บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของปลากะรังจุดฟ้า

ปลากะรังจุดฟ้า ชื่อสามัญ Blue-Spotted Grouper

ชื่อวิทยาศาสตร์ *P. maculatus*

Phylum Chordata

Class Teleostomi

Order Perciformes

Family Serranidae

Genus Plectropomus

ชีววิทยาของปลากะรังจุดฟ้า

ปลากะรังจุดฟ้าเป็นปลาในครอบครัวปลาเก๋า (Serranidae) ลักษณะรูปร่างเรียวยาว รูปกระสวย หางเว้าเล็กน้อย ลักษณะเด่นของปลาในสกุลนี้คือ มีจุดสีฟ้าปกคลุมทั้งตัว ซึ่งสามารถใช้ลักษณะจุดสีฟ้านี้ในการจำแนกชนิดได้ ปลากะรังจุดฟ้าชนิด *P. maculates* จะมีจุดสีฟ้าขนาดค่อนข้างใหญ่กระจายอยู่ห่างๆ จุดสีฟ้าบริเวณหัวและแผ่นปิดเหงือกมีลักษณะรีเหมือนเมล็ดข้าวสาร อาศัยอยู่ตามแนวปะการังในเขตอินโดแปซิฟิก และบางส่วนของประเทศออสเตรเลีย ตัวโตเต็มที่ความยาวประมาณ 70 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 6 กิโลกรัม

ความหมายของไวเทลโลเจนิน

ไวเทลโลเจนินหรือโปรตีนที่พบเฉพาะในเพศเมีย (Female Specific Serum Protein) เป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีน (Lipophosphoglycoprotein) ที่พบในเลือดและไข่ของปลาเพศเมียในช่วงที่มีการสร้างไข่หรือในช่วงที่ปลามีความสมบูรณ์เพศ ซึ่งจะมีระดับมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับการพัฒนาของไข่ โดยอาจเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล สังเกตได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังเพศเมียที่ออกลูกเป็นไข่ (Oviparous Vertebrate) หลายชนิด การศึกษาไวเทลโลเจนินครั้งแรกโดย Pan, Bell and Telfer (1969) ซึ่งจากการศึกษาได้พบโปรตีนในไข่ของแมลงซีโครเปีย และแมลงสาบอเมริกัน และได้ใช้คำว่า **ไวเทลโลเจนิน** แทนความหมายของโปรตีนที่พบเฉพาะเพศเมียเป็นครั้งแรก

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาไวเทลโลเจนินกันมากขึ้น เช่น ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำสัตว์ปีก เช่น นกและไก่ สัตว์น้ำหลายชนิด เช่น ปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง และพบว่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

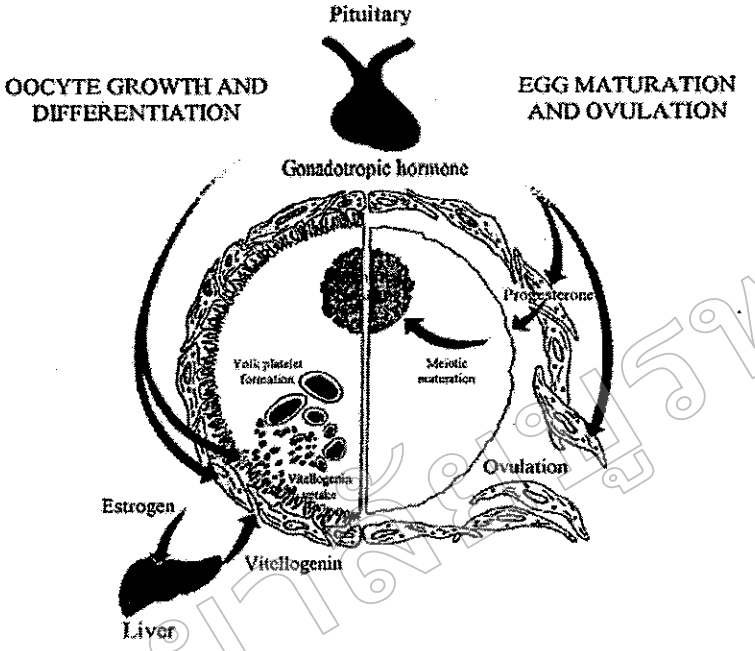
ไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างโปรตีนในไข่แดง (Egg Yolk Protein) ซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน

การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน

การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินจะเกิดขึ้นในช่วงที่มีการสร้างและสะสมโยล์ค (Vitellogenesis) ซึ่งจัดเป็นขั้นตอนที่มีการสร้างและสะสมอาหารเพื่อเป็นแหล่งอาหารสำรองสำหรับตัวอ่อนแก่ลูกปลาที่จะฟักออกมา (Alevin) การสร้างและสะสมโยล์คจะทำให้ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการสร้างและสะสมโยล์คพบว่าไข่จะสุก (Gravid) และอาจจะอยู่ในระยะพัก (Dormancy) จนกระทั่งเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมแม่ปลาจึงจะวางไข่

การสร้างและสะสมโยล์คของปลาเชื่อว่าถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนหลายชนิด เช่น โกรทฮอร์โมน (Growth Hormone) โกนาโดโทรปิน (Gonadotropin) อินซูลิน (Insulin) และไทรอกซิน (Thyroxin) แต่ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน-I (Gonadotropin หรือ GTH I) ที่หลั่งออกมาจากต่อมใต้สมอง ทำหน้าที่เสมือนเป็นฮอร์โมนหลักที่หลั่งออกมากระตุ้นเซลล์ธิคา (Theca Cell) ของรังไข่ ให้ผลิตและหลั่งฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen หรือ 17 ß-Estradiol หรือ E_2) ออกมาเพื่อทำหน้าที่ควบคุมการสร้างและสะสมโยล์คฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตโดยรังไข่จะถูกลำเลียงเข้าไปในกระแสเลือดและกระตุ้นเซลล์ตับให้ผลิตและหลั่งไวเทลโลเจนินออกมา ซึ่งต่อมาจะถูกลำเลียงมาสะสมภายในไข่ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2546) (ภาพที่ 2-1)

ปัจจุบันเพื่อให้ทราบถึงกลไกการสร้างไวเทลโลเจนินว่าถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนจึงได้มีการศึกษาในปลาชนิดต่าง ๆ มากมาย เช่น ในปลาแอตแลนติกแซลมอนตัวเมียที่ทำการศึกษาโดย King and Pankhurst (2003) พบว่า ปริมาณเอสโตรเจน เทสทอสเทอโรน และไวเทลโลเจนินมีผลต่อการพัฒนาของรังไข่ โดยในช่วงที่ทำการศึกษาปริมาณเอสโตรเจนและเทสทอสเทอโรนจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 3-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2.5-35 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และการศึกษาในปลากะรังดอกดำ (*Epinehelus malabaricus*) พบว่าเอสโตรเจนและเทสทอสเทอโรนมีบทบาทต่อการพัฒนาของรังไข่ในช่วงที่มีการสร้างและสะสมโยล์ค (Vitellogenesis) และการพัฒนาของรังไข่ขั้นสุดท้าย (Oocyte Maturation) ตรงข้ามกับโปรเจสเตอโรนที่มีปริมาณต่ำในช่วงฤดูวางไข่แต่เพิ่มสูงขึ้นนอกฤดูวางไข่ (เรณู ยาชิโร, วิชัย วัฒนกุล, เจนจิตต์ คงกำเนิด และนิเวศน์ เรืองพานิช, 2536)



ภาพที่ 2-1 กระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน (Nicolas, 1999)

