

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินเพื่อใช้ตรวจไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมพ์ของปูทะเล
Scylla serrata (Forsk.)

ปริญญานิพนธ์
ของ
นุชนาถ เกษมวงศ์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
มีนาคม 2542
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นิตยา ธรรมพาลีศ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นิตยา ธรรมพาลีศ)
.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันธุ์สิน เกตุทัต)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2542

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างยิ่งจาก รศ. ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ผศ.ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ รศ. นิตยา ธรรมพาลีศ รวมทั้ง ผศ. พันธุ์สิน เกตุทัต ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณศิวาพร ลงยันต์ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำด้วยดี มาโดยตลอด จนทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณพาณี จักรแสงชัยโชติ คุณสมปอง ใจดีเฉย คุณวันเพ็ญ สาหร่าย-ทองคำ คุณธิดา อมร คุณจิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม คุณนนทิกา ปานจันทร์ คุณจันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย คุณสิริรัตน์ นิสารัตนพร และคุณสมอรรถ บุนยะรัตเวช ที่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและเป็นที่กำลังใจอย่างยิ่งในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณและขอมอบความสำเร็จในครั้งนี้แด่คุณพ่อชำนานู เกษมวงศ์ ผู้ล่วงลับไปแล้ว และขอขอบพระคุณคุณแม่ันทา เกษมวงศ์ และทุก ๆ คนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนามในที่นี้ ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน รวมทั้งกำลังใจจากเพื่อน ๆ F.5 ทุกคนซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

นุชนาถ เกษมวงศ์

สารบัญ

บทที่

หน้า

1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
ชีววิทยาของปูทะเล	16
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	25
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	25
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	26
2 วิธีการวิจัย	27
สัตว์ทดลอง	27
อุปกรณ์และสารเคมี	27
วิธีดำเนินการทดลอง	30
การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล.....	31
การปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวเทลลินในหนูขาว	31
การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น (double immunodiffusion)	32
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล	32
การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล	33
การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและ ไวเทลโลเจนิน	35
การผลิต ascites fluid จากผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน	37
การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA	37
การหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ กับระยะพัฒนาการของรังไข่โดยวิธี competitive ELISA	38
การวิเคราะห์ข้อมูล	39

3 ผลการวิจัย	51
4 สรุปและอภิปรายผล	65
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก	76
ภาคผนวก ก	77
ภาคผนวก ข	82
ประวัติผู้วิจัยโดยย่อ	89

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1 การศึกษาเกี่ยวกับไวเทลลินและไวเทลโลเจนนในสัตว์พวกครัสตาเซีย	10
2 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนน	62
3 การประเมินความแม่นยำของวิธี competitive ELISA ในการวัดปริมาณ ไวเทลโลเจนน	63
4 ปริมาณไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมพ์ของปูทะเลที่รังไข่มีพัฒนาการ ในระยะที่ 1-4	64
5 เปรียบเทียบไวเทลลินและไวเทลโลเจนนในสัตว์ครัสตาเซีย	68
6 ปริมาณไวเทลโลเจนนในเลือดปูทะเลที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 1	78
7 ปริมาณไวเทลโลเจนนในเลือดปูทะเลที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 2	79
8 ปริมาณไวเทลโลเจนนในเลือดปูทะเลที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 3	80
9 ปริมาณไวเทลโลเจนนในเลือดปูทะเลที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 4	81
10 การเตรียม separating gel และ stacking gel	87

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	ลักษณะทั่วไปของปูทะเล (<i>Scylla serrata</i>)	19
2	ความแตกต่างระหว่างเพศของปูทะเลโดยอาศัยลักษณะที่แตกต่าง บริเวณส่วนท้อง (abdomen) ของปูทะเล	20
3	วงจรชีวิตของปูทะเล (<i>Scylla serrata</i>)	21
4	การพัฒนาของปูทะเลวัยอ่อนระยะต่าง ๆ	22
5	การพัฒนาของรังไข่ปูทะเลในระยะต่าง ๆ	24
6	ขั้นตอนดำเนินการทดลอง	40
7	การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล	41
8	การปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวเทลลินและตรวจสอบความจำเพาะ และคุณภาพของแอนติซีรัมจากหนูขาว	42
9	ขั้นตอนการตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแอนติซีรัม โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน	43
10	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน	44
11	ขั้นตอนการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA	45
12	ขั้นตอนการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot-ELISA	46
13	ขั้นตอนการตรวจสอบ Isotype และ sub-isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี sandwich ELISA	47
14	ขั้นตอนการตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Western blot	48
15	ขั้นตอนการตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนนินโดยวิธี competitive ELISA	49
16	ขั้นตอนการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนนินในฮีโมลิมพ์ กับระยะพัฒนาการของรังไข่	50
17	การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแอนติซีรัมของหนู 5 ตัว กับแอนติเจนต่าง ๆ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน	55
18	Dot-ELISA จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี (SSV) 5 ชนิด	56
19	Dot-ELISA จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี (SSV) 5 ชนิด โดยใช้ GAM-HRP ที่ดูดซับด้วยฮีโมลิมพ์ของปูทะเลเพศผู้	57

20	PAGE ของฮีโมลิมป์ปูทะเลเพศเมีย และสารสกัดจากรังไข่ ย้อมด้วย Coomassie blue, PAS, Sudan black B และ Western blot ด้วย mouse anti-vitellin antiserum หรือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่าง ๆ SSV36.3, SSV43.1, SSV45, SSV71 และ SSV81	58
21	SDS-PAGE ของฮีโมลิมป์ปูทะเลเพศผู้ เพศเมียและสารสกัดจากรังไข่ ย้อมด้วย Coomassie blue ผล Western blot ด้วย mouse anti-vitellin antiserum หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี SSV36.3 หรือ SSV81	59
22	Competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและตัวอย่างฮีโมลิมป์ของ ปูทะเลเพศเมียและเพศผู้ที่เจือจางความเข้มข้นระดับต่าง ๆ โดยใช้ ascites fluid ของ SSV71 เจือจาง 1: 10,000	60
23	เปรียบเทียบระดับไวเทลโลเจนนินในฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมีย <i>S. serrata</i> กับดัชนีของรังไข่ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ	61

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในกระบวนการสะสมไข่แดง (vitellogenesis) ของสัตว์พวกครัสเตเชีย (crustacean) จะพบไวเทลลิน (vitellin) หรือ ไลโปไวเทลลิน (lipovitellin) เป็นโปรตีนหลักที่สำคัญซึ่งสะสมอยู่ในไข่แดง (yolk) ระหว่างที่มีการเจริญหรือมีพัฒนาการของรังไข่ เพื่อเป็นแหล่งอาหารสำหรับตัวอ่อน

ไวเทลลินเป็นโปรตีนหลักในไข่แดง มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ไวเทลลินประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) จำนวนตั้งแต่ 2-11 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 40-200 กิโลดาลตัน (Lui and O'Connor. 1977; Eastman-Reks and Fingerman. 1985) โดยขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ซึ่งประกอบด้วยไขมัน (lipid) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และคาร์โรทีนอยด์ (carotenoid) ในรูป lipo-glyco-carotenoprotein (Chang and others. 1993; Chen and others. 1993) ซึ่งคาร์โรทีนอยด์จะเป็นส่วนที่ทำให้ไวเทลลินจากรังไข่มีสีที่แตกต่างกันโดยขึ้นกับชนิดของสัตว์นั้น ๆ เช่น ในปูเสฉวน (*hermit crab*) *Eupagurus bernhardus* มีสีม่วง (Cheesman and Prebble. 1966) ปูม้า (blue crab) *Callinectes sapidus* มีสีเหลืองเข้ม (Kerr. 1969) กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* รังไข่จะมีสีเขียวคล้ำ (Quinitio and others. 1990) และกุ้งทะเลในวงศ์ Penaeidae ชนิดต่าง ๆ ไวเทลลินจากรังไข่จะสีเขียวเข้ม (Zagalsky and others. 1967) ไวเทลลินจะพบเฉพาะในสัตว์เพศเมียในระยะที่รังไข่กำลังเจริญ จะไม่พบในสัตว์ที่รังไข่ยังไม่เจริญ (Wollin and others. 1973; Tom and others. 1987) และยังพบโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกับไวเทลลินในฮีโมลิมป์ (hemolymph) ของสัตว์เพศเมียขณะที่มีการพัฒนาของรังไข่ เรียกโปรตีนในฮีโมลิมป์นี้ว่า ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin)

สำหรับแหล่งที่สร้างไวเทลลิน จะพบว่าการสร้างที่ส่วนของรังไข่ (Lui and O'Connor. 1977; Eastman-Reks and Fingerman. 1985; Yano and Cheinzei. 1987; Browdy and others. 1990; Lee and Watson. 1995) หรือสร้างที่ตับ-ตับอ่อน (hepatopancreas) ในรูปของไวเทลโลเจนิน แล้วลำเลียงมาทางระบบหมุนเวียนโลหิตหรือฮีโมลิมป์ เข้าสู่รังไข่และเปลี่ยนแปลงเป็นไวเทลลินหรือไลโปไวเทลลิน (Quackenbush. 1989; Fainzilber and others. 1992) หรือสร้างมาจาก fat body ในสัตว์พวก amphipods และ isopods (Carniaux-Cotton. 1985; Suzuki and others. 1987; Tom and others. 1987)

ในสัตว์พวกครัสเตเชียในกลุ่ม decapods กระบวนการสะสมไข่แดงจะถูกควบคุมโดยฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนาการของรังไข่ (Gonad Inhibiting Hormone : GIH) หรือ ฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดง (Vitellogenesis Inhibiting Hormone : VIH) (Soyez and others. 1987;

Quackenbush. 1989; Aguilar and others. 1992; Lee and Watson. 1995) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมายืนยันว่าในสัตว์พวกครัสตาเซียน เช่น กุ้งและปูชนิดต่าง ๆ มีฮอร์โมนยับยั้งการสะสมของไข่แดงในรังไข่อยู่ในส่วนของก้านตา เนื่องจากเมื่อมีการทำลายก้านตาโดยวิธีบีบตาหรือวิธีอื่น ๆ จะมีผลทำให้เกิดการพัฒนาของรังไข่อย่างรวดเร็ว (Anilkumar and Adiyodi. 1980) และเมื่อฉีดสารสกัดจากก้านตาลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกทำลายก้านตาหรือใส่สารสกัดจากก้านตาในหลอดทดลองที่มีส่วนของเนื้อเยื่อรังไข่ของปูลงไป จะมีผลไปยับยั้งการพัฒนาของรังไข่หรือมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนต่าง ๆ ในส่วนของเนื้อเยื่อจากรังไข่ (Quackenbush and Keeley. 1988; Lee and Watson. 1995) ซึ่งการทำงานของฮอร์โมนเหล่านี้จึงเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไวเทลลินโดยตรง

ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงคุณลักษณะของไวเทลลินและความสัมพันธ์ของระดับไวเทลโลเจนนินในฮีโมลิมพ์ของปูทะเล *Scylla serrata* กับการพัฒนาของรังไข่ เนื่องจากปูทะเลเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศและส่งออกเป็นสินค้าออกไปจำหน่ายต่างประเทศ ทำรายได้เข้าประเทศปีหนึ่ง ๆ เป็นเงินจำนวนมาก แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงปูทะเลได้อย่างธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้ง ยังต้องจับปูจากธรรมชาติซึ่งเป็นปูขนาดเล็กหรือปูโพรงไปขุนให้กลายเป็นปูเนื้อแน่นแล้วจึงนำไปจำหน่ายได้ในราคาสูง (สุภาพ ไพโรพนาพงษ์. 2538) นอกจากนี้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับปูทะเลชนิดนี้ยังมีน้อยในแง่การศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการสะสมของไข่แดงและฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของรังไข่ รวมทั้งในด้านการพัฒนาวิธีการที่จะติดตามการเจริญของรังไข่โดยที่ไม่ต้องฆ่าแม่พันธุ์ปูทะเล ดังนั้นจึงคาดว่าผลการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะเป็นประโยชน์ในแง่ใช้เป็นดัชนีในการบ่งบอกถึงการพัฒนาของรังไข่และใช้สำหรับการตรวจสอบและติดตามฮอร์โมนที่ยับยั้งการเจริญของรังไข่เพื่อการแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของรังไข่ ทั้งยังเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเลี้ยงปูทะเลโดยตรงต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับไวเทลลินจากรังไข่ ไวเทลโลเจนนินในฮีโมลิมพ์ และฮอร์โมนที่ยับยั้งการสะสมไข่แดงในรังไข่ในสัตว์พวกครัสตาเซียน เช่น กุ้ง และปูชนิดต่าง ๆ ได้มีผู้ศึกษามาบ้างแล้วดังนี้ (ตาราง 1)

ในปี 1967 วอลเลส วอลคเกอร์และฮอสชกา (Wallace, Walker and Hauschka. 1967) ได้แยกไลโปไวเทลินจากรังไข่ของสัตว์พวกครัสตาเซียในอันดับ (order) decapod 6 ชนิด ได้แก่ ปูเสฉวน *Pagurus pollicaris* ปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ปูแสม *Sesarma reticulatum* ปูแมงมุม *Libinia emarginata* กุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* และปูหิน *Cancer irroratus* โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และศึกษาคุณลักษณะของไลโปไวเทลินที่แยกได้ พบว่าประกอบไปด้วยโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (high-density lipoprotein) เป็นส่วนใหญ่ และ คาร์โบทีนอยด์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยประมาณ 350,000 ดาลตัน

ฮอร์นและเคอร์ (Horn and Kerr. 1969) สนใจศึกษาฮีโมลิมพ์ของปูม้า *Callinectes sapidus* โดยศึกษาลักษณะรูปแบบของแบนโปรตีนเมื่อแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ารูปแบบของแบนโปรตีนจะมีความจำเพาะในแต่ละชนิดของปู และยังพบแบนโปรตีน 2 แบนในตัวอย่างฮีโมลิมพ์ของปูเทศเมียที่รังไข่เจริญเต็มที่ แต่ไม่พบแถบแบนนี้ในตัวอย่างฮีโมลิมพ์ปูเพศผู้ จึงเป็นไปได้ว่าแถบแบนโปรตีนนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมไข่แดงของรังไข่ ซึ่งเคอร์ (Kerr. 1969) เสนอว่าฮีโมลิมพ์อาจจะเป็นตัวขนส่งโปรตีนในไข่แดงหรือประกอบด้วยสารที่เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนในไข่แดงและส่งต่อไปสะสมที่รังไข่ โวลิน, ลัฟเฟอร์และอัลเบอร์ตินิ (Wolin, Laufer and Albertini. 1973) ได้ตรวจหาโปรตีนในฮีโมลิมพ์ที่มีลักษณะเหมือนไลโปไวเทลินในสัตว์พวกครัสตาเซีย ได้แก่ ปูก้ามดาบ *Uca pugilator* และปูแมงมุม *Libinia emarginata* โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของปูก้ามดาบเทศเมีย ในการตรวจหาโปรตีนในฮีโมลิมพ์โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion) พบว่าทั้งในฮีโมลิมพ์ของปูก้ามดาบและปูแมงมุมในระยะที่มีการสะสมของไข่แดงจะพบโปรตีนที่มีลักษณะเหมือนกับไลโปไวเทลิน แต่ไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในฮีโมลิมพ์ปูเพศผู้หรือปูเทศเมียที่รังไข่ยังไม่มีการพัฒนา และในการศึกษากระบวนการไพโนไซโตซิส (pinocytosis) ของไลโปไวเทลินที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสง และสี trypan blue บ่มกับรังไข่ของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ปูแมงมุม *Libinia emarginata* และกุ้ง crayfish *Cambarus clarkii* พบว่าบทบาทสำคัญในการสะสมไข่แดงของเซลล์ไข่ เริ่มจากการเกิดไพโนไซโตซิสของไลโปไวเทลินจากฮีโมลิมพ์และส่งต่อไปยังเซลล์ไข่ ส่วนโปรตีนอื่น ๆ ที่พบในเซลล์ไข่อาจจะสร้างภายในเซลล์ไข่เอง

ในการศึกษาไลโปไวเทลินในกุ้ง crayfish *Procambarus sp.* ฟิปปะและโอคอนเนอร์ (Fyppe and O' Connor. 1974) ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของกุ้งเทศเมีย ทำปฏิกิริยากับไลโปไวเทลินโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน และวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส (immunoelectrophoresis) พบว่า โปรตีนในฮีโมลิมพ์ของกุ้งชนิดนี้มีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสตรี้ (immunochemistry) หรือลักษณะทางเคมีที่ตรวจสอบด้วยแอนติบอดีเหมือนกับไลโปไวเทลิน และไลโปไวเทลินมีน้ำหนักโมเลกุล 500,000 ดาลตัน ประกอบด้วยไขมัน 35 เปอร์เซ็นต์

ลูและโอคอนเนอร์ (Lui and O' Connor. 1976) ศึกษาส่วนประกอบของกรดอะมิโนของไลโปไวเทลลินในกุ้ง crayfish *Procambarus* sp. ซึ่งไลโปไวเทลลินของกุ้งชนิดนี้ประกอบไปด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 5 หน่วยย่อย จากการบ่มรังไข่ด้วย ^3H leucine พบว่ากรดอะมิโนที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีถูกนำไปใช้ร่วมในการสังเคราะห์ไลโปไวเทลลิน ซึ่งพบใน 3 หน่วยย่อย แสดงว่ารังไข่ระยะที่มีการสะสมไข่แดงสามารถสังเคราะห์ไลโปไวเทลลินได้เอง และในปีถัดมา ลูและโอคอนเนอร์ (Lui and O' Connor. 1977) ได้ศึกษาไลโปไวเทลลินและศึกษาส่วนประกอบของกรดอะมิโนในไลโปไวเทลลินจากปูแสม *Pachygrapsus crassipes* และศึกษาเกี่ยวกับแหล่งที่มีการสังเคราะห์ไลโปไวเทลลิน โดยวิธีเดียวกันกับที่ใช้ในการศึกษากุ้ง crayfish *Procambarus* sp. พบว่า สามารถแยกไลโปไวเทลลินของปูแสมได้ 3 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 118,000 105,000 และ 83,000 ดาลตัน ตามลำดับ และจากการติดตามด้วย ^3H leucine ในการสังเคราะห์ไลโปไวเทลลิน จะพบสารกัมมันตภาพรังสีใน 2 หน่วยย่อย แสดงว่ารังไข่ของปูแสมที่อยู่ในระยะสะสมไข่แดงสามารถสังเคราะห์ไลโปไวเทลลินได้เช่นกัน

ต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ โดยในปี 1981 โบไมร์สกีและคนอื่น ๆ (Bomirski and others. 1981) ได้แยกสกัดฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้านดาของปู *Cancer magister* เพศเมียโดยการต้ม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด Sephadex G-25 และทดสอบสารสกัดที่ได้ในกุ้ง *Crangon crangon* เพศเมียที่ตัดตา โดยตรวจหาดัชนีของรังไข่ (ovarian index-OI) เปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ตัดตาและกุ้งที่ตัดตาที่ไม่ได้ฉีดสารสกัด พบว่า ฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่เป็นสารจำพวกเปปไทด์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,000 ดาลตัน

จากนั้นในปี 1983 แควกเคนบushและเฮร์นคินด (Quackenbush and Herrnkind. 1983) ได้แยกสกัดฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้านดากุ้งมังกร *Panulirus argus* โดยวิธีผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด Sephadex และ polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเป็นสารจำพวกเปปไทด์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 ดาลตัน

อีสท์แมนเร็คส์และฟิงเจอร์แมน (Eastmans-Rek and Fingerman. 1985) ศึกษาไลโปเทลลินจากรังไข่ของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* และติดตามการสังเคราะห์ไลโปเทลลินด้วย 4,5- ^3H leucine พบว่า ไลโปเทลลินมีการสังเคราะห์ที่บริเวณรังไข่ เมื่อนำไลโปเทลลินไปแยกโปรตีนโดย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าไลโปเทลลินประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 123,500 และ 100,600 ดาลตัน

เดอร์เรลและคณะ (Derell and others. 1986) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไลโปเทลลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เมื่อนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณไลโปเทลโลเจนนในฮีโมลิมพ์ของกุ้งก้ามกรามเพศเมียในช่วงต่าง ๆ ของวงจรการสืบพันธุ์และการลอกคราบ พบว่าปริมาณไลโปเทลโลเจนนมีปริมาณที่ต่ำประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตรในช่วงต้นของวงจรการสืบพันธุ์ และปริมาณไวเทลโลเจินจะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดประมาณ 10-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในช่วงที่กุ้งใกล้มีการลอกคราบ หลังจากนั้นปริมาณของไวเทลโลเจินจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากกุ้งวางไข่ จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าไวเทลลินในกุ้งก้ามกรามมีน้ำหนักโมเลกุล 330,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 92,000 และ 84,000 ดาลตัน โดยวิธี gel filtration และ SDS-PAGE ตามลำดับ

ต่อมายาโนและชินซาย (Yano and Chinzei. 1987) ทำการศึกษาตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ไวเทลลินในกุ้งクルマ *Penaeus japonicus* โดยนำเนื้อเยื่อจากรังไข่ และส่วนตับ-ตับอ่อนของกุ้งクルマเพศเมียบ่มในอาหารเลี้ยงที่ประกอบด้วย 14 C-amino acid และติดตามการสังเคราะห์ไวเทลลินด้วยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส และ SDS-PAGE พบว่ารังไข่เป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ไวเทลลินในกุ้งクルマ และในปีเดียวกันนี้ ทอม, กอเรนและโอวาเดีย (Tom, Goren and Ovadia. 1987) ได้ผลิตแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งทะเล *Parapenaeus longirostris* และนำไปใช้ในการศึกษาบริเวณที่พบไวเทลลินในส่วนของเนื้อเยื่อ และฮีโมลิมฟ์ของกุ้งทะเล ซึ่งจากการใช้แอนติบอดีนี้ในการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน อิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิสและอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (immunofluorescence) พบสารคล้ายไวเทลลินในเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนา และไม่พบสารคล้ายไวเทลลินนี้ในรังไข่ที่อยู่ในระยะแรกของการพัฒนา นอกจากนี้ยังพบสารคล้ายไวเทลลินในส่วนอื่น ๆ ได้แก่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง (subepidermal adipose tissue) และในฮีโมลิมฟ์ แสดงว่าไวเทลลินมีการสังเคราะห์จากส่วนอื่นภายนอกรังไข่

ควินิตีโอและคณะ (Quinitio and others. 1989) ได้ทำให้ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งน้ำกร่อย *Pandalus kessleri* บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี 3 ขั้นตอน คือ hydroxylapatite, DEAE (diethylaminoethyl) cellulose และ sepharose 6B ตามลำดับ พบว่าไวเทลลินที่ทำให้บริสุทธิ์ได้น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 560,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยมีน้ำหนักโมเลกุล 81,000 และ 110,000 ดาลตัน และยังพบว่าโปรตีนที่จำเพาะในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งเพศชนิดนี้ มีลักษณะเหมือนกับไวเทลลินที่ได้จากรังไข่โดยการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิสและอิมมูโนดิฟฟิวชัน ปริมาณของไวเทลโลเจินในฮีโมลิมฟ์จะเพิ่มขึ้นขณะที่รังไข่อยู่ในระยะที่มีการสะสมไข่แดง แต่จะลดลงหลังจากกุ้งวางไข่แล้ว ต่อมาในปี 1990 ควินิตีโอและคณะ (Quinitio and others. 1990) ได้ทำให้ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ hydroxylapatite และ sepharose 6B ตามลำดับ พบว่าไวเทลลินที่ทำให้บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 540,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 74,000 83,000 104,000 และ 168,000 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งไวเทลลินที่แยกได้อยู่ในรูป glycolipoprotein

ต่อมาทอมและคณะ (Tom and others. 1992) ได้ศึกษาเปรียบเทียบไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งในวงศ์ Penaeids 2 ชนิด ได้แก่ กุ้งกุลาลาย *Penaeus semisulcatus* กับกุ้ง *Penaeus vanamei* โดยวิธี gel filtration, electrophoresis, Western blot และวิเคราะห์หาองค์-

ประกอบของกรดอะมิโน พบว่า ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งทั้ง 2 ชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน โดยไวเทลลินของ *Penaeus semisulcatus* มีน้ำหนักโมเลกุล 283,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย น้ำหนักโมเลกุล 86,000 และ 95,000 ดาลตัน และไวเทลลินของ *Penaeus vanamei* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 289,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 61,000 และ 69,000 ดาลตัน จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโนของกุ้งทั้งสองชนิด พบว่า กุ้งทั้งสองมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกันเกือบทุกตัวมีเพียง cysteine ที่พบในกุ้ง *Penaeus vanamei* และตรวจไม่พบ tryptophan ในกุ้งทั้งสองชนิด

ปัดมาเซนและเซน (Chen and Chen. 1993) ได้ทำให้ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* บริสุทธิ์โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), SDS-PAGE, gel elution และ Western blot พบว่า ไวเทลลินประกอบไปด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 4 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 74,000 83,000 104,000 และ 168,000 ดาลตันตามลำดับ ในปีเดียวกันนี้ ชาง และคณะ (Chang and others. 1993) ได้ทำให้ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* บริสุทธิ์เช่นเดียวกับเซนและเซน แต่ใช้วิธีการต่างกัน ซึ่งชางและคณะแยกไวเทลลินโดยใช้ gel filtration, hydroxylapatite, DEAE-Sephacel และ PAGE พบว่าไวเทลลินมีน้ำหนักโมเลกุล 492,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยถึง 8 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 35,000 45,000 49,000 58,000 64,000 68,000 82,000 และ 91,000 ดาลตันตามลำดับ ซึ่งไวเทลลินอยู่ในรูป lipo-glyco-caroteno-protein ในปีถัดมา ชางและคณะ (Chang and others. 1994) ได้ศึกษาไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เพศเมียที่โตเต็มวัยด้วยวิธี ultracentrifuge, PAGE, SDS-PAGE, และ Western blot พบว่าไวเทลโลเจนินที่แยกได้ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย น้ำหนักโมเลกุล 82,000 และ 170,000 ดาลตัน ซึ่งอยู่ในรูป lipo-glyco-phosphoprotein

