บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาไวเทลโลเจนินซึ่งเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีนที่พบในพลาสมาของปลาเพศเมีย สามารถบอกความพร้อมของแม่พันธุ์ปลาที่จะนำไปผสมเทียมได้ จึงได้มีการศึกษาไวเทลโลเจนินในปลาชนิดต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น เช่นในปลาแรนโบว์เทร้าท์ (Hara และ Hirai, 1978; Norberg และ Haux, 1985) ปลาแซลมอน (So และคณะ, 1985) เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาไวเทลโลเจนินในปลาที่อาศัยอยู่ในเขตอบอุ่น ส่วนการศึกษาในปลาทะเลของไทยยังมีน้อยมาก งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาคุณสมบัติของไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง เพื่อเป็นพื้นฐานการนำไปศึกษาปลาทะเลชนิดอื่น ไวเทลโลเจนินที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 บีต้า-เอสตราไดออล แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Hara และคณะ (1980)ที่ศึกษาไวเทลโลเจนินในปลาไหลญี่ปุ่น จากผลการศึกษานี้พบว่า

1) การฉีดกระตุ้นปลากะพงแดงด้วยฮอร์โมน

การฉีดกระตุ้นปลากะพงแดงเพศเมียด้วยฮอร์โมน 17 บีต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน มีผลทำให้มีการสร้างโปรตีนในพลาสมาเพิ่มขึ้น 116.3% ของโปรตีนในพลาสมาก่อนที่ทำการฉีดฮอร์โมน ทั้งนี้เพราะฮอร์โมนไปกระตุ้นตับให้สร้างไวเทลโลเจนินเพิ่มขึ้นแล้วปล่อยไวเทลโลเจนินสู่กระแสเลือด จึงทำให้ตรวจพบปริมาณโปรตีนในพลาสมาสูงขึ้นจากปกติ ซึ่งเหมือนกับการศึกษาในปลาทอง (Bailey, 1957) และปลาซึกเดียว (Emmersen และ Petersen, 1971) และเมื่อนำพลาสมามาแยกโดยวิธีเอสดีเอสโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่า รูปแบบของโปรตีนที่พบในพลาสมาของปลาเพศเมียที่สมบูรณ์เพศจะต่างจากเพศผู้อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 5 แถวที่ 3 เทียบกับแถวที่ 4) ส่วนรูปแบบของโปรตีนในพลาสมาของปลาเพศเมียก่อนที่จะนำมาฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล (รูปที่ 5 แถวที่ 2 เทียบกับแถวที่ 1) จะปรากฏแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นจากเดิม แสดงว่าฮอร์โมน 17 บีต้า-เอสตราไดออลกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Norberg และ Haux (1985), Plack และคณะ (1971), Emmersen และ Petersen (1971) และ Mananos และคณะ

(1994) ที่กล่าวว่าไวเทลโลเจนินสามารถถูกกระตุ้นให้มีการสร้างได้ด้วยฮอร์โมน 17 บีต้า-เอสตราไดออล

2) <u>การแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ออกจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง</u>

