บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการฉีดกระตุ้นปลากะพงแดงด้วยฮอร์โมน

หลังจากนำปลากะพงแดงเพศเมีย มาฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ปริมาณ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน พบว่าปริมาณโปรตีนในพลาสมาเพิ่มขึ้นจาก 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 173 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรังไข่มีน้ำหนัก 14.8 กรัม

3.2 ผลการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ออกจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง

เมื่อนำพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล มาแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟี ได้ผลการทดลองดังนี้

3.2.1 ผลการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมา

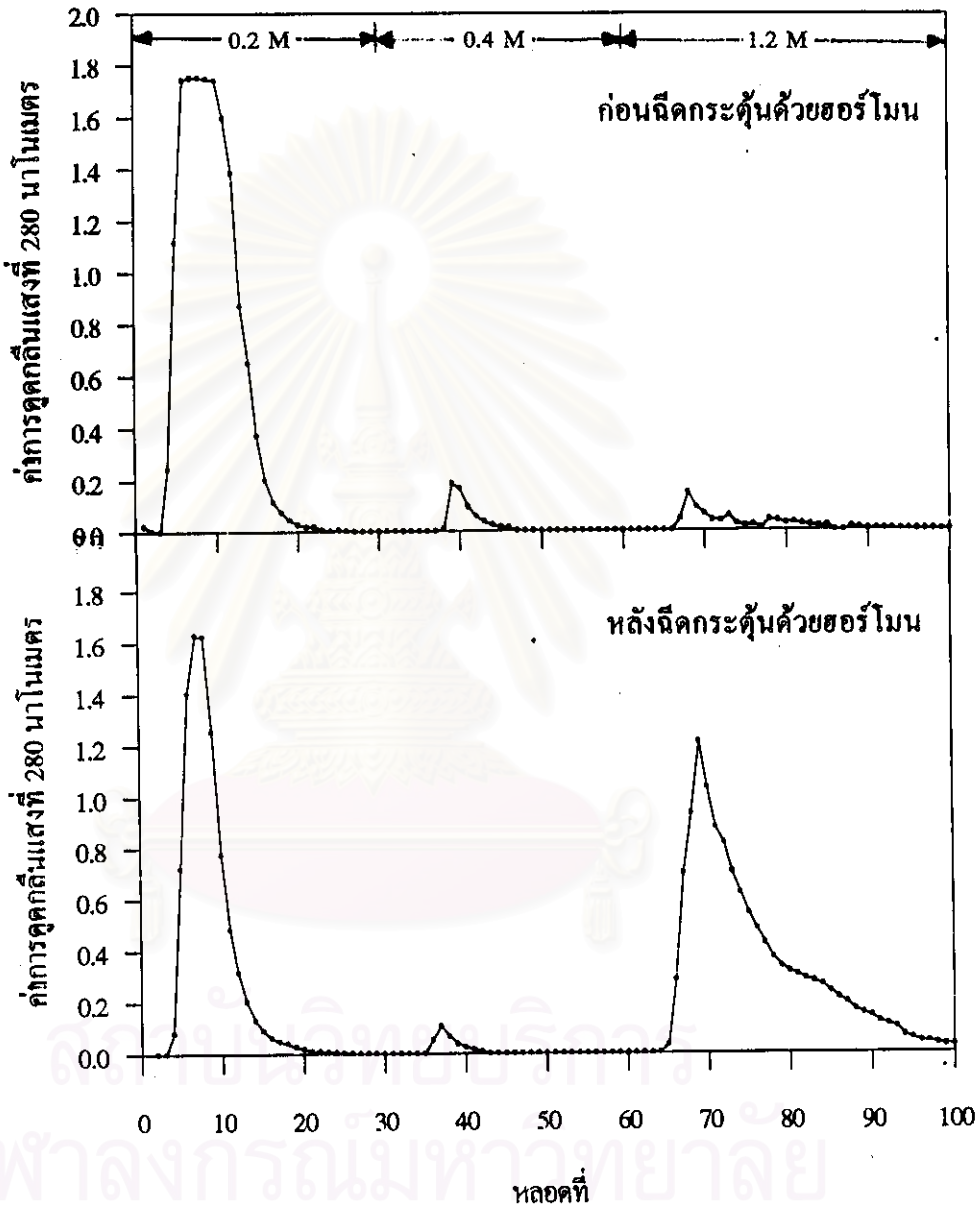
3.2.1.1 การแยกพลาสมาบนคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

