สามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีได้อย่างสมบูรณ์ (ภาพประกอบ 11) แต่ในกรณีที่ใช้สารสกัดจากรังไข่ของกึ่งตะกาด *M. ensis* ตรึงที่หลุมของถาด ELISA พบว่าสารสกัดมาตรฐานจากรังไข่ของกึ่งตะกาดทั้งสองชนิดคือ *M. ensis* และ *M. affinis* สามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนของสารสกัดหยาบของกึ่งชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ (ภาพประกอบ 12) ดังนั้นการตรวจหาระดับไข่เทอลोजเงินของกึ่งตะกาด *M. ensis* ควรใช้ไข่เทอลินจากกึ่งตะกาดชนิดเดียวกันในการจับกันหลุมและเป็นไข่เทอลินมาตรฐานสำหรับตรวจสอบหาไข่เทอลोजเงินจากเลือด

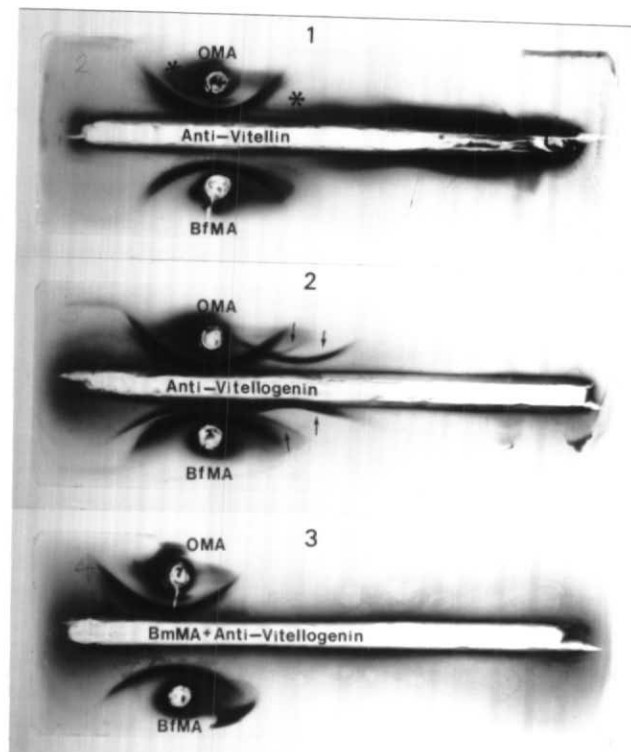


ภาพประกอบ 4 แสดงภาพคัปเบิ้ลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion) ระหว่าง แอนติซีรัม (หลุมกลาง) กับแอนติเจนต่าง ๆ

- 4.1 anti-vitellin antiserum
- 4.2 anti-vitellogenin antiserum
- 4.3 anti-vitellogenin antiserum คัดจับด้วยเลือดกึ่งตัวผู้
- OMA สารสกัดจากรังไข่ของ *Metapenaeus affinis*
- OME สารสกัดจากรังไข่ของ *M. ensis*
- OMR สารสกัดจากรังไข่ของ *Macrobrachium rosenbergii*
- OPM สารสกัดจากรังไข่ของ *Penaeus monodon*
- TMA สารสกัดจากอวัยวะของ *M. affinis*
- BfMA เลือดจากกึ่งตัวเมียของ *M. affinis*
- BfME เลือดจากกึ่งตัวเมียของ *M. ensis*
- BfMR เลือดจากกึ่งตัวเมียของ *M. rosenbergii*
- BfPM เลือดจากกึ่งตัวเมียของ *M. monodon*
- BmMA เลือดจากกึ่งตัวผู้ของ *M. affinis*

* แสดงแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่น ๆ จากรังไข่

ลูกศร แสดงแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ในเลือด



ภาพประกอบ 5 แสดงภาพอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส (immunoelectrophoresis) ของแอนติซีรัม (รื่อง) กับเลือดกึ่งตะกาดตัวเมีย (BfMA) และสารสกัดจากรังไข่ (OMA) ของกึ่งตะกาด *M. affinis*

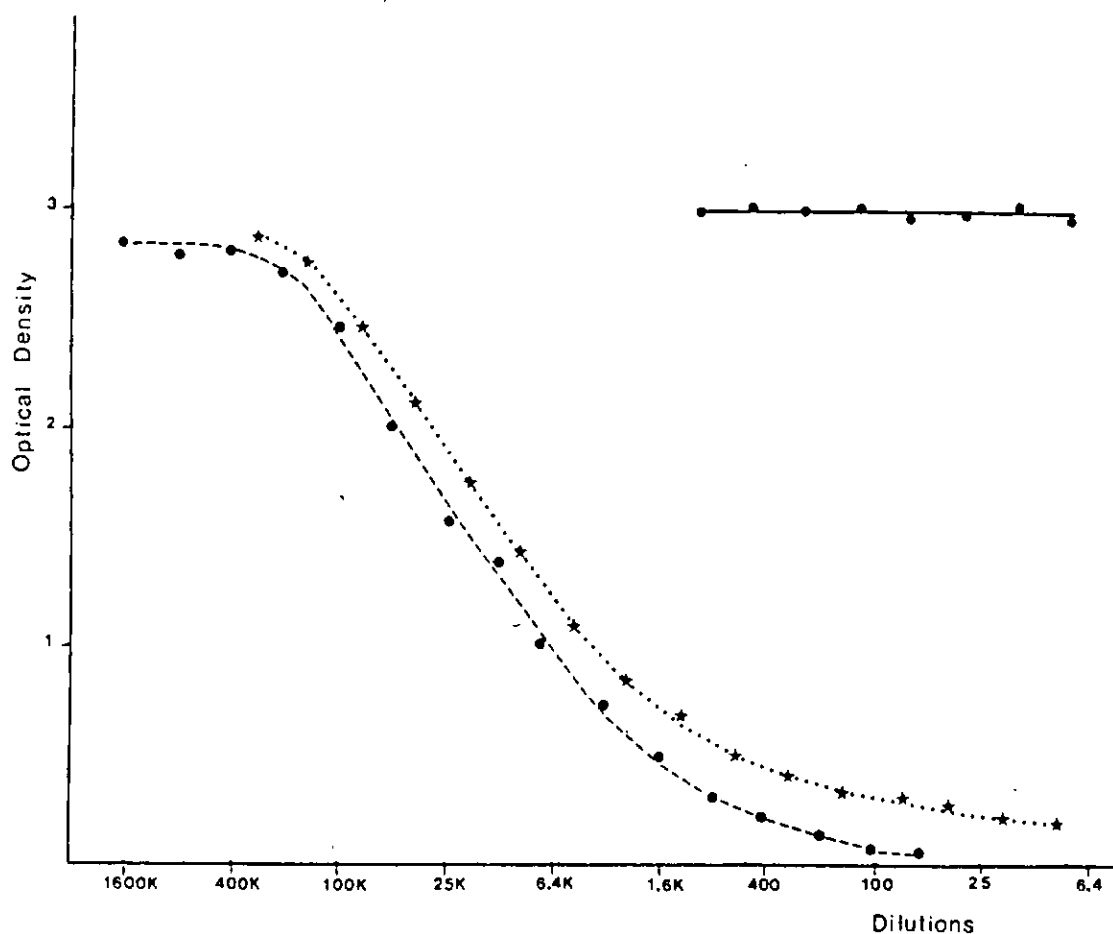
5.1 anti-vitellin antiserum

5.2 anti-vitellogenin antiserum

5.3 anti-vitellogenin antiserum ชุดขับด้วยเลือดกึ่งตัวผู้

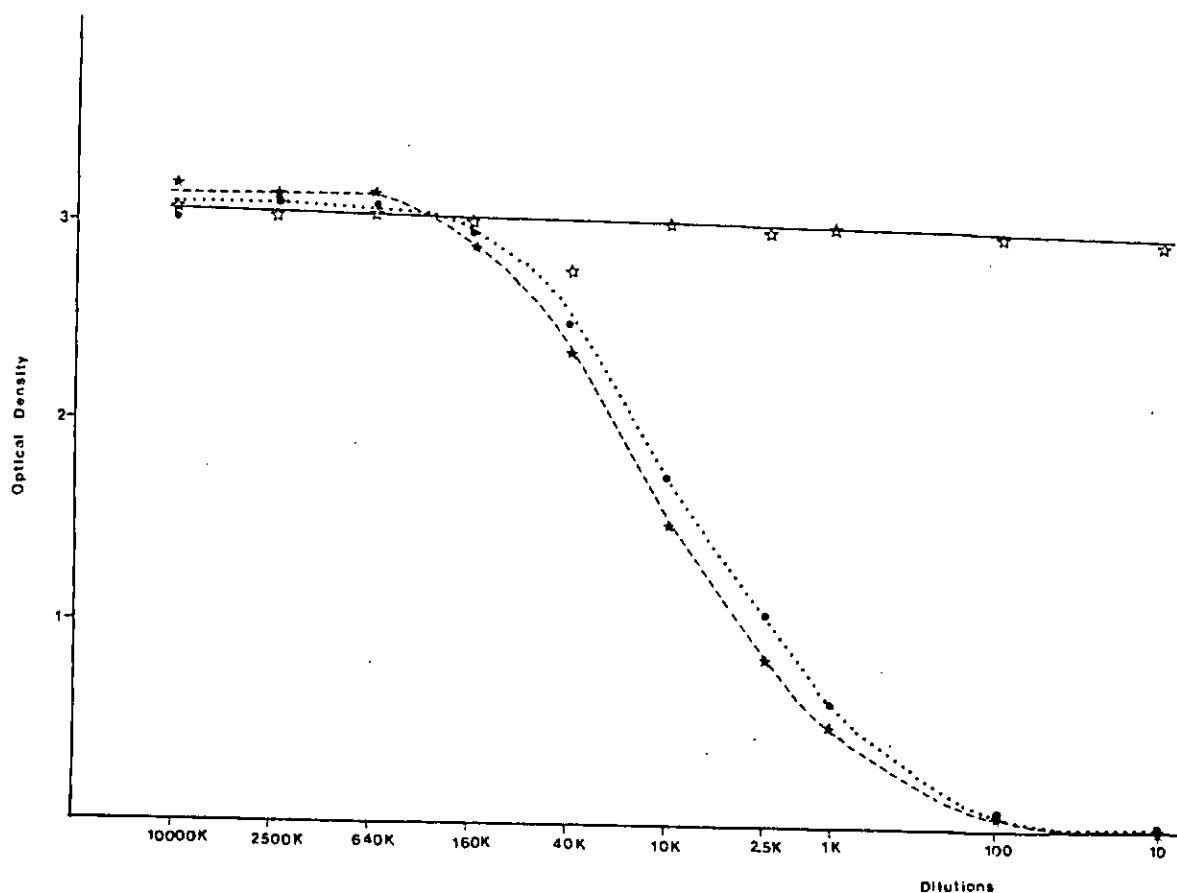
* แสดงแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่น ๆ จากรังไข่