ไวเทลโลเจนินสามารถแยกออกจากพลาสมาและไข่ได้หลายวิธี วิธีที่นิยมกันมากในการใช้แยกไวเทลโลเจนินจากปลากระดูกแข็ง คือวิธีโครมาโตกราฟี โดยการเลือกใช้คอลัมน์ในการแยกจะแตกต่างกันไป (Hara และคณะ, 1980; Campbell และ Idler, 1980; So และคณะ, 1985; ไพบูลย์, 1995) ในการศึกษานี้ได้ใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ซึ่งเป็นวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) มีคุณสมบัติในการดูดซับโปรตีนเบส (Roe, 1989) เมื่อใช้โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันชะโปรตีนที่จับไฮดรอกซิลอะพาไทต์ก็สามารถชะโปรตีนที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบออกมาตามความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ โดยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำจะชะโปรตีนที่มีแรงสัมพรรคภาพกับคอลัมน์น้อยออกมาก่อน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ก็สามารถแยกโปรตีนออกมาได้อีก จากผลการวิจัยพบว่า เมื่อนำพลาสมาของปลากะพงแดงก่อนฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออลผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิล-อะพาไทต์ ได้โปรตีนออกมา 3 พีค โดยพีคที่ 1 มีปริมาณโปรตีนสูงมาก ส่วนพีคที่ 2 และ 3 มีปริมาณโปรตีนน้อย (รูปที่ 1) เช่นเดียวกับผลที่ได้จากพลาสมาของปลากะพงแดงที่ได้หลังจากการฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล แต่โปรตีนในพีคที่ 3 มีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับพลาสมาก่อนฉีดด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล แสดงว่า ฮอร์โมนสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนซึ่งปรากฏในพีคที่ 3 ซึ่งผลการวิจัยนี้เหมือนกับผลการวิจัยที่รายงานโดย Hara และคณะ (1980) ซึ่งศึกษาในปลาไหลญี่ปุ่น เมื่อนำโปรตีนพีคที่ 3 มาทำให้เข้มข้น แล้วนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาครีล เอส-300 ซึ่งสามารถแยกกรองสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดตั้งแต่ 10-1500 kDa โดยชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ พบว่าได้โปรตีนพีคขนาดใหญ่ 1 พีค รวมโปรตีนพีคแล้วทำให้เข้มข้นเก็บไว้เพื่อเป็นสารมาตรฐานไวเทลโลเจนิน พบว่า ได้ผลผลิตไวเทลโลเจนินคิดเป็น 96.92% ของโปรตีนในพีคที่ 3

เมื่อนำโปรตีนพีคที่ 1, 2 และ 3 มาแยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส (รูปที่ 6) พบว่า โปรตีนพีคที่ 1 จะมีแถบโปรตีนมากที่สุด และในพีคที่ 2 และ 3 จะมีแถบโปรตีนลดลงตามลำดับ แต่ในการทดลองพบว่า ในรูปที่ 6 แถวที่ 5 มีการติดสีของแถบโปรตีนน้อยกว่าแถบโปรตีนในแถวอื่นที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากัน ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากในโปรตีนพีคที่ 2 นั้นมีความเข้มข้นของโปรตีนต่ำ ทำให้ต้องใช้ปริมาตรในการเติมในหลุมมาก จึงทำให้มีการฟุ้งกระจายของโปรตีนขณะเติม ทำให้มีปริมาณโปรตีนในหลุมน้อยลงกว่าปกติ ทำให้มีการติดสีของโปรตีนน้อยได้

ส่วนไข่ที่ได้จากปลากะพงแดงหลังจากฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล โดยนำไข่มาสกัดตามขั้นตอนที่ดัดแปลงจาก Campbell และ Idler (1976) แล้วนำไข่สกัดมาผ่านขั้นตอนการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีเหมือนกับพลาสมา พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาเหมือนกับที่พบในพลาสมา เมื่อมาทำให้เข้มข้น แล้วเก็บเป็นสารมาตรฐานไวเทลโลเจนินจากไข่ ได้ผลผลิตไวเทลโลเจนินคิดเป็น 63.07% ของโปรตีนในพีคที่ 3 ซึ่งน้อยกว่าผลผลิตไวเทลโลเจนินจากพลาสมา เนื่องจากตัวอย่างไข่ที่นำมาศึกษานั้น ได้มาจากการฉีดกระตุ้นปลาด้วย 17 บีต้า-เอสตรา-ไดออลซึ่งมีผลกระตุ้นให้ตับสร้างไวเทลโลเจนินแล้วส่งไปสู่กระแสเลือด จากนั้นจึงจะถูกนำไปใช้โดยไข่ ในการทดลองได้ฉีดกระตุ้นปลาด้วยฮอร์โมนทุกวัน ตับจึงผลิตไวเทลโลเจนินสู่กระแสเลือดตลอดเวลา จึงพบไวเทลโลเจนินในพลาสมาสูงกว่าในไข่ซึ่งต้องใช้เวลาในการนำไวเทลโล-เจนินจากเลือดไปใช้ หากเราปล่อยให้ไข่มีการสะสมไวเทลโลเจนินหลังจากหยุดฉีดกระตุ้นปลาด้วยฮอร์โมนแล้ว ปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดจะลดต่ำลง แต่จะพบไวเทลโลเจนินในไข่ในปริมาณสูงขึ้นได้