การที่ไวเทลโลเจนินถูกดึงออกจากกระแสเลือดมาสะสมที่เซลล์ไข่ได้ก็เนื่องมาจากเซลล์ไข่มีตัวรับสัญญาณของไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin Receptor) ที่ผิวไข่ ซึ่งทำหน้าที่จับกับไวเทลโลเจนินอย่างจำเพาะ ดังที่ปรากฏในปลากะรังดอกดำ (*E. malabaricus*) ซึ่งศึกษาโดย วิชัย วัฒนกุล (2541) พบว่าการจับกันแบบจำเพาะ (Specific Binding) ของตัวรับสัญญาณไวเทลโลเจนิน อยู่ในลักษณะ Single Class ของ Binding Site การจับของตัวรับไวเทลโลเจนินจะจำเพาะกับเนื้อเยื่อของรังไข่เท่านั้น ค่าความสามารถในการจับ (K_D) ของตัวรับสัญญาณไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นจากระยะก่อนการสร้างไวเทลโลเจนินไปยังระยะสร้างไวเทลโลเจนินโดยมีค่าเป็น 25.8, 16.0 และ 4.57 pM ตามลำดับ

เมื่อไวเทลโลเจนินสะสมภายในไข่จะส่งผลให้ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ ตามพัฒนาการของไข่ปลา เช่น ในการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการสร้างไวเทลโลเจนินในแอฟริกันแคทฟิชสองชนิด คือ *Chrysichthys nigrodigitatus* และ *Heterobrachchus longifilis* ซึ่งจากการศึกษาพบว่า *C. nigrodigitatus* จะผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงฤดูฝนที่มีอุณหภูมิและความเค็มของน้ำต่ำ ไข่ระยะก่อนที่จะมีการสะสมไวเทลโลเจนินจะมีขนาด ประมาณ 320 ไมโครเมตร แต่หลังจากกระบวนการสะสมไวเทลโลเจนินเสร็จสิ้นไข่จะมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 2.4-2.8 มิลลิเมตร ซึ่งใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 3 เดือน ส่วน *H. longifilis* หลังจากที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน HCG จะใช้เวลาในกระบวนการสร้างและสะสมไวเทลโลเจนินน้อยลง คือใช้เวลาเพียง 15 วัน ไข่ระยะก่อนที่จะมีการสะสมไวเทลโลเจนินจะ

มีขนาด 380 ไมโครเมตร แต่หลังจากที่กระบวนการสร้างไวเทลโลเจนินเสร็จสิ้นไข่จะมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 1.2-1.6 มิลลิเมตร (Rodriguez, Oteme, & Hem, 1995)

นอกจากการสร้างไวเทลโลเจนินจะเป็นไปตามธรรมชาติภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจนภายในร่างกายแล้ว ไวเทลโลเจนินยังสามารถที่จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างขึ้นได้ โดยการผสมฮอร์โมนเอสโตรเจนเข้าไปในอาหาร การฉีดฮอร์โมนเอสโตรเจนเข้าไปในร่างกาย การละลายเอสโตรเจนเข้าไปในน้ำที่ใช้เลี้ยง และการฝังฮอร์โมนเอสโตรเจนเข้าไปในเนื้อเยื่อ ดังที่ปรากฏในการศึกษาต่าง ๆ ต่อไปนี้

Mañanós, Zanúy, Le, Carrillo, and Núñez (1994) ได้ศึกษาผลของเอสโตรเจนที่มีต่อระดับไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวยุโรป (*Dicentrarachus labrax* L.) เพศผู้และเพศเมียซึ่งมีระดับไวเทลโลเจนินต่ำมาก (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยนำปลาทั้ง 2 เพศมาฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออลในปริมาณ 0.5, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทุก 2 วัน เป็นเวลา 12 วัน พบว่า ปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนทั้งสามระดับมีปริมาณไวเทลโลเจนินไม่แตกต่างกัน แสดงว่าปริมาณเอสโตรเจนไม่มีผลต่อการเพิ่มการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาที่มีความพร้อมในการสืบพันธุ์ เพราะระดับไวเทลโลเจนินที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นจะเพิ่มในระดับหนึ่งแล้วถ้ามีการฉีดกระตุ้นครั้งต่อ ๆ ไปจะไม่มีการเพิ่มขึ้นอีกแต่จะค่อย ๆ มีระดับลดลงเมื่อหยุดฉีดกระตุ้นด้วยเอสโตรเจน

Versonnen, Goemans, Belpaire, and Janssen (2004) ได้ศึกษาผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีต่อระดับการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในปลาไหลยุโรป (*Anguilla anguilla*) ในประเทศเบลเยียม โดยนำเอททินิลเอสตราไดออล (Ethinylestradiol) จำนวน 10 ไมโครกรัม มาละลายในน้ำ แล้วใช้น้ำมาเลี้ยงปลาเป็นเวลา 9 วัน พบว่า ปลาที่ได้รับเอทินิลเอสตราไดออลจะมีปริมาณไวเทลโลเจนินสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม โดยในปลากลุ่มที่ได้รับเอทินิลเอสตราไดออลจะมีปริมาณไวเทลโลเจนินประมาณ 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในปลากลุ่มควบคุมจะมีปริมาณไวเทลโลเจนินประมาณ 55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Liao, Jin, Yang, Hui, and Xu (2006) ได้ศึกษาระดับของฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล ที่มีผลต่อการสังเคราะห์ปริมาณไวเทลโลเจนินในปลา Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*) และปลาม้าลาย (*Danio rerio*) โดยนำ17 เบต้า-เอสตราไดออลมาละลายน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.6, 0.8, 1, 2, 4 และ 8 นาโนกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นนำมาใช้เลี้ยงปลาเป็นเวลา 10 วัน จากการศึกษาพบว่า ปริมาณ17 เบต้า-เอสตราไดออลต่ำสุดที่สามารถกระตุ้นให้ปลา Rare Minnow และปลาม้าลายสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินได้คือ 0.8 และ 4 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Lopez et al. (2006) ได้ศึกษาผลของฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลที่มีต่อระดับการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในปลา Goodied Fish (*Girardinichthys viviparus*) โดยนำ 17 เบต้า-เอสตราไดออลจำนวน 1 ไมโครกรัมต่อลิตร มาละลายน้ำและใช้เลี้ยงปลาเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า กระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับ ซึ่งในปลาตัวผู้จะมีความแตกต่างกันมากกว่าปลาตัวเมีย ปริมาณไวเทลโลเจนินของปลาตัวผู้จะมีความแตกต่างกันจากกลุ่มควบคุม ตั้งแต่ได้รับการกระตุ้นในวันแรกและปริมาณไวเทลโลเจนินที่วัดได้จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันแรกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล

ส่วนประกอบของไวเทลโลเจนิน

ไวเทลโลเจนินเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีนที่มีส่วนประกอบของไลโปโปรตีน ฟอสโฟโปรตีน และไกลโคโปรตีนประกอบกันเป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 250 ถึง 600 kDa แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ (Norberg & Haux, 1985)

ไวเทลโลเจนินหลังจากที่ถูกปล่อยออกจากตับเข้าสู่กระแสเลือด และไหลเวียนไปจนถึงรังไข่เข้าสู่เซลล์ไข่แล้วรังไข่จะมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงไวเทลโลเจนินออกเป็น 2 ส่วน คือ ไลโปไวเทลลิน (Lipovitellin) และฟอสไวทิน (Phosvitin) ซึ่งจะถูกเก็บสะสมไว้เป็นอาหารของตัวอ่อนในเซลล์ไข่