ลูกศร แสดงแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ในเลือด



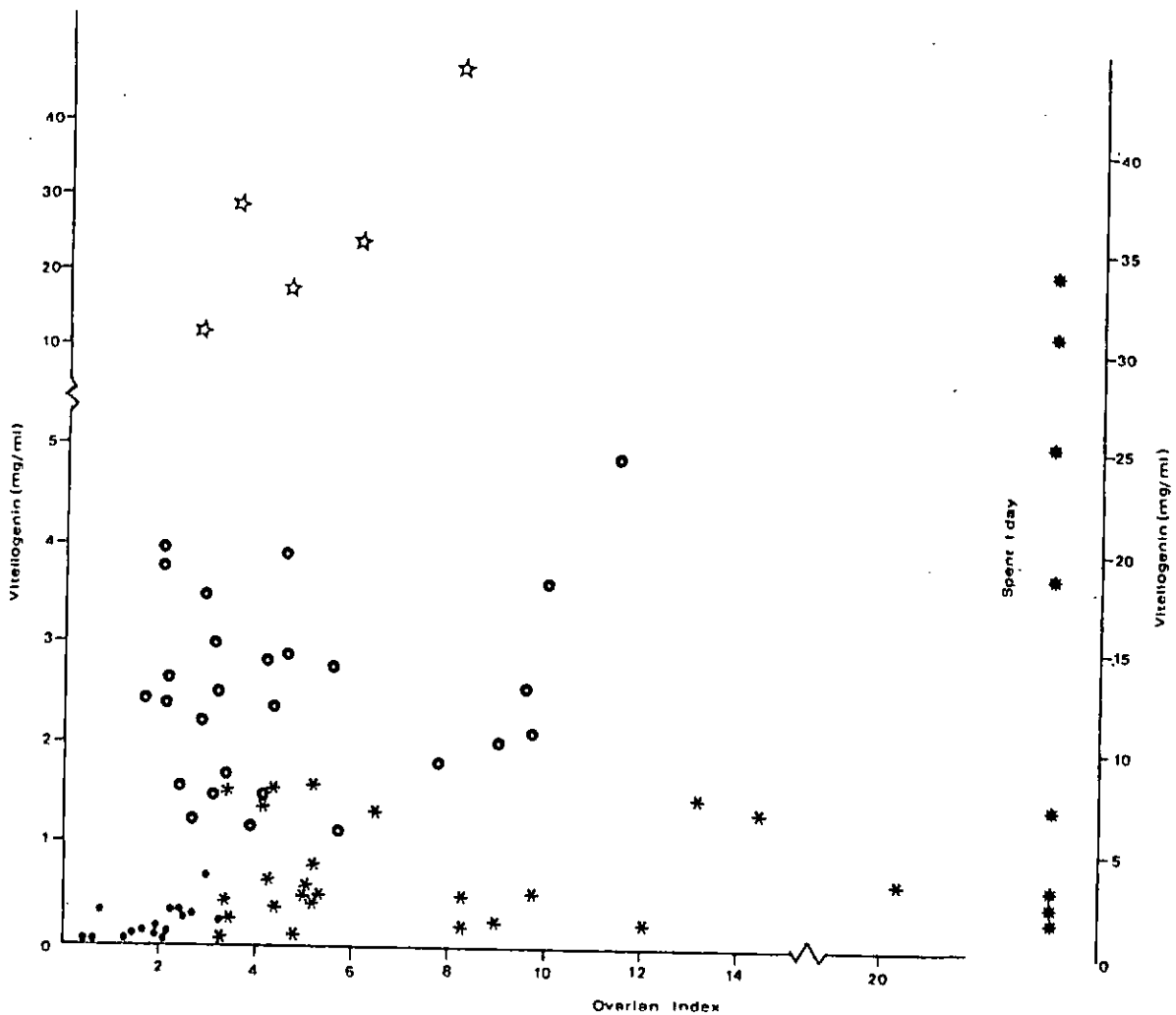
ภาพประกอบ 6 กราฟแสดง competitive ELISA ของไวเทลินมาตรฐานและตัวอย่างเลือด
กิ้งคกาด (*M. affinis*) ตัวเมียและตัวผู้ที่ระดับเจือจางต่าง ๆ โดยใช้ mouse anti-
vitellin antiserum เจือจาง 1:80,000

- ไวเทลินมาตรฐานความเข้มข้นเริ่มต้น 17.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- ★....★ เลือดจากกิ้งคกาดที่รับไข่กำลังเจริญ
- เลือดจากกิ้งคกาดตัวผู้



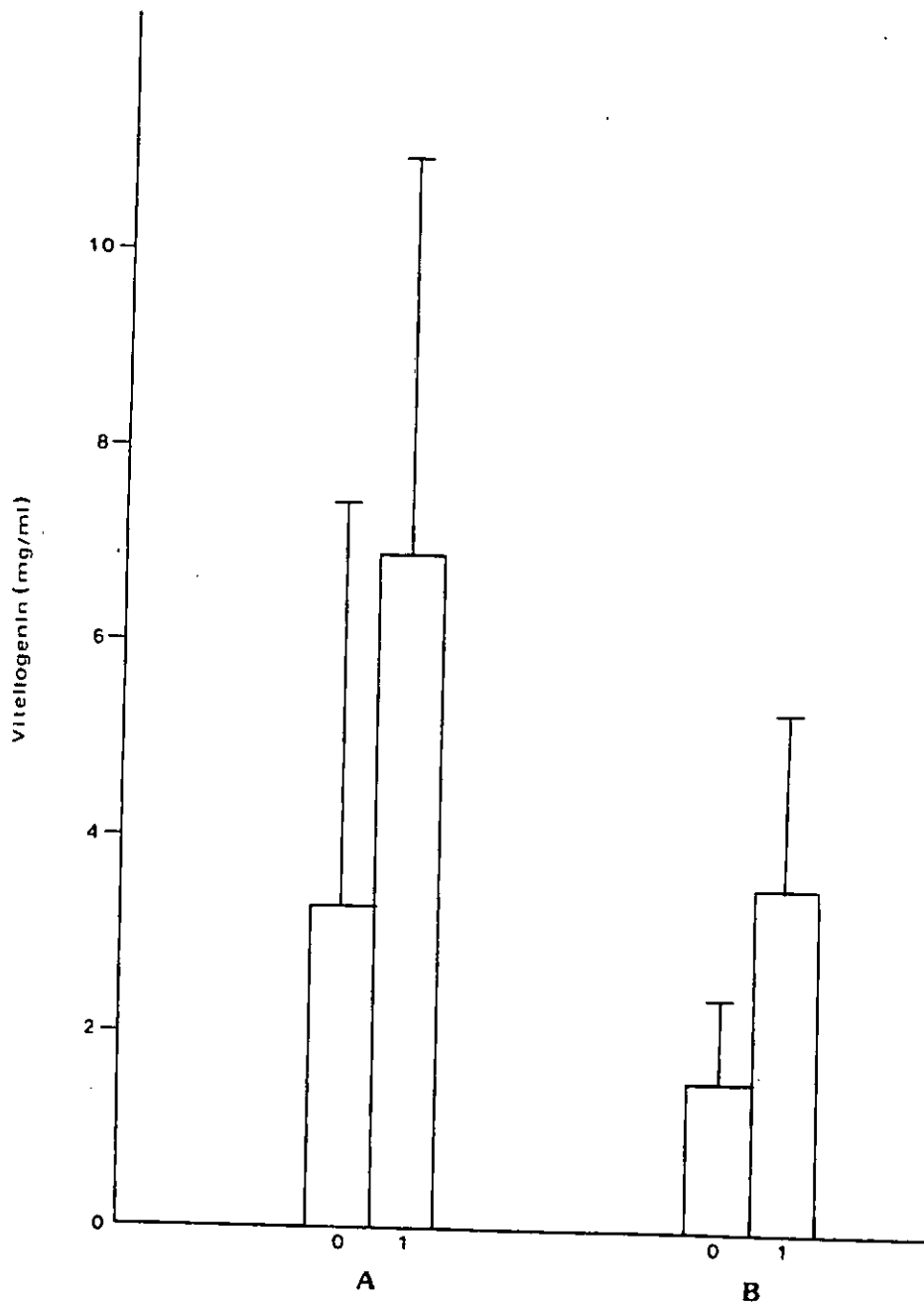
ภาพประกอบ 7 กราฟแสดง competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและตัวอย่างเลือด
กิ้งก่า (M. affinis) ตัวเมียและตัวผู้ที่ระดับเจือจางต่าง ๆ โดยใช้ mouse anti-
vitellogenin antiserum คู่กับด้วยเลือดกิ้งตัวผู้เจือจาง 1:20,000