ต่อมาชางและเจง (Chang and Jeng. 1995) ศึกษาไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งทะเล *Penaeus chinensis* เพศเมีย โดยนำฮีโมลิมพ์ของกุ้งมาย้อมด้วย Sudan black B แล้วนำไปปั่นด้วย ultracentrifuge แล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยวิธี PAGE, Western blot, immunoprecipitation และ gel elution จากนั้นนำสารที่แยกได้ไปศึกษาคุณลักษณะต่อโดย SDS-PAGE พบว่าไวเทลโลเจนินประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 และ 191,000 ดาลตันตามลำดับ อยู่ในรูป lipo-glyco-phosphoprotein ชางและคณะ (Chang and others. 1996) สนใจศึกษาไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งทะเล *Penaeus chinensis* โดยนำรังไข่มาบดและทำให้บริสุทธิ์โดย gel filtration, hydroxylapatite, PAGE และ gel elution ไวเทลลินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 380,000 ดาลตัน และเมื่อนำไปศึกษาต่อด้วย SDS-PAGE พบว่าไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งทะเล *Penaeus chinensis* ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 5 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 40,000 58,000 78,000 85,000 และ 105,000 ดาลตันตามลำดับ

ส่วนรายงานการทำให้ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* บริสุทธิ์ (Qiu and others. 1997) ด้วยวิธี gel filtration และ anion exchange chromatography จากนั้นนำมาศึกษาคุณลักษณะของไวเทลลินโดย PAGE, SDS-PAGE, Western blot และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโน พบว่าไวเทลลินมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ไม่แตกต่างมากนักกับกุ้งในวงศ์ penaeidea ชนิดอื่น ๆ และไวเทลลินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 350,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 76,000 และ 102,000 ดาลตัน และ ในปี 1999 ลงยันต์และคณะ (Longyant and others. 1999 impress) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสารสกัดจากรังไข่และฮีโมลิมพ์ของกุ้งเพศเมียในสภาพธรรมชาติ และที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ จากนั้นนำไปใช้ในการศึกษาไวเทลลินต่อโดยวิธี PAGE, SDS-PAGE, และ Western blot พบว่า ไวเทลลินของกุ้งกุลาดำประกอบไปด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 5 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 45,000, 58,000, 74,000, 83,000 และ 104,000 ดาลตัน ตามลำดับ

การศึกษาในปูม้า *Callinectes sapidus* ลีและพัฟฟิออน (Lee and Puppione. 1988) สนใจศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของฮีโมลิมพ์ ซึ่งศึกษาโดยวิธี ultracentrifuge และ electrophoresis พบว่า โปรตีนในฮีโมลิมพ์สามารถแยกได้เป็น 2 รูปแบบ คือ lipoprotein I และ lipoprotein II ซึ่ง lipoprotein I พบได้ทั้งในปูเพศผู้และปูเพศเมีย ส่วน lipoprotein II พบเฉพาะในปูเพศเมีย ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 3 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 78,000 107,000 และ 109,000 ดาลตัน ซึ่งในส่วนของสารสกัดจากรังไข่ของปูม้าประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 78,000 และ 107,000 ดาลตัน จะเห็นว่า lipoprotein II ที่แยกได้จากฮีโมลิมพ์มีส่วนที่คล้ายคลึงกับไลโปโปรตีนที่แยกจากรังไข่ ดังนั้น lipoprotein II น่าที่จะมีบทบาทในการขนส่งส่วนไขมัน และโปรตีนที่มีความจำเพาะไปยังรังไข่เพื่อใช้ในกระบวนการสะสมไข่แดง

ต่อมา ลีและวัตสัน (Lee and Watson. 1994) ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปูม้า *Callinectes sapidus* โดยทำให้บริสุทธิ์ไวเทลลินจากรังไข่ด้วยวิธี gel filtration, PAGE, SDS-PAGE และ Western blot และนำไวเทลลินที่แยกได้ไปผลิตแอนติบอดีต่อไวเทลลินเพื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ของปูเพศเมีย โดยวิธี ELISA พบว่าไวเทลลินประกอบด้วยโปรตีนหลัก 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 86,000 และ 188,000 ดาลตัน จากการใช้อันติบอดีไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินได้ช่วงกราฟ standard vitellin ที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 62.5-1,500 นาโนกรัม ซึ่งความไวในการตรวจวัดได้ในปริมาณ 148 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในปีถัดมา ลีและวัตสัน (Lee and Watson. 1995) ได้ศึกษาดำเนินการที่เป็นแหล่งในการสังเคราะห์ไวเทลลินและการควบคุมการสังเคราะห์ไวเทลลิน ซึ่งทำในหลอดทดลอง โดยนำเนื้อเยื่อในส่วนต่าง ๆ ได้แก่ รังไข่ ตับ-ตับอ่อน และ

เหงือก (gill) ของปูม้า *Callinectes sapidus* มาบ่มใน ^{35}S methionine จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปสกัด และตรวจสอบคุณสมบัติโดยวิธี SDS-PAGE, Western blot และ autoradiography พบว่าตำแหน่งที่เป็นแหล่งสร้างไวเทลลินคือที่บริเวณรังไข่ ไวเทลลินประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 4 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 86,000 109,000 168,000 และ 188,000 ดาลตัน ตามลำดับ ในส่วนของการศึกษาการควบคุมการสังเคราะห์ไวเทลลิน พบว่าสารสกัดจากก้านดาสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ไวเทลลินและโปรตีนอื่น ๆ ในรังไข่ได้

ลีและวอล์คเกอร์ (Lee and Walker. 1995) ได้ศึกษากระบวนการสะสมของไลโปไวเทลลินในเซลล์ไข่ที่อยู่ระหว่างการพัฒนาของรังไข่ในปูม้า *Callinectes sapidus* จากการศึกษาของลีและพัฟฟอนในปี 1988 ได้แยกไลโปไวเทลลินจากรังไข่ได้ 2 แบบ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ของลีและวอล์คเกอร์ (Lee and Walker. 1995) ได้ศึกษาต่อโดยตัดแต่ละแถบโปรตีนไปทำ gel elution และนำไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อทั้ง 2 แถบโปรตีน ซึ่งเรียกว่า เปปไทด์ A และ เปปไทด์ B ผลผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นำไปใช้ตรวจวัดปริมาณของไลโปไวเทลลินในส่วนของสารสกัดจากเซลล์ไข่ และสารสกัดจากตับ-ตับอ่อน ในแต่ละระยะของช่วงการพัฒนาของรังไข่โดยวิธี competitive ELISA และยังได้ศึกษาเนื้อเยื่อของเซลล์ไข่และตับ-ตับอ่อน ในระยะต่าง ๆ โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (immunohistochemistry) พบว่าปริมาณไลโปไวเทลลินจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเซลล์ไข่ แต่ปริมาณไลโปไวเทลลินที่ตับ-ตับอ่อนพบปริมาณน้อยมากและไม่พบในระยะแรกของการพัฒนาการของรังไข่ ส่วนผลจากการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ พบว่าเซลล์ไข่ และตับ-ตับอ่อนที่อยู่ในระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาจะไม่พบไลโปไวเทลลิน แต่จะพบเมื่อเซลล์ไข้อยู่ในระยะที่กำลังมีการพัฒนา และปฏิกิริยาทางอิมมูโนต่อไลโปไวเทลลินเกิดขึ้นในส่วน of perinuclear yolk complexes ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างและสะสมไลโปไวเทลลินในเซลล์ไข่

ในปีถัดมา ลีและคณะ (Lee and others. 1996) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการพัฒนาการของรังไข่กับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมพ์ของปูม้า *Callinectes sapidus* โดยวิธี ELISA เช่นเดียวกัน พบว่าช่วงการพัฒนาการของรังไข่ระยะที่ 1 และระยะที่ 2 ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนนได้ แต่จะเริ่มวัดได้ในระยะที่รังไข่อยู่ในช่วงพัฒนาการในระยะที่ 3-6 ซึ่งปริมาณไวเทลโลเจนนที่ตรวจพบจะมีปริมาณที่ต่ำ และจะค่อยเพิ่มขึ้น จากการศึกษการพัฒนาการรังไข่โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ แสดงให้เห็นว่าในช่วงพัฒนาการของรังไข่ในระยะที่ 1 และระยะที่ 2 จะไม่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนของไวเทลลิน แต่จะพบในช่วงที่รังไข่มีพัฒนาการอยู่ในระยะที่ 3-6 (หลังการวางไข่) และไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนของไวเทลลินในส่วน of ตับ-ตับอ่อน

ต่อมาในปี 1997 ปาทีราคิและสตราตาคิส (Pateraki and Stratakis. 1997) ได้ศึกษาคุณสมบัติของไวเทลลินและไวเทลโลเจนนของปู *Potamon potamios* โดยทำให้ไวเทลลินและไวเทลโลเจนนบริสุทธิ์ด้วยวิธี ultracentrifuge จากนั้นนำไปศึกษาต่อด้วย PAGE, SDS-PAGE

และ Western blot พบว่าทั้งไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของปู *Potamon potamios* ประกอบไปด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 3 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 85,000, 105,000 และ 115,000 ดาลตัน ตามลำดับ

ในการศึกษากระบวนการสะสมไข่แดงในปูทะเล *Scylla serrata* ของรานีและสุบรา-โมเนม (Rani and Subramoniam. 1997) ที่ศึกษาโดยใช้ ^{14}C phenylalanine เป็นตัวติดตามกระบวนการสังเคราะห์ไลโปไวเทลลินในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง รังไข่ ตับ-ตับอ่อน และฮีโมลิมพ์ ซึ่งแบ่งระยะพัฒนาการของรังไข่เป็น 2 ระยะ พบว่าในระยะที่ 1 มีการสังเคราะห์ไลโปไวเทลลินในเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และตับ-ตับอ่อน จากนั้นจะปล่อยไลโปไวเทลลินสู่ฮีโมลิมพ์ทันที และยังพบ ^{14}C phenylalanine ในรังไข่อยู่ในระดับที่สูง แสดงว่ารังไข่เป็นแหล่งที่มีการสร้างไลโปไวเทลลิน อย่างไรก็ตาม ระดับของ ^{14}C phenylalanine ในรังไข่เพิ่มสูงขึ้นในระยะที่ 2 ขณะที่ในฮีโมลิมพ์มีระดับของ ^{14}C phenylalanine ลดลง แสดงว่า ตับ-ตับอ่อนมีบทบาทในการสังเคราะห์และจัดเก็บไว้ในรูปของไวเทลโลเจนินก่อนที่จะส่งมาตามกระแสฮีโมลิมพ์มาสู่รังไข่ เพื่อสังเคราะห์ไลโปไวเทลลินในระหว่างกระบวนการสะสมไข่แดงต่อไป

จากรายงานการศึกษาไวเทลลิน และไวเทลโลเจนิน ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย พบว่าในฮีโมลิมพ์ของสัตว์เพศเมียในกลุ่มนี้จะมีไวเทลโลเจนินซึ่งจัดเป็นโปรตีนที่จำเพาะในฮีโมลิมพ์ของสัตว์เพศเมีย และจากการศึกษาโดยกระบวนการทางอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส และอิมมูโนดิฟฟิวชัน จะมีลักษณะที่เหมือนกับไวเทลลินในรังไข่ และปริมาณของโปรตีนนี้ในฮีโมลิมพ์จะมีความสัมพันธ์กับวงจรการสืบพันธุ์ ดังนั้นคาดว่าปูทะเล *Scylla serrata* น่าจะมีโปรตีนจำเพาะสำหรับเพศเมียที่คล้ายกับไวเทลลินในรังไข่และมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในฮีโมลิมพ์สัมพันธ์กับวงจรการสืบพันธุ์ของปูชนิดนี้เช่นกัน

สำหรับการศึกษารังไข่จึงเลือกปูทะเล *Scylla serrata* มาศึกษา เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล เพื่อตรวจวัดไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ เนื่องจากวิธีการนี้เป็นวิธีที่สามารถผลิตแอนติบอดีโดยไม่จำเป็นต้องใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์ ทั้งยังสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากอย่างไม่จำกัดและแอนติบอดีจะไม่มี ความแตกต่างกัน ซึ่งก็จะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดและติดตามการเจริญของรังไข่โดยไม่ต้องฆ่าแม่พันธุ์ปูทะเลซึ่งเป็นผลดีต่อการเพาะเลี้ยงปูทะเล อีกทั้งเพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบผลของฮอร์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนนี้จากก้านตาต่อไป

ตาราง 1 การศึกษาเกี่ยวกับไวเทลลิน และไวเทลโลเจนนในสัตว์พวกครัสเตเชีย

Name	Study	Animal	Method	Native Protein (kD)	Subunits (kD)
Wallace, Walker and Hauschka (1967)	Lipovitellin	<i>Pagurus pollicaris</i> <i>Uca pugilator</i> <i>Sesarma reticulatum</i> <i>Libinia emarginata</i> <i>Cancer irroratus</i> <i>Homarus americanus</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	~350	-
Horn and Kerr (1969)	Hemolymph	<i>Callinectes sapidus</i>	Electrophoresis	-	-
Wolin, Laufer and Albertini (1973)	Hemolymph	<i>Uca pugilator</i> <i>Libinia emarginata</i> <i>Cambarus claki</i>	Immunodiffusion	-	-
Fyppe and O'Connor (1974)	Lipovitellin	<i>Procambarus sp.</i>	Immunodiffusion, Immunoelectrophoresis	500	-
Lui and O'Connor (1976)	Lipovitellin	<i>Procambarus sp.</i>	³ H leucine	-	-
Lui and O'Connor (1977)	Lipovitellin	<i>Pachygrapsus crassipes</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation PAGE, SDS-PAGE, ³ H leucine	-	118 105 83
Bomirski and others (1981)	Gonad Inhibiting Hormone	<i>Cancer magister</i>	Boil, Sephadex G-25	2	-

ตาราง 1 (ต่อ)

Name	Study	Animal	Method	Native Protein (kD)	Subunits (kD)
Quackenbush and Herrnkind (1983)	Gonad Inhibiting Hormone	<i>Panulirus argus</i>	Gel filtration, PAGE	5	-
Eastman-Rek and Fingerman (1985)	Vitellin	<i>Uca pugilator</i>	4,5- ³ H leucine, SDS-PAGE	-	123.5 100.6
Derelle and others (1986)	Vitellin Vitellogenin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Gel filtration, SDS-PAGE Sandwich ELISA	330	92 84
Yano and Chinzei (1987)	Vitellin	<i>Penaeus japonicus</i>	¹⁴ C-amino acid, Immunoelectrophoresis SDS-PAGE, Immunohistochemistry	-	-
Tom, Goren and Ovadia (1987)	Vitellin , Hemolymph Tissue	<i>Parapenaeus longirostris</i>	Immunodiffusion, Immunoelectrophoresis Immunofluorescence	-	-
Lee and Puppione (1988)	Vitellogenin Vitellin	<i>Callinectes sapidus</i>	Ultracentrifugation, PAGE, SDS-PAGE	-	109 107 78 107 78

ตาราง 1 (ต่อ)

Name	Study	Animal	Method	Native Protein (kD)	Subunits (kD)
Quinitio and others (1989)	Vitellin	<i>Pandalus kessleri</i>	Hydroxylapatite, DEAE cellulose, Sepharose 6B	560	110 81
Quinitio and others (1990)	Vitellin	<i>Penaeus monodon</i>	Hydroxylapatite, Sepharose 6B	540	168 104 90 83 74
Tom and others (1992)	Vitellin	<i>Penaeus semisulcatus</i> <i>Penaeus vanamei</i>	Gel filtration, PAGE, SDS-PAGE, Western blot, Amino acid analysis	283 289	95 86 69 61
Chen and Chen (1993)	Vitellin	<i>Penaeus monodon</i>	PAGE, SDS-PAGE, gel elution, Western blot	-	168 104 83 74
Chang and others (1993)	Vitellin	<i>Penaeus monodon</i>	Gel filtration, Hydroxylapatite, DEAE-Sephacel, PAGE	492	91 82 68 64 58 49 45 35

ตาราง 1 (ต่อ)

Name	Study	Animal	Method	Native Protein (kD)	Subunits (kD)
Chang and others (1994)	Vitellogenin	<i>Penaeus monodon</i>	Ultracentrifugation, PAGE, SDS-PAGE, Western blot	-	170 82
Lee and Watson (1994)	Vitellin	<i>Callinectes sapidus</i>	PAGE, SDS-PAGE, Western blot	-	188 168 109 86
	Vitellogenin		ELISA		
Lee and Watson (1995)	Vitellin	<i>Callinectes sapidus</i>	³⁵ S methionine, PAGE, SDS-PAGE, Western blot, Autoradiography	-	188 168 109 86
Lee and Walker (1995)	Lipovitellin	<i>Callinectes sapidus</i>	SDS-PAGE, Gel elution, Competitive ELISA, Immunohistochemistry	-	-
Chang and Jeng (1995)	Vitellogenin	<i>Penaeus chinensis</i>	Ultracentrifugation, PAGE, Western blot, Immunoprecipitate, Gel elution, SDS-PAGE	-	191 85

ตาราง 1 (ต่อ)

Name	Study	Animal	Method	Native Protein (kD)	Subunits (kD)
Chang and others (1996)	Vitellin	<i>Penaeus chinensis</i>	Gel filtration, Hydroxylapatite, PAGE, Gel elution, SDS-PAGE	380	105 85 78 58 40
Lee and others (1996)	Vitellogenin	<i>Callinectes sapidus</i>	ELISA	-	-
Qiu and others (1997)	Vitellin	<i>Metapenaeus ensis</i>	Gel filtration, Anion exchange chromatography, PAGE, SDS-PAGE, Western blot, Amino acid analysis	350	102 76
Pateraki and Stratakis (1997)	Vitellin Vitellogenin	<i>Potamon potamios</i>	Ultracentrifugation, PAGE, SDS-PAGE, Western blot	- -	115 105 85 115 105 85
Rani and Subramoniam (1997)	Vitellin	<i>Scylla serrata</i>	¹⁴ C phenylalanine	-	-

ตาราง 1 (ต่อ)

Name	Study	Animal	Method	Native Protein (kD)	Subunits (kD)
Longyant and others (1999) (impress)	Vitellin	<i>Penaeus monodon</i>	PAGE, SDS-PAGE, Western blot	-	104 83 74 58 45

PAGE = Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ชีววิทยาของปูทะเล

ปูทะเล (*Scylla serrata*) เป็นปูในครอบครัวพอร์ทูนิดี (Portunidae) อีกชนิดหนึ่ง มีถิ่นอาศัยอยู่ตามชายฝั่งทะเลและป่าชายเลนในเขตอินโด-แปซิฟิก (Indo-Pacific) ปูชนิดนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นที่ยิมนำมาบริโภคกันอย่างกว้างขวาง ผลผลิตของปูทะเลในระยะแรกส่วนใหญ่ได้มาจากการจับในธรรมชาติแทบทั้งสิ้น บางส่วนก็จับได้จากบ่อเลี้ยงปลาและกุ้งตามบริเวณชายฝั่งทะเล สำหรับปูที่จับได้จากบ่อนั้น เป็นปูจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่หลบเข้ามาอาศัยและหากินอยู่ภายในบ่อ เมื่อมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายในบ่อก็จับปูทะเลเป็นผลผลิตพลอยได้ด้วย เวลาต่อมาเมื่อความต้องการบริโภคปูทะเลมีเพิ่มมากขึ้น จึงเริ่มมีการจับเอาปูขนาดเล็กหรือปูที่ยังไม่ได้ขนาดจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาเลี้ยงในบ่อช่วงระยะเวลาหนึ่ง เมื่อปูทะเลโตได้ขนาดและน้ำหนักตามความต้องการแล้วจึงจับขาย การเลี้ยงปูในลักษณะนี้มีในหลายประเทศคือ ฟิลิปปินส์ และประเทศไทย เป็นต้น นอกจากจะมีการจับปูจากธรรมชาติมาเลี้ยงในบ่อแล้ว ยังมีนักวิชาการหลายคนศึกษาและทดลองเพาะฟักปูทะเล เพื่อที่จะพัฒนาการเพาะเลี้ยงปูทะเลให้ได้ครบวงจร แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากอัตราการรอดตายของลูกปูที่ได้จากการเพาะฟักยังต่ำมาก อย่างไรก็ตาม การเพาะฟักและอนุบาลลูกปูทะเล ก็ยังมีการศึกษาต่อเนื่องกันมาจนถึงปัจจุบัน เพื่อที่จะหาเทคนิคและวิธีการอนุบาลลูกปูทะเลให้มีอัตราการรอดตายสูงขึ้น การเลี้ยงปูทะเลในประเทศไทยตามแนวดังกล่าวข้างต้น มีผลเสียและปัญหาที่เห็นได้ชัดคือ ผลผลิตของปูทะเลที่เลี้ยงได้แต่ละครั้งมีปริมาณไม่แน่นอน เนื่องจากต้องคอยอาศัยพันธุ์ปูที่จับมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ปัจจุบันจำนวนประชากรของปูทะเลในธรรมชาติก็มีปริมาณลดลงเป็นจำนวนมาก เนื่องจากถูกจับขึ้นมาใช้ประโยชน์มากเกินไป และวิธีการจับปูทะเลก็ยังกระทำไปโดยที่ขาดหลักการปฏิบัติให้ถูกต้องตามวิธีการบริหารทรัพยากรทะเล (สมบัติ ภูวชิรานนท์, 2533) อีกทั้งแหล่งอาศัยและแหล่งอาหารของปูทะเลเกือบตลอดชีวิตตามบริเวณชายฝั่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณป่าชายเลนได้ถูกทำลายลงอย่างต่อเนื่องจากการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ (ชามรงค์ ประกอบบุญ, 2535 ; จิตต์ คงแสงไชย, 2533 ; ทศนีย์ จันทาศิต, 2533 ; สนิท อักษรแก้ว, 2533) เป็นผลทำให้สภาพแวดล้อมชายฝั่งทะเลที่เหมาะสมแก่การดำรงชีวิตของปูทะเลเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลทำให้จำนวนประชากรปูทะเลในธรรมชาติมีแนวโน้มลดลงตามไปด้วย ดังนั้นการเลี้ยงปูทะเลในประเทศไทยจึงควรหันมาสนใจและส่งเสริมให้มีการศึกษาและพัฒนาหาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงปูทะเลให้ได้ครบตลอดวงจรชีวิต เพื่อที่จะสามารถผลิตปูทะเลให้ได้ปริมาณเพียงพอแก่ความต้องการของตลาดโดยไม่ต้องพึ่งพาอาศัยทรัพยากรปูทะเลจากแหล่งน้ำธรรมชาติมากนัก นอกจากนั้น การที่สามารถเพาะเลี้ยงปูทะเลได้เองยังเป็นอีกหนทางหนึ่งที่จะมีส่วนช่วยในการดำรงรักษาจำนวนประชากรปูทะเลที่มีอยู่ในธรรมชาติไม่ให้มีจำนวนลดลงอีกด้วย (ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม, 2539)

การจำแนกชนิดปูทะเลเคยมีการแยกปูทะเลออกเป็น 3-4 ชนิด โดย เอสตามพาดอร์ (Estampador.1949) และ เซรีน (Serene.1951) แต่ สตีเฟนสันและแคมเบลล์ (Stephenson and Cambell.1960) ได้แย้งว่า ควรต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับปูทะเลอีกมากสำหรับการที่จะยอมรับชื่อต่าง ๆ จากการแบ่งแยกเหล่านี้ได้ ดังนั้น รายงานการศึกษาเกี่ยวกับปูทะเลจึงมักจะใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ร่วมกันในชื่อเดียว คือ *Scylla serrata* (Forsk.) (ชูชาติ ชัยรัตน์. 2531)

การจำแนกชนิดปูทะเลในประเทศไทย ยังมีความสับสนอยู่ไม่น้อย สันต์ บัณฑุกุลและคณะ (2499) ได้มีการกล่าวอ้างตามความเชื่อของชาวประมงที่จับปูทะเลเป็นอาชีพว่า ปูทะเลในธรรมชาตินั้นมีลักษณะแตกต่างกันอยู่ 3-4 พันธุ์ จากการสังเกตและศึกษาของชูชาติ ชัยรัตน์ และบุรณ แก้วฤทธิ์ (2522) ได้จำแนกปูทะเล *S. serrata* โดยอาศัยความแตกต่างจากลักษณะภายนอก แบ่งปูทะเลออกเป็น 3 กลุ่มคือ ปูแดง ปูเขียว และปูขาว ในขณะที่สุรินทร์ มัจฉาชีพ (2520) ได้แบ่งปูทะเลออกเป็น 3 ชนิดดังนี้คือ ปูทองแดงหรือปูดำ (*Scylla serrata*) ปูทองโหลงหรือปูเขียว (*Scylla serrata oceanca*) และปูทองเหลืองหรือปูขาว (*Scylla serrata pelagica*) โดยที่ปูทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวมานั้นมีลักษณะที่แตกต่างกันเฉพาะสีและถิ่นที่อยู่อาศัยเท่านั้น และยังถือว่าปูทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวเป็นชนิด (species) เดียวกันและสามารถผสมข้ามพันธุ์กันและกันได้อีกด้วย (ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539)

ปัจจุบันการจำแนกชนิดปูทะเลในประเทศไทย ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่นอนและชัดเจนว่ามีปูทะเลอยู่ที่ชนิด และยังคงถือว่าปูทะเลที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างกันนั้นเป็นชนิดเดียวกันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Scylla serrata* (Forsk.) และมีลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้ (Ruppert and Barnes. 1994)

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustacea
Class	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Pleocyemata
Infraorder	Brachyura
Family	Portunidae
Genus	<i>Scylla</i>
Species	<i>serrata</i>

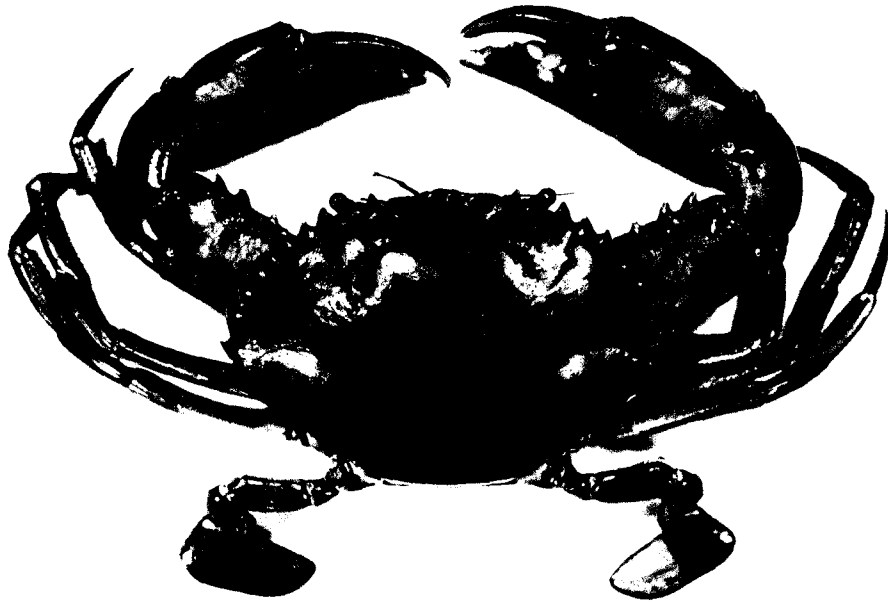
ลักษณะทั่วไปของปูทะเล

ปูทะเลมีลักษณะกระดองเป็นรูปกลมรีเป็นรูปไข่มีความกว้างมากกว่าความยาว ด้านหลังของกระดองเรียบนูน ขอบด้านข้างของกระดอง (anterolateral teeth) มีจำนวน 9 คู่ และมีหนามที่ขอบหน้ากระดอง (front teeth) จำนวน 4 อัน บนก้ามใหญ่ (chelipeds หรือ

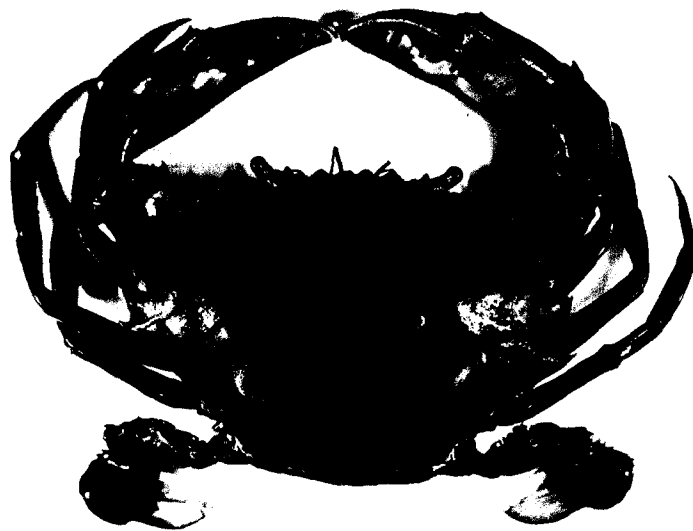
pincers) มีหนาม แต่บนขาคู่อื่นไม่มีหนาม ขาคู่สุดท้ายดัดแปลงเป็นแบบใบพายสำหรับว่ายน้ำ สีของกระดอง ก้ามและขาเดินมักเปลี่ยนแปลงตามถิ่นที่อาศัย (สุภาวดี จุลละสร. 2525) ปูเพศผู้จะมีก้ามที่มีขนาดใหญ่กว่าปูเพศเมีย ซึ่งก้ามของปูจะมีไว้เพื่อป้องกันตัว จับเหยื่อ และมีไว้สำหรับจับปูเพศเมียขณะที่มีการผสมพันธุ์ (ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539) (ภาพประกอบ 1) อีกทั้งบริเวณส่วนท้อง (abdomen) ของปูทะเลเพศผู้จะมีลักษณะเรียวยาวเป็นรูปสามเหลี่ยมและมีระยางค์เพียงคู่เดียว ซึ่งไม่ได้ทำหน้าที่ว่ายน้ำเหมือนกับกุ้ง แต่มีระยางค์ไว้เพื่อใช้จับเชื้อสปีพันธุ์ส่งเข้าไปในช่องเปิดของปูเพศเมียในขณะที่ทำการผสมพันธุ์ ในขณะที่บริเวณส่วนท้องของปูเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าและขยายออกมาเป็นรูปวงกลม และมีระยางค์อยู่ 4 คู่ เพื่อใช้สำหรับการอุ้มไข่ภายหลังจากการสืบพันธุ์ (ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539) (ภาพประกอบ 2)

วงจรชีวิตของปูทะเล

ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำกร่อยที่มีการอพยพย้ายถิ่นเพื่อการแพร่พันธุ์ โดยเพศเมียจะอพยพจากแหล่งหากินในบริเวณน้ำกร่อยออกไปวางไข่ในทะเล การวางไข่ของปูทะเลในแต่ละครั้ง จะให้ไข่คราวละไม่ต่ำกว่า 2,000,000 ฟอง การอพยพจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่ได้ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์แล้ว ในขณะที่กำลังเดินทางออกสู่ทะเล ปูบางตัวอาจจะปล่อยไข่ออกมาไว้ที่ส่วนท้องแล้วก็ได้ ไข่นอกกระดองจะฟักเป็นตัวอ่อน ภายในเวลา 2 ถึง 4 สัปดาห์ ลูกปูวัยอ่อนมี 2 ระยะ ตามลำดับ ได้แก่ ระยะ zoea (ภาพประกอบ 3 และ 4) 5 ขึ้น โดยจะมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10-12 วัน และจึงจะเปลี่ยนไปเป็นระยะ megalopa (ภาพประกอบ 4) อีก 1 ขึ้น ซึ่งมีขนาดความยาวประมาณ 4.5 มิลลิเมตร ในระยะ zoea จะล่องลอยหากินอยู่ในน้ำที่มันฟักออกจากไข่ เพราะระยางค์ว่ายน้ำเพิ่งเริ่มเกิดขึ้นในชั้น zoea ที่ 5 และยังไม่อยู่ในสภาพที่จะใช้งาน เมื่อเจริญเติบโตเป็น megalopa จะมีการว่ายน้ำสลับกับการหยุดเกาะอยู่กับที่เป็นครั้งคราว และอาศัยกระแสน้ำพัดพาให้กลับเข้าสู่ฝั่ง จึงถือว่าลูกปูระยะนี้เริ่มมีการแพร่กระจายเข้ามาหากินในบริเวณน้ำกร่อย ระยะ megalopa จะใช้เวลาประมาณ 8-10 วัน จึงจะมีการลอกคราบไปเป็นตัวปู (crab stage หรือ crab instar) มีลักษณะเป็นตัวปูคล้ายกับพ่อแม่ (ภาพประกอบ 4) ขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระยะนี้ลูกปูทะเลจะเริ่มจมตัวลงสู่พื้นดิน ซึ่งจะท่องเที่ยวหากินอยู่ในแหล่งน้ำกร่อยได้อย่างอิสระและพากันอพยพกลับเข้าไปอาศัยหากินและหลบภัยอยู่ในบริเวณป่าชายเลน หลังจากปูเพศเมียที่สมบูรณ์เพศและผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์แล้วจะเดินทางออกสู่ทะเลเพื่อการวางไข่เช่นเดียวกับแม่ของมันครบเป็นวงจรชีวิตเช่นนี้สืบต่อไป (Hill. 1983 ; ชูชาติ ชัยรัตน์. 2531 ; ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539)



(ก)

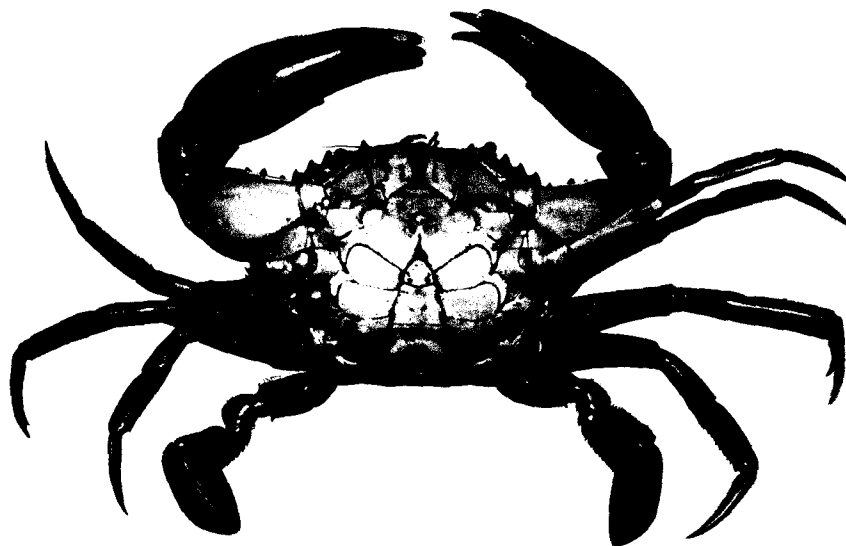


(ข)

ภาพประกอบ 1 ลักษณะทั่วไปของปูทะเล (*Scylla serrata*)

(ก) ปูทะเลเพศผู้

(ข) ปูทะเลเพศเมีย



(ก)

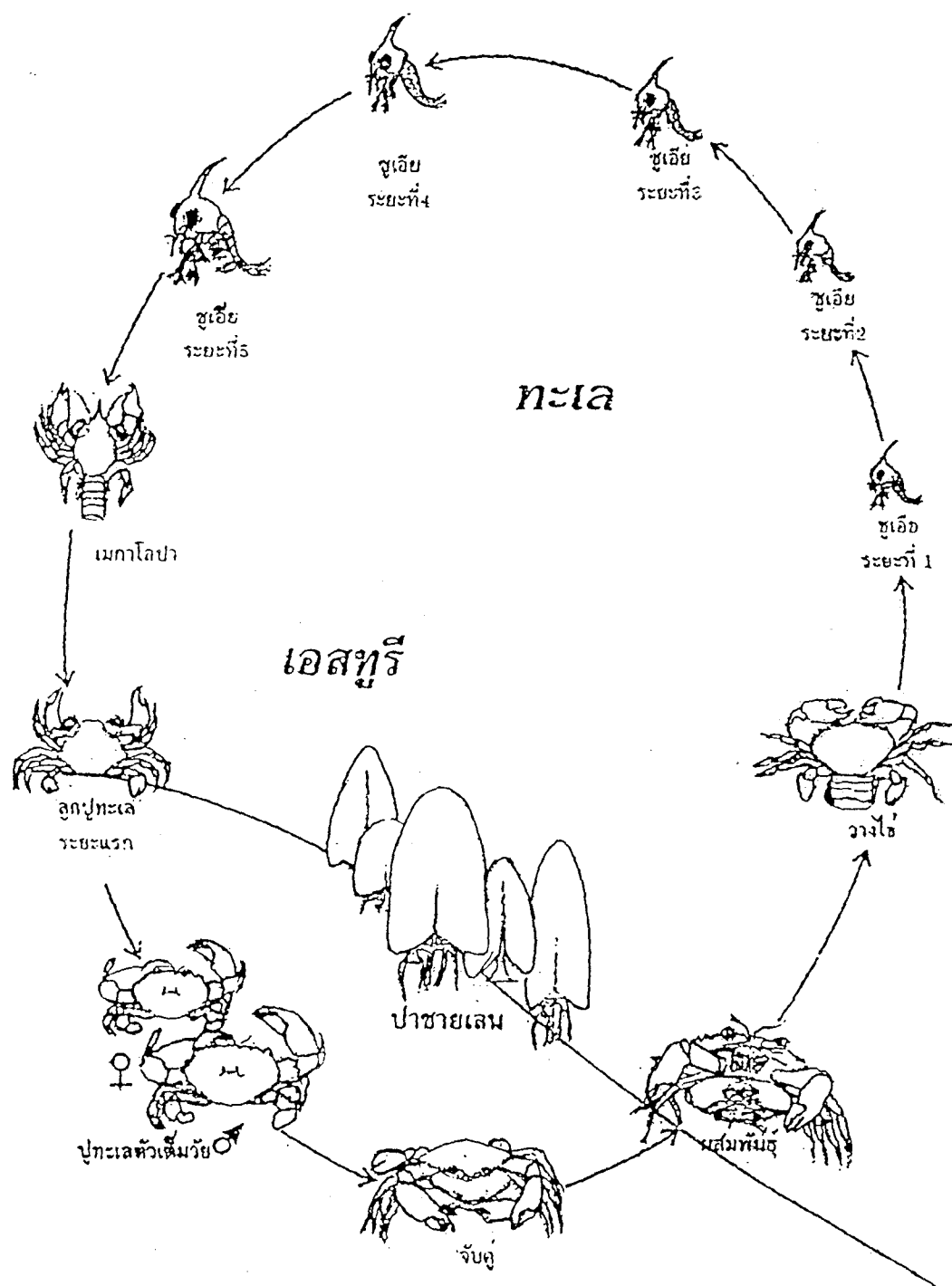


(ข)

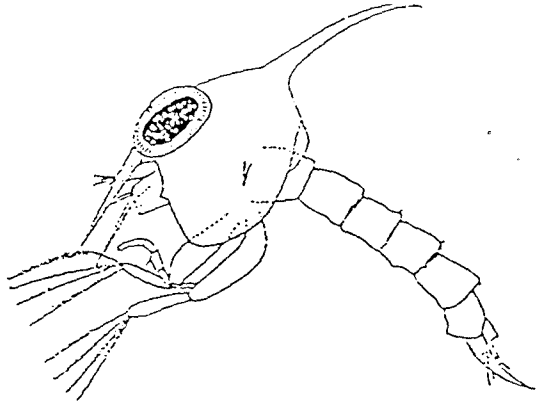
ภาพประกอบ 2 ความแตกต่างระหว่างเพศของปูทะเล โดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างบริเวณ ส่วนท้อง (abdomen) ของปูทะเล

(ก) ปูทะเลเพศผู้

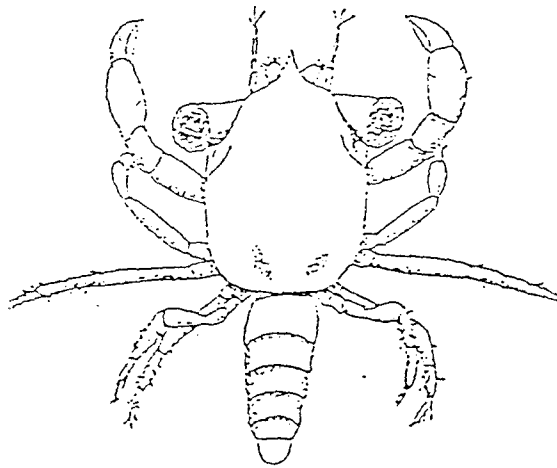
(ข) ปูทะเลเพศเมีย



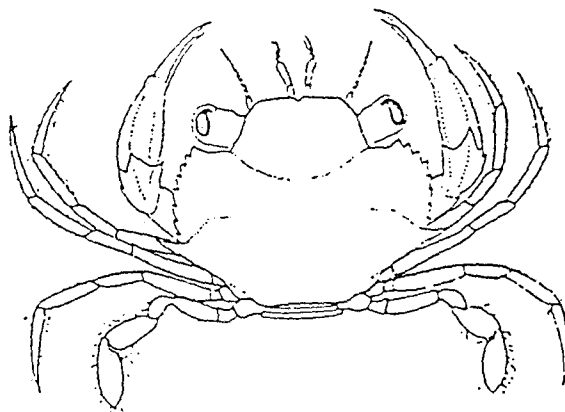
ภาพประกอบ 3 วงจรชีวิตของปูทะเล (*Scylla serrata*) (ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539)



Zoea stage



Megalopa stage



Crab stage

ภาพประกอบ 4 การพัฒนาการของปูทะเลวัยอ่อนระยะต่าง ๆ (ชาญยุทธ สุดทองคง. 2539)

การสืบพันธุ์ของปูทะเล

ปูทะเลเป็นสัตว์ที่มีการผสมพันธุ์กันภายใน (internal fertilization) อวัยวะสืบพันธุ์ของปูทะเลได้รับการพัฒนาเต็มที่และพร้อมที่จะมีการผสมพันธุ์ได้เมื่อมีอายุ 1 ปี ก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์ ปูทะเลเพศเมียจะมีการปล่อยสารเคมีจำพวกฟีโรโมน (pheromone) ออกไปสู่สภาพแวดล้อมภายนอก เพื่อดึงดูดความสนใจในต่อปูเพศผู้ เพื่อให้เข้ามาเกี่ยวพาราสีและจับคู่ผสมพันธุ์กัน (Luo and Wei. 1986 ; ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539) หลังจากปูเพศผู้ประสบความสำเร็จในการค้นหาปูเพศเมีย ปูเพศผู้จะขึ้นขี่และโอบอุ้มตัวเมียด้วยขาเดิน 2-3 คู่แรก เพื่อกอวยระวังภัยให้แก่ปูเพศเมียอยู่หลายวัน จนกระทั่งปูเพศเมียลอกคราบ (molting) ภายในรูก่อน จึงเริ่มมีการผสมพันธุ์ ซึ่งจะเกิดขึ้นภายในเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปูเพศเมียลอกคราบเสร็จแล้ว มีการผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นในช่วงเวลากลางคืน ปูทะเลเพศผู้จะใช้ขาจับปูเพศเมียพลิกตัวให้นอนหงายอยู่ภายใต้ลำตัวของเพศผู้ ระหว่างการผสมพันธุ์ปูเพศผู้จะสอดอวัยวะเพศ (pleopod) และปล่อยน้ำเชื้อ (spermatophore) ผ่านเข้าไปในถุงเก็บน้ำเชื้อของปูเพศเมีย ซึ่งสามารถเก็บน้ำเชื้อของปูเพศผู้ได้เป็นเวลาหลายเดือน ปูทะเลเพศเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะสามารถปล่อยไข่ออกนอกกระดองได้ถึง 3 ชุด ระหว่างช่วงที่มีการเจริญพันธุ์และมีการสร้างไข่ต่อไปไม่ต้องมีการผสมพันธุ์กับเพศผู้อีกเลย ช่วงระยะเวลาของการจับคู่ผสมพันธุ์ใช้เวลานานมากกว่า 8 ชั่วโมง เมื่อปูทะเลผ่านการผสมพันธุ์เรียบร้อยแล้ว ปูเพศเมียยังคงนอนอยู่ใต้ลำตัวของปูเพศผู้เป็นระยะเวลาหลายวัน เพื่อต้องการให้ปูเพศผู้ช่วยป้องกันและระวังภัยระหว่างที่เพศเมียยังอ่อนแออยู่ ซึ่งจะรองนกว่ากระดองที่ผ่านการลอกคราบน้ำมันเริ่มแข็ง เมื่อปูทะเลเพศเมียแข็งแรงพอที่จะป้องกันตัวเองได้แล้วจึงแยกจากกัน (ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539)

การพัฒนาการของรังไข่

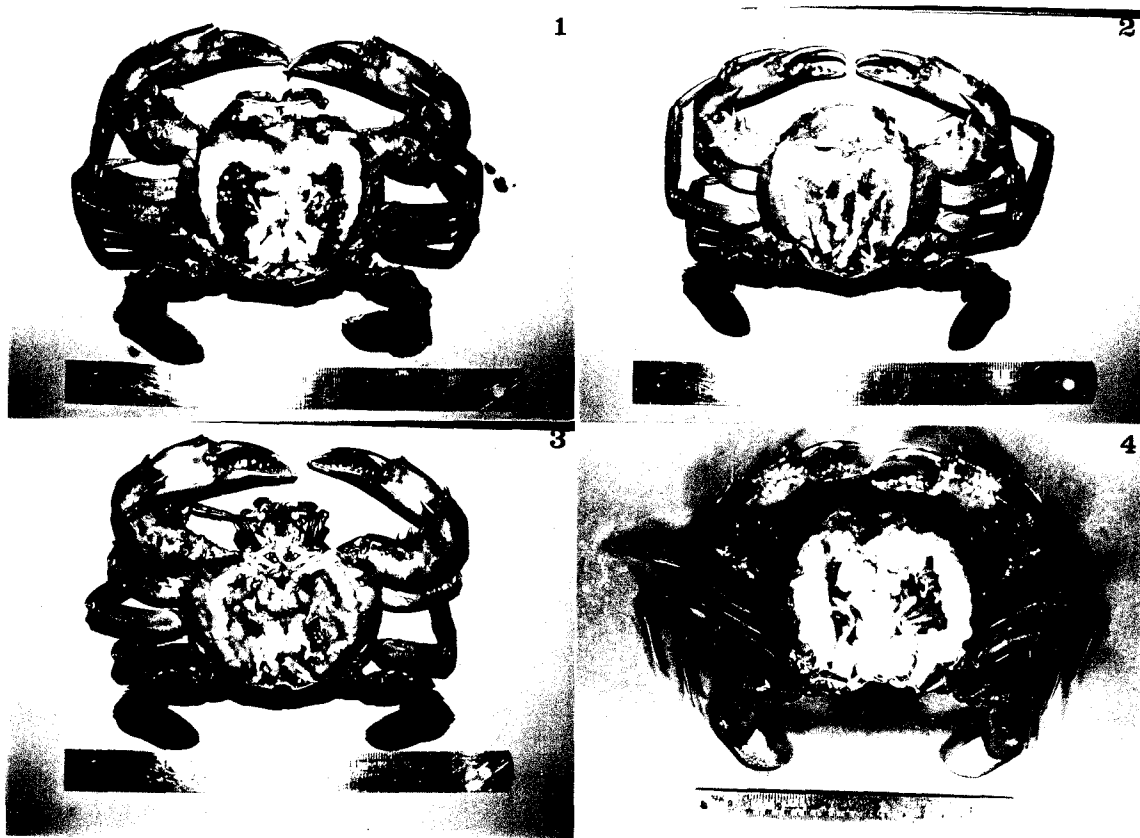
ในปูทะเลเพศเมีย รังไข่จะมีพัฒนาการเป็นระยะต่าง ๆ ซึ่งสามารถแบ่งการพัฒนาการของรังไข่ได้เป็น 4 ระยะ (สมบัติ ภูวชิรานนท์. 2530) ดังนี้ (ภาพประกอบ 5)

ระยะที่ 1 รังไข่ที่ปรากฏให้เห็นยังไม่ชัดเจน ลักษณะรังไข่เป็นเส้นบางใสมีขนาดเล็กยังไม่เจริญดี โดยรังไข่จะเป็นเส้นทอดตัวอยู่บนส่วนของอวัยวะสร้างน้ำย่อย (digestive gland) ซึ่งมีลักษณะเป็นริ้ว สีเหลืองอ่อนยาวอยู่ตามความโค้งและอยู่ใต้กระดองด้านขอบหน้าส่วนหน้า

ระยะที่ 2 รังไข่เริ่มปรากฏเห็นเป็นท่อน ลักษณะมีรอยหยักสีครีมถึงสีเหลืองอ่อนอยู่บนส่วนของอวัยวะสร้างน้ำย่อย

ระยะที่ 3 รังไข่มีขนาดใหญ่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองปกคลุมประมาณ 1/2 ถึง 3/4 ส่วนของอวัยวะสร้างน้ำย่อย

ระยะที่ 4 รังไข่มีขนาดใหญ่เต็มที่มีสีส้มถึงสีแดง ปกคลุมส่วนของอวัยวะสร้างน้ำย่อยทั้งหมด



ภาพประกอบ 5 การพัฒนาการของรังไข่ปูทะเลในระยะต่าง ๆ

1 = รังไข่ระยะที่ 1

2 = รังไข่ระยะที่ 2

3 = รังไข่ระยะที่ 3

4 = รังไข่ระยะที่ 4

การสะสมไข่แดงของรังไข่ (Vitellogenesis)

การสะสมไข่แดงของรังไข่ เริ่มต้นจากการสร้างไข่ (oogenesis) จากโอโอโกเนีย (oogonia) ที่อยู่ในบริเวณตรงกลางของรังไข่ (germinative zone) โดยโอโอโกเนียแต่ละเซลล์จะถูกล้อมรอบด้วยมีโซเดอร์มัลเซลล์ (mesodermal cell) และมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ผ่านระยะต่าง ๆ จนได้เซลล์ไข่ระยะแรก (primary oocyte) ระยะต่อมาเป็นระยะก่อนมีการสะสมโปรตีนในไข่แดง (pre-vitellogenesis) มีอัตราการสร้างไรโบโซม (ribosome) และ rough endoplasmic reticulum (RER) อัตราสูงซึ่งจะพัฒนาเป็นเซลล์ไข่ระยะแรก โดยแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะการสะสมไข่แดงระยะแรก (primary vitellogenesis) พบว่า มี RER vesicle จำนวนมากและเต็มไปด้วยสารที่อยู่ในแกรนูล (granular material) ส่วนการสะสมไข่แดงระยะที่ 2 (secondary vitellogenesis) จะเกิดขึ้นในเวลาเดียวกันกับการเจริญเติบโตของไข่ภายในรังไข่จนกระทั่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของไวเทลโลเจนนินมากขึ้น ซึ่งระยะนี้เซลล์ไข่จะถูกล้อมรอบด้วย follicular cells ระยะที่ 2 โดยจะมีท่อร่างแห (tubular network) เป็นเส้นทางลำเลียงไวเทลโลเจนนินจากฮีโมลิมฟ์เข้าไปยังเซลล์ไข่ จึงทำให้มีการสะสมไวเทลโลเจนนินในเซลล์ไข่เพิ่มมากขึ้น (Charniaux-Cotton. 1985 ; ศิวาพร ลงยันต์. 2537ก ; วิมล สุขตั้งมั่น. 2538)

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อไวเทลลิน (vitellin) ที่สกัดได้จากรังไข่ของปูทะเล *Scylla serrata* (Forsk.)
2. เพื่อพัฒนาการตรวจหาและวัดปริมาณไวเทลโลเจนนิน (vitellogenin) ในฮีโมลิมฟ์ปูทะเลด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไวเทลโลเจนนินในฮีโมลิมฟ์กับพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ของปูทะเล

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล
2. สามารถตรวจหาปริมาณของไวเทลโลเจนนินในฮีโมลิมฟ์ของปูทะเลเพศเมียด้วยวิธี competitive ELISA
3. ทราบถึงความสัมพันธ์ของระดับไวเทลโลเจนนินในฮีโมลิมฟ์กับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล
2. ตรวจสอบคุณภาพและทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี dot-ELISA และ ELISA
3. ตรวจสอบลักษณะของไวเทลลินที่แยกได้จากรังไข่ของปูทะเล โดยการย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 , Sudan black B และ periodic acid Schiff หลังจากผ่านกระบวนการแยกโปรตีนโดย PAGE และ SDS-PAGE
4. ผลิต ascites fluid ที่จำเพาะต่อไวเทลลิน
5. ตรวจสอบภาพของ ascites fluid ที่จำเพาะต่อไวเทลลินโดยวิธี ELISA
6. ตรวจสอบประสิทธิภาพของ ascites fluid ที่จำเพาะต่อไวเทลลินโดยวิธี competitive ELISA
7. ตรวจสอบปริมาณของไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ของปูทะเลเพศเมียโดยวิธี competitive ELISA
8. ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์กับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

สัตว์และเซลล์ทดลอง

1. ปูทะเล *Scylla serrata* (Forsk.) ที่มีการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4
ซื้อจากตลาดเทศบาลเมือง จังหวัดสมุทรปราการ
2. หนูขาว (Swiss mouse) ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลอง ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล
3. Myeloma cell (P3X) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.นิตยา ธรรมพาลีศ ภาควิชา-
จุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. เครื่องบดเนื้อเยื่อ (homogenizer, Janke & Kunkel)
3. เครื่องปั่นชนิดอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge, Beckman model J2-21)
4. เครื่อง microplate reader (BIO-TEK instruments EL 312e)
5. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube : Costar, USA) ขนาด 15 มิลลิลิตรและ 50
มิลลิลิตร
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, Sigma)
7. เครื่องชั่ง
8. กระบอกฉีดยา พร้อมเข็มฉีดยา
9. Autopipette พร้อม tip
10. Pipette-aid (Drummond Scientific, USA)
11. Dilution pipette พร้อมลูกยาง
12. Pasteur pipette
13. จานเลี้ยงเชื้อ (culture dish : NUNCLON, Denmark) ขนาด 5 มิลลิลิตรและ 10
มิลลิลิตร
14. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow : ESCO, USA)
15. กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope (Olympus CK₂, USA)
16. ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator : Forma
Scientific, USA)
17. 96 well culture plate (NUNCLON, Denmark)

18. 24 well culture plate (NUNCCLON, Denmark)
19. แผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส (Costar, USA)
20. กล่องพลาสติกมีฝาปิด
21. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสชุดเล็ก (mini-protein II electrophoresis cell, BIO-RAD)
22. ชุด tran-blot electrophoresis transfer cell (BIO-RAD)
23. เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (power supply) (BIO-RAD)
24. ชุด gel air drying (BIO-RAD)
25. กระดาษโครมาโตกราฟี (Whatman)
26. กระดาษแก้ว
27. หลอด cryotube (Costar, USA)
28. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube)
29. Grid
30. ถาด ELISA ชนิด 96 หลุม (ELISA microtiter plate : maxisorp Nunc)
31. เครื่องมือสำหรับเจาะวุ้น (gel punch)
32. ตะเกียงแก๊ส

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ (Roswell Park Memorial Institute - RPMI medium 1640 , Gibco BRL, USA)
2. Fetal calf serum (Starrate, Australia)
3. Hypoxanthine (Gibco BRL, USA)
4. D-glucose (Sigma)
5. L-glutamine (Sigma)
6. Sodium pyruvate (Sigma)
7. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)
8. Penicillin G
9. Streptomycin
10. Kanamycin
11. Aminopterin (Sigma)
12. DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma)
13. Phosphate buffered saline (PBS , วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
14. EDTA (disodium ethylenediamine tetraacetic acid, Sigma) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

15. Complete Freund's adjuvant (Sigma)
16. Incomplete Freund's adjuvant (Sigma)
17. 1% Merthiolate (Sigma)
18. วุ้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ (agar, Difco) ใน PBS
19. น้ำยาล้างสี (destaining solution)
 - น้ำยาล้างสี 1 (destain 1 -เมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์)
 - น้ำยาล้างสี 2 (destain 2 -เมทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 7 เปอร์เซ็นต์)
20. Bradford solution (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
21. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)
22. Glycine (BIO-RAD)
23. Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide, BIO-RAD)
24. Ammoniumpersulfate (BIO-RAD)
25. Acrylamide (BIO-RAD)
26. SDS (sodium dodecyl sulfate, BIO-RAD)
27. นมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ (Skimmed milk)
28. Triton X-100 (Sigma)
29. Goat antimouse IgG H and L chain horseradish-peroxidase conjugate (GAM-HRP, BIO-RAD)
30. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ (H_2O_2 , Sigma)
31. O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma)
32. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)
33. บัฟเฟอร์ซิเตรต (citrate buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
34. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
35. ฟีนอลเรด (phenol red)
36. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3)
37. Polyethyleneglycol (PEG)
38. น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
39. ไนโตรเจนเหลว (liquid N_2)
40. Pristane (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane, Sigma)
41. Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (CALBIOCHEM)
42. 2-Mercaptoethanol (Sigma)

43. 1% Coomassie brilliant blue
44. 10% Formalin
45. Schiff reagent (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
46. Periodic acid (Sigma)
47. Sodium metabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)
48. Sudan Black B (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
49. Ethylene glycol
50. Charcoal

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (ภาพประกอบ 6) คือ

1. การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล
2. การปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวเทลลินในหนูขาว
3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว
4. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล
5. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล
6. การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของ

ปูทะเล

7. การผลิต ascites fluid จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของ

ปูทะเล

8. การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมพ์กับระยะ

พัฒนาการของรังไข่โดยวิธี competitive ELISA

1. การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล

นำปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญเต็มที่ (รังไข่มีลักษณะสีเหลืองส้มเข้ม) มาเก็บอีโมลิบปีจากขาเดินคู่ที่ 5 จากนั้นนำปูทะเลมาฆ่าในน้ำเย็นจัด ผ่าตัดเอารังไข่และเก็บรวบรวมไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

นำรังไข่มาบดในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ที่มี EDTA 0.5 มิลลิโมลาร์ (อัตราส่วน 1 กรัมต่อ 2 มิลลิลิตร) ด้วยเครื่องบดจนละเอียด แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนไขมันและตะกอนออก แบ่งส่วนสารละลายสีเหลืองส้ม เก็บใส่หลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนหนึ่งไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) (ภาพประกอบ 5) โดยเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ คือ

ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงใน microtiter plate ปริมาตร 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นในทุกหลุมจนครบ 100 ไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นละ 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมถัดไป แล้วใส่สารละลาย Bradford ลงไปหลุมละ 290 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟเทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ส่วนการตรวจหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดไวเทลลินที่ใช้จะทำเช่นเดียวกัน โดยเตรียมสารสกัดไวเทลลินให้เจือจางอยู่ในช่วงเดียวกับกราฟมาตรฐานของ BSA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดไวเทลลินที่ต้องการทราบความเข้มข้น

2. การปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวเทลลินในหนูขาว

การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว (ภาพประกอบ 8) ทำโดยนำสารสกัดไวเทลลินที่เตรียมได้จากข้อ 1 ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาวในปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ประมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อตัว) หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีก 2 ครั้ง ทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยการฉีดครั้งที่ 2 จะผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดครั้งที่ 3 โดยไม่ต้องผสม adjuvant หลังจากฉีดครั้งที่ 3 ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ เก็บรวบรวมซีรัมจากหนูโดยการเจาะเลือดทางเข้าตาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ นำไปปั่นที่ 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งจะนำไปทดลองการเก็บเลือดครั้งต่อ ๆ ไปจะเก็บทุก ๆ 1-2 เดือน ซึ่งก่อนการเก็บอีโมลิบปีจะฉีดสารสกัดไวเทลลินโดยไม่ต้องผสม adjuvant 1 สัปดาห์

3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรั่มที่ได้จากหนูขาว โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion)

เทวุ้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายใน PBS ลงบนแผ่นสไลด์ปริมาตร 4.5-5 มิลลิลิตร จากนั้นปล่อยให้แห้งจนวันแข็งตัว เจาะวันเป็นหลุมกลม ๆ ตามแบบที่ต้องการ หยดแอนติ-ซีรั่มที่ต้องการทดสอบลงไปเป็นหลุมตรงกลางปริมาตร 10-15 ไมโครลิตรและหยดแอนติเจนต่างๆ คือ สารสกัดไวเทลลินจากข้อ 1 ตัวอย่างฮีโมลิมปูปูทะเลเพศเมียที่รังไข่เจริญเต็มที่และเพศผู้ที่โตเต็มที่ลงในหลุมที่ล้อมรอบหลุมกลาง หยดแอนติเจนชนิดต่างๆ ปริมาตรหลุมละ 10-15 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในกล่องชื้นเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วล้างโปรตีนส่วนที่ไม่เกิดแนวตะกอนออกโดยแช่ใน PBS หลาย ๆ ครั้ง ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปย้อมสี Coomassie brilliant blue 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์และกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ล้างสีออกด้วยน้ำยาล้างสี 1 เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำยาล้างสี 2 จนกระทั่งวันใส และนำแผ่นสไลด์ไปตากให้วันแห้ง (ภาพประกอบ 9) นำแผ่นสไลด์มาตรวจดูผลโดยสังเกตจากลักษณะของแนวตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนชนิดต่าง ๆ

4. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล

ฉีดสารสกัดไวเทลลินที่เตรียมได้จากข้อ 1 โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 เข้าช่องท้องของหนูขาวตัวที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ดีที่สุด (โดยดูผลจากลักษณะของแนวตะกอนจากการทดสอบในข้อที่ 3) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร การฉีดสารสกัดต้องฉีดก่อนทำ fusion 3 วัน ส่วน myeloma cell (P3X) ต้องเลี้ยงให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 2×10^7 เซลล์ โดยเลี้ยงใน RPMI ซึ่งมี hypoxanthine และ fetal calf serum 20 เปอร์เซ็นต์

ฆ่าหนูโดยทำ cervical dislocation และผ่าตัดเพื่อเอาส่วนม้าม (spleen) มาล้างใน PBS 3 ครั้งและใน RPMI ที่ไม่มี serum 1 ครั้ง แยกกระจาย spleen cell โดยนำม้ามมาบีบผ่าน grid ใน RPMI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่ง spleen cell 0.2 มิลลิลิตร เป็นตัวควบคุม ส่วน spleen cell ที่เหลือใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี myeloma cell ประมาณ 20 ล้านเซลล์และปรับปริมาตรในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุ spleen cell และ myeloma cell เป็น 40 มิลลิลิตรด้วย RPMI ที่ไม่มี serum นำไปปั่นแยกที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท RPMI ทั้ง เดิม polyethyleneglycol (PEG) 40 เปอร์เซ็นต์ใน RPMI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 1 นาที เดิม RPMI 40 มิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) 5% in air อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน RPMI ทั้ง นำเซลล์ซึ่งประกอบด้วย spleen cell, myeloma cell และ hybridoma กระจายใน selective medium (HAT

medium ประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 20% fetal calf serum และ 1% mouse RBC ใน RPMI medium) แล้วดูดใส่ใน 96 well culture plate ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 17 plate บ่มไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% in air อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจดูการเจริญของ hybridoma ใน 96 well culture plate ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป (ภาพประกอบ 10)

5. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล

5.1 การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA (Enzyme Linked

Immunosorbent Assay)

การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะใช้ indirect immunoperoxidase method และทำใน 96 well microtiter plate โดยใส่สารสกัดไวเทลลินจากข้อ 1 ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมงในกล่องขึ้นที่มีฝาปิด จากนั้นล้างด้วย blotto 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และบล็อกด้วย blotto 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม นาน 30 นาที นำ hybridoma conditioned media ในแต่ละหลุมจากข้อ 4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน microtiter plate บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย blotto 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วใส่ goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจาง อัตราส่วน 1:1000 ใน blotto 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย blotto 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และครั้งสุดท้ายล้างด้วยสารละลาย PBS เติมสารละลาย O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายในซีเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 เปอร์เซ็นต์ผสมอยู่ลงไปหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตรทิ้งไว้ เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมทันทีที่ครบเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader หลุมใดให้ค่าดูดกลืนแสงสูงกว่าหลุมควบคุม แสดงว่า hybridoma นั้นสร้างแอนติบอดีต่อสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ นำไปทำการคัดเลือกต่อไป (ภาพประกอบ 11)

5.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี dot-ELISA (dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

หยดสารสกัดไวเทลลินจากข้อ 1 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างอีโมลิบบีของปูทะเลเพศเมียที่รังไข่เจริญเต็มที่ และอีโมลิบบีปูทะเลเพศผู้โตเต็มที่เจือจางอัตราส่วน 1:10 ในสภาพปรกติ (native protein) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสในแถวบน ส่วนสารสกัดไวเทลลิน ตัวอย่างอีโมลิบบีปูทะเลเพศเมียที่รังไข่เจริญเต็มที่ และอีโมลิบบีปูทะเลเพศผู้โตเต็มที่ ทำให้อยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติ (denatured protein) โดยต้มใน treatment buffer (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) นำมาหยดลงบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสในแถวล่าง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำไปบล็อกด้วย blotto 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที (ภาพประกอบ 12)

ทดสอบความจำเพาะของ hybridoma ที่ได้โดยใช้ hybridoma conditioned media จากข้อ 4 ของ hybridoma ที่ต้องการทดสอบปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงใน blotto 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (1:20) ซึ่งมีแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่อยู่ บ่มไว้เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ล้างด้วย blotto 0.5 เปอร์เซ็นต์ 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วนำไปบ่มใน goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่ดูดซับด้วยอีโมลิบบีปูทะเลเพศผู้ 40 เปอร์เซ็นต์ เจือจางใน blotto 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย blotto 0.5 เปอร์เซ็นต์ 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วย PBS แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรทที่มี diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 เปอร์เซ็นต์ และโคบอลต์คลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง (ภาพประกอบ 12) วิธีการทำตัดแปลงจากวิธีของ สิทธิกรกุล, สเตรทตันและคาวเดน. 1991 (Sithigorngul, stretton and cowden. 1991)

5.3 การตรวจสอบ Hybridoma Isotype และ Sub-Isotype โดยใช้ชุด Hybridoma Sub-Isotyping Kit, Mouse (CALBIOCHEM)

เตรียมสารละลาย goat anti-mouse IgG ที่ละลายใน plate coating solution อัตราส่วน 1:100 (ดูภาคผนวก) จากนั้นหยดลงในหลุม 96 well microtiter plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-surfactant 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที หลุมละ 50 ไมโครลิตร ใส่ hybridoma conditioned media ของ hybridoma ที่จะตรวจสอบลงในหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร แถวสุดท้าย (แถว G) เป็น blank และในคอลัมน์ที่ 12 ใส่ mouse serum เจือจางอัตราส่วน 1:500 ใน PBS-surfactant เป็น positive control บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ

10 นาที ใส่ typing antisera (ดูภาคผนวก) แต่ละชนิดลงในหลุม ๆ ละ 2 หยด (100 ไมโครลิตร) หลุมที่เป็น blank เติม PBS-surfactant 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate ที่เจือจางอัตราส่วน 1:4,000 ใน PBS-surfactant ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม substrate-chromophore (ดูภาคผนวก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 4 นอร์มอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (ภาพประกอบ 13)

5.4 การทำ Hybridoma Cloning และการเก็บเซลล์

นับจำนวนเซลล์ของ hybridoma clone ที่ต้องการ ประมาณ 100 เซลล์เจือจางใน RPMI ที่มี fetal calf serum 20 เปอร์เซ็นต์ และ mouse RBC 1 เปอร์เซ็นต์ แยกใส่ลงใน 96 well culture plate ประมาณหลุมละ 0.5-2 เซลล์ จากนั้นบ่มไว้ในตู้บ่ม 1-2 สัปดาห์ เมื่อเซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนสังเกตเห็นโคโลนีของ hybridoma นำ hybridoma conditioned media ของแต่ละ hybridoma มาทดสอบหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA และ dot-ELISA วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1 และ 5.2 นำ hybridoma จากหลุมที่ต้องการมาขยายลง 24 well culture plate และ culture dish ขนาด 5-10 มิลลิลิตร ตามลำดับ เก็บเซลล์ที่อยู่ในช่วงที่มีการเจริญดี โดยดูดเซลล์ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท media ที่เจือ DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางใน RPMI ซึ่งอยู่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อจำนวนเซลล์ 5 ล้านเซลล์ แบ่งใส่หลอดเก็บเซลล์ (cryotube) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

6. การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน

6.1 การแยกโปรตีนโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis ; PAGE)

เตรียมสารละลาย separating gel 5 เปอร์เซ็นต์ (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) และเทลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้สำหรับเตรียมเจล เมื่อส่วนเจลในชั้น separating gel แข็งตัว นำ comb มาเสียบระหว่างแผ่นกระจกเหนือผิวเจล จากนั้นเทสารละลาย stacking gel 5 เปอร์เซ็นต์ (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) ระหว่างแผ่นกระจกบนผิวหน้าเจลจนเต็ม ตั้งไว้ให้เจลแข็งตัว บรรจุเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ ส่วนล่างประกอบด้วย lower tank buffer (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) ส่วนอ่างบัฟเฟอร์ด้านบนเติม upper tank buffer (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) จากนั้นดึง comb ออก

ใส่ตัวอย่างได้แก่ สารสกัดไวเทอลินในสภาพธรรมชาติ และอีโมลิบปีปูทะเลเพศเมียที่รังไข่เจริญเต็มที่ลงในช่องเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จึงเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 30 โวลต์ ปลอຍให้แถบสีเคลื่อนที่ลงไปจนถึงปลายแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

แบ่งเจลส่วนหนึ่งไปย้อมเพื่อตรวจสอบประกอบของไวเทอลินและไวเทอลโลเจนิน โดยย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 ย้อมส่วนไขมันด้วย Sudan black B และย้อมคาร์โบไฮเดรตด้วย periodic acid Schiff (PAS) อีกส่วนหนึ่งนำไปยาลงแผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blot

วิธีการย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 มีขั้นตอนดังนี้ นำแผ่น เจลแช่ในสีย้อม Coomassie brilliant blue R-250 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายในเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์และกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง ล้างสีออกด้วยน้ำยาล้างสี 1 เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำยาล้างสี 2 จนกระทั่งแผ่นเจลใส นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำเจลแห้ง

วิธีการย้อมไขมันด้วย Sudan black B มีขั้นตอนดังนี้ นำแผ่นเจลมาแช่ในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ไว้ข้ามคืน ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แช่แผ่นเจลในเอทิลีนไกลคอล 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ย้ายแผ่นเจลใส่ใน Sudan black B นาน 4-6 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำยาล้างสีประกอบด้วย อะซีโตน 20 เปอร์เซ็นต์และกรดอะซิติก 15 เปอร์เซ็นต์ จนแผ่นเจลใส ล้างน้ำกลั่นก่อนนำไปทำให้แห้ง (ดัดแปลงจากวิธีของ Humason, 1979)

วิธีย้อมคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิค PAS มีขั้นตอนดังนี้ แช่แผ่นเจลในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ไว้ข้ามคืน ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ใส่กรดเพอรืออกติกแช่ไว้เป็นเวลา 30-40 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที จากนั้นใส่ Schiff reagent ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างด้วยสารละลายโซเดียมโบซัลไฟด์จนแผ่นเจลใส แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนไปทำให้แห้ง (ดัดแปลงจากวิธีของ Humason, 1979)

วิธีและขั้นตอนการทำ Western blot (ภาพประกอบ 14) เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีดังต่อไปนี้ นำแผ่นเจลที่แยกโปรตีนแล้วมาถ่ายแถบโปรตีนจากแผ่นเจล ลงสู่แผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยเครื่อง transblot electrophoretic transfer cell โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน blotto 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยแช่ใน hybridoma conditioned media ของ hybridoma แต่ละ clone ที่เจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ ใน blotto 5 เปอร์เซ็นต์ (อัตราส่วน 1:100 1:500 1:1000 1:2000 และ 1:4000) บ่มไว้ข้ามคืน ล้างด้วย blotto 0.5 เปอร์เซ็นต์ 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วนำไปบ่มต่อใน goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจาง 1: 1000 ในอีโมลิบปีปูทะเลเพศผู้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์และ blotto 3 เปอร์เซ็นต์ และทำตามขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 5.2 ต่อไป

6.2 การแยกโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis ; SDS-PAGE)

เตรียมสารละลาย separating gel 7.5 เปอร์เซ็นต์ (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) และเทลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้สำหรับเตรียมเจล เมื่อเจลแข็งตัว ใส่ comb ระหว่างกระจกเหนือผิวหน้าเจล เตรียมสารละลาย stacking gel 4 เปอร์เซ็นต์ (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) และใส่ลงบนผิวหน้าเจลจนเต็ม รอให้เจลแข็งตัว แล้วบรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ ดึง comb ออก นำสารสกัดไวเทลลินจากข้อ 1 ซีโมลิบปีของปูทะเลเพศเมียที่รังไข่เจริญเต็มที่ และซีโมลิบปีของเพศผู้โตเต็มที่ ซึ่งทำให้อยู่ในรูปเสียสภาพธรรมชาติ โดยการต้มใน treatment buffer เติมห่วงอย่างลงในช่องเจล จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้า เช่นเดียวกับข้อ 6.1 เมื่อแถบสีเคลื่อนที่จนสุดปลายเจล หยุดกระแสไฟฟ้า แบ่งเจลไปทำการย้อมสีเพื่อดูคุณลักษณะต่าง ๆ และทำ Western blot เช่นเดียวกับข้อ 6.1

7. การผลิต Ascites Fluid จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน

เลี้ยง hybridoma clone ที่ต้องการผลิต ascites fluid ให้เซลล์มีจำนวนมากอยู่ในช่วงที่มีการเจริญดี ดูดใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท RPMI ออก เติม PBS ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เซลล์กระจายตัว นำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาวที่ได้รับการฉีด pristane (ก่อนฉีดเซลล์ประมาณ 1-2 สัปดาห์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ล้านเซลล์ต่อตัว) เมื่อมีการเจริญของ hybridoma cell ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เก็บ ascites fluid ในช่องท้องออกโดยใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะช่องท้องใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ จากนั้นนำไปปั่นแยกเก็บส่วนที่เป็น ascites fluid เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจหาคุณภาพของ ascites fluid ที่ได้โดยวิธี ELISA เป็นการตรวจเพื่อหาไทเตอร์ (titer) ของ ascites fluid ดังรายละเอียดในข้อ 5.1 โดยทำ two fold serial dilution ของ ascites fluid

8. การวัดปริมาณไวเทลโลเจนิน โดย Competitive ELISA

การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในซีโมลิบปีของปูทะเลเพศเมีย (ภาพประกอบ 15) ทำโดยตรึงสารสกัดไวเทลลินจากข้อ 1 โดยใส่สารสกัดไวเทลลินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน PBS ลงใน microtiter plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่ม ล้างและบล็อก เช่นเดียวกับข้อ 5.1 แล้วเติมสารสกัดไวเทลลินที่เจือจางด้วย blotto 5 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.167 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือตัวอย่างซีโมลิบปีปูทะเลเพศผู้และซีโมลิบปีปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญเต็มที่ ซึ่งเจือจาง 1:10 จนถึง 1:60,000 เช่นกัน ลงในแต่ละแถวของถาด ELISA อย่างละ 2 ซด จากนั้นเติม ascites fluid เจือจาง 1:10,000 ลงไป

บ่มไว้ 12-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และผ่านขั้นตอนตามวิธีของ indirect immunoperoxidase method เช่นเดียวกับข้อ 5.1 ต่อไป

เขียนกราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของตัวอย่างอีโมลิบปีปูทะเลเพศเมีย ปูทะเลเพศผู้และสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ

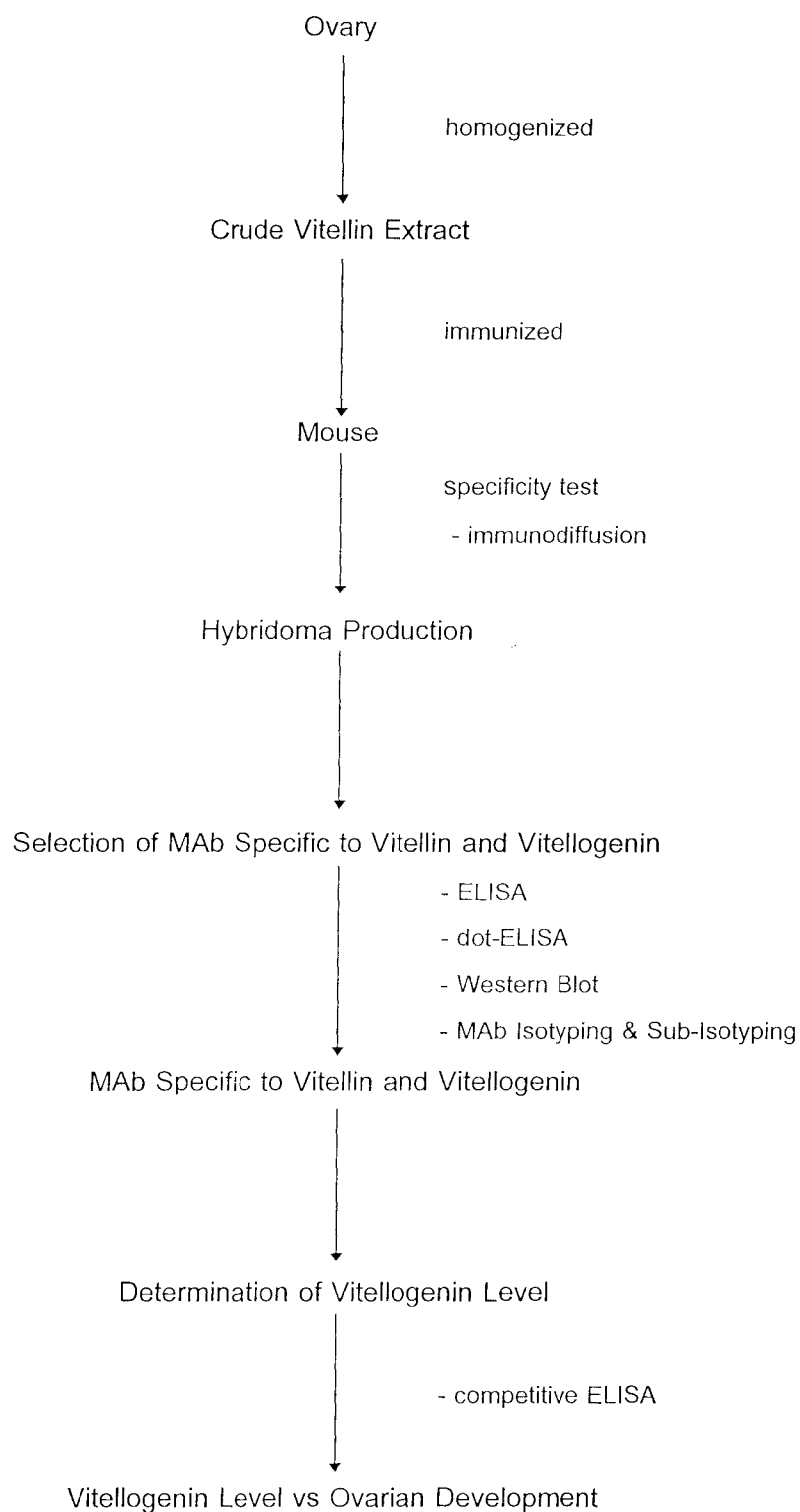
9. การหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในอีโมลิบปีกับระยะพัฒนาการของรังไข่โดยวิธี Competitive ELISA

เก็บตัวอย่างอีโมลิบปีปูทะเลที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ คือระยะที่ 1-4 โดยใช้เข็มฉีดยาดูดอีโมลิบปีจากบริเวณข้อต่อของขาเดินคู่ที่ 5 ใส่หลอดที่มีฝาปิด เก็บแช่รวบรวมไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้ ในการตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนินใช้วิธี competitive ELISA เทียบกับสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานดังในข้อ 7 ชั่งน้ำหนักตัวปูทะเลและวัดความกว้างของกระดอง จากนั้นนำมาฆ่าในน้ำเย็นจัด ผ่าตัด ชั่งน้ำหนักรังไข่ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าดัชนีรังไข่ (ovarian index-OI) แล้วบันทึกลักษณะสีและระยะการเจริญของรังไข่ระยะต่าง ๆ ตามขั้นตอนของสมบัติ ภูวชิรานนท์, 2530 สำหรับตัวอย่างปูทะเลที่ใช้ในการหาปริมาณไวเทลโลเจนินในอีโมลิบปีในระยะต่าง ๆ ของการเจริญของรังไข่จะใช้ปูทะเลระยะละประมาณ 10-15 ตัว (ภาพประกอบ 15 และ 16)

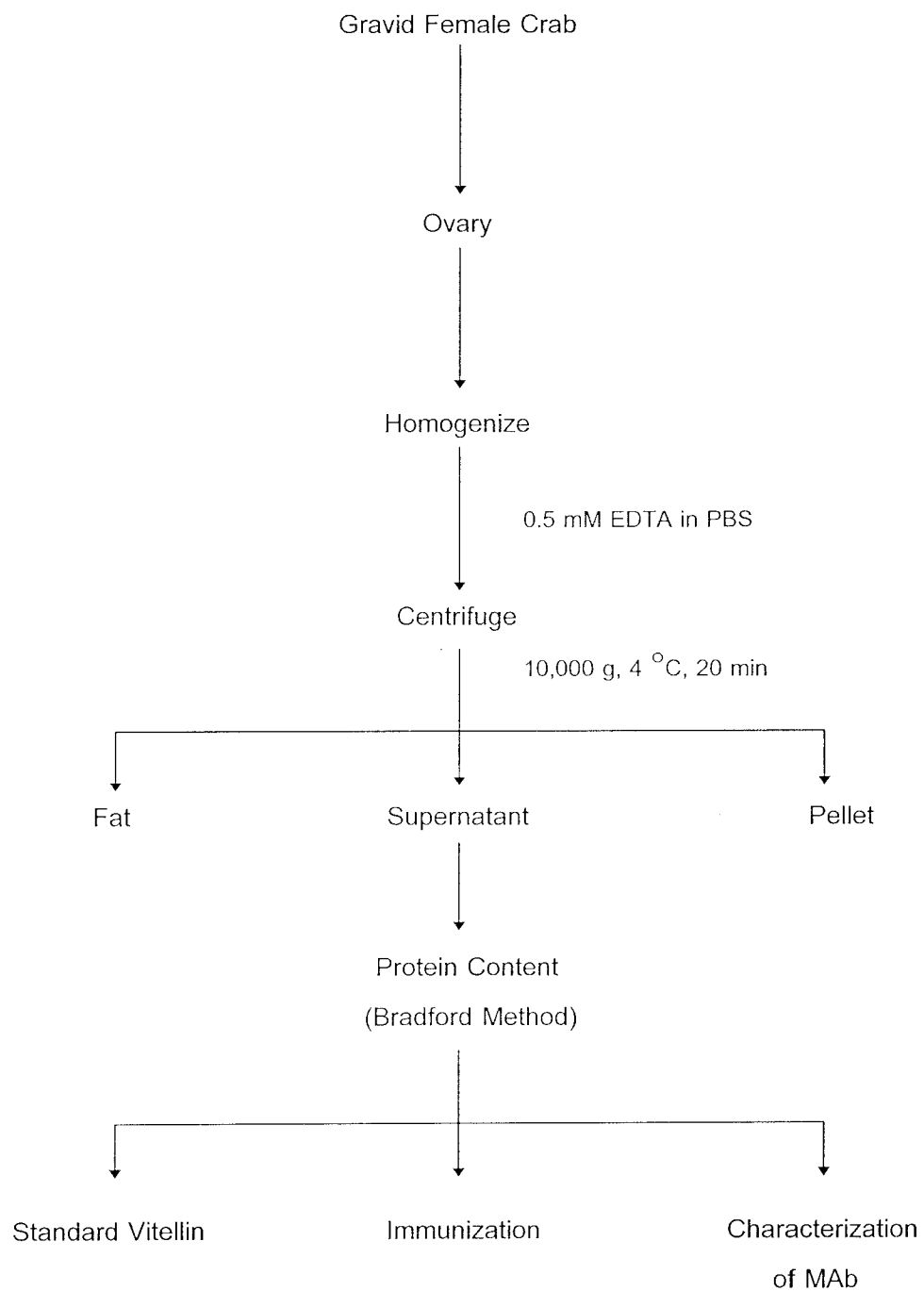
$$\text{ดัชนีรังไข่ (OI)} = \frac{\text{น้ำหนักรังไข่}}{\text{น้ำหนักตัวสุทธิ}} \times 100 \quad \text{เปอร์เซ็นต์}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

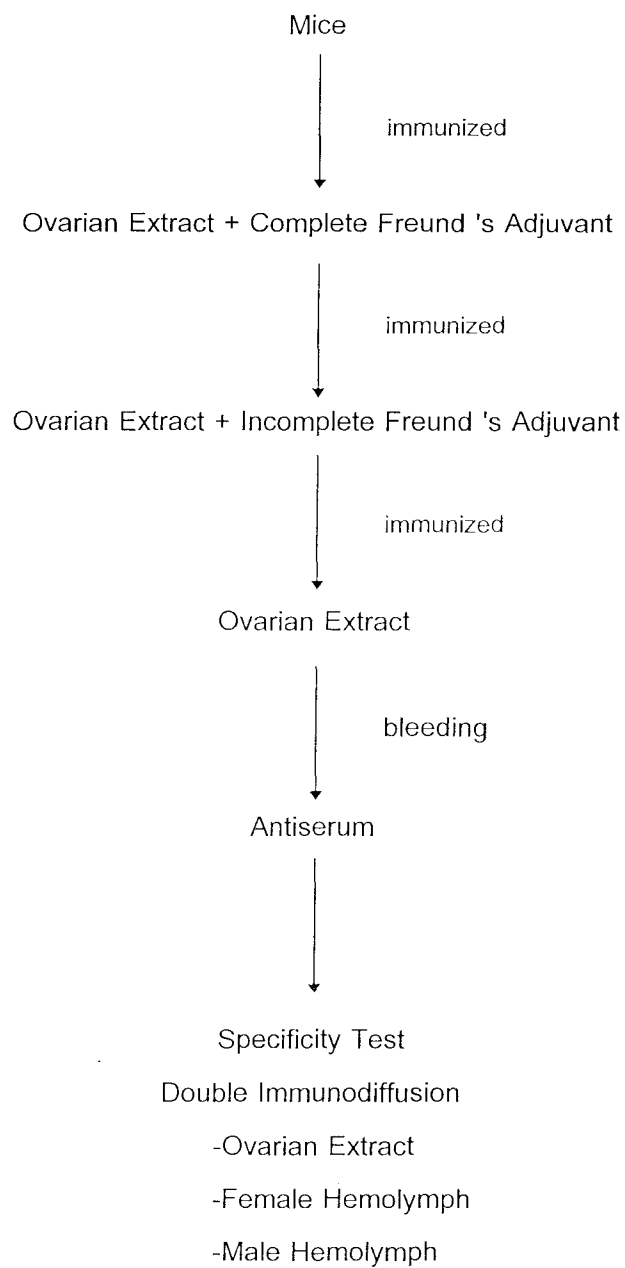
1. ตรวจสอบลักษณะของไวเทลลินที่แยกได้โดยสังเกตจากแถบแบนที่สามารถย้อมติดสี Coomassie brilliant blue R-250, Sudan black B และ periodic acid Schiff หลังจากผ่านกระบวนการแยกโปรตีนโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเล็กโตรโฟเรซิสแบบ PAGE และ SDS-PAGE
2. ตรวจสอบคุณภาพและทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินจากรังไข่ปูทะเล โดยสังเกตจากแถบแบนที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสในกระบวนการทำ Western blot
3. ตรวจสอบภาพของ ascites fluid ที่จำเพาะต่อไวเทลลิน โดยการตรวจหาไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA
4. ตรวจหาประสิทธิภาพของ ascites fluid ที่จำเพาะต่อไวเทลลิน โดยการใช้ไวเทลโลเจนนในตัวอย่างฮีโมลิมพ์ของปูทะเลไปแย่งการจับของแอนติบอดีกับไวเทลลินด้วยวิธี competitive ELISA
5. คำนวณหาปริมาณของไวเทลโลเจนนจากฮีโมลิมพ์ตัวอย่างของปูทะเลแต่ละตัวโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน
6. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของระดับไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมพ์กับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ กับดัชนีรังไข่



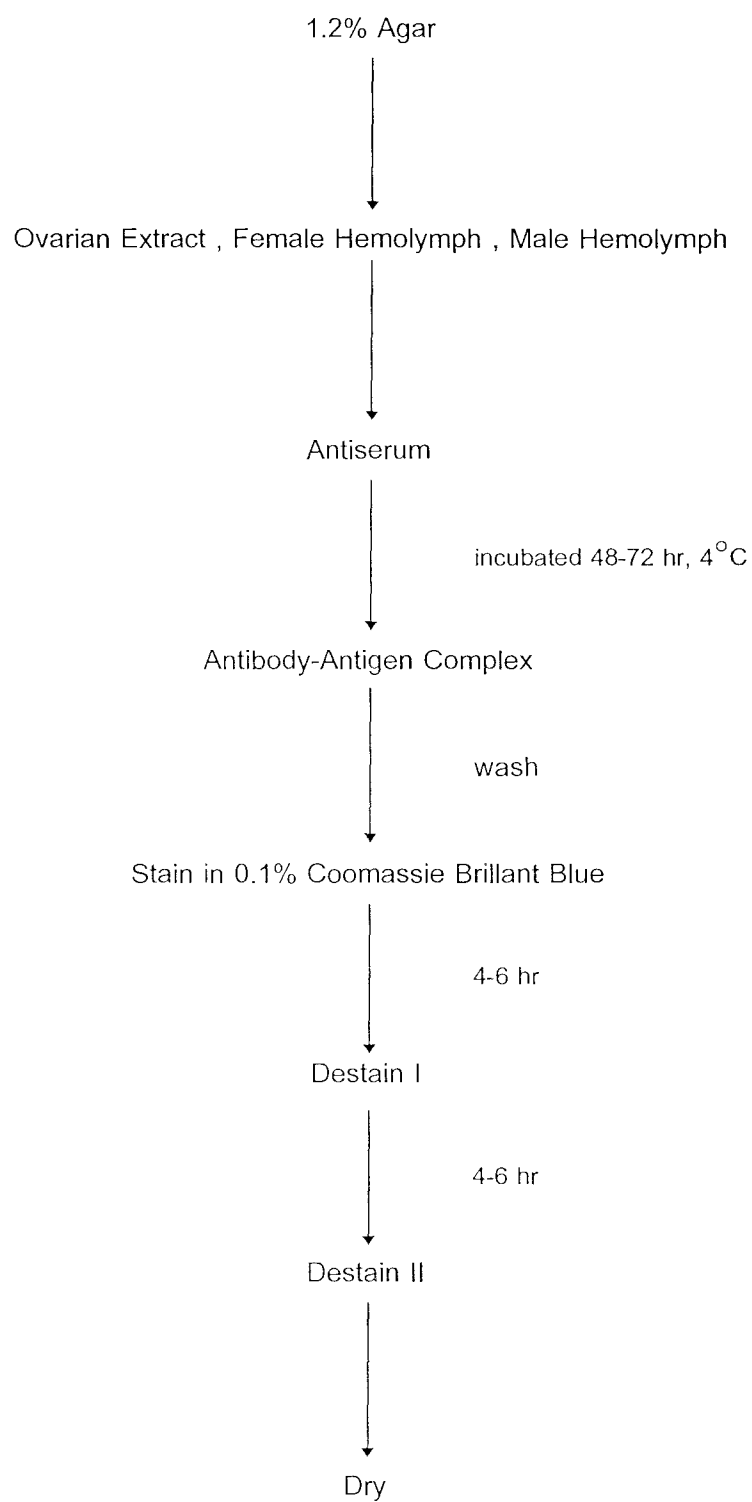
ภาพประกอบ 6 ขั้นตอนดำเนินการทดลอง



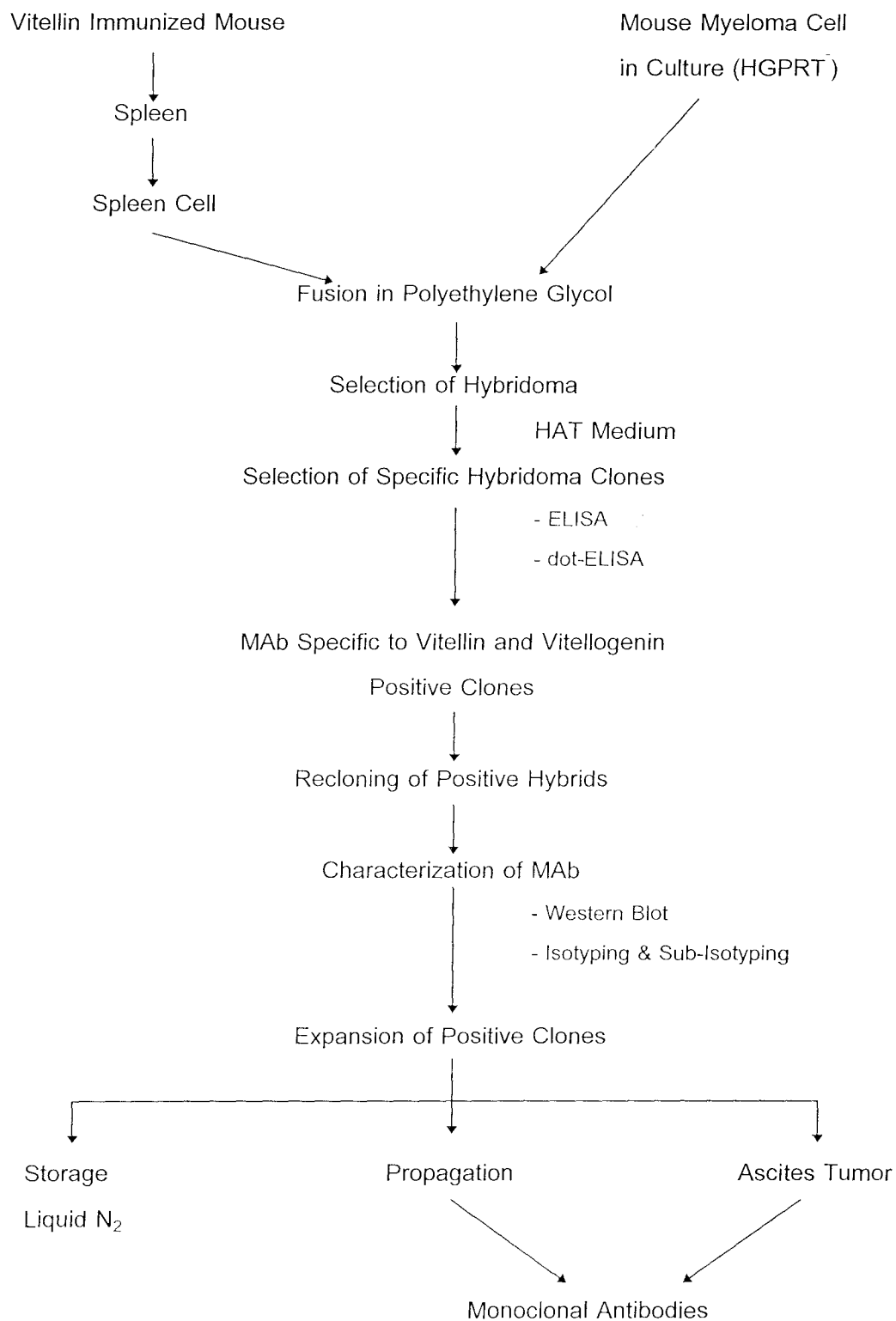
ภาพประกอบ 7 การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล



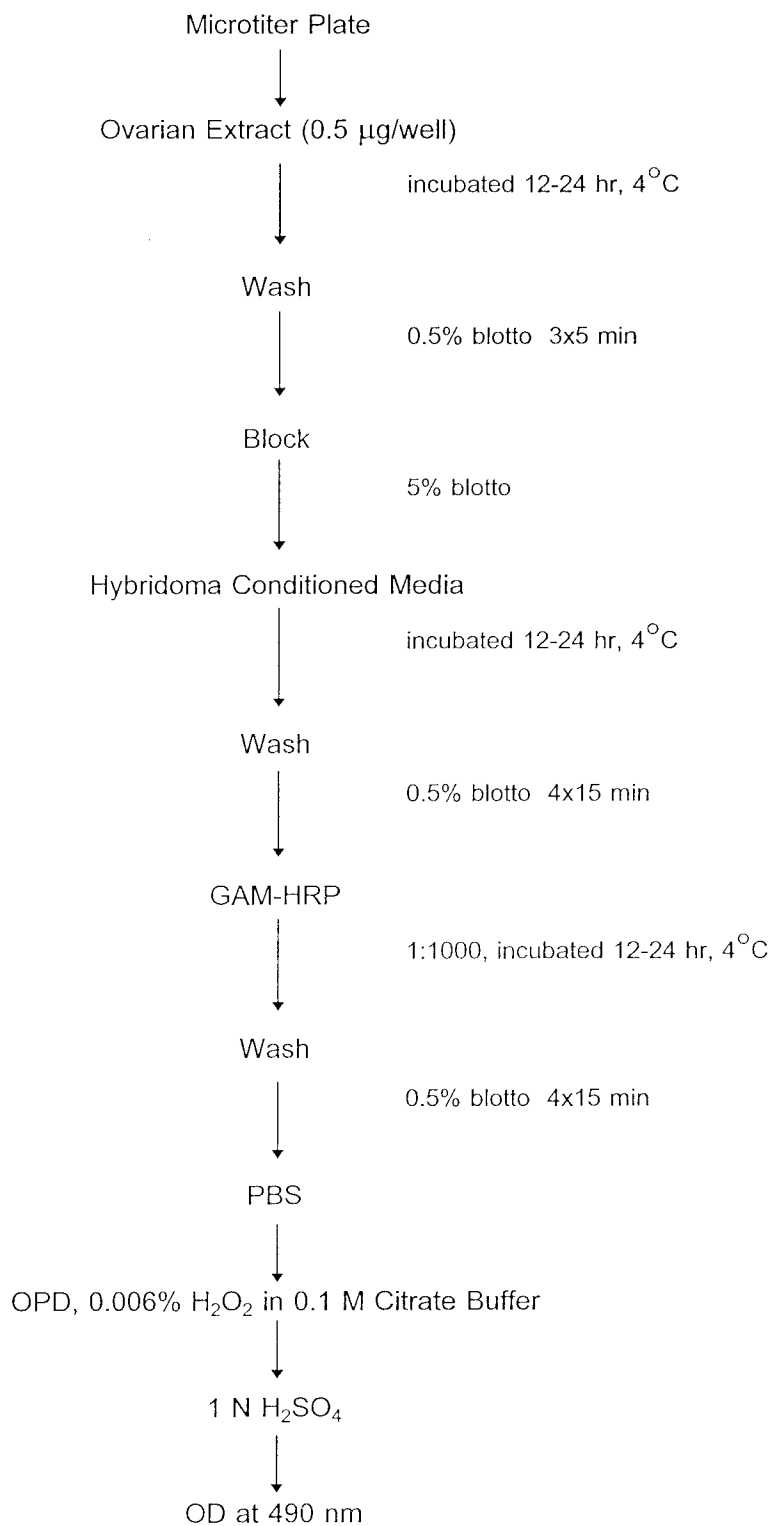
ภาพประกอบ 8 การปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวเทลลิน และตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของ แอนติซีรัมจากหนูขาว



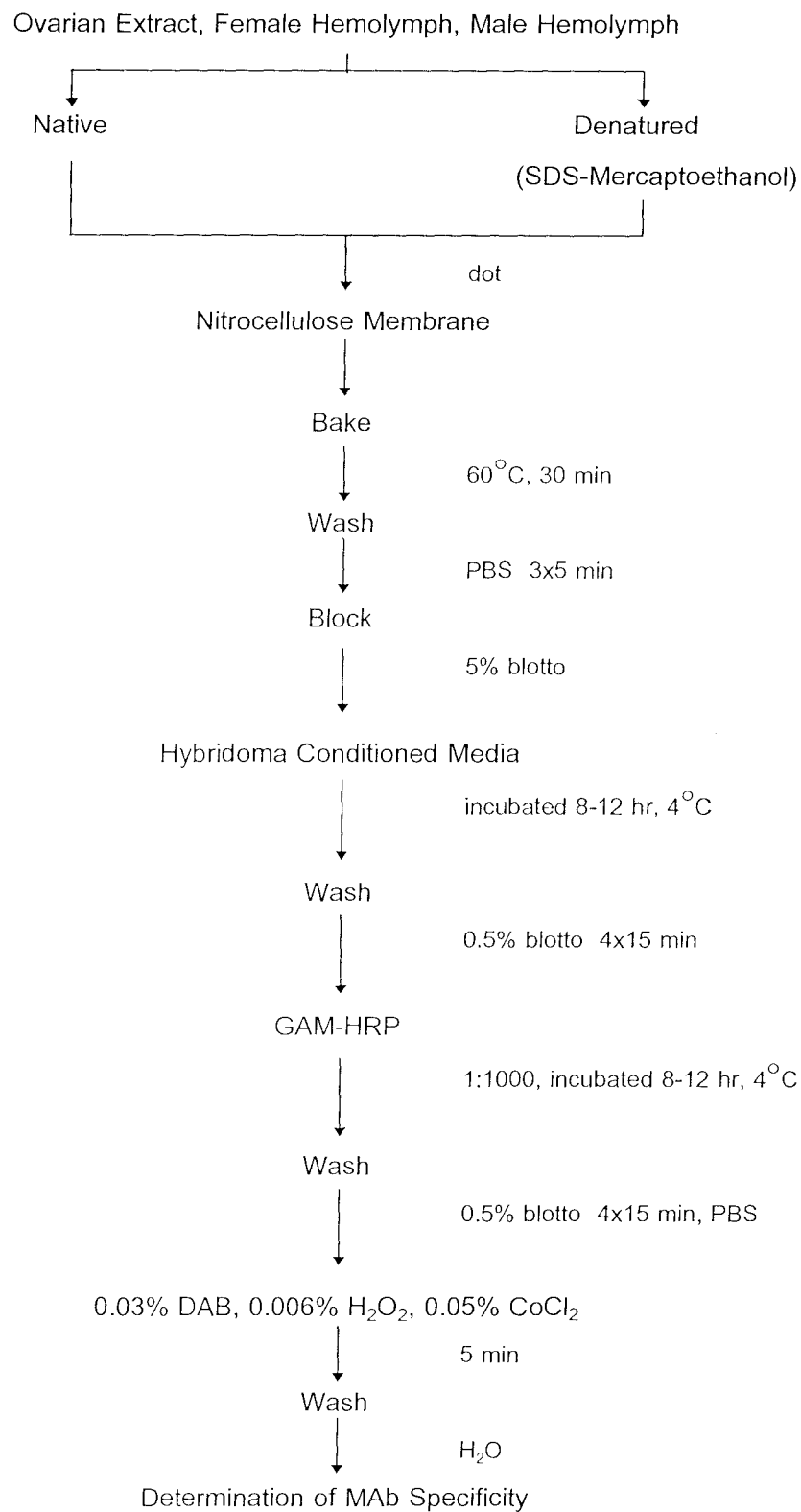
ภาพประกอบ 9 ขั้นตอนการตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแอนติซีรัมโดยวิธีดับเบิล
อิมมูโนดิฟฟิวชัน



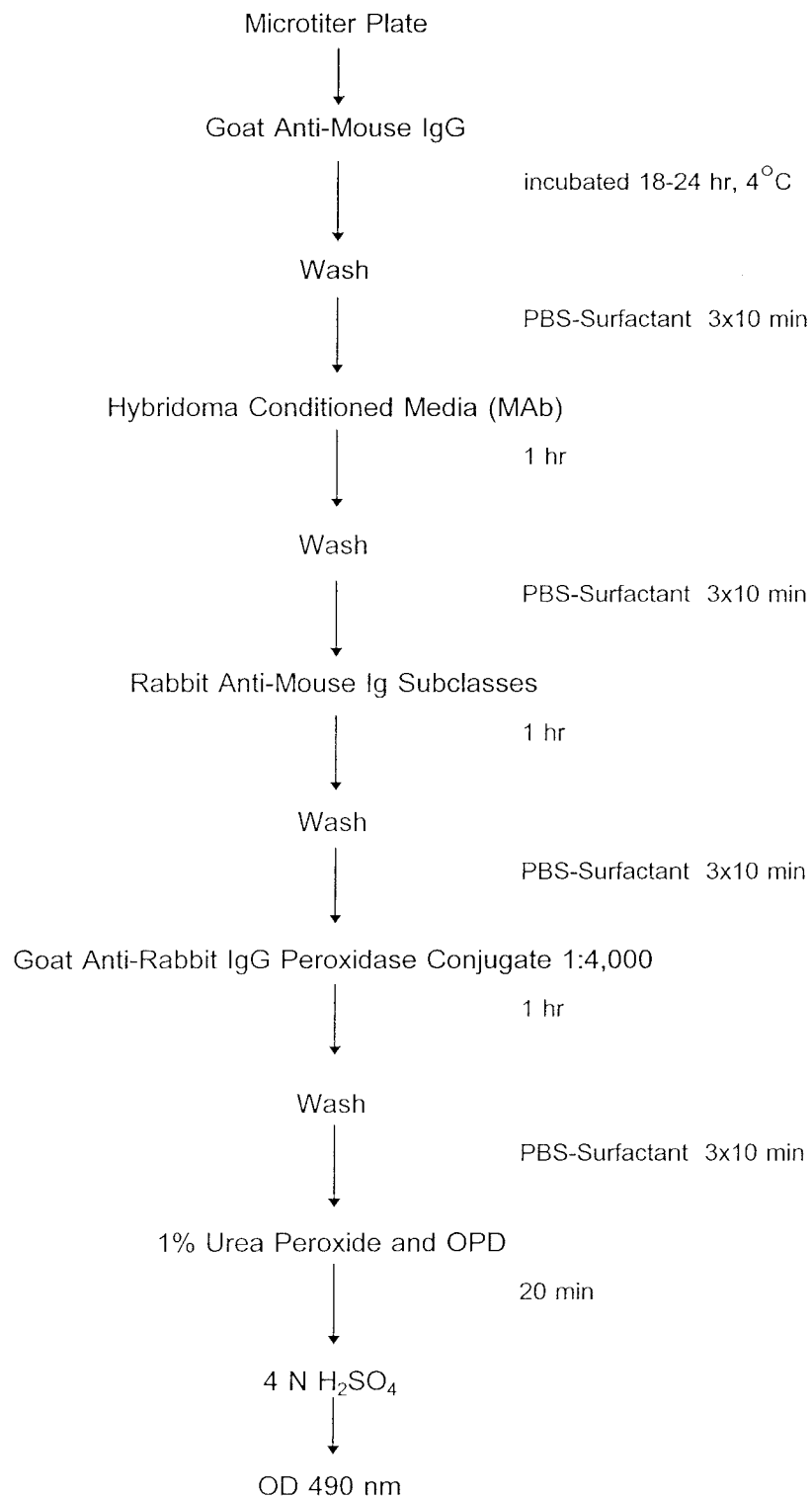
ภาพประกอบ 10 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน



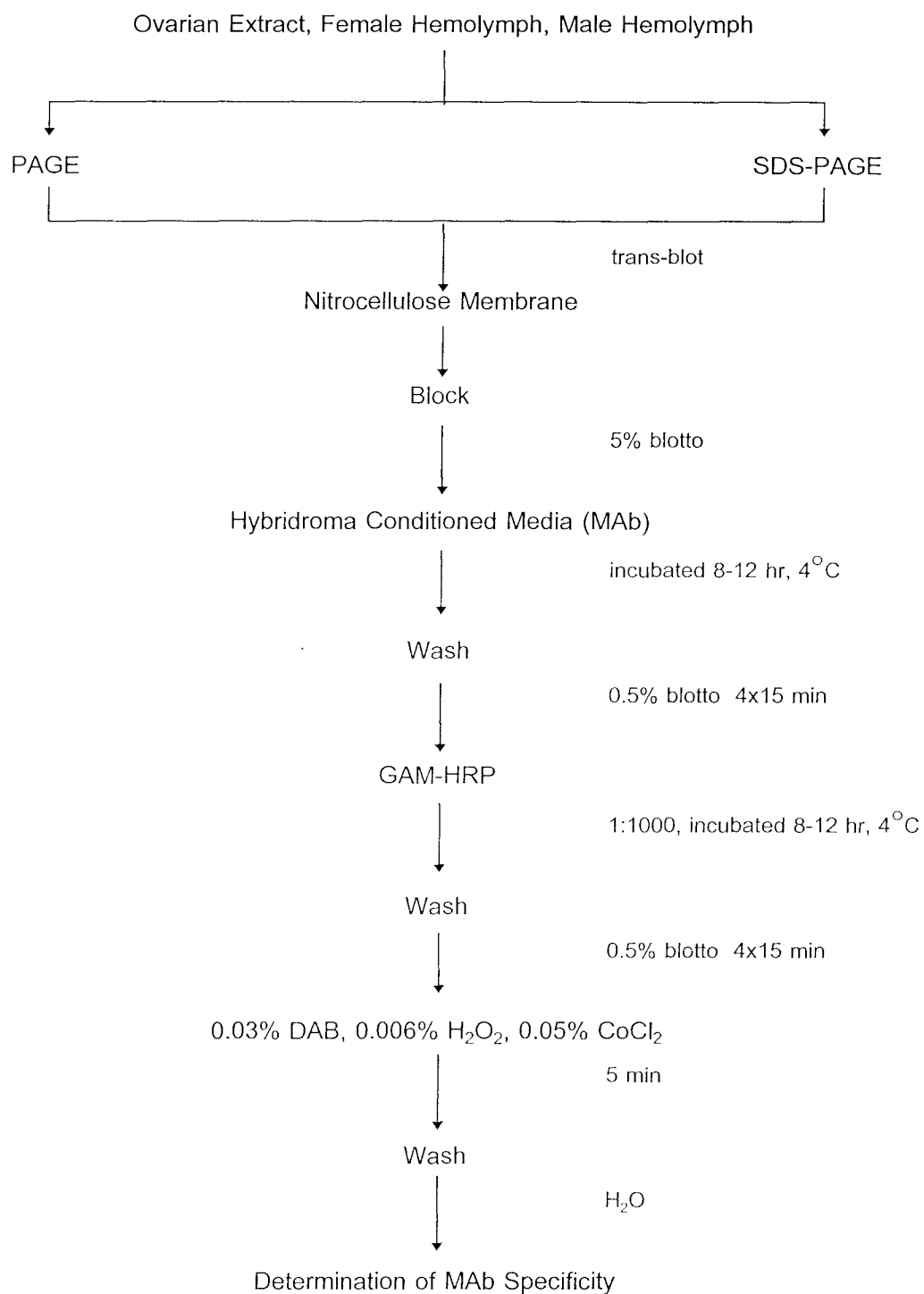
ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA



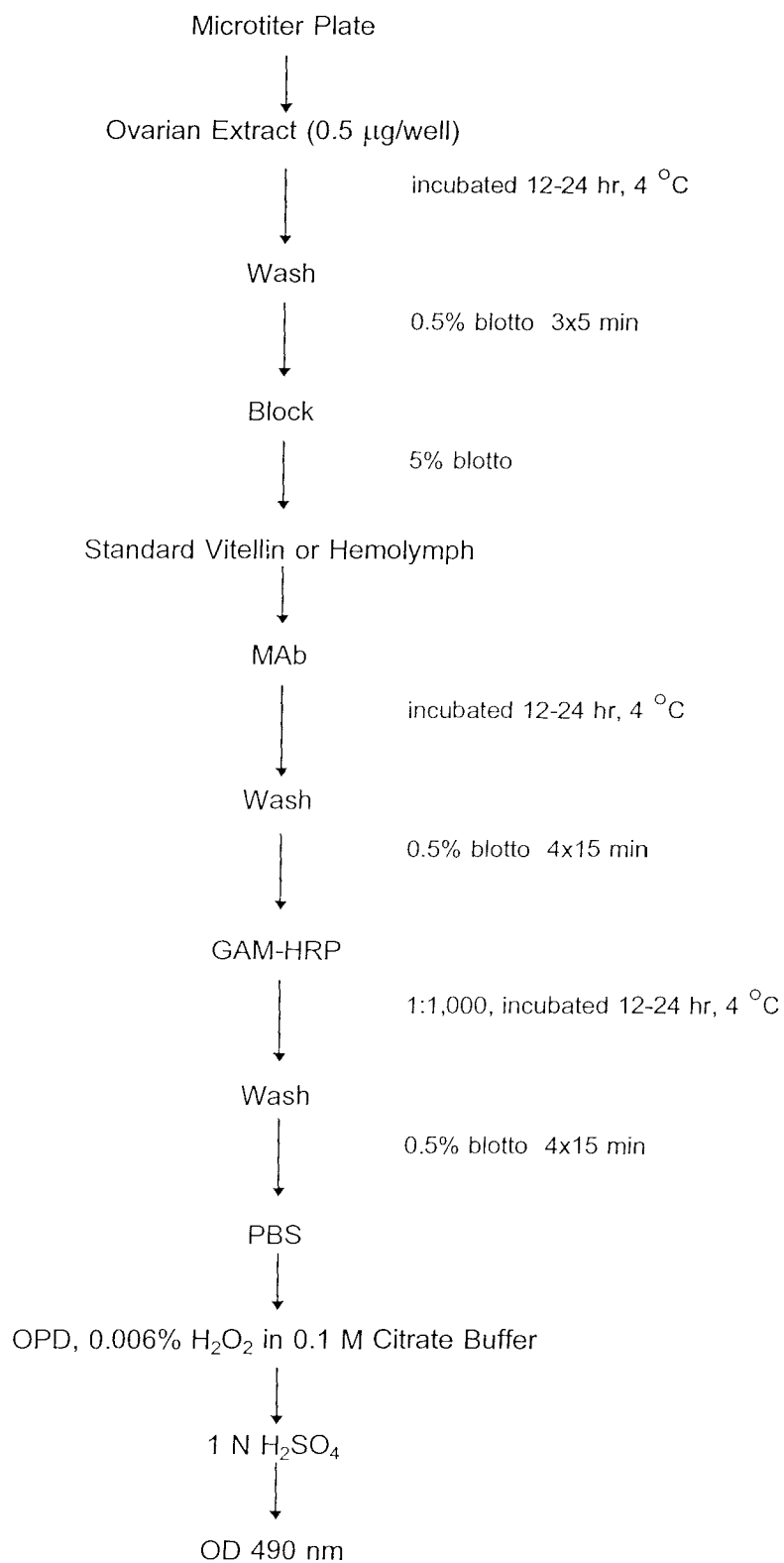
ภาพประกอบ 12 ขั้นตอนการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot-ELISA



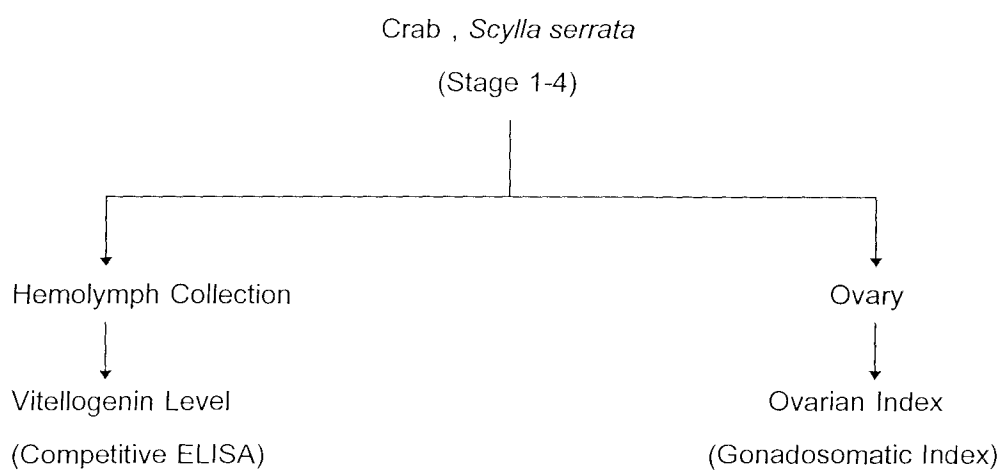
ภาพประกอบ 13 ขั้นตอนการตรวจสอบ Isotype และ sub-Isotype ของโมโนโคลนอล-แอนติบอดีโดยวิธี Sandwich ELISA



ภาพประกอบ 14 ขั้นตอนการตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
โดยวิธี Western blot



ภาพประกอบ 15 ขั้นตอนการตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนนินโดยวิธี competitive ELISA



$$\text{Ovarian Index} = \frac{\text{Ovarian Weight}}{\text{Body Weight}} \times 100 \%$$

ภาพประกอบ 16 ขั้นตอนการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์กับ
ระยะพัฒนาการของรังไข่

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมโดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน

จากการปลูกภูมิคุ้มกันหนู 5 ตัวด้วยสารสกัดจากรังไข่ของปูทะเล เมื่อนำ mouse anti-vitellin antiserum ที่ได้มาทำปฏิกิริยาดกตะกอนในเนื้อวุ้นกับแอนติเจน ซึ่งได้แก่ สารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ และฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมีย พบว่าหนูทุกตัวจะให้แนวตะกอนที่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นหนูตัวที่ 3 จะให้แนวตะกอนที่เข้มและคมชัดที่สุด มีความจำเพาะต่อโปรตีนอื่น ๆ น้อย (ภาพประกอบ 17) ดังนั้น จึงเลือกหนูตัวที่ 3 นี้ไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

2. การคัดเลือกโคลนและการศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน

หลังจากหลอมรวม P3X myeloma กับเซลล์จากม้ามของหนูตัวที่ 3 และนำมาเลี้ยงใน microtiterplate พบว่า ทั้ง 17 เพลท ทุกหลุมมี hybridoma เจริญตั้งแต่ 1-4 โคลนี เมื่อคัดเลือก hybridoma clone โดยวิธี ELISA สามารถคัดเลือก hybridoma clone ที่ผลิตแอนติบอดีต่อสารสกัดจากรังไข่ได้ถึง 82 โคลน จากนั้นนำมาคัดเลือกเพื่อตรวจสอบความจำเพาะของโคลนต่อสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ ฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียในรูปแบบธรรมชาติ และถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติโดยวิธี dot-ELISA Hybridoma clone ที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับสารสกัดไวเทลลิน และฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียในสภาพธรรมชาติมีจำนวน 5 โคลน ได้แก่ SSV36.3 SSV43.1 SSV45 SSV71 และ SSV81 และแอนติบอดีของโคลนที่ SSV36.3 ยังมีความจำเพาะต่อสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่และฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียในสภาพที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ และโคลนที่ SSV81 จะผลิตแอนติบอดีต่อสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ทั้งในรูปแบบธรรมชาติและเสียสภาพธรรมชาติ รวมทั้งฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียในรูปแบบธรรมชาติเท่านั้น (ตาราง 2 และภาพประกอบ 18)

ผลจาก dot-ELISA พบว่าจะเกิดการจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีตัวที่ 2 แบบไม่จำเพาะระหว่างสารละลาย GAM-HRP เมื่อนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่หยดแอนติเจนเหมือนกับที่ใช้ในการคัดเลือกมาบ่มในสารละลาย GAM-HRP และเมื่อนำไปใส่ substrate พบว่ามีจุดจาง ๆ เกิดขึ้นที่บริเวณจุดที่หยดฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียและเพศผู้ เพื่อกำจัดการจับแบบไม่จำเพาะนี้ โดยใช้กระดาษไนโตรเซลลูโลสที่หยดแอนติเจนเหมือนกับที่ใช้ในการคัดเลือกมาบ่มกับ HRP หรือ HRP กับไอโดรเจนเปอร์ออกไซด์แทนนำไปบ่มในสารละลาย GAM-HRP

นอกจากนี้ยังทดลองนำฮีโมลิบ์ของปูทะเลเพศผู้มาดูดซับส่วนที่ทำให้เกิดการจับแบบไม่จำเพาะในสารละลาย GAM-HRP โดยใช้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองทั้งหมดในส่วนที่ทดลองกับ HRP หรือ HRP กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไม่สามารถทำให้จุดจางหายไปหรือจางลงได้ ซึ่งจุดจาง ๆ ที่เกิดขึ้นนี้จะหายไปหรือจางลงเมื่อดูดซับสารละลาย GAM-HRP ด้วยฮีโมลิบ์ของปูทะเลเพศผู้ (ภาพประกอบ 18 และ 19)

การศึกษาคุณลักษณะและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blot พบว่า เมื่อแยกโปรตีนจากสารสกัดจากรังไข่และฮีโมลิบ์ของปูทะเลเพศเมีย โดย PAGE และเมื่อนำเจลที่ผ่านการแยกโปรตีนแล้วไปย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie brilliant blue ย้อมคาร์โบไฮเดรตด้วย PAS ย้อมไขมันด้วย Sudan black B และย้ายโปรตีนลงกระดาษไนโตรเซลลูโลสเพื่อนำไปทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งแถบโปรตีนที่แยกได้จะมีแถบเดียวในส่วนของสารสกัดจากรังไข่ซึ่งสามารถย้อมติดสีทั้ง 3 ชนิด และโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนมีความจำเพาะต่อแถบโปรตีนนี้เหมือนกันทุกโคลน อีกทั้งยังมีความจำเพาะกับแถบโปรตีนที่แยกได้ในส่วนของฮีโมลิบ์ของปูทะเลเพศเมียซึ่งมีตำแหน่งตรงกับแถบโปรตีนที่แยกได้ในส่วนของสารสกัดจากรังไข่ ในส่วนที่ทดสอบกับ mouse anti-vitellin anti-serum เกิดแถบแบนสีเทาเข้มน้ำเงินตรงกับผลในการทดสอบของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลน จึงแน่ใจว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนิน (ภาพประกอบ 20)

เมื่อแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และนำเจลมาย้อมสี Coomassie brilliant blue พบว่า ไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล ประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) ประมาณ 104 และ 77 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในการทดสอบด้วย mouse anti-vitellin antiserum พบว่าปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น มีความจำเพาะกับแถบโปรตีนในสารสกัดจากรังไข่ทั้ง 2 แถบรวมทั้งแถบโปรตีนในฮีโมลิบ์ของปูทะเลเพศเมีย คาดว่าน่าจะเป็นส่วนของไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน และไม่มีการจับกับแถบโปรตีนในส่วนของฮีโมลิบ์ของปูทะเลเพศผู้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ SSV36.3 มีความจำเพาะต่อไวเทลลินหน่วยย่อยแรก (104 กิโลดาลตัน) ในสารสกัดจากรังไข่และฮีโมลิบ์ของปูทะเลเพศเมีย และ SSV81 โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อไวเทลลินหน่วยย่อยแรก (104 กิโลดาลตัน) เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถตรวจสอบการจับของ SSV81 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน ในฮีโมลิบ์ของปูทะเลเพศเมียได้ (ภาพประกอบ 21)

จากการตรวจสอบ isotype และ sub-isotype ของโคลนที่ผลิตได้ทั้ง 5 โคลนนี้ พบว่าโคลนทั้งหมดหลังอิมมิวโนกลอบลินเป็นชนิด IgG1 (ตาราง 2)

3. การตรวจหาคุณภาพของ ascites fluid โดยวิธี ELISA

จากการตรวจหาไตเตอร์ของ ascites fluid โดยวิธี ELISA พบว่า ascites fluid ของ SSV71 สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไวเทลลินใน ascites fluid ที่เจือจางจนถึงจุดที่มีค่าดูดกลืนแสง (OD) มากกว่า 0.1 ได้เมื่อเจือจาง ascites fluid ถึง 1 ต่อ 640,000 เท่า

4. การทดสอบความจำเพาะของ ascites fluid โดยวิธี competitive ELISA

จากการทดสอบความจำเพาะของ ascites fluid โดยการบ่มสารละลายไวเทลลินมาตรฐานจากไข่หรืออีโมลิบ์ของปูทะเลเพศเมียและเพศผู้ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ ascites fluid โดยเจือจางใน blotto 5 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:10,000 และไวเทลลินที่ตรึงในภาค ELISA พบว่า ascites fluid ของ SSV71 มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหาปริมาณไวเทลโลเจนนในอีโมลิบ์ของปูทะเลเพศเมียได้ ซึ่งพบว่า สามารถวัดปริมาณของสารสกัดไวเทลลินได้อยู่ในช่วง 0.33-2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายไวเทลลินมาตรฐานสูง ๆ จะสามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ติดอยู่บนภาค ELISA ได้อย่างสมบูรณ์ ในอีโมลิบ์ปูทะเลเพศเมียบังให้ผลเช่นเดียวกัน ส่วนอีโมลิบ์ของปูทะเลเพศผู้มีผลต่อการจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนบนภาคน้อยมาก นอกจากกรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอีโมลิบ์สูงมาก ๆ พบว่าค่า OD ลดต่ำลงเพียงเล็กน้อย (ภาพประกอบ 22)

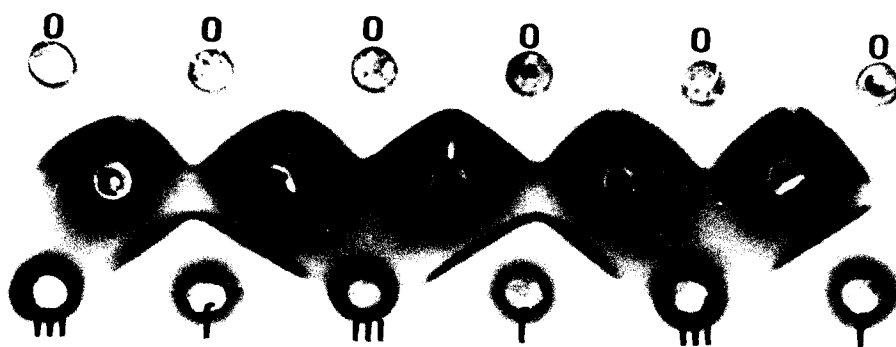
5. การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของรังไข่กับระดับไวเทลโลเจนนในอีโมลิบ์

5.1 การประเมินความแม่นยำของวิธี competitive ELISA ในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนนในอีโมลิบ์

จากการสุ่มตัวอย่างอีโมลิบ์ของปูทะเลเพศเมียมาตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนนด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้ ascites fluid ของ SSV71 โดยทำใน microtiter plate เดียวกันและต่าง microtiter plate กัน ในเวลาต่าง ๆ กัน พบว่า ปริมาณไวเทลโลเจนนที่ตรวจวัดได้ในแต่ละครั้งมีค่าใกล้เคียงกัน มีค่าความแปรปรวนต่ำ 3.8-7.5 เปอร์เซ็นต์ และแม้จะทำต่าง microtiter plate ต่างเวลากันก็มีค่าเฉลี่ยความแปรปรวนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 3) ดังนั้น จึงเชื่อว่าวิธี competitive ELISA ที่ใช้ตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนนในอีโมลิบ์มีความแม่นยำพอสมควร

5.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของรังไข่กับระดับไวเทลโลเจนินในฮีมอลิมป์

จากการสุ่มตัวอย่างฮีมอลิมป์ของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่อยู่ในระยะต่าง ๆ คือ ระยะที่ 1 ถึง 4 นำมาตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA เทียบกับ สารละลายไวเทลลินมาตรฐาน จะเห็นว่า ค่าของไวเทลโลเจนินในฮีมอลิมป์ เมื่อเทียบกับค่าดัชนีของรังไข่จะมีลักษณะที่กระจายมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง (ตาราง 4 และภาพประกอบ 23) โดยจะพบว่า ระดับของไวเทลโลเจนินในฮีมอลิมป์จะมีระดับต่ำในระยะการเจริญของรังไข่ในระยะ 1 และ 2 ซึ่งจะมีค่าดัชนีของรังไข่ต่ำ และระดับไวเทลโลเจนินจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3 และ 4 ซึ่งพบว่าระดับของไวเทลโลเจนินในระยะนี้จะมีค่าความแปรปรวนค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยแล้วจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น



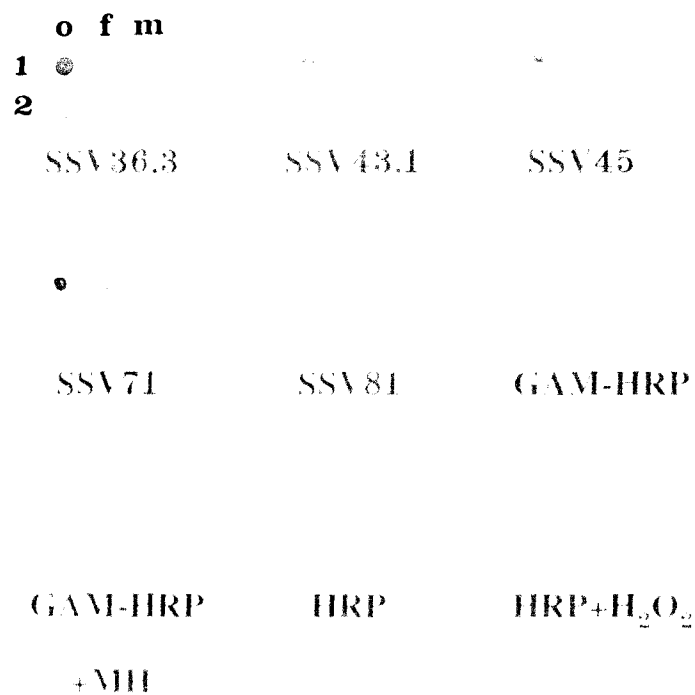
ภาพประกอบ 17 การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแอนติซีรัมของหนู 5 ตัวกับแอนติเจนต่าง ๆ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

o = Ovarian Extract

f = Female Hemolymph

m = Male Hemolymph

หลุมกลาง = Mouse Anti-vitellin Antiserum ของหนูตัวที่ 1-5



ภาพประกอบ 18 Dot-ELISA จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี (SSV) 5 ชนิด

o = Ovarian Extract

f = Female Hemolymph

m = Male Hemolymph

1 = โปรตีนที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ

2 = โปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ

GAM-HRP = Goat Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase Conjugate

HRP = Horseradish Peroxidase

MH = Male Hemolymph

o f m		
1		
2		
SSV36.3	SSV43.1	SSV45
SSV71	SSV81	GAM-HRP
		+ MH

ภาพประกอบ 19 Dot-ELISA จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี (SSV) 5 ชนิด โดยใช้
GAM-HRP ที่ดูดซับด้วยฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศผู้ (GAM-HRP + MH)

o = Ovarian Extract

f = Female Hemolymph

m = Male Hemolymph

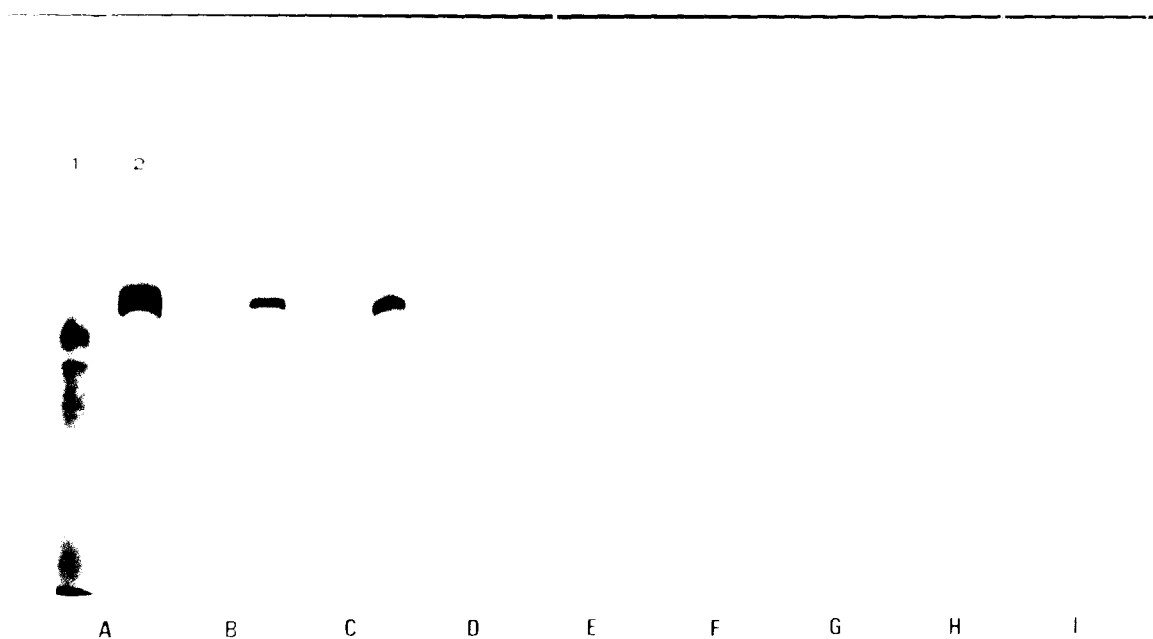
1 = โปรตีนที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ

2 = โปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ

GAM-HRP = Goat Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase Conjugate

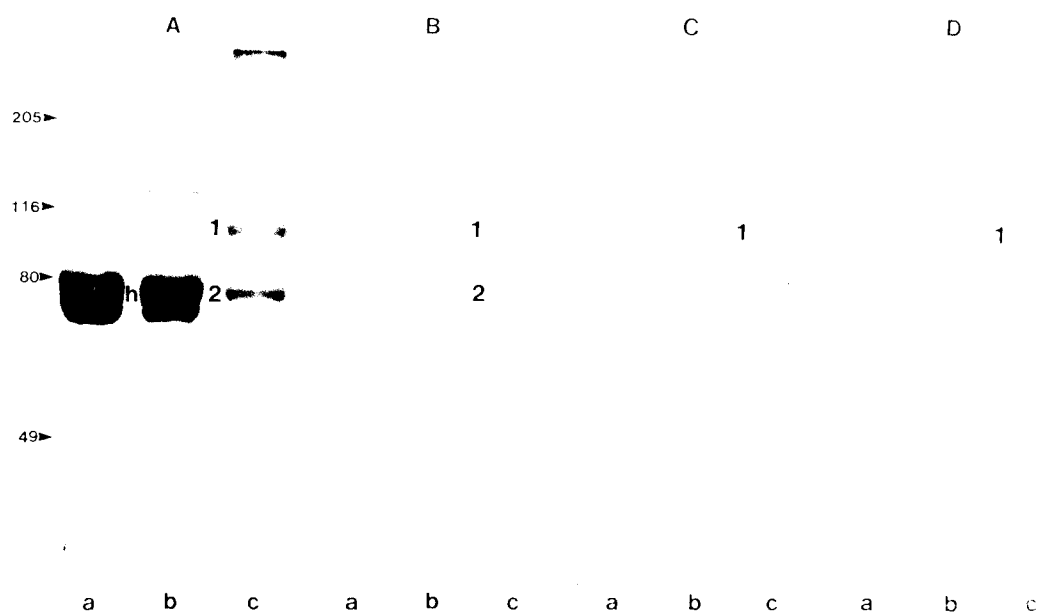
HRP = Horseradish Peroxidase

MH = Male Hemolymph



ภาพประกอบ 20 PAGE ของฮีโมลิมปูปะเลเพศเมีย (1) และสารสกัดจากรังไข่ (2)

ย้อมด้วย Coomassie blue (A), PAS (B), Sudan black B (C) และ Western blot ด้วย mouse anti-vitellin antiserum (D) หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่าง ๆ SSV36.3 (E) SSV43.1 (F) SSV45 (G) SSV71 (H) และ SSV81 (I)

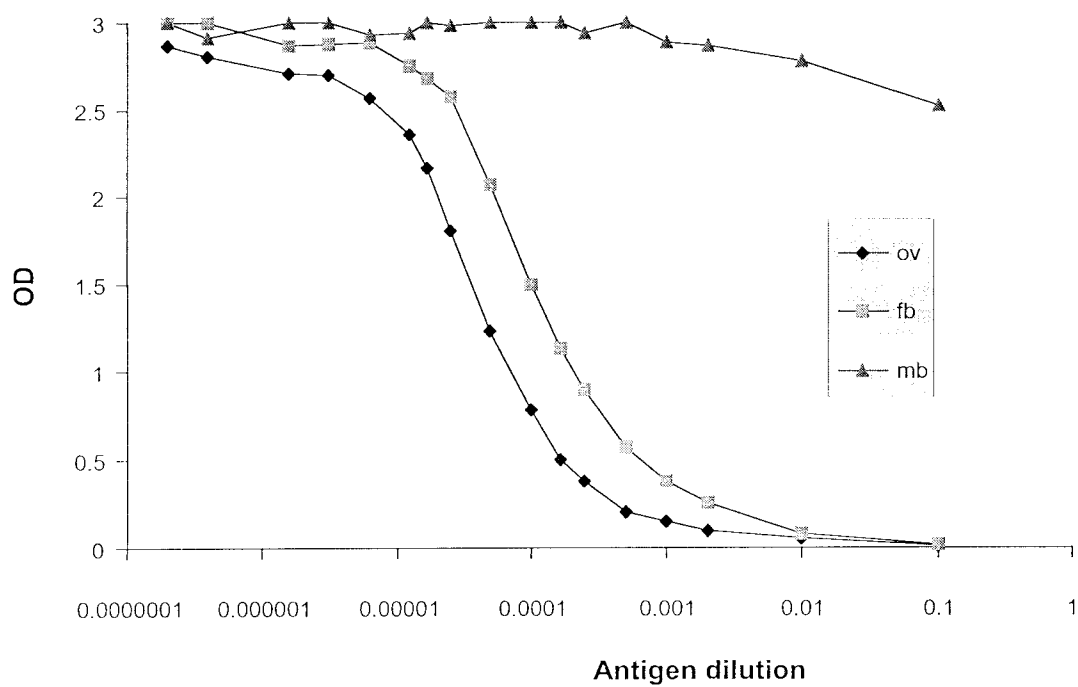


ภาพประกอบ 21 SDS-PAGE ของฮีโมลิมปูทะเลเพศผู้ (a) เพศเมีย (b) และสารสกัดจากรังไข่ (c) ย้อมด้วย Coomassie blue (A) ผล Western blot ด้วย mouse anti-vitellin antiserum (B) หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี SSV36.3 (C) หรือ SSV81(D)

h = Hemocyanin

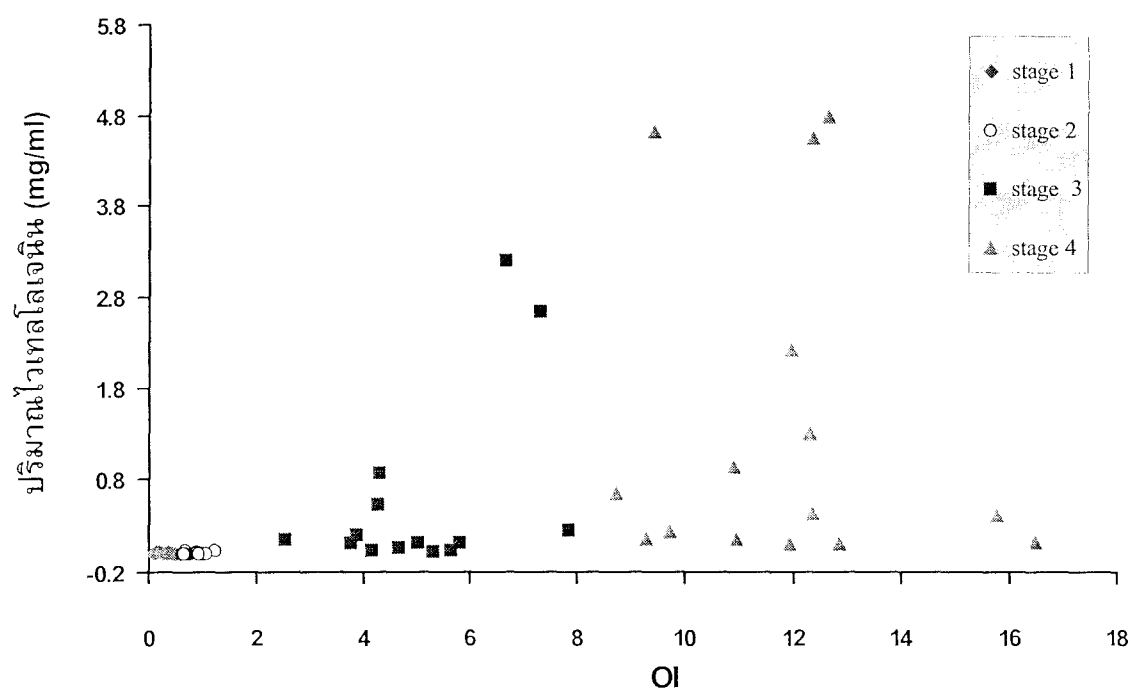
1 = โปรตีนหน่วยย่อยแรก

2 = โปรตีนหน่วยย่อยที่สอง



ภาพประกอบ 22 Competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและตัวอย่างอีโมลิบปีของ
ปูทะเลเพศเมีย และเพศผู้ที่เจือจางความเข้มข้นระดับต่าง ๆ โดยใช้ ascites fluid ของ
SSV71 เจือจาง 1:10,000

- ov = ไวเทลลินมาตรฐาน ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
fb = อีโมลิบปีจากปูทะเลเพศเมียที่รังไข่เจริญเต็มที่
mb = อีโมลิบปีจากปูทะเลเพศผู้



ภาพประกอบ 23 เปรียบเทียบระดับไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ของปูทะเลเพศเมีย *S. serrata* กับดัชนีของรังไข่ในระยะเวลาการเจริญต่าง ๆ

ตาราง 2 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน

Hybridoma Clone	Class & Subclass	Dot-blot Test			
		Native Protein		Denatured Protein	
		Vitellin	Vitellogenin	Vitellin	Vitellogenin
SSV36.3	IgG1	+	+	+	+
SSV43.1	IgG1	+	+	-	-
SSV45	IgG1	+	+	-	-
SSV71	IgG1	+	+	-	-
SSV81	IgG1	+	+	+	-

- + แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน
- แอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน

ตาราง 3 การประเมินความแม่นยำของวิธี competitive ELISA ในการวัดปริมาณ
ไวเทรโลเจนิน

ครั้งที่	ปริมาณไวเทรโลเจนิน (mg/ml)					ค่าเฉลี่ย	SD	ความแปรปรวน (%)
	1	2	3	4	5			
1	0.4154	0.4145	0.4099	0.4382	0.4461	0.4248	0.0162	3.81
2	0.4111	0.4102	0.3941	0.4400	0.4731	0.4257	0.0312	7.32
3	0.5040	0.4230	0.4557	0.4281	0.4298	0.4481	0.0337	7.52
4	0.4199	0.4130	0.4590	0.4328	0.4142	0.4278	0.0191	4.46
5	0.4881	0.4889	0.4497	0.4984	0.4763	0.4803	0.0188	3.91
						0.4413	0.0238	5.39

ตาราง 4 ปริมาณไวเทลโลเจนนในฮีมอลิมปของปูทะเลที่รังไข่มีพัฒนาการในระยะที่ 1-4

	ระยะที่ 1		ระยะที่ 2		ระยะที่ 3		ระยะที่ 4	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
น้ำหนักตัว (g)	173.65	53.48	189.36	78.17	327.88	149.71	309.12	106.26
น้ำหนักรังไข่ (g)	0.60	0.26	1.59	0.74	16.83	8.66	36.47	13.52
ดัชนีรังไข่ (OI)	0.36	0.15	0.84	0.19	5.08	1.46	11.83	2.18
ปริมาณ ไวเทลโลเจนน (mg/ml)	0.0050	0.0064	0.0100	0.0126	0.6019	1.0157	1.3890	1.7830

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือก hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทล-
ลินและไวเทลโลเจนินจำนวน 5 ชนิด ซึ่งคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด
เหล่านี้มีความจำเพาะต่อทั้งไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน เนื่องจากสามารถจับกับโปรตีนในรังไข่
และโปรตีนในฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียที่รังไข่กำลังเจริญ แต่ไม่จับกับโปรตีนต่าง ๆ ในฮีโม-
ลิมป์ของปูทะเลเพศผู้ (ภาพประกอบ 18, 19, 20 และ 21) และโปรตีนที่จับในรังไข่นั้นเป็น
glycolipoprotein (ภาพประกอบ 20 A,B,C) แต่จะมี hybridoma 2 โคลน (SSV36.3 และ
SSV81) ที่ผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับกับไวเทลลินในรูปที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ (ตาราง
2) ซึ่งแอนติบอดีของ SSV36.3 ยังมีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินที่ถูกทำให้เสียสภาพ
ธรรมชาติอีกด้วย และแอนติบอดีของทั้ง 2 ชนิดนี้มีความจำเพาะกับแถบโปรตีนแรกซึ่งมี
น้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 104 กิโลดาลตันในสารสกัดจากรังไข่ และในฮีโมลิมป์ของปูทะเล
เพศเมียที่มีพัฒนาการของรังไข่อยู่ในระยะที่ 4 แต่การที่ไม่สามารถตรวจพบไวเทลโลเจนินใน
ฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียด้วย SSV81 นั้น อาจเป็นเพราะว่าแรงจับ (affinity) ของแอนติบอดี
ของ SSV81 ต่ำกว่า SSV36.3 มากและปริมาณไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมป์มีระดับต่ำกว่าสาร-
สกัดจากรังไข่มาก หรืออาจเป็นเพราะ epitope ของ SSV81 บนไวเทลโลเจนินต่างจากไวเทลลิน
ดังนั้น เมื่อถูกทำให้เสียสภาพไปจึงทำให้แอนติบอดีของ SSV81 ไม่สามารถจับกับไวเทลโล-
เจนินได้ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นกรณีหลังมากกว่าเนื่องจากในสภาพปกติแอนติบอดี SSV81
สามารถจับกับไวเทลโลเจนินได้ (ภาพประกอบ 18, 19, 20 และ 21)

ในการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE สารสกัดจากรังไข่ของปูทะเลประกอบด้วย 2
หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 104 และ 77 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อใช้
mouse anti-vitellin antiserum ทดสอบปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน ปรากฏว่าแถบโปรตีนทั้งสองเกิด
ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันกับ mouse anti-vitellin antiserum (ภาพประกอบ 21) ดังนั้น แถบ
โปรตีนทั้งสองนี้น่าที่จะเป็นไวเทลลิน ซึ่งไวเทลลินของปูม้า *Callinectes sapidus* ประกอบด้วย
2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 107 และ 78 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Lee and
Puppione. 1988) แต่ในรายงานการศึกษาเกี่ยวกับไวเทลลินในปี 1994-1995 ของ ลีและวัดสัน
พบว่า ไวเทลลินของปูม้า *Callinectes sapidus* ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล
ประมาณ 188, 168, 109 และ 86 กิโลดาลตัน ตามลำดับ นอกจากนี้ไวเทลลินของปูก้ามดาบ
Uca pugilator ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 123.5 และ 100.6 กิโล-
ดาลตัน ตามลำดับ (Eastman-Rek and Fingerman. 1985) ในปูแสม *Pachygrasus crassipes*
ไวเทลลินประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 118, 105 และ 83 กิโลดาลตัน
ตามลำดับ (Lui and O'Connor. 1977) ซึ่งการที่พบหน่วยย่อยของ ไวเทลลินต่างกันนี้อาจเกิด

จากการใช้รังไข่ที่มีระยะการเจริญต่างกัน และไวเทลลินหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอาจเป็น precursor ของไวเทลลินที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างพัฒนาการของรังไข่

ในการศึกษาครั้งนี้ไวเทลโลเจนินของปูทะเล *Scylla serrata* น่าที่จะประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (107 และ 77 กิโลดาลตัน) จากการแยกฮีโมลิมพ์ของปูทะเลเพศเมียที่มีพัฒนาการของรังไข่อยู่ในระยะที่ 4 ด้วย SDS-PAGE และทดสอบปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันด้วย mouse anti-vitelin antiserum พบว่าเกิดแถบสีเทาแกมน้ำเงินเกิดขึ้น 2 แถบ แต่ส่วนแถบที่ 2 จะเห็นไม่ชัดเจน (ภาพประกอบ 21 Bb) อีกทั้งเมื่อย้อมด้วย Coomassie blue ไม่สามารถเห็นแถบโปรตีนขนาด 77 กิโลดาลตันได้ เนื่องจากปริมาณฮีโมไซยานินมีปริมาณมาก และมีน้ำหนักใกล้เคียงกับโปรตีนแถบนี้ (ภาพประกอบ 21 Aab)

ส่วนการทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี SSV36.3 สามารถจับกับแถบโปรตีนหน่วยย่อยแรก (107 กิโลดาลตัน) เพียงแถบโปรตีนเดียว (ภาพประกอบ 21 Cb) ซึ่งในการทดลองนี้ไม่สามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแถบโปรตีนที่สองได้ (77 กิโลดาลตัน) ดังนั้น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนหน่วยย่อยที่สองนี้ จะเป็นการช่วยให้พิสูจน์ทราบแน่นอนในส่วนของโปรตีนหน่วยย่อยที่สองนี้ (77 กิโลดาลตัน) ในฮีโมลิมพ์ของปูทะเลเพศเมียต่อไป รายงานการศึกษาเกี่ยวกับไวเทลโลเจนินในปูม้า *Callinectes sapidus* ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 109, 107 และ 78 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Lee and Puppione. 1988)

ในกึ่งชนิดต่าง ๆ ไวเทลลินและไวเทลโลเจนินจะประกอบด้วย 2-8 หน่วยย่อย (ตาราง 5) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกุ้งหรือสัตว์ที่นำมาศึกษา และระยะของพัฒนาการของรังไข่ของสัตว์ทดลองที่นำมาใช้ศึกษา รวมถึงวิธีดำเนินการทดลองที่ใช้ในการศึกษาอีกด้วย

จากการใช้ ascites fluid ของ SSV71 วัดปริมาณไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA จะเห็นว่า ไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 4 สามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับไวเทลลินที่ตรึงอยู่บน microtiter plate ได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับไวเทลลินในสารสกัดจากรังไข่ ในขณะที่ฮีโมลิมพ์ของปูทะเลเพศผู้มีผลต่อการจับของแอนติบอดีกับไวเทลลินบน microtiter plate น้อยมาก ถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นของฮีโมลิมพ์ของปูทะเลเพศผู้สูงมาก ๆ จะพบว่ามีผลทำให้ค่า OD ต่ำลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ภาพประกอบ 22) แสดงให้เห็นว่า ไวเทลลินและไวเทลโลเจนินมีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสรีเหมือนกันจึงสามารถนำ ascites fluid ของ SSV71 มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมพ์ได้

Ascites fluid ของ SSV71 ที่ใช้ในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA มีค่าไคเตอร์ที่สูงกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยสามารถใช้ในระดับที่เจือจางถึง 1:10,000 เท่า และสามารถวัดปริมาณของสารสกัดไวเทลลินได้ในช่วง 0.33-2.5 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร ซึ่งการตรวจปริมาณไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมีย โดยทำซ้ำใน microtiter plate เดียวกัน ปริมาณไวเทลโลเจนนที่ตรวจวัดได้ในแต่ละครั้งมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าความแปรปรวนต่ำประมาณ 3.8-7.5 เปอร์เซ็นต์ หรือแม้ทำต่าง microtiterplate กันในเวลาต่าง ๆ กัน ค่าความแปรปรวนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 3) แสดงว่าวิธี competitive ELISA นี้ใช้ตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์นี้มีความแม่นยำและเชื่อถือได้

จากการตรวจวัดไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียที่รังไข่มีพัฒนาการอยู่ในระยะต่าง ๆ คือ ระยะที่ 1-4 จะเห็นว่า ระดับไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียจะอยู่ในระดับต่ำมากในช่วงที่รังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 1 และ 2 และจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงที่รังไข่พัฒนาอยู่ในระยะ 3 และ 4 ตามลำดับ (ตาราง 4) ซึ่งปริมาณไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์ของปูทะเลเพศเมียที่รังไข่มีพัฒนาใน ระยะ 3 และ 4 นี้ มีค่าความแปรปรวนค่อนข้างสูง (ภาพประกอบ 23) แต่โดยเฉลี่ยแล้วจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น การวัดปริมาณไวเทลโลเจนนในกึ่งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่า ไวเทลโลเจนนซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมียในฮีโมลิมป์จะมีระดับเพิ่มขึ้นในระหว่างที่มีการสะสมของไข่แดงจนถึงสูงสุดและลดลงก่อนการวางไข่ (Derelle and others. 1986) ระดับไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์น่าจะเป็นดัชนีที่ดีสำหรับแสดงพัฒนาการของรังไข่ได้ ซึ่งสามารถตรวจได้แม้กึ่งก้ามกรามเริ่มมีการพัฒนาการของรังไข่ และเป็นสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า กระบวนการสะสมของไข่แดงในกึ่งก้ามกรามมีการสังเคราะห์มาจากภายนอกรังไข่ (Lee and Chang. 1997) และการวัดปริมาณไวเทลโลเจนนในปูม้า *Callinectes sapidus* ระดับไวเทลโลเจนนอยู่ในระดับที่ต่ำไม่เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดจนกระทั่งหลังจากวางไข่ (Lee and others. 1996) ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ว่า ไวเทลโลเจนนเป็น precursor ของไวเทลลิน โดยสร้างมาจากภายนอกรังไข่และส่งมาตามฮีโมลิมป์เพื่อไปสะสมในรังไข่ในรูปไวเทลลิน และจากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับตำแหน่งการสังเคราะห์ไวเทลลินในปูม้า *Callinectes sapidus* พบว่าตำแหน่งการสังเคราะห์ไวเทลลินในปูม้า *Callinectes sapidus* อยู่ที่บริเวณรังไข่ ไม่ใช่ส่วนที่ตับ-ตับอ่อน (Lee and Watson. 1995) จึงเป็นไปได้ที่ไวเทลโลเจนนที่วัดได้ในฮีโมลิมป์เป็นส่วนที่เกิดจากการรั่วออกจากรังไข่ แต่ในการศึกษาเกี่ยวกับการสะสมของไข่แดงในปูทะเล *Scylla serrata* มีการสังเคราะห์โปรตีนจากภายนอกรังไข่ เช่น ที่ส่วนตับ-ตับอ่อน และเก็บอยู่ในรูปไวเทลโลเจนนก่อนส่งไปเปลี่ยนรูปและสะสมอยู่ในรังไข่ในรูปไวเทลลินต่อไป (Rani and Subramonium. 1997)

จากการศึกษาดังนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนนได้ ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้นอกจากจะเป็นประโยชน์ในการตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์ได้โดยใช้ตัวอย่างฮีโมลิมป์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แอนติบอดีเหล่านี้ยังจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ด้านต่าง ๆ เช่น ตรวจหาแหล่งสร้างและการเปลี่ยนแปลงของไวเทลลินในเซลล์หลังจากมีการปฏิสนธิ และพัฒนาการของตัวอ่อน แต่อย่างไรก็ดี

ในการศึกษาครั้งนี้ยังขาดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินหน่วยย่อยที่ 2 จึงจำเป็นต้องมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพิ่มเติม เพื่อให้การศึกษาต่อไปมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ตาราง 5 เปรียบเทียบไวเทลลินและไวเทลโลเจนินในสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลา

Species	Yolk Protein (kD)	Subunits (kD)	References
<i>Uca pugilator</i> (Vn)	-	123.5, 100.6	Eastman-Rek and Fingerman., 1985.
<i>Pachygrapsus crassipes</i> (Vn)	-	118, 105, 83	Lui and O'Connor., 1977.
<i>Callinectes sapidus</i> (Vn)	-	107, 78	Lee and Puppione., 1988.
	-	188, 168, 109, 86	Lee and Watson., 1994-1995.
(Vg)	-	109, 107, 78	Lee and Puppione., 1988.
<i>Potamon potamios</i> (Vn)	-	115, 105, 85	Pateraki and Stratakis., 1997.
(Vg)	-	115, 105, 85	Pateraki and Stratakis., 1997.
<i>Scylla serrata</i> (Vn)	-	104, 77	This study
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (Vn)	330	92, 84	Derelle and others., 1986.
<i>Penaeus monodon</i> (Vn)	540	168, 104, 90, 83, 74	Quinitio and others., 1990.
	-	168, 104, 83, 74	Chen and Chen., 1993.
	492	91, 82, 68, 64, 58, 49, 45, 35	Chang and others., 1993.
	-	104, 83, 74, 58, 45	Longyant and others., 1999.
(Vg)	-	168, 104, 83, 74	Chen and Chen., 1994.
	-	170, 82	Chang and others., 1994.
<i>Penaeus chinensis</i> (Vn)	380	105, 85, 78, 58, 40	Chang and others., 1996.
	500	155, 85, 78	Chang and others., 1996.
(Vg)	-	191, 85	Chang and Jeng., 1995.
<i>Penaeus semisulcatus</i> (Vn)	283	95, 86	Tom and others., 1992.
	-	90, 80, 63, 50	Browdy and others., 1990.
(Vg)	-	200, 120, 80	Lubzens and others., 1997.
<i>Penaeus vanamei</i> (Vn)	289	69, 61	Tom and others., 1992.
	-	158, 97, 76	Quackenbush. 1989.

Vn = vitellin

Vg = vitellogenin

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จิตต์ คงแสงไชย. "สถานการณ์ป่าชายเลนของประเทศไทย," ใน สิ่งแวดล้อม '33 เอกสารประกอบการสัมมนา เรื่อง การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย. บรรณาธิการโดย สุรพล สุดารา, ปริญญา นุดาลัย และธงชัย พรรณสวัสดิ์. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : หน้า 85-92 ; 2533.
- ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. การเพาะเลี้ยงปูทะเล (Scylla serrata Forskal). แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี, 2539.
- ชาญยุทธ สุตทองคง. การเลือกแหล่งอาศัยและอาหาร และชีววิทยาการประมงของปูทะเล Scylla serrata (Forsk., 1755) ในป่าชายเลนคลองหวาง จังหวัดระนอง. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539. อัดสำเนา.
- ชูชาติ ชัยรัตน์ และ บุรณ์ แก้วฤทธิ์. การแบ่งกลุ่มปูทะเล. รายงานประจำปี 2522. สถานีประมงจังหวัดจันทบุรี กองประมงน้ำกร่อย. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2522.
- ชูชาติ ชัยรัตน์. การศึกษาเกี่ยวกับปูทะเล. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2531.
- ทัศนีย์ จันทาดิษฐ์. "ผลกระทบทางสังคมจากการจัดการทรัพยากรป่าชายเลนและการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ," ใน สิ่งแวดล้อม '33 เอกสารประกอบการสัมมนา เรื่อง การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย. บรรณาธิการโดย สุรพล สุดารา, ปริญญา นุดาลัย และธงชัย พรรณสวัสดิ์. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : หน้า 85-92 ; 2533.
- ข้ามรงค์ ประกอบบุญ. สถานการณ์ป่าชายเลนของประเทศไทย. กรมป่าไม้, 2535.
- วิมล สุขตั้งมั่น. การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินเพื่อใช้ทดสอบผลของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ในกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ) กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2538. อัดสำเนา.
- วิมล สุขตั้งมั่น, วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ ไพศาล สิทธิกรกุล. "การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินในกุ้งก้ามกราม," วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 12(2) : 25-37 ; 2539ก.
- _____. "ผลของสารสกัดจากก้านดาต่อระดับไวเทลโลเจนนินในเลือดของกุ้งก้ามกราม," วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 12(2) : 38-47 ; 2539ข.
- ศิวาพร ลงยันต์. การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและการตรวจวัดไวเทลโลเจนนินในเลือดกุ้งตะกาด. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ) กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2537ก. อัดสำเนา.

- ตีวพร ลงยันต์ และคนอื่น ๆ. "การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนนในกุ้งตะกาด," วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 10(2) : 10-26 ; 2537ข.
- _____. "ระดับไวเทลโลเจนนในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ของกุ้งตะกาด." วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 10(2) : 27-39 ; 2537ค.
- สนธิ อักษรแก้ว. "ป้าชายเลนทรัพยากรธรรมชาติชายฝั่งที่ควรรอนุรักษ์," ใน สิ่งแวดล้อม '33 เอกสารประกอบการสัมมนา เรื่อง การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย. บรรณาธิการโดย สุพล สุดารา, ปริญญา นุดาลัย และธงชัย พรรณสวัสดิ์. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : หน้า 85-92 ; 2533.
- สมบัติ ภูวชิรานนท์. การประมงปูทะเล Scylla serrata (Forsk.) บริเวณป่าชายเลนบางลา จังหวัดภูเก็ต และศึกษาชีววิทยาบางประการ. ศูนย์ชีววิทยาทางทะเลภูเก็ต : กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, หน้า 237 ; 2530.
- _____. ศึกษาชีววิทยาของปูทะเลในระบบนิเวศน์ป่าชายเลนฝั่งทะเลอันดามัน. สถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเล : กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2533.
- สันต์ บัณฑุกุล, ศิริ จันทนศิริ และผดุง ผลประสิทธิ์. "การสอบสวนปูทะเลและปัญหาเกี่ยวกับการควบคุมการจับปูทะเล," วารสารการประมง. 9(1) : 61-82 ; 2499.
- สุภาพ ไพรพนาพงศ์. "ปริมาณการจับและชีววิทยาบางประการของปูทะเลในจังหวัดระนอง," เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 42, กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, 10 หน้า ; 2538.
- สุภาวดี จุลละสร. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เล่ม 2. กรุงเทพฯ : บริษัทรุ่งศิลป์การพิมพ์ (1977) จำกัด, หน้า 482-483 ; 2525.
- สุรินทร์ มัจฉาชีพ. "ปูทะเล," เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับสัตว์ทะเล เล่ม 1. สตรีเนติศึกษา : 69-80 ; 2520.
- 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)," Int. J. Invert. Reprod. Dev. 2 : 95-105 ; 1980.
- Bomirski, A. and others. "Partial characterization of crustacean gonad inhibiting hormone," Int. J. Invert. Reprod. Dev. 3 : 213-219 ; 1981.
- Browdy, C.L. and others. "Vitellin synthesis in relation to oogenesis in *in vitro*-incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacean, Decapod, Penaeidae)," J. Exp. Zool. 255 : 205-215 ; 1990.

- Chang, C.-F., Lee, F.-Y. and Y.-S. Huang. "Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*," Comp. Biochem. Physiol. 105B : 409-414 ; 1993.
- Chang, C.-F., Lee, F.-Y., Huang, Y.-S and T.-S. Hong. "Purification and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of prawn, *Penaeus monodon*," Invert. Reprod. Dev. 25 : 185-192 ; 1994.
- Chang, C.-F. and S.-R. Jeng. "Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn *Penaeus chinensis*," Comp. Biochem. Physiol. 112B : 257-263 ; 1995.
- Chang, C.-F., Jeng, S.-R., Lin, M.-N. and Y.-Y. Tin. "Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus chinensis*," Invert. Reprod. Dev. 29(2) : 87-93 ; 1996.
- Charniaux-Cotton, H. "Vitellogenesis and its control in malacostracan crustacea," Amer. Zool. 25 : 197-206 ; 1985.
- Chen, C.-C. and S.-N. Chen. "Isolation and partial characterization of vitellin from the egg of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*," Comp. Biochem. Physiol. 106B : 141-146 ; 1993.
- _____. "Vitellogenesis in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, 1789," Comp. Biochem. Physiol. 107B : 453-460 ; 1994.
- 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.
- Estampador, E.P. "Studies on *Scylla serrata* (Crustacea : Portunidae). I. Revision of the genus," Philip. J. Sci. 78(1) : 95-109 ; 1949.
- Fainzilber, M. and others. "Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp?," Biol. Bull. 183 : 233-241 ; 1992.
- Fyfe, W. and J.D. O'Connor. "Characterization and quantification of a crustacean lipovitellin," Comp. Biochem. Physiol. 47B : 851-867 ; 1974.

- Hill, B.J. "Aquaculture of the mud crab (*Scylla serrata*)," CSIRO Division of Fisheries Research. 29-44 ; 1983.
- Horn, E.C. and M.S. Kerr. "The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus* I. Hemocyanins and certain other major protein constituents," Comp. Biochem. Physiol. 29 : 493-508 ; 1969.
- Humason, G.L. The animal tissue techniques, W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA. 661 pp ; 1979.
- 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.
- Lee, R.F. and D.L. Puppione. "Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus* : Lipoprotein II associated with vitellogenesis," J. Exp. Zool. 248 : 278-289 ; 1988.
- Lee, C.-Y. and R.D. Watson. "Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin and vitellogenin of the blue crab *Callinectes sapidus*," J. Crustacean Biol. 14(4) : 617-626 ; 1994.
- Lee, C.-Y. and R.D. Watson. "*In vitro* study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): site and control of vitellin synthesis," J. Exp. Zool. 271 : 364-372 ; 1995.
- Lee, R.F. and A. Walker. "Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab *Callinectes sapidus*," J. Exp. Zool. 271 : 401-412 ; 1995.
- Lee, C.-Y., Umphrey, H.R. and R.D. Watson. "Developmental changes in the level of vitellin-immunoreactive proteins in hemolymph and tissues of the blue crab *Callinectes sapidus*: relation to vitellogenesis," J. Crustacean Biol. 16(1) : 1-9 ; 1996.
- Longyant, S. and others. "Monoclonal antibodies production specific to vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon*," Invert. Reprod. Dev. 1999. (impress)
- Lubzens, E. and others. "Isolation and characterization of the high-density lipoproteins from the hemolymph and ovary of the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* (dehaan) : Apoproteins and lipids," J. Exp. Zool. 278 : 339-348 ; 1997.

- 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.
- Luo, Y. and S. Wei. "A study on the experimental ecology of the mud crab *Scylla serrata* Forskal," Donghai Haiyang. 4 : 91-95 ; 1986.
- Paulus, J.E. and H. Laufer. "Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapod brachyura)," Int. J. Invert. Rep. Dev. 11 : 29-44 ; 1987.
- Qiu, Y.W., NG, T.B. and K.H. Chu. "Purification and characterization of vitellin from the ovaries of the shrimp *Metapenaeus ensis* (Crustacea: Decapod: Penaeidae)," Invert. Reprod. Dev. 31(1-3) : 217-223 ; 1997.
- Quackenbush, L.S. and W.F. Herrnkind. "Partial characterization of eyestalk hormone controlling molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus*," J. Crustacean Biol. 3(1) : 34-44 ; 1983.
- Quackenbush, L.S. and L.L. Keeley. "Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab, *Uca pugnator*," Biol. Bull. 175 : 321-331 ; 1988.
- 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.
- Quinitio, E.T., Hara, A., Yamauchi, K. and A. Fuji. "Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*," Invert. Reprod. Dev. 17 : 221-227 ; 1990.
- Rani, K. and T. Subramoniam. "Vitellogenesis in the mud crab *Scylla serrata* an *in vivo* isotope study," J. Crustacean Biol. 17(4) : 659-665 ; 1997.
- Serene, R. "Les especes du genre *Scylla* a Nhatrang (Vietnam)," IPEC Procs. 3(2) : 133-137 ; 1951.
- Ruppert, E.E. and R.D. Barnes. Invertebrate Zoology, 6th ed. Saunders College Publishing, USA. 1056 pp ; 1994.

- Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. "A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides," J. Immunol. Methods. 141 : 23-32 ; 1991.
- Stephenson, W. and B. Cambell. "The Australian portunids (Crustacea : Portunidae). IV. Remaining genera," Aust. J. Mar. Freshw. Res. 11(1) : 111-115 ; 1960.
- Soyez, S., Van Deijnen, J. E. 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. "Vitellin and vitellogenins of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*," Biol. Bull. 173 : 345-354 ; 1987.
- Suzuki, S., Yamasaki, K. 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., Goren, M. and M. Ovadia. "Purification and characterization of vitellin from the ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapod, Penaeidae)," Comp. Biochem. Physiol. 87B : 17-23 ; 1987a.
- _____. "Localization of the vitellin and its possible precursors in various organ of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapod, Penaeidae)," Int. J. Invert. Rep. Dev. 12 : 1-12 ; 1987b.
- Tom, M. and others. "A comparative study of the ovarian proteins from two penaeid shrimps, *Penaeus semisulcatus* De Haan and *Penaeus vannamei* (Boone)," Comp. Biochem. Physiol. 102B(3) : 483-490 ; 1992.
- Wallace, R., S. Walker and P. Hauschka. "Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of decapod," Biochem. 6 : 1582-1590 ; 1967.
- Wollin, E., Laufer, H. 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 kuruma prawn, *Penaeus japonicus*," Comp. Biochem. Physiol. 86B : 213-218 ; 1987.
- Zagalsky, P.F., Cheesman, D.F. and H.J. Ceccaldi. "Studies on carotenoid-containing lipoproteins isolated from the eggs and ovaries of certain marine invertebrates," Comp. Biochem. Physiol. 22B : 851-871 ; 1967.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบของปริมาณไวเทลโลเจนินในฮีมอลิมพ์ของปูทะเล
ที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 1-4

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. 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 water) ปรับปริมาณเป็น	1,000	มิลลิลิตร

2. Bradford solution (Bradford. 1976)

Coomassie brilliant blue G-250	100	มิลลิกรัม
Methanol	50	มิลลิลิตร
85% Phosphoric acid	100	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water) ปรับปริมาณเป็น	1,000	มิลลิลิตร

3. สารละลาย 5% Blotto

นมพร่องมันเนย	5.0	กรัม
PBS 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2	100	มิลลิลิตร
1% Merthiolate	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100	0.1	มิลลิลิตร

4. Citrate Buffer 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5

Sodium citrate	29.41	กรัม
1% Merthiolate	10	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชด้วย NaOH 0.1 โมลาร์ หรือ HCl 0.1 โมลาร์		

5. อาหารเลี้ยงเซลล์

RPMI 1640	10.4000	กรัม
D-glucose	3.6000	กรัม
L-glutamine	0.2923	กรัม
Sodium pyruvate (C ₃ H ₃ O ₃ Na)	1.1005	กรัม

NaHCO ₃	2.0160	กรัม
HEPES	5.9525	กรัม
H ₂ O (Triple distilled water)	1,000	มิลลิลิตร
เติม Penicillin G 20,000 unit/l	120	ไมโครลิตร
Streptomycin 200 mg/l	900	ไมโครลิตร
Kanamycin 200 mg/l	600	ไมโครลิตร
กรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 ไมครอน		

6. สารละลายสำหรับ PAGE และ SDS-PAGE

6.1 Monomer solution (30% T, 2.7% C_{Bis})

Acrylamide	58.4	กรัม
Bis	1.6	กรัม
H ₂ O (distilled water)	200	มิลลิลิตร

6.2 4X Running gel buffer (1.5 โมลาร์ tris-Cl pH 8.8)

Tris	36.3	กรัม
H ₂ O (distilled water)	200	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชด้วย HCl		

6.3 4X Stacking gel buffer (0.5 โมลาร์ tris-Cl pH 6.8)

Tris	3.0	กรัม
H ₂ O (distilled water)	50	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชด้วย HCl		

6.4 10% SDS

SDS	50	กรัม
H ₂ O (distilled water)	500	มิลลิลิตร

6.5 10% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate	0.5	กรัม
H ₂ O (distilled water)	5	มิลลิลิตร

ควรเตรียมแล้วใช้ทันที

6.6 Running gel overlay (0.375 โมลาร์ tris-Cl pH 8.8, 0.1% SDS)

1.5 M Tris (จากข้อ 6.2)	25	มิลลิลิตร
10% SDS (จากข้อ 6.4)	1.0	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	100	มิลลิลิตร

6.7 2X Treatment buffer (0.125 โมลาร์ tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)

0.5 M Tris (จากข้อ 6.3)	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS (จากข้อ 6.4)	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol	2.0	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	100	มิลลิลิตร

สำหรับที่ใช้กับ PAGE จะไม่ใส่ SDS และ 2-mercaptoethanol

6.8 Tank buffer (0.025 โมลาร์ tris pH 8.3, 0.192 โมลาร์ glycine, 0.1% SDS) สำหรับ SDS-PAGE

Tris	12	กรัม
Glycine	57.6	กรัม
10% SDS (จากข้อ 6.4)	40	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	4,000	มิลลิลิตร

6.9 Upper tank buffer (37.6 มิลลิโมลาร์ tris, 40 มิลลิโมลาร์ HCl, pH 8.89) สำหรับ PAGE

Tris	4.56	กรัม
Glycine	3.0	กรัม
H ₂ O (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

6.10 Lower tank buffer (63 มิลลิโมลาร์ tris, 50 มิลลิโมลาร์ HCl, pH 7.47) สำหรับ PAGE

Tris	22.7	กรัม
1 N HCl	150	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	3,000	มิลลิลิตร

6.11 Stain stock (1% Coomassie blue R-250)

1% Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
H ₂ O (distilled water)	100	มิลลิลิตร

6.12 Stain (0.125% coomassie blue R-250, 50% methanol, 10% acetic acid)

Coomassie blue R-250 (จากข้อ 6.11)	62.5	มิลลิลิตร
Methanol	250	มิลลิลิตร
Acetic acid	50	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	500	มิลลิลิตร

6.13 Destaining solution I (50% methanol, 10% acetic acid)

Methanol	500	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

6.14 Destaining solution II (5% methanol, 7% acetic acid)

Methanol	50	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

7. Separating gel และ stacking gel

7.1 Separating gel และ stacking gel สำหรับ PAGE 5% gel (5% T 2.7% C)

30% T 2.7% C _{Bis} (จากข้อ 6.1)	10	มิลลิลิตร
1.5 M tris-Cl (จากข้อ 6.2)	15	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	34.7	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (จากข้อ 6.5)	300	ไมโครลิตร
TEMED	20	ไมโครลิตร

7.2 Separating gel สำหรับ SDS-PAGE 7.5% gel (7.5% T 2.7% C)

30% T 2.7% C _{Bis} (จากข้อ 6.1)	15	มิลลิลิตร
1.5 M tris-Cl pH 8.8 (จากข้อ 6.2)	15	มิลลิลิตร
10% SDS (จากข้อ 6.4)	0.6	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	34.1	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (จากข้อ 6.5)	300	ไมโครลิตร
TEMED	20	ไมโครลิตร

7.3 Stacking gel สำหรับ SDS-PAGE 4% gel (4% T 2.7% C)

30% T 2.7% C (จากข้อ 6.1)	2.66	มิลลิลิตร
0.5 M tris-Cl pH 6.8 (จากข้อ 6.3)	5	มิลลิลิตร
10% SDS (จากข้อ 6.4)	0.2	มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water)	12.2	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (จากข้อ 6.5)	100	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร

ตาราง 10 การเตรียม Separating Gel และ Stacking Gel

สารละลาย	Separating Gel		Stacking Gel
	5% T 2.7% C (for PAGE)	7.5% T 2.7% C (for SDS-PAGE)	4% T 2.7% C (for SDS-GAGE)
30% T 2.7% C _{Bis} (6.1)	10 ml	15 ml	2.66 ml
1.5 M tris-Cl pH 8.8 (6.2)	15 ml	15 ml	-
0.5 M tris-Cl pH 6.8 (6.3)	-	-	5 ml
10% SDS (6.4)	-	0.6 ml	0.2 ml
H ₂ O	34.7 ml	34.1 ml	12.2 ml
10% Ammonium persulfate (6.5)	300 µl	300 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl
Total	60 ml	60 ml	20 ml

8. Hybridoma Isotyping and sub-isotyping kit, mouse

ประกอบด้วย

Goat anti-mouse immunoglobulins (Plate coating reagent)	3.0	มิลลิลิตร
Rabbit anti-mouse IgG ₁	15	มิลลิลิตร
Rabbit anti-mouse IgG _{2a}	15	มิลลิลิตร
Rabbit anti-mouse IgG _{2b}	15	มิลลิลิตร
Rabbit anti-mouse IgG ₃	15	มิลลิลิตร
Rabbit anti-mouse IgM	15	มิลลิลิตร
Rabbit anti-mouse IgA	15	มิลลิลิตร
Goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate	0.25	มิลลิลิตร
Plate coating solution	15	มิลลิลิตร
Substrate reagent (citrate buffer and 1% urea peroxide)	15	มิลลิลิตร
Chromaphore tablets (o-phenylene diamine)	30	เม็ด
PBS buffer reagent tablets	25	เม็ด
Surfactant	1.25	มิลลิลิตร

8.1 Plate coating			
Plate coating solution	1	มิลลิลิตร	
H ₂ O (distilled water)	9	มิลลิลิตร	
Goat anti-mouse immunoglobulins	100	ไมโครลิตร	
8.2 PBS-surfactant			
PBS tablet	1	เม็ด	
H ₂ O (distilled water)	100	มิลลิลิตร	
Surfactant	50	ไมโครลิตร	
8.3 Substrate chromophore			
Substrate reagent (1% urea peroxide)	1	มิลลิลิตร	
H ₂ O (distilled water)	9	มิลลิลิตร	
Chromophore tablets (O-phenylene diamine)	2	เม็ด	
9. Periodic acid			
Periodic acid (HIO ₄)	0.6	กรัม	
Nitric acid (concentrated)	0.3	มิลลิลิตร	
H ₂ O (distilled water)	100	มิลลิลิตร	
10. Schiff reagent			
Basic fuchsin	0.5-1.0	กรัม	
Sodium metabisulfite (Na ₂ S ₂ O ₅)	1.9	กรัม	
1 N HCl	15	มิลลิลิตร	
H ₂ O (distilled water)	85	มิลลิลิตร	
เติม charcoal ไม่ควรผสมนานเกิน 45 วินาที กรองจะได้สารละลายใส			
11. Sodium metabisulfite solution			
Sodium metabisulfite (Na ₂ S ₂ O ₅)	0.5	กรัม	
H ₂ O (distilled water)	100	มิลลิลิตร	
12. Sudan black B			
Sudan black B	0.7	กรัม	
Ethylene glycol	100	มิลลิลิตร	

ประวัติผู้วิจัยโดยย่อ

ชื่อ	นางสาวนุชนาถ เกษมวงศ์
วันเดือนปีเกิด	10 พฤษภาคม 2516
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	33/1101 หมู่บ้าน ด.รวมโชค ซอยโชคชัย 4 ถนนลาดพร้าว เขตลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร 10230

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2529	มัธยมศึกษาปีที่ 3 จากโรงเรียนสตรีวัดระฆัง
พ.ศ. 2531	มัธยมศึกษาปีที่ 5 จากโรงเรียนธนบุรีวรเทพีพลารักษ์
พ.ศ. 2531	เทียบเท่าระดับมัธยมศึกษาที่ 6 การศึกษานอกโรงเรียน
พ.ศ. 2535	กศ.บ. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขต ประสานมิตร
พ.ศ. 2542	วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขต ประสานมิตร

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัลโปรตีนเพื่อใช้ตรวจไวรัสโกลเดนในฮีมโกลิมป์ของปูทะเล
Scylla serrata (Forsk.)

บทคัดย่อ
ของ
นุชนาถ เกษมวงศ์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
มีนาคม 2542

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนนของปูทะเล ผลิตโดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนู mouse ด้วยสารสกัดหยาบจากรังไข่ของปูทะเล โดยนำเซลล์ม้ามของหนูมารวมกับเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิต P3X จากการคัดเลือก hybridoma โดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA และ dot-ELISA โดยใช้ไวเทลลินและไวเทลโลเจนนเป็นแอนติเจน สามารถแยก hybridoma ได้ 5 โคลนที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามความจำเพาะ คือกลุ่มที่ 1 มี 3 โคลน สร้างแอนติบอดีที่สามารถจับได้เฉพาะโปรตีนที่อยู่ในสภาพปกติ และกลุ่มที่ 2 มี 2 โคลน สร้างแอนติบอดีที่สามารถจับได้ทั้งโปรตีนที่อยู่ในสภาพปกติและสภาพที่เสียสภาพ โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดที่ได้อยู่ในกลุ่มย่อย IgG1 จากการตรวจไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์ของปูทะเลที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 1-4 ด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้ ascites fluid ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (SSV71) พบว่าสามารถวัดปริมาณของสารสกัดไวเทลลินได้ในช่วง 0.33-2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจไวเทลโลเจนนในฮีโมลิมป์ซึ่งพบในระดับที่ต่ำในปูทะเลที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 1 และ 2 และไวเทลโลเจนนจะมีระดับสูงขึ้นในปูทะเลที่มีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะที่ 3 และ 4 ซึ่งในช่วงระยะนี้จะมีค่าความแปรปรวนค่อนข้างสูง

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST VITELLIN FOR
DETERMINATION OF HEMOLYMPH VITELLOGENIN
IN MUD CRAB *Scylla serrata* (FORSKAL)

AN ABSTRACT
BY
NUCHANATH KASEMWONG

Presented in partial fulfillment of requirements for the
Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakarinwirot University
March 1999

Monoclonal antibodies (MAbs) specific to vitellin and vitellogenin of the mud crab, *Scylla serrata*, were produced by immunization of Swiss mice with crude ovarian extract. After fusion of the mouse spleen cells with P3X myeloma cells, the hybridoma were selected against the vitellin and vitellogenin by indirect immunoperoxidase ELISA and dot-ELISA. Five hybridoma clones producing antibodies specific to both the vitellin and vitellogenin were divided into two groups according to their specificity, to native and/or denatured vitellin and vitellogenin. Three MAbs of the first group recognized only the native protein (SSV43.1, SSV45, SSV71) whereas the other two MAbs of the second group recognized both the native and denatured proteins (SSV36.3 and SSV81). All of the MAbs belong to IgG1 subisotype. Vitellogenin levels in hemolymph of *Scylla serrata* at various stages of ovarian development (stage 1 to 4) were determined by competitive ELISA using ascites fluid of MAb (SSV71) in particular. In competitive ELISA, ascites fluid reacted similarity to the vitellin and vitellogenin and was able to be used for detection of the vitellin at the range of 0.33-2.5 µg/ml. During the resting stage and the early ovarian development (stage 1 & 2), the vitellogenin levels were low. The levels of the vitellogenin increased to high levels but highly varied during stage 3 and 4 of the ovarian development.