3) <u>รูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมาและไข่</u>

การใช้วิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แยกไวเทลโลเจนิน จากพลาสมาและไข่ พบว่าไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่มีลักษณะเหมือนกัน ไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งจะถูกเอสดีเอสย่อยโปรตีนออกเป็นหน่วยย่อย ปรากฏเป็นแถบโปรตีน 5 แถบ เมื่อนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของไวเทลโลเจนินจากไข่และพลาสมา มาหาน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้โปรตีนหน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 140, 108, 95, 90 และ 77 kDa ตามลำดับ พบว่าไวเทลโลเจนินที่พบในพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับไวเทลโลเจนินที่พบในปลากระดูกแข็งซึ่งมีค่าตั้งแต่ 200 ถึง 600 kDa เช่นในปลาไหลญี่ปุ่น, *A. japonica* มีน้ำหนักโมเลกุล 350 kDa ซึ่งถูกแยกเป็นหน่วยย่อย 4 แถบ (Hara และคณะ, 1980) , ในปลาคอด, *G. morhua* พบน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 400 kDa ที่ประกอบด้วยแถบโปรตีน 6 แถบเมื่อแยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส (Plack และคณะ, 1971) เป็นต้น ส่วนในปลากะรัง, *E. malabaricus* ใช้วิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งพบโปรตีน 3 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 470, 335 และ 290 kDa ตามลำดับ (ไพบูลย์, 1995)

4) <u>คุณสมบัติทางชีวเคมีของไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่</u>

การแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมาและไข่ โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลค โตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ พบว่า โปรตีนที่แยกได้จากพลาสมาและไข่มีโปรตีน, ลิปิด, คาร์โบไฮเดรต และฟอสฟอรัส เป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับไวเทลโลเจนิน (รูปที่ 10-13) ซึ่งเหมือนกับการศึกษาไวเทลโลเจนินในปลาเรนโบว์เทร้าท์ ที่พบโดย Hara และ Hirai (1978) และ ปลาดุก ที่พบโดย Nath และ Sundararaj (1981)

5) <u>ปริมาณฟอสฟอรัสในไวเทลโลเจนิน</u>

การหาปริมาณฟอสฟอรัสในไวเทลโลเจนินสำหรับการศึกษานี้ เพื่อเสริมจากการย้อมสีย้อมฟอสฟอรัส เพื่อแสดงว่าไวเทลโลเจนินมีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ การวิจัยนี้ได้หาฟอสฟอรัสออกมาในรูปของอัลคาไลน์-เลบายล์ ฟอสฟอรัส พบว่าฟอสฟอรัสในไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ มีค่า 0.13% และ 0.11% ของมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งน้อยกว่าที่พบในปลาไหลญี่ปุ่นที่ศึกษาโดย Hara และคณะ (1980) ได้ค่าฟอสฟอรัสเป็น 0.71% และ 0.63% ตามลำดับ และที่พบในปลาเรนโบว์เทร้าท์ และซีเทร้าท์ ที่ศึกษาโดย Norberg และ Haux (1985) ที่พบปริมาณฟอสฟอรัสในไวเทลโลเจนินจากพลาสมามีค่า 0.63% และ 0.58% ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองนี้ได้ค่าปริมาณฟอสฟอรัสต่ำกว่าที่พบในปลาชนิดอื่น ๆ อาจเป็นเพราะมีการใช้ฟอสโฟโปรตีนไปในการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ซึ่งปกติแล้วปริมาณฟอสฟอรัสในไข่จะลดลงตามพัฒนาการของไข่ และจะลดลงต่ำสุดในไข่ที่เจริญเต็มที่แล้ว (Craik, 1978) หรือเนื่องจากปริมาณโปรตีนต่อมิลลิกรัมของไวเทลโลเจนินเริ่มต้นมีค่าน้อยมาก และขั้นตอนการศึกษาอัลคาไลน์-เลบายล์ ฟอสฟอรัสค่อนข้างซับซ้อน จึงอาจมีการสลายไปของฟอสฟอรัสในไวเทลโลเจนินในขั้นตอนการย่อยด้วยความร้อนและการสกัดด้วยสารเคมี จึงทำให้ความสามารถในการตรวจพบปริมาณฟอสฟอรัสต่ำกว่าที่พบในปลาชนิดอื่น

