บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบัน วงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย มีการขยายตัวอย่างกว้างขวาง มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ เพื่อใช้ในการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค เนื่องจากสัตว์น้ำมีโปรตีนสูง ไขมันต่ำ มีกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ย่อยง่าย และราคาไม่แพง สัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคในปัจจุบัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงเทคนิคต่าง ๆ เช่น การพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม, การพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อลดต้นทุนการผลิตและปัญหาเกี่ยวกับโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในบ่อเลี้ยง โดยหาวิธีการตรวจโรคในสัตว์น้ำ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำโดยวิธีผสมเทียม ซึ่งในทางปฏิบัติยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากในปลาทะเลทั่ว ๆ ไป มีลักษณะภายนอกของเพศผู้และเพศเมียไม่แตกต่างกัน จึงต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์อย่างมากในการที่จะแยกเพศและตรวจสอบความพร้อมของแม่พันธุ์ปลาที่จะนำมาฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพื่อให้ปลาวางไข่ ซึ่งวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำพยายามหาวิธีที่จะมาอำนวยความสะดวกในการผสมเทียม มีผู้พบโปรตีนชนิดหนึ่งคือ ไวเทลโลเจนิน ซึ่งจะพบเฉพาะในเลือดของปลาเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เพศ พบว่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือดจะเพิ่มสูงขึ้นไปพร้อม ๆ กับการพัฒนาของไข่ จนถึงระดับหนึ่งแล้วจะค่อย ๆ ลดลงในช่วง 1-2 วันก่อนที่จะมีการวางไข่ (Bohemen และ Lambert, 1981) แต่ในปลาเพศผู้จะมีไวเทลโลเจนินในเลือดต่ำมาก (ต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตร) (So, Idler และ Hwang, 1985) การค้นพบนี้ แสดงให้เห็นว่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือด น่าจะเป็นตัวบ่งชี้พัฒนาการของไข่ และใช้เป็นดัชนีชี้ถึงความพร้อมของแม่พันธุ์ปลาที่จะนำมาผสมเทียมได้

ปลากะพงแดง, *Lutjanus argentimaculatus* เป็นปลาในวงศ์ Lutjanidae พบในเขตน่านน้ำไทยประมาณ 20 ชนิด โดยทั่วไปอาศัยในเขตแนวปะการังน้ำตื้น ไปจนถึงเขตน้ำกร่อยปากแม่น้ำ ตัวเต็มวัยมีขนาดตั้งแต่ 80-120 เซนติเมตร ในช่วงที่เป็นตัวอ่อนจะมีลักษณะลำตัวเป็นแถบสีเข้ม 8-10 แถบ พบในเขตชายฝั่งตะวันออกของทะเลไทยตั้งแต่จังหวัดจันทบุรีไปจนถึงจังหวัดระยอง (Singhagraiwan, 1993) เป็นปลาที่เป็นที่นิยมบริโภคและมีการเพาะเลี้ยงกันมากตามแนวชายฝั่งของจังหวัดระยอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาและเปรียบเทียบคุณสมบัติของไวเทลโลเจนินในปลากะพงแดง, *L. argentimaculatus* โดยวิธีแยกไวเทลโลเจนินออกมาจากเลือดและไข่ของปลากะพงแดง โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานจากการสำรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องมาปรับปรุงเทคนิคบางประการ เพื่อให้

เหมาะสมกับความพร้อมของห้องปฏิบัติการ โดยตัวอย่างพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงได้จากปลากะพงแดงซึ่งจับจากทะเลเขตภาคตะวันออกของอ่าวไทยมาเลี้ยงไว้ ณ สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อ. เกาะสีชัง จ. ชลบุรี ข้อมูลของไวเทลโลเจนินที่ได้จากการศึกษานี้ น่าจะใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความสมบูรณ์เพศของปลากะพงแดงเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาการผสมเทียมได้ และเพื่อเป็นแนวทางพื้นฐานในการศึกษาไวเทลโลเจนินในปลาทะเลเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ซึ่งกำลังมีการเพาะเลี้ยงกันมากขึ้นในหลายพื้นที่ของชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกและทางภาคใต้ของประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

แยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง, *L. argentimaculatus* เพื่อศึกษาเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุล และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของไวเทลโลเจนินที่แยกจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบคุณสมบัติของไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในการศึกษาไวเทลโลเจนินของปลาชนิดอื่น ต่อไป
3. สามารถนำคุณสมบัติของไวเทลโลเจนินไปประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของปลาเพื่อการผสมเทียมได้
4. นำไวเทลโลเจนินที่แยกออกมาได้ ใช้เป็นสารมาตรฐานในการคิดค้นชุดตรวจสอบเพศปลาได้ในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความหมายของไวเทลโลเจนิน

ไวเทลโลเจนิน หรือ female specific serum protein เป็นไลโปฟอสโฟไกลโค-โปรตีน (lipophosphoglycoprotein) ที่พบในเลือดและไข่ของปลาเพศเมียในช่วงที่มีการสร้างไข่ หรือในช่วงที่ปลามีความสมบูรณ์เพศ ซึ่งจะมีระดับมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาการของไข่ โดยอาจเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล สังเกตได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังเพศเมียที่ออกลูกเป็นไข่ (oviparous vertebrate) หลายชนิด การศึกษาไวเทลโลเจนินครั้งแรกโดย Pan, Bell และ Telfer (1969) ได้พบโปรตีนในไข่ของแมลงซีโครเปีย และแมลงสาบอเมริกัน และได้ใช้คำว่า "ไวเทลโลเจนิน" แทนความหมายของโปรตีนที่พบเฉพาะในเพศเมีย หรือ female specific serum protein เป็นครั้งแรก ต่อมามีผู้ศึกษาไวเทลโลเจนินกันมากขึ้น เช่นในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Wallace, 1970; Redshaw และ Follett, 1971; Ansari และคณะ, 1971; Follett และ Redshaw, 1974; Tata, 1976), สัตว์ปีก เช่น นก และไก่ (Bergink และ Wallace, 1974; Deeley และคณะ, 1975) และในสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น ปลากระดูกอ่อน (Perez และ Callard, 1992), ปลากระดูกแข็ง (Plack , 1971; Hara และ Hirai, 1978; Hara, Yamauchi และ Hirai, 1980) จากการศึกษาพบว่าไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ เป็นสารตั้งต้นในการสร้างโปรตีนในไข่แดง (egg yolk protein) ซึ่งเป็นที่สะสมอาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน ในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ออกลูกเป็นไข่ ไวเทลโลเจนินจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในตับ โดยขณะที่ไข่เจริญเติบโต ไวเทลโลเจนินที่สร้างขึ้นจากไข่ถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วจึงมีไวเทลโลเจนินไม่เพียงพอ รังไข่จึงหลั่งฮอร์โมนเอสโตรเจนมากระตุ้นตับให้สร้างไวเทลโลเจนิน แล้วปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดไปสู่รังไข่ซึ่งจะนำไวเทลโลเจนินไปใช้โดยย่อยไวเทลโลเจนินออกเป็น 2 ส่วน คือ ไลโปไวเทลลิน (lipovitellin) และ ฟอสวิทิน (phosvitin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนในไข่แดง Campbell และ Idler (1980) ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบของไวเทลโลเจนินในปลาเรนโบว์เทร้าท์, *Salmo gairdneri* พบว่ามีไลโปไวเทลลิน และฟอสวิทิน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 290 และ 45 kDa ตามลำดับ และพบว่ามีส่วนประกอบเล็ก ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 21 kDa มีคุณสมบัติเหมือนกับส่วนประกอบชนิดบีด้า (β' - component) ที่ Markert และ Vanstone (1971) ได้พบในการศึกษาปลาโคโฮแซลมอน นอกจากนี้ยังพบว่าไลโปไวเทลลินจะมีลิปิดเป็นส่วนประกอบมาก มีฟอสฟอรัสน้อย และมีกรดอะมิโนลิวซีน (leucine) เป็นส่วนประกอบ มีความเป็นขั้วน้อยกว่าฟอสวิทิน ในทางตรงกันข้ามฟอสวิทินมีลิปิดเป็นส่วนประกอบน้อยแต่มีฟอสฟอรัสมาก และมีกรดอะมิโนซีรีน (serine) 56% หรือเรียกฟอสวิทินชนิดนี้ว่าฟอสโฟซีรีน (phosphoserine) พบว่าไวเทลโลเจนินประกอบด้วยไลโปไวเทลลิน 85% และฟอสวิทิน 4% (Redshaw และ Follett, 1971; Penning และคณะ, 1977)

การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน

โดยปกติแล้วการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินจะมีขึ้นในช่วงไวเทลโลเจเนซิส (vitellogenesis) Bohemen, Lambert และ Peute (1981) ; So และคณะ (1985) พบว่าวงจรสืบพันธุ์ของปลาที่ออกลูกเป็นไข่ในช่วง 1 ปี จะมีวงจรสืบพันธุ์ 4 ช่วง คือ

1. Previtellogenic period ในช่วงนี้ปลาจะมีระดับไวเทลโลเจนินในพลาสมาต่ำ เพราะปลานำไวเทลโลเจนินจากเลือดไปใช้ในการสร้างไข่จนหมด

2. Period of endogenous vitellogenesis มีการเพิ่มปริมาณไวเทลโลเจนินในกระแสเลือดทีละน้อยพร้อม ๆ กับ มีการเจริญของไข่เพิ่มขึ้น

3. Period of exogenous vitellogenesis มีการเพิ่มขึ้นของไวเทลโลเจนินในกระแสเลือดพร้อมกับการเพิ่มของ hepatosomatic index (HSI), gonadosomatic index (GSI) และปริมาณ Rough Endoplasmic Reticulum (RER) ในเซลล์ของตับ แสดงว่าตับจะทำการสร้างไวเทลโลเจนินขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง แล้วหลั่งลงสู่กระแสเลือด ไปสู่รังไข่ ซึ่งไข่จะนำไวเทลโลเจนินไปใช้ โดยสลายออกมาในรูปของไลโปไวเทลลิน และฟอสวิทิน เพื่อเก็บสะสมไว้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน

4. Ovulation and spawning เป็นช่วงที่ไข่สมบูรณ์พร้อมที่จะผสมพันธุ์และวางไข่

นอกจากการสร้างไวเทลโลเจนินตามธรรมชาติภายใต้การควบคุมของเอสโตรเจนในร่างกายแล้ว ไวเทลโลเจนินยังสามารถที่จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างขึ้นได้จากการฉีดฮอร์โมนเอสโตรเจน, การผสมเอสโตรเจนเข้าในอาหารหรือวิธีการฝังฮอร์โมนได้ (Hamazaki, Iuchi และ Yamakami, 1987) และสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ออกลูกเป็นไข่เพศผู้ก็สามารถชักนำให้มีระดับของฟอสโฟลิปิด, แคลเซี่ยม และฟอสโฟโปรตีนในเลือดเพิ่มขึ้นได้ด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน (Craik, 1978) ในช่วงแรก Wallace และ Jared (1968) ได้ศึกษา *Xenopus laevis* เพศเมีย ที่กำลังอยู่ในช่วงไวเทลโลเจเนซิส และเพศผู้ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอสโตรเจน พบว่ามีการสร้างฟอสโฟโปรตีนขึ้นทันทีหลังจากที่ *Xenopus* เพศผู้ถูกฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล 1 มิลลิกรัมเพียง 1 ครั้ง และได้สรุปว่า ภายใต้สภาวะปกติ ฟอสโฟโปรตีนที่อยู่ในระบบหมุนเวียนเลือดถูกควบคุมโดยตับซึ่งถูกกระตุ้นด้วยเอสโตรเจน แล้วมาสะสมในไข่ไว้สำหรับเลี้ยงตัวอ่อน ซึ่งฟอสโฟโปรตีนในซีรัมนี้คือ ไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีน ซึ่งมีฟอสวิทินเป็นองค์ประกอบ ได้มีการศึกษาการชักนำให้มีการสร้างไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีนในสัตว์อีกหลายชนิด เช่น ในสัตว์เลื้อยคลาน (Bergink และ Wallace, 1974) และสัตว์ปีก เช่นไก่ (Deeley และคณะ, 1975) ต่อมามีการศึกษาโปรตีน ที่เกิดจากการชักนำให้สร้างไวเทลโลเจนินในปลาเพศเมียที่ยังไม่สมบูรณ์เพศ และในปลาเพศผู้ได้ เช่น

Emmersen และ Petersen (1976) ศึกษาโดยการทดลองฉีดกระตุ้นปลาซีกเดียว, *Platichtys flesus* ด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออลปริมาณ 250 ไมโครกรัม 4 ครั้งในช่วงเวลา 2 สัปดาห์ ให้กับปลาเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ, ปลาเพศเมียที่ยังไม่สมบูรณ์เพศและปลาที่อยู่ในช่วงไวเทลโลเจเนซิส (vitellogenic fish) พบว่า เอสตราไดออลสามารถชักนำให้สร้างไวเทลโลเจนินได้ในปลาเพศผู้และเพศเมียที่ยังไม่สมบูรณ์เพศ ส่วนในปลาที่อยู่ในช่วงไวเทลโลเจเนซิสก็จะมีการสร้างไวเทลโลเจนินเพิ่มขึ้นด้วย

Norberg และ Haux (1985) ได้ศึกษาการกระตุ้นไวเทลโลเจนินในปลาเรนโบว์เทร้าท์, *S. gairdneri* และซีเทร้าท์, *S. trutta* ด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมต่อสัปดาห์ พบว่ามีปริมาณโปรตีนในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นจาก 3.8 เป็น 12.9 กรัมต่อพลาสมา 100 มิลลิลิตร และ 4.6 เป็น 10.5 กรัมต่อพลาสมา 100 มิลลิลิตร ในปลาเรนโบว์-เทร้าท์และปลาซีเทร้าท์ ตามลำดับ และพบว่าความแตกต่างของเพศไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในพลาสมาในระดับที่ตรวจวัดได้ และเมื่อนำโปรตีนที่แยกออกมานี้มาทดสอบโดยวิธีทางชีวเคมีพบว่าเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในพลาสมาของปลาเพศเมียที่อยู่ในช่วงที่มีการสร้างไข่ในธรรมชาติ และไม่พบในพลาสมาของปลาเพศผู้ที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้นด้วยเอสโตรเจนและปลาเพศเมียที่อยู่ในช่วง previtellogenic ไวเทลโลเจนินมีคุณสมบัติเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีน มีฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบอยู่มาก และสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไข่สกัดได้ โดยไวเทลโลเจนิน มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 440 kDa ซึ่งสรุปได้ว่าการฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตรา-ไดออลในปลาเรนโบว์เทร้าท์ สามารถชักนำให้มีการสร้างไวเทลโลเจนินได้

Mananos และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของเอสโตรเจนที่มีต่อระดับไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้และปลาเพศเมียซึ่งมีระดับไวเทลโลเจนินต่ำมาก (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยนำปลาทั้ง 2 เพศมาฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออลในปริมาณ 0.5, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 2 วัน เป็นเวลา 12 วันพบว่าปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนทั้ง 3 ระดับมีปริมาณไวเทลโลเจนินไม่แตกต่างกัน แสดงว่าปริมาณเอสโตรเจนไม่มีผลต่อการเพิ่มการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาที่มีความพร้อมในการสืบพันธุ์ เพราะระดับไวเทลโลเจนินที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นจะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งและถ้ามีการฉีดกระตุ้นครั้งต่อ ๆ ไป จะไม่มีการเพิ่มขึ้นอีกแต่จะค่อย ๆ มีระดับลดลงเมื่อหยุดฉีดกระตุ้นด้วยเอสโตรเจน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาส่วนประกอบของไวเทลโลเจนิน

ไวเทลโลเจนินเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีนที่มีส่วนประกอบของไลโปโปรตีน ฟอสโฟโปรตีน และไกลโคโปรตีนประกอบกันเป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 250 ถึง 600 kDa แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของสัตว์ และอัตราส่วนของลิปิด, ฟอสฟอรัส และคาร์โบไฮเดรตก็จะมีความแตกต่างกันไปด้วย เทคนิคที่ใช้ในการแยกไวเทลโลเจนินออกจากพลาสมาและไข่นั้นมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ที่นำมาศึกษา เช่น การแยกไวเทลโลเจนินของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ จะใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (ultracentrifugation) (Redshaw และ Follett, 1971), การตกตะกอนโปรตีนด้วยไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (Ansari และคณะ, 1971), แมกนีเซียมคลอไรด์ในอีดีทีเอ (Wiley, Opresko และ Wallace, 1979) และโครมาโตกราฟี (Wallace, 1970; Wiley และคณะ, 1979) ส่วนในปลาจะมีการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาโดยวิธีโครมาโตกราฟี มีผู้ศึกษาและพัฒนาวิธีการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์ในปลาชนิดต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคต่างกัน ดังนี้

Emmersen และ Petersen (1976) นำพลาสมาของปลาซีกเดียว, *P. flesus* ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล มาแยกไวเทลโลเจนินโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น (gel filtration) ผ่านคอลัมน์อุลโทรเจล-34 แอลเคบี แล้วชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่มีโปตัสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์, พีเอช 7.0 เมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลได้มีค่า 550 kDa

Hara และ Hirai (1978) แยกไวเทลโลเจนินจากซีรัมของเรนโบว์เทร้าท์, *S. gairdneri* โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นเช่นกัน แต่ใช้คอลัมน์เซฟาโรส-6บี ชะด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2% นำมาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบแถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 220 และ 130 kDa ตามลำดับ เมื่อนำไข่ของปลาเรนโบว์เทร้าท์เพศเมียที่สมบูรณ์เพศมา ทำการสกัดตามวิธีของ Markert และ Vanstone (1971) นำส่วนใสสีเหลืองที่สกัดได้ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ชะด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 เช่นเดียวกับ ขั้นตอนการแยกไวเทลโลเจนินจากซีรัม พบว่าแยกออกมาได้ 2 ส่วนคือ E1 และ E2 และเมื่อนำ E1 และ E2 มาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส ได้น้ำหนักโมเลกุล 130 และ 30 kDa แต่น้ำหนักโมเลกุลที่หาได้จากวิธีเจลฟิลเตรชั่น พบว่าไวเทลโลเจนินมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 600 kDa ซึ่งผู้วิจัยได้สรุปไว้ว่าไวเทลโลเจนินนี้ เป็นโพลิเมอร์ของโปรตีนทีที่มีน้ำหนักโมเลกุล 220 kDa ซึ่งประกอบด้วยลิปิดและคาร์โบไฮเดรตบางตัวที่ทำให้

น้ำหนักของโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็น 600 kDa แต่การศึกษาในเรื่องของลิปิดและคาร์โบไฮเดรตนี้ยังไม่เด่นชัด

Hara และคณะ (1980) ศึกษาไวเทลโลเจนินในซีรัม และโปรตีนในไข่ของปลาไหลญี่ปุ่น, *Anguilla japonica* โดยนำซีรัมของปลามาผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ซึ่งอยู่ในสมดุลของโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 จากนั้นโปรตีนจะถูกชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 1.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ตามลำดับ แล้วนำโปรตีนพีคที่ได้จากการชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ มาผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ที่อยู่ในสมดุลของทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 และคอลัมน์เซฟาโรส-6บี แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์เดียวกัน ได้ไวเทลโลเจนินออกมา เมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่า ไวเทลโลเจนินที่ได้จากทั้งซีรัมและไข่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือ 350 kDa ประกอบด้วย 4 ซับยูนิต (น้ำหนักโมเลกุล 85 kDa) และพบว่ามีคาร์โบไฮเดรต, ลิปิด และฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบในรูปของไกลโคไลโปฟอสโฟโปรตีนที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ 0.71% และ 0.63% โดยน้ำหนักตามลำดับ และเมื่อนำไวเทลโลเจนินจากซีรัมและไข่ไปกระตุ้นสัตว์ให้สร้างแอนติบอดี พบว่าสัตว์สร้างแอนติบอดีที่มีสมบัติเหมือนกัน

Campbell และ Idler (1980) แยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ของปลาเรนโบว์เทร้าท์, *S. gairdneri* แล้วนำมาผ่านบนคอลัมน์ทีอีเออี-เซลลูโลส ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของกรดอะซิติก-2-อะมิโนไพรพานอล แล้วนำมาผ่านบนคอลัมน์อุลโทรเจน เอซีเอ-22 ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 8.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ หาน้ำหนักโมเลกุลได้ 470 kDa

So และคณะ (1985) แยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของแลนด์ลอคแอตแลนติก-แซลมอน, *S. salar* และนำมาเปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลโลเจนินจากปลาชนิดอื่น ไวเทลโลเจนินที่แยกใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) ด้วยคอลัมน์เซฟาโรส-4บี แล้วชะด้วย โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่มีแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์, พีเอช 11 นำส่วนของพีคมาทำให้เป็นกลางด้วยอีดีทีเอ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, ทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ นำส่วนของไวเทลโลเจนินที่ได้มาผ่านเจลฟิลเตรชั่นบนคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 แล้ววัดระดับไวเทลโลเจนินที่ได้ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (radioimmunoassay; RIA)

Norberg และ Haux (1985) ศึกษาไวเทลโลเจนินในปลาเรนโบว์เทร้าท์, *S. gairdneri* และซีเทร้าท์, *S. trutta* โดยฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นนำพลาสมามาแยกไวเทลโลเจนินโดยนำมาตกตะกอนด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์ในอีดีทีเอ นำตะกอนมาละลาย แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาเซล ที่อยู่ในสมดุลของทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์, พีเอช 8.0 แล้วชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0.0-0.3 โมลาร์ แล้วนำไวเทลโลเจนินที่ได้จากปลาทั้ง 2 ชนิดมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้คอลัมน์เซฟาโรส-6 บี โดยมี อัลโดเลส (158 kDa), คะตาเลส (232 kDa), เฟอริทิน (440 kDa) และไทโรโกลบูลิน (669 kDa) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ได้น้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 440 kDa และพบว่ามีลิปิดในโมเลกุลของไวเทลโลเจนินของปลาเรนโบว์เทร้าท์ และซีเทร้าท์ 18% และ 19% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และ 2 ใน 3 ของลิปิดในไวเทลโลเจนินเป็นฟอสโฟลิปิด ส่วนที่เหลือเป็นไตรกลีเซอไรด์ และโคเลสเตอรอล ปริมาณฟอสฟอรัสในโมเลกุลของไวเทลโลเจนินของเรนโบว์เทร้าท์มี 0.63% และในซีเทร้าท์มีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 0.58% โดยน้ำหนัก

Hamazaki และคณะ (1987) ศึกษาไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของเมดากะ, *Oryzias latipes* ที่กระตุ้นด้วยอาหารผสมเอสโตรเจน โดยนำพลาสมามาผ่านเจลฟิลเตรชั่น ใช้คอลัมน์โตโยเพิร์ลเอชดับบลิว-605 และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0.0-0.5 โมลาร์ นำไวเทลโลเจนินมาหาปริมาณฟอสฟอรัสได้ 8% โดยน้ำหนัก ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในปลาเรนโบว์เทร้าท์ และปลาทอง เมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพพบว่ามีค่า 420 kDa แต่เมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลแบบเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าเอสดีเอสจะย่อยโปรตีนออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ซึ่งมีแถบโปรตีนหลักมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 kDa

Ding, Hee และ Lam (1989) ศึกษาไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและรังไข่ของปลา *Oreochromis aureus* เพศผู้และเพศเมีย ซึ่งถูกกระตุ้นให้สร้างไวเทลโลเจนินด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 2 วัน นำพลาสมามาแยกไวเทลโลเจนินโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น จากนั้นหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 300 และ 500 kDa. ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 แถบ มีปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน และเมื่อนำแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินของ *O. aureus* มาทดสอบปฏิกิริยากับไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่นในวงศ์ Cyprinidae เหมือนกัน เช่น ปลาตะเพียน, *Cyprinus carpio* หรือ *Carassius auratus* จะไม่พบ

ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเลย ปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีของ *O. aureus* นี้ จะเกิดขึ้นเฉพาะกับปลาที่อยู่ในสกุลเดียวกันเช่น *O. mossambicus* และลูกผสมของปลานิลสีชมพู เป็นต้น ผู้วิจัยสรุปว่าโมเลกุลของไวเทลโลเจนิน นั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ (species- specific) มาก

Silversand, Hyllner และ Haux (1993) แยกไวเทลโลเจนินและศึกษาสมบัติทาง immunochemical และเสถียรภาพของไวเทลโลเจนินในปลากระดูกแข็ง 4 ชนิด คือ ปลาคอด, *Gadus morhua*, ปลาเรนโบว์เทร้าท์, *Onchorhynchus mykiss*, ปลาเทอร์บอท, *Scophthalmus maximus*, และปลาวูล์ฟฟิช, *Anarhichas lapus* ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทุก ๆ 5 วัน เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นนำพลาสมามาตกตะกอนโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Wiley และคณะ (1979) แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ High performance ion-exchange chromatography ตามวิธีของ Silversand และ Haux (1989) ใช้คอลัมน์โมโน-คิว ซึ่งอยู่ในสมดุลของ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0.0-0.5 โมลาร์ จากนั้นนำไวเทลโลเจนินที่ได้มาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส ได้น้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลเจนินของปลาคอด 167 kDa, ปลาเรนโบว์เทร้าท์ 175 kDa, ปลาเทอร์บอท 175 kDa และปลาวูล์ฟฟิช 176 kDa และพบว่าไวเทลโลเจนินจากปลากระดูกแข็งจะสลายได้ง่าย เพราะไวเทลโลเจนินแยกออกเป็นโปรตีนส่วนย่อย ๆ ซึ่งจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการศึกษาสมบัติของโปรตีนได้ ดังนั้นจึงต้องเพิ่มความระมัดระวังระหว่างทำการแยกพลาสมา

Kishida และ Specker (1993) ศึกษาไวเทลโลเจนินในพลาสมาและในไข่ของปลานิล, *O. mossambicus* เพศเมียที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก ๆ 2 วัน จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเก็บพลาสมามาแยกไวเทลโลเจนินโดยวิธีโครมาโตกราฟี บนคอลัมน์ดีอีเออี-อะกาโรส ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0.07-0.5 โมลาร์ จากนั้นนำพีคของไวเทลโลเจนินมาผ่านไบโอเจล เอ-1.5 เอ็ม (BioRad) ที่อยู่ในสมดุลของโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์ที่มีอะโปรตินิน 0.1% นำไวเทลโลเจนินที่ได้มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส ได้น้ำหนักโมเลกุลเป็น 200 และ 130 kDa นำสารสกัดจากไข่ของปลานิลมาผ่านคอลัมน์เหมือนกับพลาสมา และนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสเช่นเดียวกัน พบว่าแยกโปรตีนออกมาหลายแถบ โดยมีโปรตีนแถบหลักมีน้ำหนักโมเลกุล 106 kDa และ รองลงมาคือ 26.6, 24.2 และ 23.7 kDa ตามลำดับ

Mananos และคณะ (1994) ศึกษาสมบัติของไวเทลโลเจนินของซีแบส, *Dicentrarchus labrax* โดยฉีดกระตุ้นปลาซีแบสเพศผู้และเพศเมียที่ไม่สมบูรณ์เพศด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 0.5, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 12 วัน นำพลาสมาที่ได้ไปผ่านคอลัมน์เซฟาโรส-6 บี ชะด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์, พีเอช 7.8 ที่มี PMSF 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำพีคที่ได้ไปทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตร้าฟิลเตรชั่น แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาโรส ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียม-คลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0.05-0.3 โมลาร์ นำไวเทลโลเจนินที่ได้จากปลาเพศผู้และเพศเมีย มาหาน้ำหนักโมเลกุลได้ 445 kDa

ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (1995) แยกและศึกษาสมบัติของไวเทลโลเจนินในปลากะรัง, *Epinephelus malabaricus* โดยฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 9 วัน นำพลาสมาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเซลที่อยู่ในสมดุลของทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์, พีเอช 7.5 ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0.0-0.35 โมลาร์แล้วนำพีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ได้ไวเทลโลเจนินออกมา จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ได้โปรตีน 3 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 470, 335 และ 290 kDa ตามลำดับ

การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลา

การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลาสามารถทำได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม (direct and indirect method) การวัดโดยทางตรงก็คือ ใช้วิธีทาง immunochemical ใช้สมบัติความจำเพาะเจาะจงของไวเทลโลเจนินและแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลาแต่ละชนิดมาเป็นตัววัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลาได้ ซึ่งสมบัติความจำเพาะของไวเทลโล-เจนินนี้ Redshaw และ Follett (1976) ได้รายงานไว้จากการศึกษาความจำเพาะของไวเทลโลเจนินในนก แล้วใช้เทคนิคเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (radioimmunoassay) แสดงปริมาณไวเทลโลเจนิน พบว่า แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินของนก จะไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาจากปลาที่อยู่ในช่วงสมบูรณ์เพศ สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ หรือสัตว์เลื้อยคลานอื่น ๆ เลย หรือแม้จะอยู่ในไฟลัมเดียวกัน จึงได้มีผู้นำหลักการนี้มาใช้พัฒนาวิธีวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลาหลายชนิด ซึ่งสามารถวัดได้ในปริมาณตั้งแต่ 0-48 มิลลิกรัมต่อพลาสมา 1 มิลลิลิตร เช่น Plack และคณะ (1971) ได้ใช้เทคนิคอิมมูโนดิฟฟิวชั่น (immunodiffusion) วัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาคอด, *G. morhua*,

Goedmaker และ Verbroom (1974) ใช้เทคนิคอิมมูโนอิเลคโตรโฟรีซิส (immunoelectrophoresis) วัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาไพค์, *Esox lucius*, Bohemen และคณะ (1981) ใช้เทคนิคเดนสิโตเมตริก สแกนนิ่ง (densitometric scanning) หลังจากผ่านขั้นตอนการทำอิเลคโตรโฟรีซิสในเรนโบว์เทร้าท์, *S. gairdneri* , Idler และคณะ (1979) และ Campbell และ Idler (1980) ใช้เทคนิคเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ เริ่มทำครั้งแรกในปลากระดูกแข็ง เป็นวิธีที่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีโดยการติดฉลากสารกัมมันตรังสีกับโปรตีนที่ได้จากไข่แดง แทนที่จะใช้ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ เพราะยังไม่มีเทคนิคที่ดีที่จะมาใช้ติดฉลากสารกัมมันตรังสีกับไวเทลโลเจนิน ในระยะแรกมีการนำเทคนิคนี้มาวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลากันอย่างกว้างขวาง เช่น *O. mykiss* โดย Sumpter (1985), *S. salar* โดย So และคณะ (1985), *Cynoscion nebulosus* โดย Copeland และ Thomus (1988) เป็นต้น ในปี 1980 Engvall ได้ทดลองใช้เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยการนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีมาติดฉลากด้วยเอนไซม์แทนการใช้สารกัมมันตรังสี และพบว่าเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินเท่าเทียมกับเทคนิคเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ จึงมีผู้นำมาพัฒนาการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลากระดูกแข็งได้สำเร็จมากมาย เช่น *Solea vulgaris* (Nunez และคณะ, 1989), *S. salar* (Olin, Westman และ Decken, 1989), *Ictalurus punctatus* (Goodwin และคณะ, 1992), *D. labrax* (Mananos และคณะ, 1994) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถใช้วัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาได้ 1-60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินโดยทางอ้อม คือ การใช้ปริมาณอัลคาไล-เลบายล์ฟอสฟอรัส (alkali-labile phosphorus) เป็นดัชนีในการบอกระดับของไวเทลโลเจนิน ซึ่ง Nath และ Sundararaj (1981); Sundararaj, Nath และ Burzawa (1982) ได้พบปริมาณฟอสฟอรัสในไวเทลโลเจนินของปลาดุก, *Heteropneustes fossilis* วัดได้ปริมาณในช่วง 0-1.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Emmersen และ Petersen (1976) พบปริมาณฟอสฟอรัสในช่วง 5-180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในปลาซีกเดียว, *P. flesus* ซึ่งในการวัดโดยทางอ้อมนี้ จะไม่ได้ค่าปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดสุทธิ เพราะในเลือดมีฟอสฟอรัสที่มาจากแหล่งอื่นด้วย ซึ่งอาจทำให้ค่าที่วัดได้สูงเกินความเป็นจริงได้