ไลโปไวเทลลินและฟอสไวทิน เกิดจากการรวมกันของโปรตีนกับฟอสฟอรัส ลิปิด และคาร์โบไฮเดรตแต่มีความแตกต่างกันเล็กน้อย คือ ไลโปไวเทลลิน มีฟอสฟอรัสน้อยแต่มีลิปิด และคาร์โบไฮเดรตมาก ส่วนฟอสไวทินจะมีฟอสฟอรัสมาก แต่มีลิปิดและคาร์โบไฮเดรตน้อย (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2531) ไวเทลโลเจนินประกอบด้วย ไลโปไวเทลลิน 85% และฟอสไวทิน 4% (Redshaw & Follett, 1971; Penning, Merry, Munday, & Akhtar, 1977)

เทคนิคที่ใช้ในการแยกไวเทลโลเจนิน

ไวเทลโลเจนินสามารถแยกออกมาได้จากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังหลายกลุ่ม เช่น ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และนก โดยทั่วไปแล้วไวเทลโลเจนินของสัตว์ต่างชนิดกันก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนั้นเทคนิคที่จะนำใช้ในการแยกไวเทลโลเจนินจึงขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ที่จะนำมาศึกษา เช่น ในการแยกไวเทลโลเจนินของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำจะใช้เครื่องหมุนเวี่ยงความเร็วสูง (Ultracentrifugation) การตกตะกอนของโปรตีนด้วยไดเมธิลฟอร์มาลดีไฮด์ และโครโมโตรกราฟี (Chromatography) (Wallace, 1970; Wiley et al., 1979 อ้างถึงใน พอจิต วิโนทพรรษ์, 2539) ส่วนในปลา จะมีการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาโดยวิธีโครมาโตกราฟี มีผู้ศึกษาและพัฒนาวิธีการแยกพลาสมา และวิธีการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์ในปลาชนิดต่าง ๆ ดังนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Kishida and Specker (1993) ได้ทำการศึกษาไวเทลโลเจนินในพลาสมาและในไข่ของปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) เพศเมีย โดยการเก็บพลาสมามาทำการแยกไวเทลโลเจนินด้วยวิธีโครมาโตกราฟี บนคอลัมน์ DEAE-Agarose จากนั้นนำพีคของไวเทลโลเจนินมาผ่าน Biogel A-1.5 M ที่อยู่ในสมดุลของโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์ ที่มีอะโปรตินิน (Aprotinin) 0.1% นำไวเทลโลเจนินที่ได้มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส ได้น้ำหนักโมเลกุลเป็น 200 และ 130 kDa นำสารสกัดจากไข่ของปลาหมอเทศ มาผ่านคอลัมน์เหมือนกับพลาสมา และนำมาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส เช่นเดียวกัน พบว่า แยกโปรตีนออกมาได้หลายแถบ โดยมีโปรตีนแถบหลักมีน้ำหนักโมเลกุล 106 kDa และรองลงมาคือ 26.6, 24.2 และ 23.7 kDa ตามลำดับ

Siversand and Specker (1993) ได้ศึกษาการแยกไวเทลโลเจนินและศึกษาสมบัติทาง Immunochemical และเสถียรภาพของไวเทลโลเจนินในปลากระดูกแข็ง 4 ชนิด คือ ปลาคอด (*Gadus morhua*), ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*Onchorhynchus mykiss*), ปลาเทอร์บอท (*Scophthalmus maximus*) และปลาวูล์ฟฟิช (*Anarhichas lapus*) โดยการนำพลาสมามาตกตะกอนโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Wiley et al. (1979) แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ High Performance Ion-Exchange Chromatography ตามวิธีของ Siversand and Haux (1989) และใช้คอลัมน์ Mono-Q จากนั้นนำไวเทลโลเจนินที่ได้มาหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส ได้น้ำหนักโมเลกุลปลาคอด 167 kDa, ปลาเรนโบว์เทร้าท์ 175 kDa, ปลาเทอร์บอท 175 kDa และปลาวูล์ฟฟิช 176 kDa และพบว่าไวเทลโลเจนินจากปลากระดูกแข็งจะสลายได้ง่ายเพราะไวเทลโลเจนินแยกออกเป็นส่วนย่อย ๆ ซึ่งจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการศึกษาสมบัติของโปรตีนได้ ดังนั้นจึงต้องเพิ่มความระมัดระวังระหว่างทำการแยกพลาสมา

Korsgaard and Pedersen (1998) ได้ศึกษาการแยกไวเทลโลเจนินในปลา *Zoarces viviparus* ที่มีการกระตุ้นโดยใช้ 17- เบต้า เอสตราไดออล และ 4- โนนิลฟีนอล โดยการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของปลาจะใช้วิธี Gel-Filtration และ Ion-Exchange Chromatography ใช้คอลัมน์ Sephacryl S-300 HR และ DEAE- Sepharose ในโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส แบบไม่แปลงสภาพจะแยกโปรตีนได้ 1 แถบ ที่มีโมเลกุลสูง ส่วนในเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส จะพบแถบโปรตีนเล็ก ๆ 5 แถบ ซึ่งอาจจะเกิดจากการย่อยของโปรตีน

Brion et al. (2000) ได้ศึกษาและพัฒนาเทคนิคการแยกไวเทลโลเจนิน และการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธ์ในปลากระดูกแข็ง 3 ชนิด คือ ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*O. mykiss*), ปลา Gudgeon (*Gobio gobio*), ปลา Chub (*Leuciscus cephalus*) โดยเทคนิคที่นำมาใช้ในการแยกไวเทลโลเจนินและการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์นั้นจะประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน คือ

Ion-Exchange Chromatography และ Gel Filtration Chromatography ใช้คอลัมน์ Hitrap Q Sepharose และ Superdex G-200 หลังจากนั้นก็ทำการศึกษาลักษณะของไวเทลโลเจนินโดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ โปรตีนที่แยกได้จากปลาเรนโบว์เทร้าท์, ปลา Gudgeon และปลา Chub จะปรากฏเพียงแถบเดียว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 442, 435 และ 424 kDa ตามลำดับ

Hashimoto et al. (2000) ทำการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ของปลา Flounder (*Pleuronectes yokohamae*) เพศผู้ ที่มีอยู่ในธรรมชาติในอ่าวโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น โดยการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ของปลา Flounder จะใช้การแยก 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกจะใช้ Ion-Exchange Chromatography และขั้นที่สองจะใช้ Gel Filtration Chromatography ใช้คอลัมน์ Hydroxylapatite และ Sephadex G-200 จากนั้นนำไวเทลโลเจนินที่ได้มาหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส โดยใช้ Serum Albumin เป็นโปรตีนมาตรฐานในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลซึ่งพบว่าไวเทลโลเจนินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 kDa ส่วนไลโปไวเทลลินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 380 kDa

Tolar, Mohollin, Watson, and Angus (2001) ได้ศึกษาการแยกไวเทลโลเจนินและการทำไวเทลโลเจนินของปลากินยุง (*Gambusia affinis*) ให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Gel-Filtration Chromatography และใช้คอลัมน์ Sephacryl S-300 และคอลัมน์ Sephadex G-200 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าไวเทลโลเจนินของปลากินยุงจะอยู่ใน Fraction 26-28 หลังจากที่นำไปเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า ไวเทลโลเจนินมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 429 kDa ในตัวอย่างเลือดของปลาเพศผู้ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล เมื่อทำการแยกด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่า จะปรากฏแถบของไวเทลโลเจนิน จากลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในปลาตัวผู้สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินได้เมื่อมีการกระตุ้นด้วยเอสตราไดออล

Hiramatsu, Hiramatsu, Hirano, and Hara (2002) ได้ทำการแยกและศึกษาของไวเทลโลเจนินในปลา Sturgeon ลูกผสม (Bester; *Huso huso* x *Acipencer ruthenus*) โดยการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของปลาจะใช้เทคนิค Anion-Exchange Chromatography และ Gel Filtration Chromatography ส่วนคอลัมน์ที่ใช้ในการแยก คือ คอลัมน์ Hydroxylapatite และ Sephadex G-200 ในการวิเคราะห์ลักษณะของไวเทลโลเจนินจะใช้วิธีอิเลคโตรโฟรีซีสและการวิเคราะห์ทางชีวเคมี โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลเจนิน คือ Lactate Dehydrogenase (36 kDa), Catalase (60 kDa), Albumin (67 kDa), Ferritin (18.5 kDa) และ Thyroglobulin (330 kDa) ในเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส ไวเทลโลเจนินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 580 kDa นอกจากนี้ก็ยังพบแถบโปรตีนขนาดเล็กอีกสองแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 180 และ 120 kDa

Hennies et al. (2003) ได้ศึกษาการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์และศึกษาถึงลักษณะของไวเทลโลเจนินในปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) และปลาเพิร์ช (*Perca fluviatilis*) ซึ่งในการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์จะใช้วิธีโครมาโทกราฟฟี โดยมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกจะใช้วิธี Ion Exchange Chromatography และขั้นตอนที่สองจะใช้วิธี Size-Exclusion Chromatography ส่วนคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกคือ คอลัมน์ Source 15 Q และ Superdex G-200 ไวเทลโลเจนินของปลาคาร์พจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 150 kDa ส่วนไวเทลโลเจนินของปลาเพิร์ชจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160 kDa เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของไวเทลโลเจนินในปลาคาร์พและปลาเพิร์ช พบว่า ไวเทลโลเจนินของปลาเพิร์ชจะไม่เสถียร เพราะพบแถบโปรตีนเล็ก ๆ จำนวนมากเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western Blot ซึ่งแถบโปรตีนเหล่านี้อาจจะเกิดจากการย่อยของผลผลิตของไวเทลโลเจนินรวมถึงการนำไปแช่แข็งและการนำออกมาละลาย

Zhong, Xu, Liang, Lioa, and Wang (2004) ได้ศึกษาการแยกไวเทลโลเจนินในปลาคาร์พจีน (*Gobiocypris rarus*) ที่มีการกระตุ้นด้วย Diethylstilestol โดยการละลายในน้ำ การแยกไวเทลโลเจนินจะใช้วิธี Anion-Exchange Chromatography และในการศึกษาจะใช้คอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B ในการแยกไวเทลโลเจนิน อิเลคโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพจะปรากฏแถบของไวเทลโลเจนินที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 540 kDa

ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2538) ได้ทำการศึกษาไวเทลโลเจนินของปลากะรังดอกดำ (*E. malabaricus*) ในการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของปลาที่ได้จากการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล, ^{32}P-Ortho-Phosphate และ ^{3}H-Leucine จะใช้คอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-150 ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์คิดเป็น 19.2% ของพลาสมาเริ่มต้น ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ ปรากฏโปรตีน 3 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 470, 335 และ 290 kDa ตามลำดับ

พอจิต วิโนทพรรษ์ (2539) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และลักษณะของไวเทลโลเจนินในปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) โดยแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงด้วยคอลัมน์ Hydroxylapatite และคอลัมน์ Sephacryl S-300 ได้ผลผลิตไวเทลโลเจนิน ในขั้นสุดท้าย 96.92% และ 63.07% ตามลำดับ เมื่อนำมาแยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าได้โปรตีน 5 แถบเหมือนกัน มีน้ำหนักโมเลกุล 140, 108, 95, 90 และ 77 kDa

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-1 การศึกษาการแยกไวเทลโลเจนินในปลาชนิดต่าง ๆ

ผู้ศึกษา	ปลาที่ใช้ในการศึกษา	เทคนิคที่ใช้ในการศึกษา	ผลการศึกษา
Kishida and Specker (1993)	ปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*)	- DEAE-Agarose Column - Biogel A 1.5 Column - SDS-PAGE	- โปรตีนที่แยกได้จากพลาสมามีน้ำหนักโมเลกุล 200 และ 130 kDa - โปรตีนที่แยกได้จากไข่มีน้ำหนักโมเลกุล 106, 26.6, 24.2 และ 130 kDa ตามลำดับ
Siversand and Specker (1993)	- ปลาคอด (*G. morhua*) - ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*O. mykiss*) - ปลาเทอร์บอท (*S. maximus*) - ปลาวูล์ฟฟิช (*A. lapus*)	- การตกตะกอนด้วย EDTA - Mono Q Column - SDS-PAGE	-ไวเทลโลเจนินปลาคอดมีน้ำหนักโมเลกุล 167 kDa -ไวเทลโลเจนินปลาเรนโบว์เทร้าท์และปลาเทอร์บอทมีน้ำหนักโมเลกุล 175 kDa - ไวเทลโลเจนินปลาวูล์ฟฟิชมีน้ำหนักโมเลกุล 167 kDa
Korsagaard and Pedersen (1998)	- *Z. viviparus*	- Sephacryl S-300 Column - DEAE-Sephacel Column - SDS-PAGE	- พบโปรตีน 5 แถบ
Brion et al. (2000)	- ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*O. mykiss*) - ปลา Gudgeon (*G. gobio*) - ปลา Chub (*L. cephalus*)	- Hitrap Q Sepharose Column - Superdex 200 HR Column - SDS-PAGE	- ไวเทลโลเจนินปลาเรนโบว์เทร้าท์, ปลา Gudgeon และปลา Chub มีน้ำหนักโมเลกุล 442, 435 และ 424 kDa ตามลำดับ
Hashimoto et al. (2000)	- ปลา Flounder (*P. yokohamae*)	- Hydroxylapatite Column - Superose 6 Column - SDS-PAGE	- ไวเทลโลเจนินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 480 kDa - ไลโปไวเทลลินมีน้ำหนักโมเลกุล 380 kDa

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

ผู้ศึกษา	ปลาที่ใช้ในการศึกษา	เทคนิคที่ใช้ในการศึกษา	ผลการศึกษา
Tolar et al. (2001)	- ปลากินยุง (*G. affinis*)	- Sephacryl S-300 Column - Sephadex G-200 Column - Native-PAGE	- ไวเทลโลเจนินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 429 kDa
Hiramatsu et al. (2002)	- ปลา Sturgeon (Bester: *H. huso* x *A. ruthenus*)	- Hydroxylapatite Column - Sephadex G-200 Column - SDS-PAGE	- ไวเทลโลเจนินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 580 kDa
Hennies et al. (2003)	- ปลา คาร์พ (*C. carpio*) - ปลาเพิร์ช (*P. fluviatilis*)	- Source 15 Q Column - Sephadex G-200 Column - SDS-PAGE	- ไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากปลาคาร์พมีน้ำหนักโมเลกุล 150 kDa - ไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากปลาเพิร์ชมีน้ำหนักโมเลกุล 580 kDa
Zhong et al. (2004)	- ปลาคาร์พจีน (*G. rarus*)	- DEAE- Sepharose CL-6B Column - SDS-PAGE	- ไวเทลโลเจนินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 540 kDa
ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2537)	- ปลากะรังดอกดำ (*E. malabaricus*)	- DEAE- Sephacel Column - Sephadex G-150 Column - Native -PAGE	- พบโปรตีน 3 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 470, 335 และ 290 kDa
พอจิต วิโนทพรรษ์ (2539)	- ปลากะพงแดง (*L.argentimaculatus*)	- Hydroxylapatite Column - Sephacryl S-300 Column - SDS-PAGE - Native-PAGE	- เมื่อแยกโดยใช้ SDS-PAGE พบโปรตีน 5 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 140, 108, 95, 90 และ 77 kDa - เมื่อแยกโปรตีนโดยใช้ Native-PAGE พบโปรตีน 4 แถบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การตรวจสอบไวเทลโลเจนิน

ปัจจุบันได้มีการตรวจสอบถึงลักษณะและคุณสมบัติของไวเทลโลเจนินในสัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์ปีก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์น้ำ ซึ่งไวเทลโลเจนินที่พบในสัตว์แต่ละชนิดก็มีลักษณะที่แตกต่างกันไป ทำให้ต้องมีการพัฒนาเทคนิคให้เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบไวเทลโลเจนินของสัตว์ชนิดนั้น ๆ ในสัตว์น้ำเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนิน คือ เทคนิคในการย้อมสี การหาปริมาณฟอสฟอรัสในรูปอัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัส และการใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกัน

การย้อมสี

เนื่องจากไวเทลโลเจนินเป็นสารประกอบประเภทที่เกิดจากการการรวมตัวกันของไลโปโปรตีน ฟอสโฟโปรตีน และไกลโคโปรตีน ดังนั้น เพื่อยืนยันถึงการมีคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวเทลโลเจนินโดยใช้เทคนิคการย้อมสีมาเป็นเครื่องมือตรวจสอบ ซึ่งการสีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่คือ Coomassie Brilliant Blue R-250, Sudan Black B, Periodic Acid Shift' s Reagent และ Methyl Green

ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ (2538) ได้ทำการตรวจสอบไวเทลโลเจนินที่ได้จากปลากะรังดอกดำ (*E. malabaricus*) โดยใช้เทคนิคการย้อมสี ซึ่งจากการศึกษาพบว่า โปรตีนที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะรังดอกดำมีคุณสมบัติความเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีนเช่นเดียวกับไวเทลโลเจนิน คือ เมื่อแยกโปรตีนโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่า มีโปรตีน 3 แถบ ที่ติดสีน้ำเงินของ Coomassie Brilliant Blue R-250 ซึ่งแสดงคุณสมบัติความเป็นโปรตีน และโปรตีนทั้ง 3 แถบนี้ก็ย้อมติดสีชมพูของ Periodic Acid Shift' s Reagent ได้เช่นกัน การย้อมติดสีชมพูนี้ก็แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลเนินของปลากะรังดอกดำมีคาร์โบไฮเดรทเป็นองค์ประกอบ และเมื่อทำการย้อมด้วย Sudan Black B ซึ่งเป็นสีสำหรับย้อมไขมัน พบว่าไวเทลโลเจนินทั้ง 3 แถบย้อมติดสีของ Sudan Black B แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลเจนินของปลากะรังดอกดำมีไขมันเป็นองค์ประกอบ

พอจิต วิโนทพรรษ์ (2539) ได้ทำการตรวจสอบไวเทลโลเจนินที่ได้จากไข่และพลาสมาของปลากะพงแดง (*L. argentimaculatus*) โดยใช้เทคนิคการย้อมสี ซึ่งจากการศึกษาพบว่า โปรตีนที่แยกได้ทั้งจากพลาสมาและไข่มีคุณสมบัติความเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีนเช่นเดียวกับไวเทลโลเจนินคือ เมื่อแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) โดยวิธีโพลีอะครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ จะมีโปรตีน 4 แถบที่ติดสีน้ำเงินของ Coomassie Brilliant Blue R-250 เหมือนกับ BSA ซึ่งเป็นโปรตีน มีโปรตีน 3 แถบที่ติดสีดำของ Sudan Black B เหมือนกับอะโปไลโปโปรตีน ซึ่งเป็นไลโปโปรตีน มีโปรตีน 3 แถบ ที่ติดสีชมพูของ Periodic Acid Shift' s

Reagent เหมือนกับโคริออนิกโกนาโดโทรปิน (Chorionicgonadotropin) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน และมีโปรตีน 2 แถบที่ติดสีเขียวของ Methyl Green เหมือนกับเคซีนซึ่งเป็นฟอสโฟโปรตีน

การหาปริมาณฟอสฟอรัสในรูปอัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัส (ALP)

การปริมาณฟอสฟอรัสในรูปอัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัส ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับนำมาใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินของสัตว์น้ำ ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบหนึ่งของไวเทลโลเจนิน ปริมาณฟอสฟอรัสจะขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของตัวอ่อน (พอจิต วิโนทพรรษ์, 2539) โดยทั่วไปฟอสฟอรัสจะจับอยู่กับซีรัมโปรตีน จับอยู่กับสารอินทรีย์ และจับอยู่กับไขมัน เพราะฉะนั้นการใช้ฟอสฟอรัสเป็นดัชนีบอกถึงปริมาณไวเทลโลเจนิน อาจจะทำให้ไม่ได้ค่าปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดสุทธิ เพราะเลือดมีฟอสฟอรัสที่มาจากแหล่งอื่นด้วย จึงทำให้ได้ค่าที่วัดได้สูงกว่าความเป็นจริง

Verslycke et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินทางอ้อมในปลาเรนโบว์เทร้า (*O. mykiss*) ที่มีการกระตุ้นโดยใช้ 17 เบต้า-เอสตราไดออล ซึ่งจากการศึกษาพบว่าปลาเรนโบว์เทร้าหลังจากที่มีการกระตุ้นด้วย17 เบต้า-เอสตราไดออลจะมีผลทำให้พารามิเตอร์ทั้ง 4 คือ โปรตีนในพลาสมา อัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัส แคลเซียมในพลาสมา และไวเทลโลเจนินในพลาสมามีค่าเพิ่มขึ้นและเมื่อทำการวัดอัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัสและแคลเซียมในพลาสมาจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในทางตรงโดยใช้เทคนิค EIA

Versonnen et al. (2004) ได้ทำการศึกษาการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินทางอ้อมในปลาไหลยุโรป (*A. anguilla*) โดยพิจารณาจากปริมาณแคลเซียมในพลาสมา ปริมาณโปรตีนในพลาสมา และอัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัส ซึ่งจากการศึกษาพบว่าปริมาณแคลเซียมในพลาสมาและอัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัสจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมา โดยปริมาณแคลเซียมในพลาสมาที่วัดได้จะมีค่าประมาณ 636 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนอัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัสที่วัดได้จะมีค่าประมาณ 762 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เทคนิคทางภูมิคุ้มกัน

เทคนิคทางภูมิคุ้มกันเป็นการทดสอบหาแอนติบอดี หรือหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ ซึ่งเป็นของเหลวในซีรุ่ม (นภาธร บานชื่น, 2537) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะ (Specificity) ต่อกันสูงมาก

การทดสอบที่อาศัยหลักการระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ คือ ปฏิกิริยาการตกตะกอน ปฏิกิริยาการรวมกลุ่ม ปฏิกิริยา Neutralization ปฏิกิริยาการตรึงคอมพลีเมนท์ (Complement Fixation Test), Immunofluorescence, Radioimmunoassay, Enzyme Immunoassay, Avidin-Biotin System, ImmunoBlotting (อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2539)

ในปัจจุบันการทดสอบทางภูมิคุ้มกันถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินอย่างแพร่หลาย แต่การนำเทคนิคต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษานั้น ๆ ด้วย เทคนิคทางภูมิคุ้มกันที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาไวเทลโลเจนินสำหรับสัตว์น้ำ ได้แก่ ณ Immounodiffusion, WesternBlot, Dot Blot และ ELISA

Immounodiffusion เป็นการทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอนของแอนติเจนและแอนติบอดีในเนื้อวุ้นโดยอาศัยหลักการของการซึมผ่านของตัวทำปฏิกิริยาเทคนิค Immounodiffusion ถูกค้นพบในช่วงปี ค.ศ. 1946-1948 และถูกนำมาพัฒนาโดย Orjan Ouchteriony จากสวีเดน, Stephen Elek จากสหรัฐอเมริกา และ Jeques Oudin จากฝรั่งเศส เทคนิค Immounodiffusion เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีความจำเพาะสูง จึงทำให้เป็นที่นิยมในปัจจุบัน เทคนิค Immounodiffusion แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ Double Immounodiffusion และ Single Immounodiffusion (นภาธร บานชื่น, 2537) โดย Double Immounodiffusion ส่วนใหญ่จะถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติเจนต่อแอนติบอดี และตรวจสอบความเหมือนกันและต่างกันของแอนติเจน ส่วน Single Immounodiffusion จะถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนหรือสารต่าง ๆ เพื่อบอกถึงปริมาณของสารนั้น ๆ ด้วย (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

Mañanós, Zanúy, Le, Carrillo, and Núñez (1994) ได้ทำการตรวจสอบไวเทลโลเจนินจากไข่และพลาสมาของปลากะพงขาวยุโรป (*D. labrax* L.) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินของปลาซีแบสสามารถทำปฏิกิริยาเกิดการตกตะกอนได้กับโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากไข่และพลาสมา พลาสมาของปลาซีแบสตัวเมียที่สมบูรณ์เพศ และพลาสมาของปลาซีแบสตัวผู้ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับพลาสมาของปลาซีแบสตัวผู้ในกลุ่มควบคุม

พอจิต วิโนทพรรษ์ (2539) ได้ทำการตรวจสอบไวเทลโลเจนินจากไข่และพลาสมาของปลากะพงแดง (*L. argentimaculats*) โดยใช้เทคนิค Immnodiffusion ซึ่งจากการศึกษาพบว่า แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินสามารถทำปฏิกิริยาเกิดการตกตะกอนได้กับโปรตีนที่แยกได้จากไข่และพลาสมา พลาสมาจากปลากะพงแดงเพศเมียที่อยู่ในช่วงสมบูรณ์เพศ พลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล ส่วนพลาสมาของปลากะพงแดงตัวผู้ ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอน แสดงให้เห็นว่าปลากะพงแดงเพศผู้ไม่มีไวเทลโลเจนินหรือมีปริมาณน้อย

WesternBlot เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณโปรตีนที่มีปริมาณน้อยในเซลล์หรือในของเหลว เมื่อทำการแยกโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ อิเลคโตรโฟรีซีส ได้แถบโปรตีนต่าง ๆ แล้วหลังจากนั้นก็ทำการย้าย (Transfer) แถบโปรตีนไปยังแผ่นโพลีเมอร์ หยดแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่สนใจศึกษาลงบนแผ่นโพลีเมอร์ ล้างเพื่อกำจัด

แอนติบอดีที่ไม่ไปจับกับโปรตีนคอมเพล็กซ์ของแอนติบอดีชนิดที่ 2 ที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีชนิดแรก (อาภัสรา ชมิดท์, 2537)

Peter, Doyotte, Michelmore, Mcevoy, and Livingstone (2001) ได้ทำการตรวจสอบไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาของปลาไหล (*A. anguilla*) ในประเทศอังกฤษ โดยใช้เทคนิค WesternBlot พบว่า พลาสมาของปลาไหลเพศเมียมีความจำเพาะกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน คือ เมื่อทำการทดสอบจะพบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 211 kDa ซึ่งแตกต่างจากการแยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ อิเลคโตรโฟรีซีสที่จะปรากฏแถบโปรตีนทั้งหมดที่แยกได้ Sensitivity ของการตรวจสอบโดย WesternBlot สำหรับปลาไหล คือ ประมาณ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Liao, Jin, Yang, Hui, and Xu (2006) ได้ทำการตรวจสอบไวเทลโลเนินที่ได้จากพลาสมาของปลา Rare Minnow (*G. rarus*) และปลาม้าลาย (*Danio rerio*) โดยใช้เทคนิค WesternBlot พบว่า พลาสมาของปลา Rare Minnow และปลาม้าลายเพศเมียมีความจำเพาะกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินที่ถูกสร้างขึ้นในกระต่าย ตรงข้ามกับในปลาตัวผู้ที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ โดยในปลา Rare Minnow และปลาม้าลายเพศเมียเมื่อทำการทดสอบจะพบแถบโปรตีนหลักเพียง 2 แถบ

Dot Blot การตรวจสอบโดย Dot Blot นี้จะอาศัยไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose Membrane) เป็น Solid Phase สำหรับยึดเกาะจับแอนติเจนหรือแอนติบอดี แล้วตรวจสอบปฏิกิริยาโดยอาศัยหลักการของ Enzyme Immunoassay เป็นส่วนใหญ่ วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจสอบหาได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี การทดสอบได้ผลรวดเร็วภายใน 5-10 นาที มีความไวและความจำเพาะสูง ไม่ต้องมีเครื่องมือหรืออุปกรณ์พิเศษ สำหรับการหยดมี 2 แบบ คือ แบบหยดกลม (Dot) และแบบหยดแถบ (Slot) (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

Parks et al. (1999) ได้ทำการตรวจสอบไวเทลโลเจนินที่ได้มาจากพลาสมาของปลา Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายเอสโตรเจนโดยใช้เทคนิค Dot Blot ซึ่งจากการศึกษาพบว่า พลาสมาของปลาจะมีความจำเพาะกับแอนติบอดีต่อไวเทลเจนิน แต่การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค dot Blot จะเกิดขึ้นได้เมื่อปลาได้รับการกระตุ้นโดยเอสโตรเจนเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน

Peter, Doyotte, Mitchelmore, Mcevoy, and Livingstone (2001) ได้ทำการตรวจสอบไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาของปลาไหล (*A. anguilla*) ในประเทศอังกฤษโดยใช้เทคนิค Dot Blot ซึ่งจากการศึกษาพบว่า Sensitivity ของการตรวจสอบมีค่าประมาณ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณไวเทลโลเจนินของปลาไหลที่สามารถตรวจสอบได้จะอยู่ในช่วง 25-250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ELISA เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยแอนติเจนหรือแอนติบอดีสามารถนำมาติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยไม่ให้คุณสมบัติของทั้งคู่เสียไป ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบโดยการใส่ซับสเตรทของเอนไซม์นั้นลงไป เมื่อมีการย่อยซับสเตรทจะทำให้มีการเปลี่ยนสีสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ซึ่งสามารถใช้ในการหาปริมาณสารตัวอย่างได้ (อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2539) ในปี 1980 Engvall ได้ทดลองใช้เทคนิค ELISA โดยการนำแอนติบอดีหรือแอนติเจนมาติดฉลากด้วยเอนไซม์แทนการใช้สารกัมมันตรังสี และพบว่าเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะสูงในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินเท่าเทียมกับเทคนิค Radioimmunoassay คือสามารถใช้วัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาได้ 1-60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่มีข้อดีมากมาย Parks et al. (1999) ได้อธิบายถึงข้อดีของเทคนิค ELISA ไว้ว่า ELISA เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่ายไม่อันตราย, มีความไวสูง, ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยในการทดสอบ, ใช้ในการตรวจวัดสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ และสามารถตรวจวัดสารตัวอย่างคราวละมาก ๆ ได้ ดังนั้นจึงมีผู้นำมาพัฒนาใช้สำหรับการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลากระดูกแข็งได้สำเร็จมากมาย

Carballo, Aguayo, Torre, and Munoz (2005) ได้วัดปริมาณไวเทลโลเจนินของปลาคาร์พ (*C. carpio* L.) จากลำธาร 4 แห่งในประเทศสเปน จากการศึกษาพบว่า ปริมาณไวเทลโลเจนินของปลาเพศเมียที่วัดได้อยู่ในช่วง 608.89-1,755.71 ไมโครกรัมต่อต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละบริเวณที่ทำการศึกษา ส่วนปริมาณไวเทลโลเจนินของปลาเพศผู้ที่ตรวจสอบได้จะอยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 60-70% ของปลาเพศผู้ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณไวเทลโลเจนินได้ ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากปริมาณไวเทลโลเจนินมีค่าต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Shoe, Shi, Song, and Jiang (2005) ได้ทำการศึกษาและพัฒนาเทคนิค ELISA มาใช้สำหรับการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาหมูจีน (*Misgurnus angaillicaudatus*) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ปริมาณไวเทลโลเจนินที่วัดได้จะอยู่ในช่วง 15.6-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการตรวจสอบจะอยู่ที่ 5.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณไวเทลโลเจนินของปลาตัวผู้ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยจะอยู่ในช่วง 2.9$\pm$0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณไวเทลโลเจนินของปลาตัวเมียที่วัดได้จะมีค่าตั้งแต่ 518.4-1,922.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีและแอนติเจนสามารถทำได้โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ มากมาย แต่เทคนิคที่กล่าวมาแล้วนั้นก็มีข้อดีข้อเสียต่างกัน รวมทั้งความไวของการทดสอบ (Sensitivity of Test) ก็แตกต่างกันด้วย ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการตรวจสอบแบบใด ๆ ก็ต้องคำนึงถึงความเหมาะสม ทั้งในแง่ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ และความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการด้วย (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

ตารางที่ 2-2 ความไวของการตรวจสอบวิธีทางภูมิคุ้มกัน (Stiles et al., 1998 อ้างอิงใน กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

Immunoassay	Sensitivity (per dl)
Serum protein Electrophoresis	150 mg
Immunoelectrophoresis	5-10 mg
Radial Immounodiffusion	< 1-2 mg
Counterimmunoelectrophoresis	< 1 mg
ElectroImmounodiffusion	< 0.5 mg
Double Diffusion in Agar	< 0.1 mg
Nephelometry	0.1 mg
Complement Fixation	1 µg
Agglutination	1 µg
Enzyme Immunoassay	< 1 µg
Quantitative Immunofluorescence	< 1 pg
Radioimmunoassay	< 1 pg
Viral Neutralization	< 1 pg
Chemiluminescence	< 1 pg

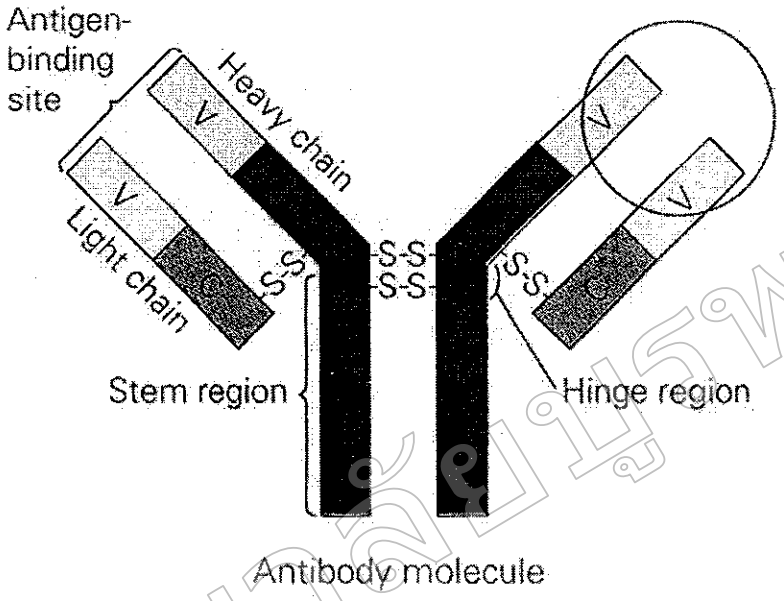
แอนติบอดีและการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน

แอนติบอดีเป็นสารน้ำที่อยู่ในสารคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น เลือดส่วนที่เป็นน้ำเหลืองหรือที่เรียกว่า ซีรัม หรือ พลาสมา และน้ำในไขสันหลัง (Cerebrospinal Fluid: CSF) เป็นต้น แอนติบอดีเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นจากการกระตุ้นของสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน แอนติบอดีมีทั้งหมด 5 Class คือ IgG, IgM, IgA, IgE และ IgD แอนติบอดี Class ต่าง ๆ เป็นโปรตีนชนิด Globulin จึงเรียกแอนติบอดีว่า Immuno Globulin (Ig) (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

โครงสร้างของแอนติบอดี

แอนติบอดีประกอบด้วยโปรตีนสายสั้น (Light Chain) เหมือนกัน 2 สาย และสายยาว (Heavy Chain) เหมือนกัน 2 สาย ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide Bond) กรดอะมิโนทางปลาย N ประมาณ 110 หน่วยของสายสั้นและสายยาวเป็นส่วนที่มีความแปรปรวน (Variable Domain V_L และ V_H) ส่วนที่เหลือของโปรตีนสายสั้นประกอบด้วยส่วนคงที่ 1 ส่วน (Constant Domain C_L) แต่ส่วนที่เหลือของโปรตีนสายยาวประกอบด้วยส่วนคงที่ 3-4 ส่วน (C_L) (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

Adjuvant

เป็นสารที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายพร้อมกับแอนติเจนแล้วจะช่วยเสริมให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดีขึ้น โดยอาจจะไปยืดเวลาในการอยู่ในร่างกายของแอนติเจนให้นานขึ้น (ทัศนีย์ สุโกศล, 2537) สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนให้มากขึ้น (Burn, 2002) เพิ่มขนาดของแอนติเจนให้ใหญ่ หรือกระตุ้นให้มาโครฟาจ (Macrophage) หรือลิมโฟไซท์ (Lymphocyte) มายังบริเวณที่มีแอนติเจนมากขึ้น ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนมากขึ้น (ทัศนีย์ สุโกศล, 2537) เช่น Freund' s Adjuvant ซึ่งเป็น Adjuvant ที่นิยมใช้ในการศึกษาและได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน (Burn, 2002)

Freund' s Adjuvant แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. Incomplete Freund' s Adjuvant เป็น Water-in Oil Emulsion

2. Complete Freund' s Adjuvant เป็น Water-in Oil Emulsion ที่มี *Mycobacterium tuberculosis* ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนรวมตัวอยู่ในชั้นของน้ำมันด้วย Adjuvant ชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีได้ดีกว่า Water-in Oil Emulsion ธรรมดา แต่มีข้อเสียตรงที่เมื่อใช้กับสัตว์ทดลองอาจทำให้เกิด Granuloma และบ่อยครั้งที่เกิดเป็นฝีตรงบริเวณที่ฉีดเข้าไป (ทัศนีย์ สุขโกศล, 2537)

เกณฑ์ในการคัดเลือกสัตว์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดี

ในการคัดเลือกสัตว์ที่นำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดีจำเป็นจะต้องพิจารณาถึง

ความเหมาะสมในด้านต่าง ๆ เช่น ปริมาณของแอนติบอดีที่ต้องการ ขนาดและอายุของสัตว์ที่เหมาะสม สายพันธุ์ของสัตว์ คือ ควรเลือกสัตว์ที่มีวิวัฒนาการห่างจากสัตว์ที่ผลิตแอนติเจนมากที่สุด จึงจะตอบสนองการผลิตแอนติบอดีดีที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) และชนิดของสัตว์ โดยพิจารณาจากการนำแอนติบอดีไปใช้ประโยชน์ คือ ถ้าต้องการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี สัตว์ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดี คือ กระต่าย แกะ แพะ หนู และลา ส่วนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี สัตว์ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดี คือ หนูและกระต่าย เป็นต้น (Campbell, 1996) นอกจากลักษณะที่กล่าวมาแล้ว จริยธรรมและกฎหมายก็เป็นอีกประเด็นหนึ่ง ที่ต้องนำมาพิจารณาร่วมด้วย

การผลิตแอนติบอดี (Antibody Production)

การผลิตแอนติบอดีในสิ่งมีชีวิตจะเริ่มจากร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นที่เรียกว่า แอนติเจน จากนั้นกระบวนการทางภูมิคุ้มกันของร่างกายจะทำการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น กล่าวคือ แอนติเจนจะกระตุ้น B-Cell ที่จำเพาะต่อ Epitope บนแอนติเจนพร้อมกันหลายๆเซลล์หรือหลาย ๆ โคลน แอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากหลาย ๆ โคลน ซึ่งมีความจำเพาะต่อหลาย ๆ Epitope จะเรียกว่า **โพลีโคลนอล แอนติบอดี** อย่างไรก็ตามการสร้างแอนติบอดีเพื่อใช้ในงานวิจัยหรืออื่น ๆ สามารถสร้างและคัดเลือกแอนติบอดีที่สร้างจากโคลนเดียวหรือจำเพาะต่อ Epitope หนึ่ง ๆ ของแอนติเจน ซึ่งจะทำให้แอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะสูง เรียกแอนติบอดีนี้ว่า **โมโนโคลนอลแอนติบอดี**

1. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ขั้นตอนการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี เริ่มต้นจากการเตรียมแอนติเจนจากนั้นฉีดแอนติเจนให้กับสัตว์ทดลองที่ต้องการ และรอเวลาการสร้างแอนติบอดี จากนั้นฉีดแอนติเจนกระตุ้นซ้ำเพื่อให้สร้างแอนติบอดีปริมาณมาก ทำการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง และปั่นแยกซีรัม เก็บไว้ใช้งาน (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

Cheek, King, Burse, Borton, and Sullivan (2004) ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลา Bluegill (*Lepomis macrochirus*) โดยเริ่มจากการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีโดยการฉีดไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์และ Freund' s Adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 ทั้งหมด 6 ครั้ง หลังจากนั้นก็ทำการเก็บเลือดมาทดสอบโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันคือ Indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ และ Sensitivity ของการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินจะอยู่ในช่วง 29-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Zhong et al. (2004) ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีของปลา Rare Minnow (*G. rarus*) ซึ่งการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีจะเริ่มจากฉีดไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ และ Freund' s Adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 ทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังจากฉีด

ครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ก็ทำการเก็บเลือดและนำมาปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบเป็นเวลา 10 นาที โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จะถูกนำมาทดสอบโดยเทคนิคทางภูมิคุ้มกัน คือ WesternBlot และ Non-Competitive ELISA จากการทดสอบพบว่า โพลีโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้ มีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลา Rare Minnow เพราะพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 540 kDa ส่วนการทดสอบโดยใช้เทคนิค Non-Competitive ELISA พบว่า Sensitivity ของเทคนิคนี้จะอยู่ที่ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนคลนอลแอนติบอดีจะทำได้โดยการใช้เซลล์จากม้ามหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการ ($HGRPT^{+}$, Ig^{+}) มาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือมิโลมาเซลล์ (Myeloma Cells: $HGPRT^{-}$, Ig^{-}) ได้เซลล์ที่เรียกว่า B-Cell Hybridoma ซึ่งสามารถผลิตและหลั่งแอนติบอดี และมีคุณสมบัติเป็นเซลล์อมตะจากเซลล์มะเร็ง

An et al. (2005) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลา Crucian Carp (*Carassius carassius*) โดยเริ่มจากการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว โดยการฉีดไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่ได้จากปลา Crucian Carp กับ Freund' s Adjuvantในอัตราส่วน 1: 1 ทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้นก็ทำการผ่าเอาม้ามออกมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และเลือก Sub Class ที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันมาตรวจสอบคือ WesternBlot และ Sandwich-ELISA ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่า Sub Class IgG มี Affinity สูงที่สุดคือ ประมาณ $7.0x10^{8}$ ลิตรต่อโมล์ จึงถูกนำมาใช้พัฒนาการตรวจสอบไวเทลโลเจนินโดยใช้เทคนิค Sandwich-ELISA อัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมคือ 1: 1,000 และ Sensitivity ของการตรวจวัดคือ 98 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Li et al. (2005) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลา *Carassius auratus* โดยเริ่มจากการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว โดยการฉีดไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่ได้จากปลา *Carassius auratus* กับ Freund' s Adjuvantในอัตราส่วน 1: 1 ทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ก็ทำการผ่าเอาม้ามออกมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และทำการเลือกโคลนที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกัน มาตรวจสอบ คือ WesternBlot และ ELISA จากการตรวจสอบพบว่า มี 2 โคลน คือ CVmA7 และ CVmA2 มีประสิทธิภาพดีที่สุด

ในปัจจุบันถึงแม้การผลิตแอนติบอดีในรูปโมโนโคลนอลแอนติบอดีทำได้ไม่ยากนักในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไปก็ตาม การผลิตแอนติบอดีในรูปแอนติซีรัมหรือโพลีโคลนอลแอนติบอดีก็ยังมีการผลิตในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต้องมีกระบวนการเพิ่มเติมต่อจากการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หลายขั้นตอน และนอกจากต้องมีจะต้องมีอุปกรณ์มากมายเกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติมแล้ว ต้องพัฒนาวิธีการเลือกไฮบริโดมา (Hybridoma) ที่สร้างโมโนโคลนอลที่ต้องการ ซึ่งต้องทดสอบหลายครั้งและหลายรูปแบบรวมทั้งต้องใช้กระบวนการโคลนซ้ำ (Recloning) และการแช่เย็งซึ่งต้องใช้เวลา อุปกรณ์และสารเคมีมากมายเพิ่มจากการผลิตแอนติซีรัมตามปกติ ดังนั้นการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจึงยังคงเป็นอีกทางเลือกที่ควรนำมาพิจารณาสำหรับการผลิตแอนบอดีในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 2-3 การเปรียบเทียบลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โพลีโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
1. ต้นทุนในการผลิตต่ำ	1. ต้นทุนในการผลิตสูง
2. กระบวนการผลิตไม่ซับซ้อนและใช้เวลาในการผลิตน้อยคือประมาณ 6 สัปดาห์	2. กระบวนการผลิตค่อนข้างซับซ้อน และใช้เวลานานคืออย่างน้อย 3 เดือน
3. เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับแอนติเจนได้ง่าย เนื่องจากประกอบด้วยประชากรจำนวนมากของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Epitope ต่าง ๆ	3. เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนได้ยากกับแอนติเจน เนื่องจากมี Epitope แต่ละชนิดเพียงตำแหน่งเดียวที่จับกับแอนติเจนได้
4. สามารถใช้กับเทคนิคทางภูมิคุ้มกันได้เกือบทุกรูปแบบ	4. นำมาใช้กับเทคนิคทางภูมิคุ้มกันได้บางชนิด เช่น *Vibrio harveyi* และ *Aeromonas hydrophila* ส่วนใหญ่จะใช้ตรวจสอบแบคทีเรียได้ด้วยเทคนิค Dot Blot และ WesternBlot แต่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบแบคทีเรียในเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University