- ☆---☆ ไวเทลลินมาตรฐานความเข้มข้นเริ่มต้น 10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
-● เลือดจากกิ้งก่าที่รังไข่กำลังเจริญ
- ☆---☆ เลือดจากกิ้งก่าตัวผู้



ภาพประกอบ 8 แสดงการกระจายของค่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกิ้งคกาด *M. affinis* เทียบกับดัชนีของรังไข่ ในระยะการเจริญต่าง ๆ และหลังจากวางไข่ประมาณ 1 วัน สเกลทางด้านขวาใช้เฉพาะกับกิ้งหลังวางไข่เท่านั้น

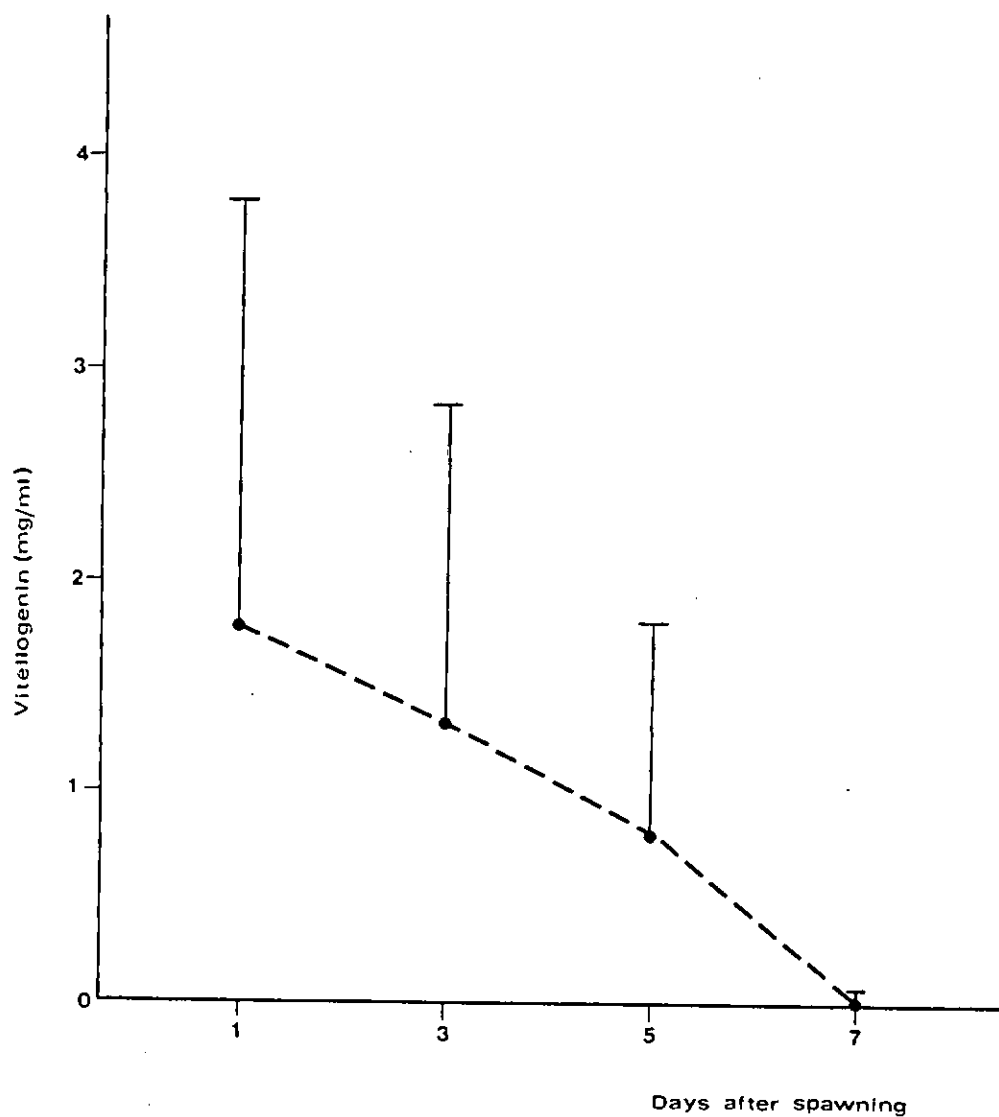
- แสดงปริมาณไวเทลโลเจนินของกิ้งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1
- แสดงปริมาณไวเทลโลเจนินของกิ้งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 2 และ 3
- * แสดงปริมาณไวเทลโลเจนินของกิ้งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 4
- * แสดงปริมาณไวเทลโลเจนินของกิ้งหลังวางไข่ประมาณ 1 วัน
- ☆ แสดงปริมาณไวเทลโลเจนินของกิ้งที่รังไข่กำลังสลายตัว



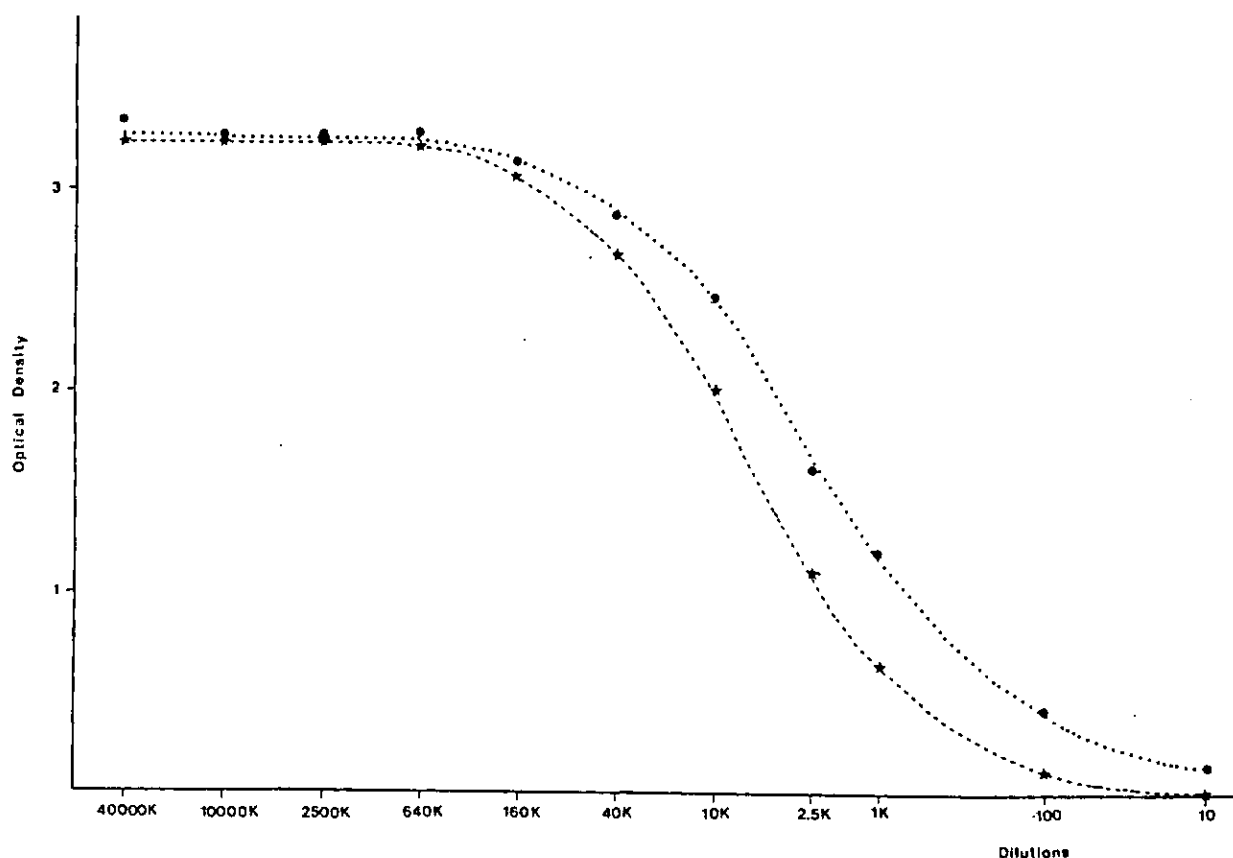
ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงปริมาณไวเทลโลเจนิน (ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ในเลือดของกิ้งก่า (H. affinis) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะ II-III และระยะที่ IV ในวันที่ 0 (จากทะเล) และหลังจากนำมาเลี้ยง 1 วัน