6) <u>การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาและไข่ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น</u>

จากการนำแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินมาทดสอบโดยให้ทำปฏิกิริยากับไวเทลโลเจนินโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินสามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นตะกอนได้กับโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกจากพลาสมาและไข่, พลาสมาของปลากะพงแดงเพศเมียที่อยู่ในช่วงสมบูรณ์เพศ, พลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงเพศเมียที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ส่วนพลาสมาของปลากะพงแดงเพศผู้ ไม่เกิดตะกอน (รูปที่ 15) แสดงว่าพลาสมาปลา

กะพงแดงเพศผู้ไม่มีไวเทลโลเจนิน หรือมีปริมาณน้อย ไม่สามารถวัดได้โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ไวเทลโลเจนินที่มีอยู่ในพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนน่าจะเป็นสารชนิดเดียวกัน จึงสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวเดียวกันได้

7) <u>การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลโลเจนิน โดยวิธี ELISA</u>

จากการนำไวเทลโลเจนินที่เตรียมได้ในข้อ 2.4.2.2 มาทำให้เจือจางแบบอนุกรมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินโดยเทคนิค ELISA พบว่า เมื่อมีไวเทลโลเจนินมาก แอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับไวเทลโลเจนินมาก ทำให้อ่านค่าการดูดกลืนแสงได้สูง ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไวเทลโลเจนิน เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาพลอตกราฟเทียบกับความเข้มข้นของไวเทลโลเจนิน พบว่าสามารถใช้ความสัมพันธ์นี้สร้างเป็นกราฟมาตรฐานได้ สามารถใช้หาค่าไวเทลโลเจนินที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ วิธีนี้เหมาะที่จะนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณไวเทลโลเจนินโดยไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี

4.2 <u>สรุปผลการทดลอง</u>

1) ไวเทลโลเจนินสามารถถูกกระตุ้นให้สร้างได้โดยใช้ 17 บีต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม

2) ไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ มีคุณสมบัติเหมือนกัน

3) ไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาและไข่เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 140, 108, 95, 90 และ 77 kDa โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส

4) ไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาและไข่มีคุณสมบัติเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีน คือ โมเลกุลประกอบด้วยโปรตีน, ไลโปโปรตีน, ไกลโคโปรตีน และฟอสโฟโปรตีน

5) ไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาและไข่ มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ และสามารถหาปริมาณได้ในรูปของอัลคาไลน์-เลบายล์ ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ

6) สามารถให้แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินทำปฏิกิริยากับไวเทลโลเจนินโดยวิธีอิมมูโน-ดิฟฟิวชั่น และวิธี ELISA ได้

7) เทคนิคอิมมูโนดิฟฟิวชั่นและ ELISA สามารถนำมาประยุกต์ใช้วัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมา เพื่อใช้บ่งชี้ความสมบูรณ์เพศของปลากะพงแดงเพื่อการผสมเทียมหรือใช้ในการแยกเพศปลาได้

4.3 ข้อเสนอแนะ

1) ไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีน สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยความร้อนและเอนไซม์ ดังนั้น การเก็บตัวอย่างจึงต้องมีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เช่น PMSF จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซีรีนโปรติเอส และ Aprotinin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริบซิน ถ้าไม่มีสารเหล่านี้ในตัวอย่าง อาจมีผลให้ไวเทลโลเจนินถูกแบ่งออกเป็นหลาย ๆ ส่วน ในระหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง อาจมีผลให้การศึกษาลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินไม่เป็นไปตามความเป็นจริงได้

2) จากการศึกษาไวเทลโลเจนินนี้เป็นแนวทางสำหรับใช้คิดค้นชุดตรวจสอบเพศปลาได้ โดยใช้คุณสมบัติความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับ ไวเทลโลเจนินจากปลากะพงแดงมาพัฒนาเทคนิค ELISA มาวัดระดับไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลา เพื่อบอกระดับความสมบูรณ์เพศของปลาที่จะนำมาผสมเทียมต่อไป เป็นการอำนวยความสะดวกแก่ผู้เพาะพันธุ์ปลาทะเลต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย