บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

ไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนหลักในโยล์คซึ่งตัวอ่อนจะใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต ในขณะที่ไข่มีการพัฒนาการสะสมไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นตามพัฒนาการของไข่ ฉะนั้นการศึกษาถึงปริมาณไวเทลโลเจนินจึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความพร้อมของแม่พันธุ์ปลาก่อนถึงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ได้

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการศึกษาถึงการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ที่น่าจะได้รับการสนับสนุนให้มีการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากปลากะรังจุดฟ้าเป็นปลาทะเลที่มีลักษณะภายนอกของตัวผู้และตัวเมียไม่แตกต่างกันในการแยกเพศจึงต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ การใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน เพื่อให้ทราบถึงความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ผลิตได้ จึงมีการทดสอบโดยใช้เทคนิค Immunodiffusion, Dot Blot และ Western Blot ไวเทลโลเจนินที่นำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้ได้มาจากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่มีการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 จากผลการศึกษาพบว่า

การฉีดกระตุ้นปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้ฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล

การฉีดกระตุ้นปลากะรังจุดฟ้าด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3 วัน มีผลทำให้การสร้างโปรตีนในพลาสมาเพิ่มมากขึ้นจาก 50.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 266.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลไปกระตุ้นให้ตับสร้างไวเทลโลเจนินเพิ่มขึ้นแล้วปล่อยไวเทลโลเจนินสู่กระแสเลือดจึงทำให้ตรวจพบปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าปกติ ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาในปลาไหล (*A. anguilla*) พบว่า ปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออลจะสูงกว่าปลาใน

กลุ่มควบคุมถึง 750,000 เท่า (Peter et al., 2001) การศึกษาในปลา Cunner (*T. adspersus*) พบว่า ปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาที่มีการกระตุ้นด้วยการฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล จะมีค่าประมาณ 21.4±0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในปลากลุ่มควบคุมปริมาณไวเทลโลเจนินที่ตรวจสอบได้จะมีค่าประมาณ 6.2±0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Mill et al., 2003) การศึกษาในปลา Arctic Char (*S. alpinus*) พบว่า ปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาที่มีการกระตุ้นด้วยการฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล จะมีค่าประมาณ 0.005-60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในปลากลุ่มควบคุมปริมาณไวเทลโลเจนินที่ตรวจสอบได้จะมีค่าประมาณ 0.005-1.521 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Berg et al., 2004) และการศึกษาในปลาคอด (*G. morhua*) พบว่า ปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาที่มีการกระตุ้นด้วยการฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ 1-20,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Scott, 2006)

ในการศึกษาถึงผลของฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลต่อกระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินโดยใช้เทคนิคเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบว่า โปรตีนที่พบในพลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล และโปรตีนที่พบในปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลมีลักษณะต่างกันอย่างชัดเจน โดยในปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีแถบโปรตีนมากว่าปลาที่ไม่ได้รับการกระตุ้น 7 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 159, 143, 102, 94, 75, 68 และ 55 kDa ตามลำดับ (ภาพที่ 4-1 แถวที่ 2 เปรียบเทียบกับแถวที่ 3, 4, 5 และ 6) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน เทคนิคเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส ได้พัฒนาใช้ในการตรวจสอบผลของฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลในปลาหลายชนิด เช่น ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*O. mykiss*) (Siversand et al., 1993), ปลา *Z. viviparus* (Korsgaard et al., 1998) และปลาหมูจีน (*M. angaillicaudatus*) (Shoa et al., 2005) แต่ปริมาณโปรตีนในพลาสมาที่ถูกสร้างขึ้น ก็อาจจะขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับด้วย (ตารางที่ 4-1) ดังที่ปรากฏในการศึกษาในปลา Mosquito Fish (*G. affinis*) ที่ศึกษาโดย Tolar และคณะในปี 2001

นอกจากกระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินจะเกิดขึ้นจากการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลแล้ว ในปัจจุบันยังพบว่าสารที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเอสโตรเจนที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติก็มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในปลาชนิดต่าง ๆ ด้วย (Tolar et al., 2001)

การเตรียมไวเทลโลเจนินและการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์

การทำไวเทลโลเจนินจากพลาสมาให้บริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอน

ด้วยแคทไอออน (Cation), การเซนติฟิวจ์ที่ความเร็วสูง (Utracentrifugation) และการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี เป็นต้น ในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่การแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาจะนิยมใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนโดยการผ่านสารละลายโปรตีนผสมเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุตัวกลางหรือแมทริกซ์ (Matrix) ที่เป็นของแข็งมีรูพรุน อาศัยคุณสมบัติของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันที่ขนาดประจุและความสามารถที่จะจับกับหมู่เคมีที่เฉพาะบนตัวกลางนี้ ทำให้โปรตีนชนิดต่าง ๆ แยกออกจากกันและสามารถเก็บโปรตีนที่แยกออกมาได้จากปลายคอลัมน์ การเลือกใช้คอลัมน์ในการแยกจะแตกต่างกันออกไปซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์การแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยในการแยกจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ การใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ซึ่งเป็นวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption Chromatography) ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับโปรตีนเบส (Roe, 1989) ร่วมกับการใช้ Gel Filtration Chromatography

ในการแยกโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ เมื่อใช้โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันก็จะสามารถชะโปรตีนที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบออกมาตามความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำจะชะโปรตีนที่มีสัมพรรคภาพกับคอลัมน์น้อยออกมาก่อน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงขึ้นก็จะชะโปรตีนออกมาได้อีก

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อนำพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าก่อนฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลมาผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์จะได้โปรตีนออกมา 1 พีค ส่วนผลการแยกโปรตีนจากพลาสมาของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออลตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึง 4 จะแยกโปรตีนออกมาได้ 3 พีค แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออลสามารถกระตุ้นให้ปลามีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นได้ โปรตีนพีคที่ 1 จะมีปริมาณสูงกว่าพีคที่ 2 และพีคที่ 3 ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในปลา Fathead Minnow (*P. promelas*) (Park et al., 1999), ปลาหมูจีน (*M. anguillicau*) (Shoa et al., 2005) และปลา Bluegill (*L. macrochinus*) (Cheek et al., 2004)

เมื่อนำโปรตีนพีคที่ 3 มาทำให้เข้มข้น และนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 ซึ่งสามารถแยกกรองสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10-1,500 kDa โดยชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ พบว่าได้โปรตีนพีคใหญ่ออกมา 1 พีค ปริมาณไวเทลโลเจนินที่สามารถแยกได้ตั้งแต่เริ่มฉีดกระตุ้น 1 ครั้งจนถึง 4 ครั้งจะมีค่าเท่ากับ 4.03, 6.53, 14.19 และ 2.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) การที่ปริมาณไวเทลโลเจนินลดลงหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลจะไม่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในปลาที่มีความพร้อมในการสืบพันธุ์เพราะปริมาณไวเทลโลเจนินที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นจะเพิ่มในระดับ

หนึ่งและถ้ามีการฉีดกระตุ้นครั้งต่อ ๆ ไปจะไม่มีการเพิ่มขึ้นอีกแต่จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อหยุดฉีดกระตุ้น คล้ายคลึงกับการศึกษาในปลากะพงขาวยุโรป (*D. labrax* L.) (Mañanós et al., 1994)

รูปแบบของโปรตีนและการหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้เทคนิคเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส

การใช้เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส แยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมา พบว่า ไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งจะถูก B-Capthoethanol ย่อยโปรตีนออกเป็นหน่วยย่อย ปรากฏเป็นแถบโปรตีนหลายแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันออกไป ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อนำพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล โปรตีนพีคที่ 1, 2 และ 3 ที่แยกโดยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และการนำโปรตีนพีคที่ 3 (ไวเทลโลเจนิน) ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เซฟาคริลเอส -300 มาแยกโดยเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส จะได้รูปแบบของแถบโปรตีนที่ต่างกัน คือ ปลาที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออล (ภาพที่ 4-4 แถวที่ 3) จะมีโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้นกว่าปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้น (ภาพที่ 4-4 แถวที่ 2) และเมื่อทำการแยกโปรตีนโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์พบว่าพีคที่ 1 มีแถบโปรตีนหลายแถบ พีคที่ 2 มีแถบโปรตีนน้อยกว่าพีคที่ 1 ส่วนพีคที่ 3 จะมีแถบโปรตีนมากกว่าพีคที่ 2 แต่น้อยกว่าพีคที่ 1 และเมื่อนำโปรตีนพีคที่ 3 มาผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 จะพบโปรตีนแถบหลักเพียง 2 แถบแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่แยกได้จะมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเมื่อนำมาผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส -300 (ภาพที่ 4-4 แถวที่ 7) โปรตีนที่แยกได้ 2 แถบมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.33 และ 0.42 ตามลำดับ และเมื่อนำแถบโปรตีนนี้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่สัมพัทธ์กับน้ำหนักโมเลกุลพบว่าแถบโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 102 kDa และ 94 kDa ตามลำดับ ซึ่งโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้มีค่าใกล้เคียงกับไวเทลโลเจนินที่พบในปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ เช่น ปลา *Z. viviparous* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลเจนินเป็น 137, 98, 75 และ 71 kDa ตามลำดับ (Korsaard & Pedersen, 1998), ปลา Rare Minnow ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 170 และ 147 kDa ตามลำดับ (Liao et al., 2006) และปลากะพงแดงที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 140, 108, 95, 90 และ 77 kDa ตามลำดับ (พอจิต วิโนทพรรษ์, 2539)

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้า

หลังจากที่มีการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาวโดยใช้แอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนพีคที่ 3 ผสมกับ Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 หนูขาวสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ

แอนติเจนที่ฉีดเข้าไปโดยการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จะใช้เทคนิค Immunodiffusion, Dot Blot และ Western Blot

1. การศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้เทคนิค Immunodiffusion

ผลจากการศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้เทคนิค Immunodiffusion พบว่า โพลีโคลนอนแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล (หลุมที่ 2) เกิดเป็นแนวตะกอนสีน้ำเงินเข้ม 1 เส้น และมีความจำเพาะกับไวเทลโลเจนินที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 (หลุมที่ 3) เกิดเป็นแนวตะกอนสีน้ำเงินเข้ม 1 แนว แต่โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จะไม่จำเพาะกับพลาสมาของปลาตัวเมียที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล และพลาสมาของปลากะรังเพศผู้

การที่ไม่เกิดแนวตะกอนกับพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออลก็อาจจะเนื่องมาจาก Sensitivity ของเทคนิค Immunodiffusion ต่ำ และปลาที่นำมาใช้ในการศึกษายังไม่สมบูรณ์เพศปริมาณไวเทลโลเจนินที่พบในเลือดต่ำจึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ ส่วนปลากะรังเพศผู้นั้นไม่มีกระบวนการสร้างไข่เหมือนกับปลากะรังเพศเมีย เพราะฉะนั้นปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดจึงต่ำกว่าปลาเพศเมียทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิค Immunodiffusion ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาในปลากะพงขาวยุโรป (*D. labrax* L.) (Mañanós et al., 1994), ปลาะพงแดง (*L. argentimaculatus*) (พอจิต วิโนทพรรษ์, 2539) และ ปลา Saturgeon ลูกผสม (*H. huso* x *A. ruthenus*) (Hiramatsu , 2002) ที่พบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับพลาสมาของปลาเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออลและไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี

2. การศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ (Antibody Titer) โดยใช้เทคนิค Dot Blot

เพื่อให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมจะต้องมีการสุ่มระดับความเข้มข้นของแอนติบอดี ซึ่งการหาระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมนี้ เรียกว่าแอนติบอดีไตเตอร์

แอนติบอดีไตเตอร์ (Antibody Titer) เป็นการบอกระดับหรือปริมาณของแอนติบอดีอย่างคร่าว ๆ โดยบอกเป็นระดับความเจือจางเรียกว่า Dilution หรือ Titer เพื่อให้สามารถนำระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาใช้ในการศึกษานั้น ๆ ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ความเข้มข้นของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษามี 6 ระดับ คือ 1: 200 , 1: 500, 1: 1,000, 1: 5,000, 1: 10,000 และ 1: 20,000 จากการศึกษาพบว่า ทุกระดับ

ความเข้มข้นสามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นจุดสีน้ำตาลดำกับพลาสมาของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออล และโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เซฟาคริล เอส -300 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนและเมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มของสีในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นพบว่าทุกระดับความเข้มข้นคือ1: 200 , 1: 500, 1: 1,000, 1: 5,000 และ 1: 10,000 ไม่มีความแตกต่างกันมากนักฉะนั้นเพื่อความประหยัดเนื่องจากการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต้องใช้เวลานานจึงควรเลือกใช้ระดับความเข้มข้นที่ 1: 10,000 แต่สำหรับที่ระดับความเข้มข้นที่ 1: 20,000 สีที่เกิดขึ้นไม่เข้มมากอาจจะทำให้การวิเคราะห์ผลคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาวิจัย คล้ายคลึงกับการศึกษาในปลาหมูจีน (*M. anguillicau*) ที่พบว่า ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาคือ 1: 16,000 (Shoa et al., 2005)

3. การศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้ Western Blot

Western Blot เป็นเทคนิคการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยการย้ายแถบโปรตีนที่แยกได้ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส หลังจากนั้นก็ทำการบ่มกระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วยแอนติบอดีชนิดแรกที่จำเพาะกับโปรตีน และบ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้วก็ทำการ Develop สี ทำให้เห็นแถบโปรตีนที่จับกับแอนติบอดีสีน้ำตาลดำ

ในการศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้เทคนิค Western Blot ในครั้งนี้จะเริ่มจากการย้ายแถบโปรตีนที่แยกได้ทั้งหมดจากเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส ลงไปในกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน และทำการบ่มด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะและทำการ Develop สี

แอนติบอดีที่ผลิตที่ใช้ในการศึกษาจะได้มาจากการนำไวเทลโลเจนินที่บริสุทธิ์ไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว และเก็บซีรัมมาใช้ในการทำ Western Blot แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่แยกได้มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอสำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว ดังนั้นจึงนำโปรตีนพีคที่ 3 ซึ่งมีปริมาณมากกว่ามาใช้ในการกระตุ้นแทนโปรตีนพีคที่ 3 ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด แอนติซีรัมที่ผลิตได้จึงมีความจำเพาะต่ำไม่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันปัญหาการติดสีพื้น (Blackground Signal) และป้องกันผลบวกแปลกปลอม (False Positive) จึงต้องมีการดูดซับแอนติบอดีอื่นที่เจือปนออกให้มากที่สุด ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ก็จะมีการนำพลาสมาปลากะรังเพศผู้มาผสมกับแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูขาวก่อนนำไปใช้ในการศึกษาความจำเพาะโดยใช้เทคนิค Western Blot

จากการศึกษาพบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการฉีดกระตุ้นโดยการฉีดฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออล

คือ จะปรากฏแถบโปรตีนที่ย้อมติดสีน้ำตาลดำ และ เมื่อนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาทดสอบกับโปรตีนพีคที่ 3 ที่แยกได้โดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 จะพบแถบโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกันแสดงให้เห็นว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะกับโปรตีนพีคที่ 3 และไวเทลเลเจนินบริสุทธิ์คล้ายคลึงกับการศึกษาในปลา Rare Minnow (*G. rarus*) และปลาม้าลาย (*D. rerio*) ที่พบว่า ไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลาเพศเมียมีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่ผลิตได้ตรงข้ามกับปลาตัวผู้ที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ (Liao et al., 2006) โพลีโคลนอลแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ได้ โปรตีนทั้งหมด 5 แถบ คือ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 94, 75, 70, 68 และ 50 kDa ตามลำดับ แต่แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 kDa จะติดสีจางมากและเมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่แยกได้โดยใช้เทคนิค เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล เลคโตร โฟรีซีส กับ Western Blot พบว่าแถบโปรตีนที่พบจะต่างกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากไวเทลโลเจนินสลายตัวได้ง่าย จึงทำให้มีการเปลี่ยนรูปไป เพราะฉะนั้นแถบโปรตีนเล็ก ๆ ที่พบเมื่อศึกษาโดยเทคนิค Western Blot จึงน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ของไวเทลโลเจนิน ซึ่งในการศึกษาก่อนหน้านี้ก็มีรายงานว่าไวเทลโลเจนินสลายตัวได้ง่าย จึงต้องเพิ่มความระมัดระวังในการแยก (Siversand & Specker, 1993; Korsgaard & Pedersen, 1998; Hennies et al., 2003)

เมื่อทำการเปรียบเทียบการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้เทคนิคทางระบบภูมิคุ้มกันเป็นตัวตรวจสอบพบว่าให้ผลไปในทางเดียวกัน คือ เมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค Immunodiffusion และ Dot Blot โพลีโคลนอลแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลาเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลและไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นและพลาสมาของปลาเพศผู้ และเมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค Western Blot พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีจะมีความจำเพาะกับโปรตีนพีคที่ 3 และไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ คือ พบแถบโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกันดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาทางระบบภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดฟ้าได้

สรุปผลการวิจัย

1. กระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้าสามารถกระตุ้นให้เกิดขึ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลจำนวน 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม

2. ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์สามารถแยกได้จากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. เมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิคเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าไวเทลโลเจนินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 102 และ 94 kDa ตามลำดับ

4. ระดับความเข้มข้นของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการศึกษาโดยใช้เทคนิค Dot Blot ในครั้งนี้คือ 1: 10,000 ที่ปริมาณของแอนติเจน 1 ไมโครกรัม

5. ในการศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้าสามารถนำเทคนิค Western Blot และ Immunodiffusion มาประยุกต์ใช้ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการแยกโปรตีนโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีควรคำนึงการค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในการชะโปรตีนด้วยเนื่องจากโปรตีนเป็นสารที่มีประจุ

2. อุณหภูมิก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ไวเทลโลเจนินเกิดการสลายตัว เพราะฉะนั้นในขณะที่ทำการแยกไวเทลโลเจนินโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี บัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในการชะโปรตีนควรจะทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. เพื่อป้องกันปัญหาการถูกย่อยหรือเกิดการแตกหักของชิ้นส่วนไวเทลโลเจนินในขณะที่ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการควรจะทำการแบ่งโปรตีนออกเป็นหลอดเล็ก ๆ (Aliqout) นำมาใช้ในแต่ละครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University