A = ระยะที่ II และ III

B = ระยะที่ IV



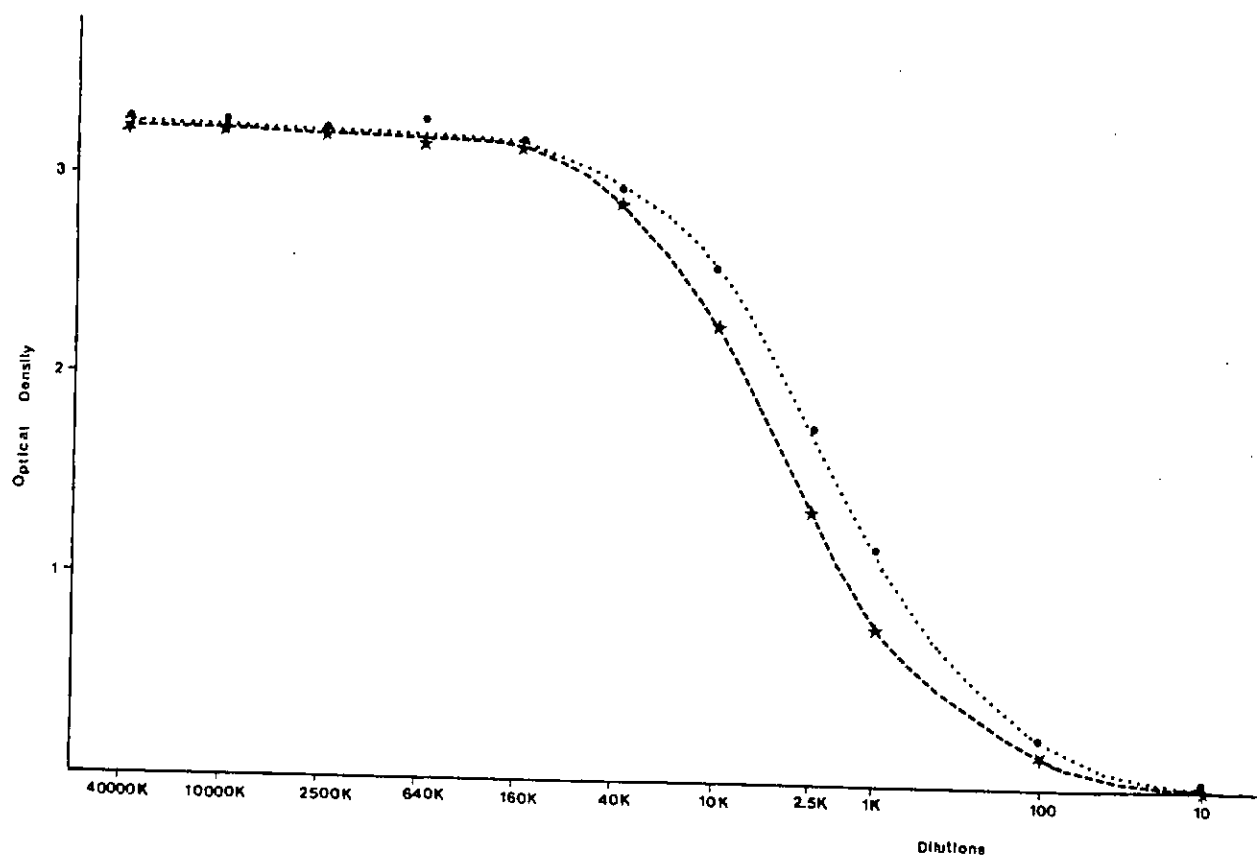
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงปริมาณไวเทลโลเจนิน (ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ในเลือดของกุ้งตะกาด (*M. affinis*) ที่อยู่ในระยะหลังจากการวางไข่ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 วันตามลำดับ



ภาพประกอบ 11 กราฟแสดง competitive ELISA ของสารสกัดไข่เทลลินมาตรฐานของ
กิ้งคกาด (*M. affinis*) และสารสกัดหยาบมาตรฐานจากรังไข่ของกิ้งคกาดชนิดที่ 2
(*M. ensis*) โดยใช้สารสกัดจากรังไข่ของกิ้งคกาด *M. affinis* ครึ่งที่หลุมของถาด ELISA
และใช้ mouse anti-vitellogenin antiserum เจือจาง 1:20,000

★---★ สารสกัดไข่เทลลินมาตรฐานของกิ้งคกาด *M. affinis*

●.....● สารสกัดหยาบมาตรฐานจากรังไข่ของกิ้งคกาด *M. ensis*



ภาพประกอบ 12 ภาพแสดง competitive ELISA ของสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานของกิ้งคตา (M. affinis) และสารสกัดหนามมาตรฐานจากรังไข่ของกิ้งคตาชนิดที่ 2 (M. ensis) โดยใช้สารสกัดหนามจากรังไข่ของกิ้งคตา M. ensis ตีรังที่หลุมของภาค ELISA และใช้ mouse anti-vitellogenin antiserum เจือจาง 1:20,000

★---★ สารสกัดไวเทลลินมาตรฐานของกิ้งคตา *M. affinis*

•..... สารสกัดหนามมาตรฐานจากรังไข่ของกิ้งคตา *M. ensis*

ตาราง 1 แสดงปริมาณไวเทรโลเจน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในเลือดของกิ้งคกาด (*M.*

affinis) ตัวเมืงที่คำนวณได้จากการตรวจวัดโดยวิธี competitive ELISA เทียบกับไวเทร-
ลินมาตรฐาน โดยใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรลินและแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรโลเจน
เปรียบเทียบกัน

แอนติซีรัม	แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรลิน			แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทรโลเจน		
ตัวอย่างที่	ครั้งที่ 1 1:80,000	ครั้งที่ 2 1:80,000	$\bar{X} \pm SD$	ครั้งที่ 1 1:25,000	ครั้งที่ 2 1:25,000	$\bar{X} \pm SD$
1	24.942	25.441	25.129 $\pm$ 0.250	24.171	24.520	24.345 $\pm$ 0.175
2	2.336	2.404	2.370 $\pm$ 0.034	2.267	2.369	2.318 $\pm$ 0.051
3	0.068	0.065	0.067 $\pm$ 0.002	0.061	0.066	0.073 $\pm$ 0.007
4	0.061	0.065	0.063 $\pm$ 0.002	0.068	0.070	0.069 $\pm$ 0.001
5	1.273	1.232	1.252 $\pm$ 0.021	1.287	1.248	1.268 $\pm$ 0.020
6	0.101	0.108	0.104 $\pm$ 0.003	0.097	0.093	0.095 $\pm$ 0.002
7	1.408	1.528	1.468 $\pm$ 0.060	1.654	1.330	1.492 $\pm$ 0.162
8	2.247	2.461	2.354 $\pm$ 0.107	2.307	2.469	2.388 $\pm$ 0.081

ตาราง 2 แสดงปริมาณไวเทรโละเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เทียบกับดัชนีรังไข่ (OI-ค่าเฉลี่ย $(\bar{X}) \pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ของกิ้งก่า (M. affinis) ที่มีพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ คือ ระยะที่ I ถึงระยะที่ IV และระยะหลังวางไข่ 1 วัน (ข้อมูลดิบของแต่ละตัวอย่างอยู่ในภาคผนวก ก)

ระยะการเจริญของ รังไข่	ปริมาณไวเทรโละเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) $\bar{X} \pm SD$	ค่าดัชนี รังไข่ $\bar{X} \pm SD$	จำนวน กิ้งตัวอย่าง
I	0.193 ± 0.167	1.908 ± 0.798	16
II	2.343 ± 0.906	2.761 ± 0.730	13
III	2.673 ± 0.951	6.562 ± 2.841	14
IV	0.708 ± 0.508	6.979 ± 0.384	24
หลังวางไข่ 1 วัน	15.351 ± 12.330	2.311 ± 0.384	8
Degenerate (II & III)	25.734 ± 12.330	4.996 ± 1.947	5

ตาราง 3 แสดงลักษณะของรังไข่และปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของกุ้งตะกาด (*M. affinis*) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ II และ III และหลังจากนำมาเลี้ยง 1 วัน

ตัวอย่างที่	เริ่มทดลอง		หลังจากเลี้ยง 1 วัน		
	ลักษณะ สีของรังไข่	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		ค่าดัชนี รังไข่	ลักษณะ สีของรังไข่
1	เทาขาว	2.546	6.995	2.424	เทาขาว
2	เหลืองขาว	0.619	11.131	2.629	เหลืองขาว
3	เหลือง	6.261	10.590	1.977	เหลือง
4	เขียวอ่อน	1.211	8.195	3.913	เขียวอ่อน
5	เหลืองขาว	0.476	8.212	2.739	เหลืองขาว
6	เขียวอ่อน	1.609	13.072	3.436	เขียวอ่อน
7	"	4.458	1.466	8.176	"
8	"	14.390	6.780	4.728	เขียว
9	"	0.948	1.895	4.172	เขียวเหลือง
10	เขียว	0.435	0.865	4.571	"
ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)		3.295	6.920	3.877	
ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)		4.121	4.050	1.690	

ตาราง 4 แสดงลักษณะของรังไข่และปริมาณไวเทลโลเจนนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในเลือดของ
กิ้งก่า (H. affinis) ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ IV และหลังจากนำมาเลี้ยง 1 วัน
แล้ววางไข่

ตัวอย่าง ที่	เริ่มทดลอง		หลังจากเลี้ยง 1 วัน		
	ลักษณะ สีของรังไข่	ปริมาณไวเทลโลเจนนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		ค่าดัชนี รังไข่	ลักษณะ สีของรังไข่
1	เขียวทอง	1.110	1.083	1.565	ขาวขุ่น
2	"	1.545	1.404	1.573	"
3	เขียว	1.232	3.333	1.754	"
4	"	2.487	6.072	2.053	"
5	"	0.455	5.329	1.351	"
6	"	0.374	2.460	1.241	"
7	เขียวเทา	1.349	2.536	1.437	"
8	เขียว	1.774	3.987	2.246	เขียว-ขาวขุ่น
9	"	3.461	4.944	1.765	เหลือง-ขุ่น
10	เขียวเทา	2.022	1.681	1.928	ขาวขุ่น-เหลือง
11	เขียว	1.034	5.982	1.131	ขาวขุ่น
ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)		1.531	3.528	1.640	
ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)		0.852	1.759	0.331	

ตาราง 5 แสดงปริมาณไวเทลดเจนนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในเลือดของกิ้งก่าแคด (*M. affinis*) หลังจากวางไข่ 1, 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ

ตัวอย่างที่	ปริมาณไวเทลดเจนนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	หลังจาก วางไข่ 1 วัน	หลังจาก วางไข่ 3 วัน	หลังจาก วางไข่ 5 วัน	หลังจาก วางไข่ 7 วัน
1	0.385	0.642	1.307	0.116
2	4.978	4.516	3.202	0.008
3	1.445	1.885	1.603	0.024
4	0.053	0.022	0.003	0.104
5	0.271	0.180	0.032	0.003
6	0.397	0.403	0.056	0.004
7	0.868	1.124	1.321	0.014
8	1.293	1.439	0.633	0.003
9	5.855	1.887	0.029	0.016
10	0.695	0.445	0.029	0.022
11	1.413	0.494	0.024	0.013
12	5.930	5.112	2.198	0.031
13	0.476	0.071	0.014	0.038
14	2.448	1.606	1.588	0.018
15	0.122	0.006	0.004	0.013
ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	1.775	1.322	0.803	0.028
ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	2.009	1.514	0.979	0.033

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

จากการสร้างแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ (anti-vitellin antiserum) และแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากเลือด (anti-vitellogenin antiserum) ของกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* ในหนูพบว่า จะได้แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะคล้ายคลึงกัน แต่กรณีของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อสารสกัดไวเทลลินจะมีแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนอื่น ๆ ในรังไข่ปะปนอยู่ด้วย (ภาพประกอบ 4.1 และ 5.1 (*)) ซึ่งเป็นการยากที่จะกำจัดออกได้ ส่วนแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินถึงแม้จะมีแอนติบอดีต่อส่วนประกอบอื่น ๆ ของเลือดปะปนมาด้วย (ภาพประกอบ 4.2 และ 5.2 (ลูกศร)) แต่ก็สามารถกำจัดแอนติบอดีนี้ได้โดยการดูดซับออกด้วยเลือดจากกุ้งตัวผู้ (ภาพประกอบ 4.3 และ 5.3) ดังนั้นแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ทั้งในด้านเชิงปริมาณและคุณภาพของแอนติเจนเพราะสามารถกำจัดแอนติบอดีต่อสารอื่น ๆ ที่อาจมารบกวนการแสดงผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่ต้องการ แต่อย่างไรก็ดีจากการใช้แอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิดในการวิเคราะห์หาปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดได้ผลไม่แตกต่างกันนัก แสดงว่าการปนเปื้อนของสารอื่น ๆ ในสารสกัดหยาบจากรังไข่มีปริมาณต่ำมากและแอนติซีรัมที่ใช้มีความจำเพาะสูง การตรวจวัดจึงสามารถใช้ในปริมาณที่เจือจางมากทั้งแอนติบอดีและแอนติเจน คือใช้แอนติบอดีเจือจางประมาณ 1 ต่อ 20,000-80,000 เท่า ส่วนแอนติเจนเจือจางประมาณ 1 ต่อ 5,000 เท่า สารที่ปนเปื้อนจึงถูกเจือจางจนอยู่ในระดับต่ำมาก จนไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ด้านปริมาณ

จากการทำดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมกับสารสกัดหยาบจากรังไข่ อັฐตะและเลือดของกุ้งชนิดต่าง ๆ พบว่า แอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิดนี้คือแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินและแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจะทำปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) กับไวเทลลินจากรังไข่และไวเทลโลเจนินจากเลือดของกุ้งตะกาด *M. affinis* ตัวเมียโดยจะให้เห็นแนวตะกอนหลักเชื่อมกัน แสดงถึงความคล้ายคลึงของไวเทลโลเจนินที่เป็นโปรตีนจำเพาะของตัวเมียในเลือดกับไวเทลลินจากรังไข่ ซึ่งคล้ายคลึงกับในสัตว์ครึ่งตัวเข็นหลายชนิดคือ

semisulcatus) ซึ่งเป็นกุ้งที่อยู่ในวงศ์ Penaeidae มีไวเทลลินคล้ายกันด้วย (Tom, Goren and Ovadia. 1987)

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลลินและไวเทลโลเจนินจากกุ้ง *M. ensis* โดยวิธี competitive ELISA พบว่าไวเทลลินหรือไวเทลโลเจนินจากสารสกัดหยาบจากรังไข่ของกุ้งตะกาด *M. ensis* ไม่สามารถทนต่อการจับของแอนติบอดีกับสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งตะกาด *M. affinis* ได้อย่างสมบูรณ์ (ภาพประกอบ 12) ทั้งนี้เนื่องมาจากแอนติซีรัมที่ใช้เป็นแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของกุ้งตะกาด *M. affinis* จึงทำให้สามารถจับกับแอนติเจนที่ก้นหลุมของภาควัดได้ดีกว่าสารสกัดมาตรฐานจากรังไข่ของกุ้ง *M. ensis* และอาจเนื่องจากในแอนติซีรัมนี้มีแอนติบอดีบางส่วนที่สามารถจับกับ epitope ในสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้ง *M. affinis* แต่ไม่พบ epitope นี้ในสารสกัดหยาบจากรังไข่ของกุ้ง *M. ensis* เป็นเครื่องชี้ให้เห็นว่า ถึงแม้กุ้งสกุลเดียวกัน ก็สามารถตรวจความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของโมเลกุลของไวเทลลินได้ ดังนั้นการใช้แอนติซีรัมนี้เพื่อวัดปริมาณไวเทลลินหรือไวเทลโลเจนินควรวัดใช้แอนติเจนที่ตรงกับภาควัด ELISA และแอนติเจนมาตรฐานจากกุ้งชนิดเดียวกันเป็นค่าเปรียบเทียบจึงจะให้ผลแม่นยำว่าการเปรียบเทียบกับแอนติเจนจากกุ้งต่างชนิดกันเพราะมีความคล้ายคลึงกันมากกว่าแอนติเจนจากกุ้งต่างชนิด

จากการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของตัวอย่างกุ้งตะกาด *M. affinis* ที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะต่าง ๆ คือระยะที่ I ถึงระยะที่ IV และระยะหลังจากการวางไข่ สรุปได้ว่า ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งตะกาดจะอยู่ในระดับต่ำในตอนต้นของวงจรการสืบพันธุ์ คือมีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ I และจะเพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับสูงมากในระยะที่มีการพัฒนาของรังไข่คือระยะที่ II และ III ตามลำดับ จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วในระยะที่ IV ซึ่งเป็นระยะที่ไข่สุกหรือระยะก่อนการวางไข่ ส่วนในระยะหลังจากการวางไข่ พบว่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือดจะเพิ่มขึ้นสูงมากในวันที่ 1 หลังจากวางไข่ (ตาราง 2) ทั้งนี้เนื่องจากการสลายตัวของไวเทลลินจากไข่ที่เหลือหลังจากการวางไข่อยู่ แต่ก็ลดลงจนอยู่ในระดับต่ำมากหลังจากวางไข่ 7 วัน (ตาราง 5) ซึ่งรังไข่ของกุ้งในระยะนี้ น่าจะอยู่ในระยะพัก ทำให้มีระดับไวเทลโลเจนินต่ำมาก จากผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับในกุ้งล็อบสเตอร์ (*Homarus americanus*) และในกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ที่พบว่าระดับของไวเทลโลเจนินซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะสำหรับตัวเมียใน

เลือดจะเพิ่มขึ้นในระหว่างที่มีการสะสมของไข่แดงจนถึงจุดสูงสุดและลดลงก่อนการวางไข่ โดยจะไม่พบโปรตีนนี้ในกึ่งที่รังไข่ที่อยู่ในระยะพัก (Byard and Aiken. 1984; Derelle and others. 1986) เช่นเดียวกับในกึ่งน้ำกร่อย *Pandalus kessleri* พบว่าไวเทลอเจนินในเลือดของกึ่งตัวเมื่อยที่มีรังไข่ที่อยู่ในระยะพักจะอยู่ในระดับต่ำ ไม่สามารถตรวจหาได้ แต่จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะที่รังไข่เจริญเต็มที่และจะลดลงทันทีที่กึ่งวางไข่ (Quinitio and others. 1989) ดังนั้นจากผลการทดลองจึงเชื่อว่า ระดับของไวเทลอเจนินในเลือดน่าจะเป็นดัชนีที่ดีสำหรับแสดงพัฒนาการของรังไข่ได้ และคิดว่าการสังเคราะห์ของรังไข่ ทั้งนี้เพราะว่าจากการสังเคราะห์ของรังไข่ในกึ่งตะกาดที่เจริญอยู่ในระยะที่ IV หรือระยะไข่สุก พบว่าจะมีหลากหลายระดับตั้งแต่ เทาเขียว เขียวแก่ เขียวอ่อน เขียว เทาและเหลืองเขียว อีกทั้งค่าดัชนีของรังไข่ของกึ่งในแต่ละระยะนี้แปรปรวนสูงเนื่องจากมีปัจจัยเกี่ยวกับความสมบูรณ์ของกึ่งแต่ละตัวเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย อนึ่ง กระบวนการพัฒนาของรังไข่เป็นกระบวนการที่ต่อเนื่อง การใช้การสังเคราะห์ลักษณะเพื่อแบ่งแยกระยะการเจริญไม่สามารถทำได้แม่นยำโดยเฉพาะในระยะที่ II และ III หรือระยะคาบเกี่ยวระหว่างระยะ I และ II หรือระยะ III และ IV เป็นต้น แต่อย่างไรก็ดีจากตัวอย่างกึ่งที่สุ่มมาพบว่า กึ่งบางตัวอย่างที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ II และ III มีค่าปริมาณไวเทลอเจนินในเลือดสูงมากกว่าปกติ คาดว่าเกิดเนื่องจากเกิดการสลายตัวของรังไข่ เพราะจากตัวอย่างเลือดกึ่งหลังจากวางไข่จะพบว่าระดับไวเทลอเจนินในเลือดกึ่งเพิ่มขึ้นในระดับต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับปริมาณของไข่ที่หลงเหลืออยู่ในรังไข่ในปริมาณต่าง ๆ (ตาราง 4) ซึ่งต่อมาจะฟ่อนหายไป ซึ่งสอดคล้องกับระดับไวเทลอเจนินในเลือดที่ลดต่ำลงในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน จนถึงระดับต่ำสุดเท่ากับระยะพัก (ภาพประกอบ 10 และตาราง 5)

ในการนี้ของตัวอย่างกึ่งที่มีรังไข่เจริญในระยะที่ II และ III ที่สุ่มขึ้นมาตรวจปริมาณไวเทลอเจนินในเลือดในวันแรกที่จับจากทะเลบางตัวอย่าง (ตาราง 2) พบว่ามีปริมาณไวเทลอเจนินสูงผิดปกติ ทั้งนี้ น่าจะมีสาเหตุมาจากการสลายตัวของรังไข่ แล้วปล่อยไวเทอลินจากรังไข่เข้าสู่กระแสโลหิต การสลายตัวของรังไข่อาจเกิดเนื่องจากสภาวะความกดดัน (stress) จากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีสภาพแตกต่างจากในธรรมชาติ ชักนำไปเกิดการยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ และเกิดการสลายตัวของรังไข่ที่กำลังเจริญในเวลาต่อมา ข้อสนับสนุนแนวคิดนี้ ได้แก่การสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งตะกาดในระยะการเจริญของรังไข่ระยะที่ II, III และ IV จากกึ่งที่จับจากทะเลในวันแรกและจากกึ่งตัวเดิมที่เลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง จะพบว่าระดับไวเทลอเจนินใน

เลือดสูงเกินจากวันแรกมากในกึ่งที่มีรังไข่เจริญในระยะที่ II หรือ III ช่วงต้น ๆ ส่วนกึ่งที่มีรังไข่เจริญมาก (ระยะ 3 ช่วงปลาย) ระดับไวเทลโลเจนนินเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือลดลง (ตาราง 3) แสดงว่าอาจมีการเจริญต่อของรังไข่หรือหยุดการเจริญเตรียมพร้อมที่จะวางไข่หรืออาจมีอัตราการสลายของรังไข่ในอัตราต่ำ (ตาราง 3 กึ่งตัวที่ 7-10)

ในกรณีของกึ่งที่มีรังไข่เจริญในระยะที่ IV จะมีการวางไข่ภายใน 24 ชั่วโมง ในกรณีที่วางไข่ไม่สมบูรณ์ จะมีไข่หลงเหลืออยู่ในส่วนต่าง ๆ ของรังไข่ หลังจากนั้นไข่ก็จะสลายไป พบว่าระดับไวเทลโลเจนนินในเลือดกึ่งหลังการวางไข่เพิ่มขึ้นสูงในระดับต่าง ๆ กัน (ตาราง 4)

ผลการทดลองนี้สนับสนุนข้อสังเกตเกี่ยวกับพัฒนาการของรังไข่ของกึ่งทะเลชนิดต่าง ๆ ที่ว่า การเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมของกึ่งที่ผลิตจากสภาวะธรรมชาติในทะเลก่อให้เกิดการสลายของรังไข่ที่กำลังเจริญในช่วงก่อนไข่สุกซึ่งอาจเป็นผลจากการหลั่งฮอร์โมน GIH เช่นกัน เพราะจากแนววิธีปฏิบัติเพื่อชักนำการวางไข่ของกึ่งทะเลต่าง ๆ เช่น กึ่งกุลาคำทำโดยการตัดก้านคาทั้งที่ได้จากทะเล ไม่ว่าจะเป็นระยะใดก็ตามรังไข่ก็จะเจริญต่อไปอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าไม่ทำการตัดคารังไข่ของกึ่งที่เจริญอยู่ในระยะต้นก็จะฝ่อสลายไป

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจวัดระดับไวเทลลिनหรือไวเทลโลเจนนินของกึ่งทะเล *M. ensis* หรือกึ่งทะเลอื่น ๆ อาจใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนนินจากกึ่ง *M. affinis* ได้แต่ควรวัดแอนติเจนที่ตรงกับกาด ELISA จากกึ่งชนิดเดียวกัน
2. การศึกษาผลของฮอร์โมนที่มีต่อพัฒนาการของรังไข่ เช่น VIH ตัวอย่างกึ่งเริ่มต้นที่ใช้ทดลองควรวัดกึ่งที่อยู่ในระยะพัก คือ หลังจากการวางไข่แล้ว 7 วัน หรือมากกว่านั้น ทั้งนี้เพราะว่ากึ่งในระยะนี้จะมีปริมาณไวเทลโลเจนนินในเลือดต่ำและมีความแปรปรวนน้อย
3. ควรศึกษาผลของการตัดคาคอระดับไวเทลโลเจนนินในเลือดและผลของการให้สารสกัดจากก้านคาคอระดับไวเทลโลเจนนินในเลือด

מדחאמדדו

บรรณานุกรม

- ชูศิลป์ อัคร. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ใช้เป็นอาหารในภาคกลางของประเทศไทย.
วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ ฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526. อัครสำเนา.
ประจวบ หล้าอบล. คู่มือปฏิบัติการกุ้ง. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2525.
ปิยะพงษ์ รัชติพันธุ์. "การเลี้ยงกุ้งทะเล," การเลี้ยงกุ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 1. โครงการหนังสือ
คู่มือประกอบอาชีพสำหรับประชาชน. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, 27-29; 2525.
- ศุภผล เทนเฉลิม. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ใช้เป็นอาหารในภาคใต้ของประเทศไทย.
วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ ฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2527. อัครสำเนา.
สุภาวดี จุลละสร. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เล่ม 2. กรุงเทพฯ ฯ : บริษัทรุ่งศิลป์การพิมพ์
(1977) จำกัด, 2525.
- 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.
- 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.
- Cheesman, D.F. and J. Prebble. "Astaxanthin ester as a prosthetic
group : a carotenoprotein from the hermit crab," Comp. Biochem.
Physiol. 17 : 929-936 ; 1966.
- Charniaux-Cotton, H. "Vitellogenesis and its control in Malacostracan
Crustacea," Amer. Zool. 25 : 197-206 ; 1985.
- Charniaux-Cotton, H. and G. Payen. "Crustacean reproduction," in
Endocrinology Selected Invertebrate Types. Edit H. Laufer and
R. G. H. Downer. Alan R. Liss., New York. p.279-303 ; 1988.
- 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.

- Fernlund, P. and L. Josefsson. "Crustacean color change hormone : amino acid sequence and chemical synthesis," Science. 177 : 173-175 ; 1972.
- Fielder, D.R., K.R. Rao and M. Fingerman. "A female-limited lipoprotein and the diversity of hemocyanin components in the dimorphic variants of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as revealed by disc electrophoresis," Comp. Biochem. Physiol. 39B : 291-297; 1971.
- Fingerman, M. "The endocrine mechanisms of crustaceans," J. Crust. Biol. 70 : 1-24 ; 1987.
- Fyppe, W. and J.D. O'Connor. "Characterization and quantification of a crustacean lipovitellin," Comp. Biochem. Physiol. 47B : 851-867 ; 1974.
- Hasegawa, Y., E. Hirose and Y. Katakura. "Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in crustacea," Amer. Zool. 33 : 403-411 ; 1993.
- 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. Blackwell Scientific Publication, London, 1976.
- 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.
- Lui, C.W. and J.D. O'Connor. "Biosynthesis of lipovitellin by the incorporation of amino acids into the purified subunits," J. Exp. Zool. 195 : 41-52 ; 1976.
- . "Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. III. The incorporation of labelled amino acids into the purified lipovitellin of the crab, *Pachygrapsus crassipes*," J. Exp. Zool. 199 : 105-108 ; 1977.
- 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.
- Quinitio, E.T. and others. "Identification and characterization of vitellin in a hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*," Comp. Biochem. Physiol. 94B : 445-451 ; 1989.
- . "Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*," Invert. Rep. Dev. 19(3) : 221-227 ; 1990.
- Rao, K.R. and others. "Characterization of a Pigment-Dispersing Hormone in eyestalk of the fiddler crab *Uca pugilator*," Proc. Natl. Acad. USA. 82 : 5319-5322 ; 1985.
- 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.
- 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* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)," Inter. J. Invert. Rep. Dev. 12 : 1-12 ; 1987.
- Wallace, R., S. Walker and P. Hauschka. "Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of decapoda," Biochem. 6 : 1582-1590 ; 1967.
- Webster, G. and R. Keller. "Purification, characterization and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda)," J. Comp. Physiol. 156B : 617-624 ; 1986.

- 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. 86(2) : 213-218 ; 1987.
- Zagalsky, P.F. "Comparative studies on the amino acid composition of some carotenoids containing lipoglycoproteins and a glycoprotein from the eggs and ovaries of a certain aquatic invertebrate," Comp. Biochem. Physiol. 41B : 385-395 ; 1972.
- . "A study of the astaxanthin lipovitellin ovoverdin isolated from the ovaries of the lobster *Homarus americanus*," Comp. Biochem. Physiol. 80B : 589-598 ; 1985.
- Zagalsky, P.F. and B.M. Gilchrist. "Isolation of a blue canthaxanthin-lipovitellin from the yolk platelets of *Branchipus stagnalis* (L.) (Crustacea : Anostraca)," Comp. Biochem. physiol. 55B : 195-200 ; 1976.
- Zagalsky, P.F., D.F. Cheesman and H.J. Ceccaldi. "Studies on carotenoid-containing lipoproteins isolated from the eggs and ovaries of certain marine invertebrates," Comp. Biochem. Physiol. 22 : 851-871 ; 1967.

การคำนวณ

பாடகமனந் த

ตาราง 6 แสดงข้อมูลลักษณะของรังไข่และปริมาณไวเทลโลเจนนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ของตัวอย่างกึ่งตกาศ *M. affinis* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ คือระยะที่ I ถึง IV

และระยะหลังจากวางไข่ 1 วัน

* แสดงถึงที่รังไข่มีการสลายตัว

NO.	น้ำหนัก ตัว	น้ำหนัก รังไข่	ค่าดัชนี รังไข่	ระยะการเจริญ ของรังไข่	ลักษณะสีของ รังไข่	ปริมาณไวเทลโลเจนนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
1	35.4	1.83	5.169	IV	เทา	0.427
2	17.1	0.46	2.690	I	เหลืองอ่อน-ใส	0.255
3	16.6	0.49	2.952	I	"	0.671
* 4	25.2	1.53	6.071	III	เขียว	23.872
5	12.0	0.32	2.667	II	ขาว-ใส	1.248
6	18.5	0.72	3.892	II	เทาเหลือง	1.173
7	24.8	0.42	1.694	I	ขาว-ใส	0.133
8	12.2	0.31	2.541	I	เหลือง-ใส	0.264
9	21.0	0.91	4.333	III	เขียวอ่อน	2.350
10	17.1	0.74	4.327	IV	เทาเขียว	0.356
11	12.5	0.18	1.440	I	ขาว-ใส	0.070
12	13.0	0.29	2.231	I	"	0.324
13	15.9	0.75	4.717	IV	เทาเขียว	0.073
14	11.3	0.19	1.681	II	ขาว-ใส	2.425
15	19.1	0.80	4.188	III	เขียวอ่อน	2.842
16	19.7	0.38	1.929	I	ขาว-ใส	0.075
17	15.2	0.50	3.289	I	เหลือง	0.226
18	16.3	0.35	2.147	I	ขาว-ใส	0.099

ตาราง 6 (ต่อ)

NO.	น้ำหนัก ตัว	น้ำหนัก รังไข่	ค่าดัชนี รังไข่	ระยะการเจริญ ของรังไข่	ลักษณะสีของ รังไข่	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
19	17.2	0.78	4.535	III	เขียว	2.896
20	22.6	2.04	9.027	III	เขียว	2.014
21	22.1	0.47	2.127	II	เหลืองอ่อน-ฟ้า	2.646
22	15.6	1.52	9.744	III	เทาเขียวเหลือง	2.113
23	20.9	0.50	2.392	III	เขียวอ่อน	1.559
24	18.9	0.98	5.185	IV	เทาเขียว	1.553
25	19.6	0.80	4.082	IV	"	1.404
26	17.1	0.71	4.152	II	เหลือง	1.484
27	19.5	0.98	5.026	IV	เหลืองเขียว	0.589
28	14.4	0.74	5.139	IV	"	0.798
29	22.7	0.76	3.348	IV	เขียว	1.514
30	18.0	1.04	5.778	III	เหลืองเขียว	1.136
31	13.2	1.09	8.258	IV	เขียว	0.194
32	17.5	2.31	13.200	IV	"	1.480
33	19.0	1.23	6.474	IV	"	1.336
34	12.1	2.46	20.331	IV	"	0.643
35	12.1	1.00	8.264	IV	"	0.484
36	17.9	1.38	7.709	III	"	1.803
37	20.9	0.69	3.301	IV	"	0.403
38	20.3	1.98	9.754	IV	เขียว	0.515

ตาราง 6 (ต่อ)

NO.	น้ำหนัก ตัว	น้ำหนัก รังไข่	ค่าดัชนี รังไข่	ระยะการเจริญ ของรังไข่	ลักษณะสีของ รังไข่	ปริมาณไขมันเทสโทเจน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
39	22.8	0.98	4.298	IV	เทาเขียว	1.530
40	14.2	0.48	3.380	IV	"	0.228
41	11.4	0.58	5.088	IV	"	0.452
42	14.1	0.30	2.128	I	ขาว-ใส	0.099
43	11.2	0.36	3.214	IV	เขียวอ่อน	0.092
44	21.1	3.05	14.455	IV	เขียว	1.352
45	16.0	1.43	8.938	IV	"	0.246
46	12.5	0.30	2.400	I	ใส	0.339
47	33.3	4.01	12.042	IV	เขียว	0.230
48	22.2	1.16	5.225	IV	เขียวอ่อน	0.451
49	19.0	0.09	0.474	I	ขาว-ใส	0.009
50	19.1	0.15	0.785	I	ขาว-ใส	0.336
51	19.0	0.25	1.316	I	ขาว-ใส	0.025
52	17.5	0.10	0.571	I	ขาว-ใส	0.006
53	14.9	0.29	1.946	I	ขาว-ใส	0.164
54	19.2	0.82	4.271	IV	เขียว	0.642
55	20.6	0.59	2.864	II	เหลืองเขียว	2.221
56	23.8	2.38	10.000	III	เขียวขี้ม้า	3.646
57	19.8	0.62	3.131	II	เหลืองขุ่น	2.496
58	16.0	0.47	2.938	II	เหลืองเขียวอ่อน	3.457

ตาราง 6 (ต่อ)

NO.	น้ำหนัก ตัว	น้ำหนัก รังไข่	ค่าดัชนี รังไข่	ระยะการเจริญ ของรังไข่	ลักษณะสีของ รังไข่	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
59	15.8	0.32	2.025	II	เหลืองเขียว	3.992
60	22.0	0.67	3.045	II	เหลืองเขียวอ่อน	1.460
61	22.8	2.62	11.491	III	เขียวขี้ม้า	4.876
*62	16.4	0.45	2.744	III	เขียวอ่อน	11.380
63	18.8	1.80	9.574	III	เขียว	2.571
*64	16.4	1.34	8.171	III	"	47.470
65	18.0	0.55	3.056	III	เขียวอ่อน	2.975
66	18.6	0.38	2.043	II	เหลือง	2.395
67	20.6	0.68	3.301	II	เทาเหลือง	1.681
68	15.5	0.70	4.516	III	เขียวอ่อน	3.885
69	15.2	0.84	5.526	III	"	2.755
*70	16.0	0.73	4.563	III	เขียว	17.362
*71	14.0	0.48	3.429	III	"	28.587
72	13.8	0.28	2.029	II	เหลือง	3.775
73	19.2	0.46	2.396	Spent 1 day	เหลือง-ใส	25.286
74	16.2	0.34	2.099	Spent 1 day	เหลือง-ใส	18.723
75	15.3	0.28	1.830	Spent 1 day	เหลือง-ใส	3.213
76	22.6	0.58	2.566	Spent 1 day	เหลือง-ใส	30.856
77	19.5	0.50	2.564	Spent 1 day	เหลือง-ใส	7.101

ตาราง 6 (ต่อ)

NO.	น้ำหนัก ตัว	น้ำหนัก รังไข่	ค่าดัชนี รังไข่	ระยะเวลาเจริญ ของรังไข่	ลักษณะสีของ รังไข่	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
78	15.0	0.25	1.667	Spent 1 day	เหลือง-ใส	2.125
79	20.9	0.52	2.488	Spent 1 day	เหลืองเขียว-ใส	33.949
80	13.2	0.38	2.879	Spent 1 day	"	1.554

ภาคผนวก ๗

การเตรียมสารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer Saline-PBS)

0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2 (Hudson and Hay. 1976)

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.15	กรัม
H_2O (distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร

2. 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_2O (double distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร

3. สารละลาย Blotto 5%

นมพว่องมันเนย	5.0	กรัม
PBS 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2	100.0	มิลลิลิตร
สารละลายเมอร์ไทรโอเรด 1%	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100	0.1	มิลลิลิตร

4. ซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 (Citrate buffer)

โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate)	29.41	กรัม
สารละลายเมอร์ไทรโอเรด 1%	10.0	มิลลิลิตร

H_2O (distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร
--------------------------	---------	-----------

ปรับพีเอชด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 โมลาร์ หรือ
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 โมลาร์

5. บัฟเฟอร์ซาลิน พีเอช 8.6 (Borate buffer saline)

โซเดียมเตตระโบเรต (Sodium tetraborate)

0.05 โมลาร์	19.071	กรัม
-------------	--------	------

NaCl 0.04 โมลาร์	2.34	กรัม
------------------	------	------

H_2O (distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร
--------------------------	---------	-----------

ปรับพีเอชด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 โมลาร์ หรือ
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 โมลาร์

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นายสีวาพร ชื่อสกุล ลงอันต์

เกิดวันที่ 21 เดือนพฤศจิกายน

พุทธศักราช 2511

สถานที่เกิด

กรุงเทพ ฯ

สถานที่อยู่ปัจจุบัน

บ้านเลขที่ 59 หมู่ 12

แขวงบางหว้า เขตภาษีเจริญ

กรุงเทพ ฯ 10160

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2526

มัธยมศึกษาปีที่ 3 (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียน
วัดรางบัว กรุงเทพ ฯ

พ.ศ. 2529

มัธยมศึกษาปีที่ 6 (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียน
วัดนวลนรดิศ กรุงเทพ ฯ

พ.ศ. 2533

วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร

พ.ศ. 2536

วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร

การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัลเกล็ดและการตรวจ
วัดไวรัลเกล็ดในเลือดกึ่งตะกาศ

บทคัดย่อ

ของ

ศิวาพร ลงยันต์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

มีนาคม 2537

ได้ผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินโดยการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยสารสกัดจากรังไข่กึ่งตะกาด *Metapenaeus affinis* ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และได้ผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนนโดยการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อไวเทลลินกับเลือดกึ่งตะกาดตัวเมีย จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมทั้งสองต่อแอนติเจนจากกุ้งชนิดต่าง ๆ โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่าแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่และเลือดจากกึ่งตะกาดตัวเมีย *M. affinis* และ *M. ensis* มีลักษณะคล้ายคลึงกันมากกว่าแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่และเลือดจากกึ่งกุดาคตัวเมีย (*Penaeus monodon*) แต่จะไม่สังเกตเห็นปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับสารสกัดจากรังไข่หรือเลือดของกึ่งก้ามกราม

(*Macrobrachium rosenbergii*) สารสกัดจากอวัยวะและเลือดกึ่งตะกาด (*M. affinis*) ตัวผู้ ความจำเพาะของแอนติซีรัมทั้งสองตรวจสอบโดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชันและอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงแนวตะกอนคล้ายคลึงกัน แต่แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนประกอบอื่น ๆ ในรังไข่ปะปนอยู่ด้วย ในทำนองเดียวกัน แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนนก็มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนประกอบอื่น ๆ ในเลือดปะปนอยู่ด้วย แต่ในกรณีของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนนสามารถกำจัดแอนติบอดีที่ปะปนมาโดยการดูดซับแอนติซีรัมด้วยเลือดกึ่งตะกาดตัวผู้

แอนติซีรัมทั้งสองมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันในการตรวจสอบปริมาณไวเทลโลเจนนในเลือดกึ่งตะกาด *M. affinis* โดยวิธี competitive ELISA แต่กรณีของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนนมีข้อได้เปรียบคือ เมื่อใช้แอนติเจนจากเลือดกึ่งตะกาดตัวเมียที่ความเข้มข้นสูง สามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีต่อสารสกัดจากรังไข่ที่ครึ่งบนภาค ELISA ได้อย่างสมบูรณ์กว่ากรณีที่ใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลิน นอกจากนี้แอนติซีรัมนี้สามารถใช้ตรวจสอบไวเทลลินจากกึ่งตะกาดชนิดอื่นเช่น *M. ensis* เป็นต้น

จากการสำรวจระดับไวเทลโลเจนนของเลือดกึ่งตะกาด *M. affinis* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ คือระยะที่ I ถึง IV และระยะหลังจากวางไข่ด้วยวิธี competitive ELISA พบว่าระดับไวเทลโลเจนนในเลือดจะอยู่ในระดับต่ำในกุ้งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ I ซึ่งเป็นระยะพัก คือประมาณ 0.193 ± 0.167 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสูงขึ้นในกุ้งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ II และ III คือประมาณ 2.343 ± 0.906 และ 2.673 ± 0.951 มิลลิกรัมต่อมิลลิ-

ลิตตามล่ำดับ และมีปริมาณลดลงในกึ่งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 4 (ก่อนการวางไข่) คือประมาณ 0.708 ± 0.508 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในระยะหลังวางไข่ 1 วัน พบว่าระดับไวเทลโลเจนนีจะสูงขึ้นและแปรปรวนในระดับต่าง ๆ (15.351 ± 12.330 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งอาจสืบเนื่องจากการสลายตัวของไข่ที่ยังหลงเหลือจากการวางไข่ไม่สมบูรณ์ ในบางตัวอย่างของกึ่งที่มีรังไข่เจริญในระยะที่ II และ III พบระดับไวเทลโลเจนนีในเลือดสูงมากผิดปกติ คาดว่าเกิดเนื่องจากการสลายตัวของรังไข่ที่กำลังเจริญในระยะต้น ๆ และปล่อยไวเทลโลเจนนีเข้าสู่กระแสโลหิต ซึ่งได้ยืนยันโดยการตรวจระดับไวเทลโลเจนนีจากเลือดกึ่งตะกาศที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ II, III และ IV ในวันแรกและหลังจากเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ 24 ชั่วโมง พบว่ากึ่งตะกาศที่มีระยะการเจริญของรังไข่อยู่ในระยะที่ II หรือ III ช่วงแรก ๆ จะมีระดับไวเทลโลเจนนีเพิ่มขึ้นสูงมากหลังจากเลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง แต่ในกึ่งที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะ III ช่วงปลาย ระดับไวเทลโลเจนนีเปลี่ยนแปลงไม่มาก ส่วนกึ่งระยะหลังวางไข่จะมีระดับไวเทลโลเจนนีในเลือดแปรปรวนตามปริมาณไข่ที่หลงเหลืออยู่ในรังไข่ และระดับไวเทลโลเจนนีจะลดต่ำลงเรื่อย ๆ ในอัตราต่าง ๆ กัน จนถึงระดับต่ำใกล้เคียงกับระยะพักหลังจากวางไข่ได้ 7 วัน

PRODUCTION OF ANTIBODY AGAINST VITELLIN AND DETERMINATION
OF VITELLOGENIN IN THE HEMOLYMPH OF
Metapenaeus affinis

AN ABSTRACT

BY

SIWAPORN LONGYANT

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

March 1994

The vitellin specific antisera were obtained from mice immunized with ammonium sulfate precipitate ovarian extract of the shrimp, *Metapenaeus affinis* and the vitellogenin specific antisera were produced by immunization of mice with precipitate from a mixture of anti-vitellin antiserum and haemolymph of the female shrimp. Specificity of both antisera was determined by double immunodiffusion against antigens from various shrimp species and by immunoelectrophoresis. The antigens from ovarian extract and from female hemolymph of *M. affinis* and *M. ensis* show higher degree of similarity than the antigens from ovarian extract and from female hemolymph of the tiger prawn *Penaeus monodon*. Cross-react of both antisera to the antigens from ovarian extract and female hemolymph of the giant fresh-water prawn *Macrobrachium rosenbergii*, and from testicular extract and male hemolymph of *M. affinis* were not observed.

The anti-vitellin antiserum also contain antibodies against other components in ovarian extract as well as the anti-vitellogenin antiserum contain antibodies against other components in blood. However, those antibodies in the anti-vitellogenin antiserum could be eliminated by absorption of the antiserum with hemolymph from the male *M. affinis*.

Both antisera showed similar consistency for determination of vitellogenin levels in the hemolymph of *M. affinis* by competitive ELISA method. However, when the anti-vitellin antiserum was used, the high concentration of female hemolymph from *M. affinis* could not completely block the binding of antibodies to the ovarian antigens where as it could when the anti-vitellogenin antiserum was used. The anti-

vitellogenin antiserum can be used to determine the levels of vitellogenin hemolymph of *M. ensis* as well.

The relationship between vitellogenin levels in the hemolymph and ovarian development was surveyed from blood samples of *M. affinis* at different stages of ovarian development (I to IV) and post spawning. During the resting stage of the ovarian development (stage I), the hemolymph vitellogenin level was very low (about 0.193 ± 0.167 mg/ml) compare to the growing stage (II & III) which was high about 2.343 ± 0.906 and 2.673 ± 0.951 mg/ml. The level of vitellogenin in the hemolymph decreased to about 0.708 ± 0.508 mg/ml during the riping stage (stage IV) and rising up to various degrees after spawning (spent; 15.351 ± 12.330 mg/ml). The vitellogenin levels of some hemolymph samples from *M. affinis* with ovarian development stage II or III were unusually high. It is possible that the high levels of vitellogenin in blood may be result from degeneration of the early growing ovary and from resorption of vitellogenin into the circulation. This evidence was confirmed by determination of hemolymph vitellogenin of shrimp with ovarian development stage II, III and IV after maintained in captivity for 24 hours. After 24 hours in captivity the vitellogenin levels in hemolymph strikely increased in shrimp with ovarian development stage II and early of stage III but slightly changed in shrimp with ovarian development at late of stage III. The hemolymph vitellogenin levels in post spawning shrimp were quite variable depending on the amount of unspawned eggs remained in the ovary and gradually decreased to the low levels within 7 days.