จากการแยกพลาสมาของปลากะพงแดงตามวิธีในข้อ 2.4.2.1 พบว่ามีโปรตีนแยกออกมา 3 พีค โดยพีคที่ 1, 2 และ 3 ได้จากการชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, 0.4 และ 1.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ตามลำดับ มีโครมาโตแกรมที่ได้จากการแยกพลาสมาปลาก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเหมือนกัน (รูปที่ 1) และพบว่าโปรตีนพีคที่ 3 จากพลาสมาหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น แสดงว่าฮอร์โมนมีผลต่อการสร้างโปรตีน ได้เก็บรวบรวมโปรตีนพีคที่ 3 ที่ได้จากการแยกพลาสมาหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 บีต้า-เอสตราไดออล (หลอดที่ 67-77) มาทำให้เข้มข้น แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

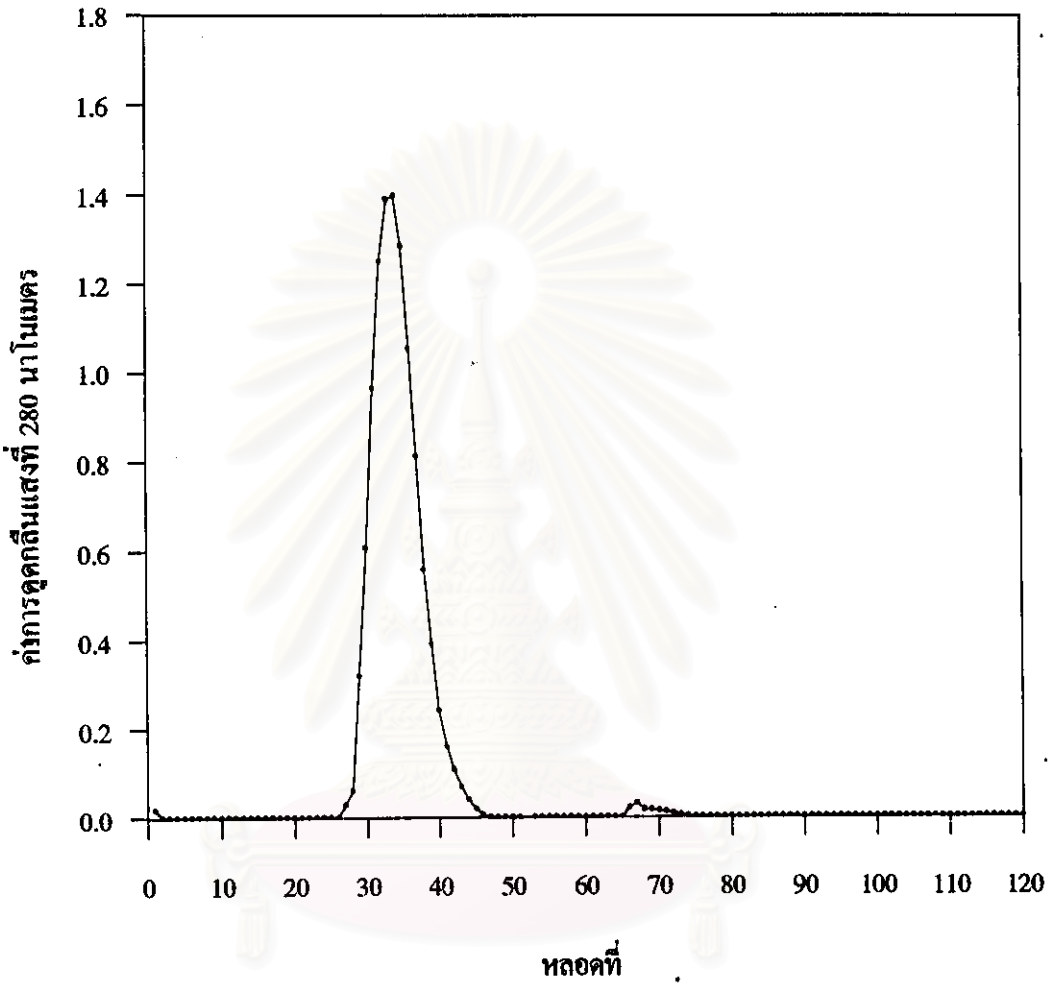
3.2.1.2 การแยกโปรตีนพีคที่ 3 ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

เมื่อนำโปรตีนพีคที่ 3 ที่ได้จากการรวบรวมพีคในวิธีการข้อ 2.4.2.1 มาผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ตามวิธีในข้อ 2.4.2.2 พบว่าได้โปรตีนออกมา 1 พีค (รูปที่ 2) ซึ่งเรียกว่าไวเทลโลเจนิน (Hara และคณะ, 1980) คิดเป็นผลผลิต 96.92% ของโปรตีนในพีคที่ 3 (ตารางที่ 1) นำโปรตีนพีคมารวมกัน นำไปทำให้เข้มข้น แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำไป

ทดสอบคุณสมบัติของไวเทลโลเจนิน เพื่อใช้เป็นไวเทลโลเจนินมาตรฐานและเป็นอิมมูโนเจนเพื่อฉีดกระตุ้นกระต่ายให้ผลิตแอนติบอดี



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมแสดงการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของปลากะพงแดงก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (ขนาด 1.6 x 10 เซนติเมตร) ชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 1.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแฟรกชั่นละ 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมแสดงการทำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมาให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 (ขนาด 1.5 x 90 เซนติเมตร) ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแฟรกชั่นละ 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมา โดยวิธีโครมาโตกราฟี

ขั้นตอน	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	% ผลผลิต
- ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์				
พลาสมาที่ฉีดกระตุ้นด้วย E_2	168.0	2.5	420.0	100.0
โปรตีนพีคที่ 1	15.73	15.0	235.0	55.95
โปรตีนพีคที่ 2	1.11	16.0	17.76	4.23
โปรตีนพีคที่ 3	3.29	18.0	59.17	14.09
โปรตีนพีคที่ 3 หลังจากทำให้เข้มข้น	9.79	6.0	58.77	
- ผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300				
โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน)	14.24	4.0	56.96	96.92

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 ผลการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่

3.2.2.1 การสกัดไข่

เมื่อนำไข่ของปลากะพงแดงมาทำการสกัดตามขั้นตอนในข้อ 2.4.1 แล้วหาปริมาณโปรตีน พบว่า ในไข่สกัดมีปริมาณโปรตีน 9.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

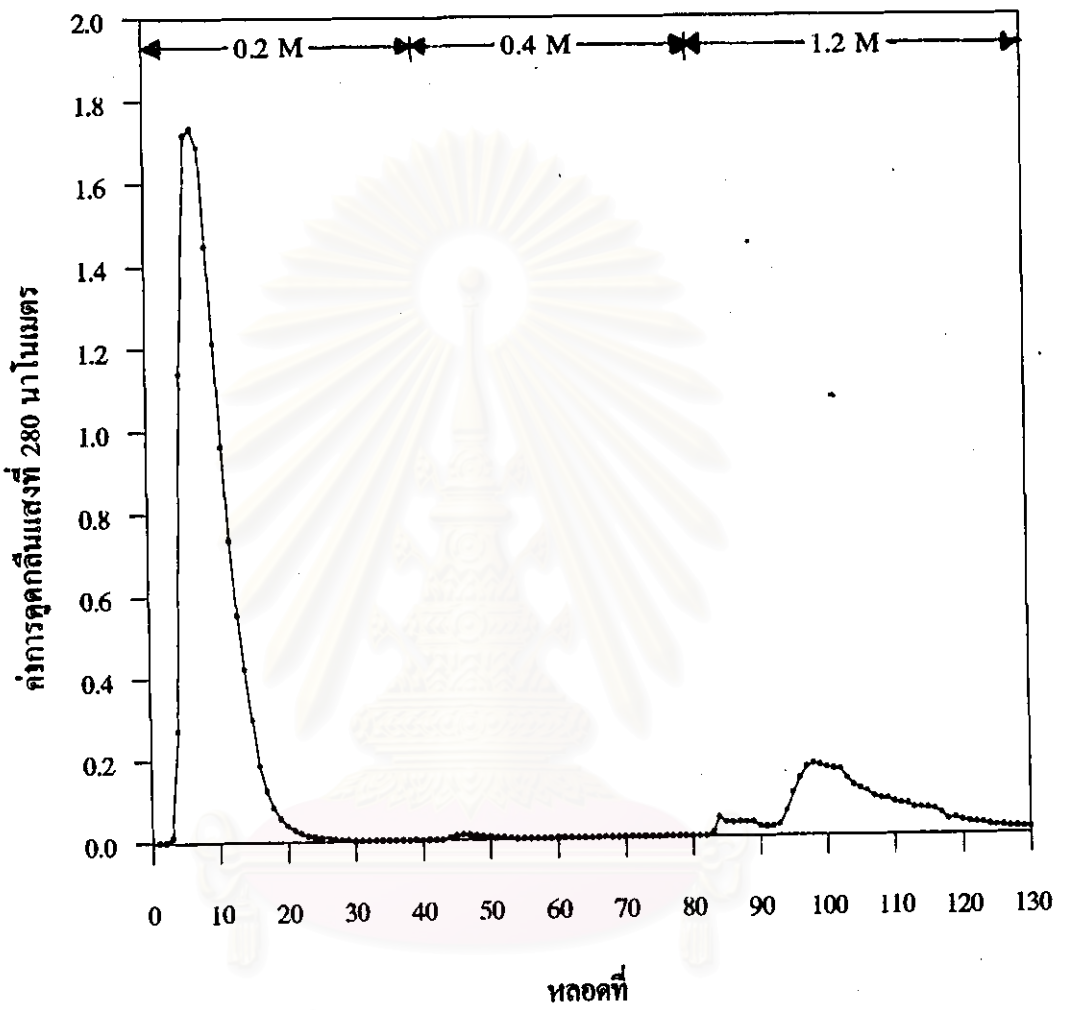
3.2.2.2 การแยกโปรตีนจากไข่สกัดโดยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

เมื่อนำไข่สกัดที่ได้ในข้อ 2.4.1 มาผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ตามวิธีในข้อ 2.4.2.1 พบว่ามีโปรตีนแยกออกมา 3 พีคเหมือนกับผลการแยกพลาสมา (รูปที่ 3) แต่ละพีคมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) ได้เก็บรวบรวมโปรตีนพีคที่ 3 (หลอดที่ 95-115) มาทำให้เข้มข้น แล้วนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

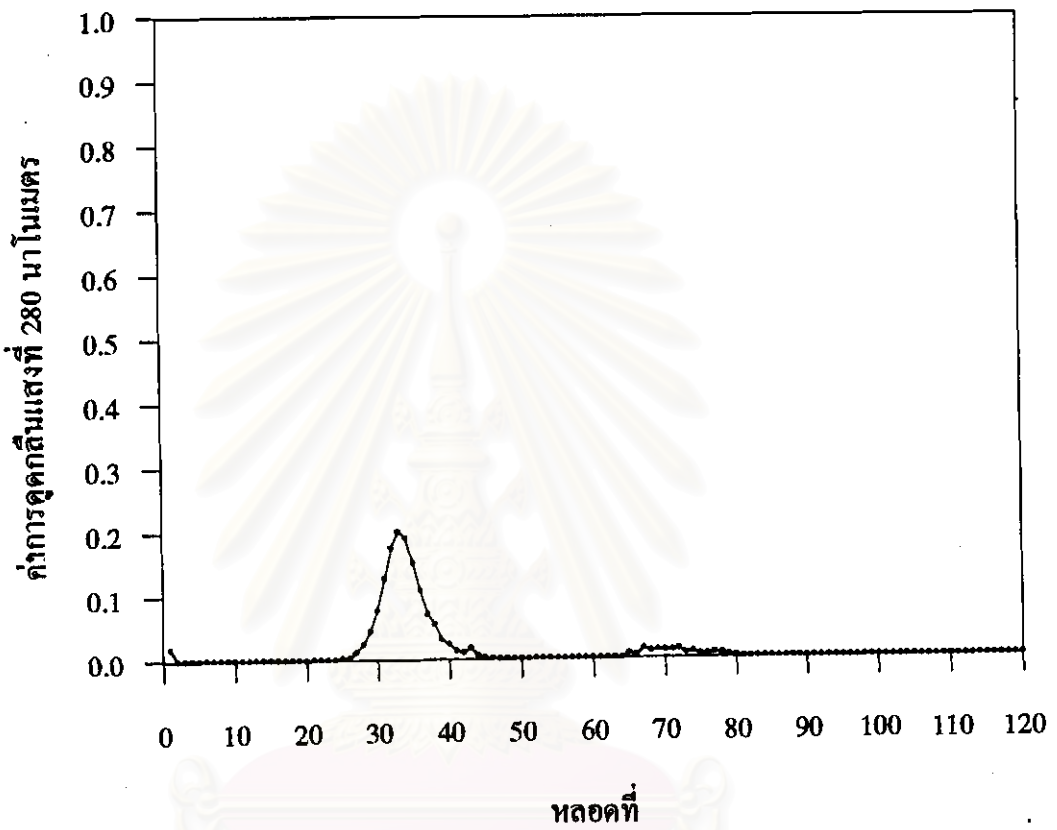
3.2.2.3 การแยกโปรตีนพีคที่ 3 ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

จากการนำโปรตีนในข้อ 3.2.2.2 มาผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 พบว่าได้โปรตีน 1 พีค (รูปที่ 4) เมื่อนำโปรตีนพีคนี้มาทำให้เข้มข้น แล้วหาปริมาณโปรตีนพบว่า มีปริมาณโปรตีนคิดเป็นผลผลิต 63.07% ของโปรตีนในพีคที่ 3 (ตารางที่ 2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 โครมาโตแกรมแสดงการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ของปลากะพงแดง ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (ขนาด 1.6 x 10 เซนติเมตร) ชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 1.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแฟรกชั่นละ 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



รูปที่ 4 โครมาโตแกรมแสดงการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่สกัดด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 (ขนาด 1.5 x 90 เซนติเมตร) ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแฟรกชั่นละ 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ โดยวิธีโครมาโตกราฟี

ขั้นตอน	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	% ผลผลิต
- ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์				
พลาสมาที่ฉีดกระตุ้นด้วย E_2	9.26	4.0	37.04	100.0
โปรตีนพีคที่ 1	1.90	13.5	25.65	69.25
โปรตีนพีคที่ 2	0.10	16.5	1.65	4.45
โปรตีนพีคที่ 3	0.14	36.0	5.04	13.6
โปรตีนพีคที่ 3 หลังจากทำให้เข้มข้น	2.08	2.0	4.162	
-ผ่านคอลัมน์เซฟาครีล เอส-300				
โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่	1.05	2.5	2.625	63.07

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17199XX

3.3 ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตร- โฟรีซิส

3.3.1 ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมา

3.3.1.1 รูปแบบของพลาสมา

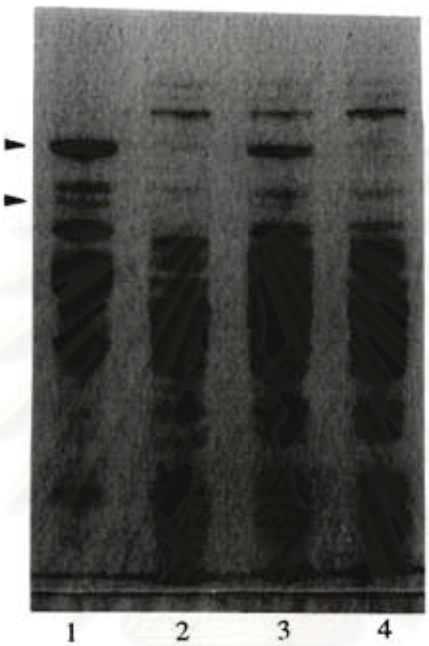
จากการนำพลาสมาของปลากะพงแดงก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตรา-ไดออล, พลาสมาของปลากระพงเพศเมีย และพลาสมาของปลากะพงเพศผู้ มาแยกโปรตีนโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 2.4.3 ได้ผลดังรูปที่ 5 พบว่าในพลาสมาของปลากะพงแดงหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล (แถวที่ 1) มีแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนในแถวที่ 2 และพบว่ารูปแบบของโปรตีนเหมือนกับรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากพลาสมาของปลากะพงเพศเมีย (แถวที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบโปรตีนของพลาสมาปลากะพงแดงเพศผู้ (แถวที่ 4) มีรูปแบบของโปรตีนเหมือนรูปแบบของโปรตีนในพลาสมาปลากะพงแดงก่อนฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

3.3.1.2 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

จากการนำโปรตีนพีคที่ 1, พีคที่ 2 และพีคที่ 3 ซึ่งได้จากการแยกพลาสมาบนคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ตามวิธีในข้อ 2.4.2.1 มาแยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่า ในพีคที่ 1 มีแถบโปรตีนหลายแถบ, พีคที่ 2 มีแถบโปรตีนจำนวนน้อยกว่าพีคที่ 1, พีคที่ 3 มีจำนวนแถบโปรตีนลักษณะคล้ายกับที่พบในพีคที่ 2 และเมื่อนำพีคที่ 3 มาผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ตามวิธีในข้อ 2.4.2.2 จะได้โปรตีน (หรือไวเทลโลเจนิน) 5 แถบ ดังรูปที่ 6

3.3.2 ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่สกัด

จากการนำไข่สกัดตามวิธีในข้อ 2.4.1 และโปรตีนพีคที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งได้จากการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และเซฟาคริล เอส-300 มาแยกโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าไข่สกัดมีโปรตีนแยกออกมาหลายแถบ ดังรูปที่ 7 แถวที่ 2 ไปผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ พบว่าจำนวนแถบโปรตีนของพีคที่ 1 และพีคที่ 2 จะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 7 แถวที่ 3 และแถวที่ 4 ตามลำดับส่วนโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 จะมีแถบโปรตีน 5 แถบ ดังแสดงในรูปที่ 7 แถวที่ 5



รูปที่ 5 รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาของปลากะพงแดงแยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส

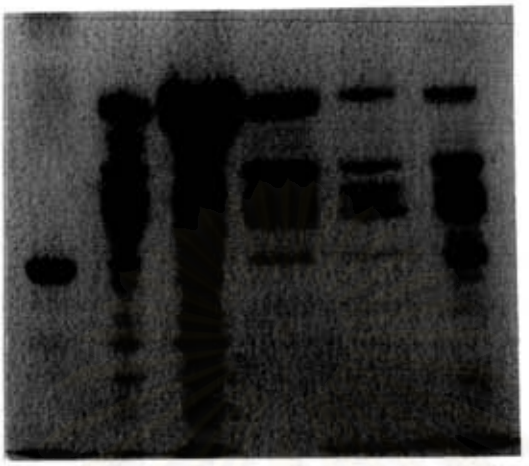
แถวที่ 1 พลาสมาหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 พลาสมาก่อนฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 พลาสมาของปลากะพงแดงเพศเมีย (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 4 พลาสมาของปลากะพงแดงเพศผู้ (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1 2 3 4 5 6

รูปที่ 6 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมา แยกโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส

แถวที่ 1 BSA (มีโปรตีน 5 ไมโครกรัม)

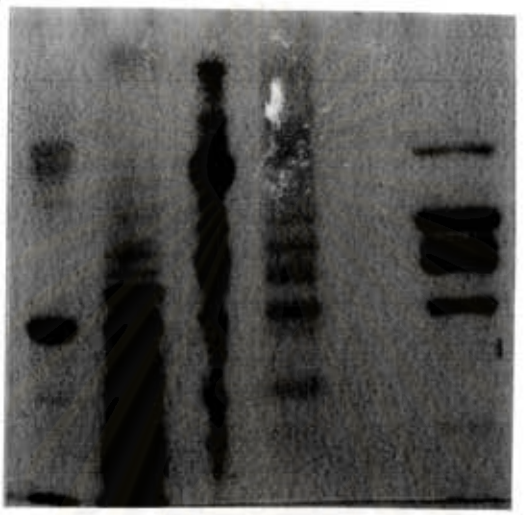
แถวที่ 2 พลาสมาของปลากะพงแดงที่ได้หลังจากฉีดกระตุ้นด้วย 17บีต้า-เอสตราไดออล (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 โปรตีนพีคที่ 1 ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ชะด้วยโปตัสเซียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 4 โปรตีนพีคที่ 2 ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์, พีเอช 6.8 (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 5 โปรตีนพีคที่ 3 ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 6 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกออกมาได้ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)



1 2 3 4 5

รูปที่ 7 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ของปลากะพงแดง แยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส

แถวที่ 1 BSA (มีโปรตีน 5 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 ไข่สกัดที่ได้จากวิธีทดลองข้อ 2.4.1 (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 โปรตีนพีคที่ 1 ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

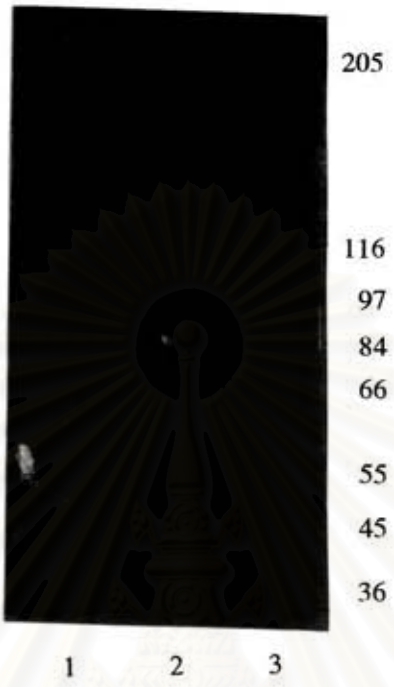
แถวที่ 4 โปรตีนพีคที่ 2 ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์, พีเอช 6.8 (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 5 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกออกมาได้ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

3.3.3 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกจากพลาสมาและไข่

เมื่อนำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงมีแถบโปรตีน 5 แถบเช่นเดียวกัน โดยมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) เป็น 0.28, 0.42,0.48, 0.51 และ 0.6 ตามลำดับ (รูปที่ 8) เมื่อนำแถบโปรตีนนี้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ovalbumin, glutamic dehydrogenase, albumin, fructose-6-phosphate kinase, phosphorylase b, β-galactosidase และ myosin) (รูปที่ 9) พบว่าแถบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 140, 108, 95, 90 และ 77 kDa ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

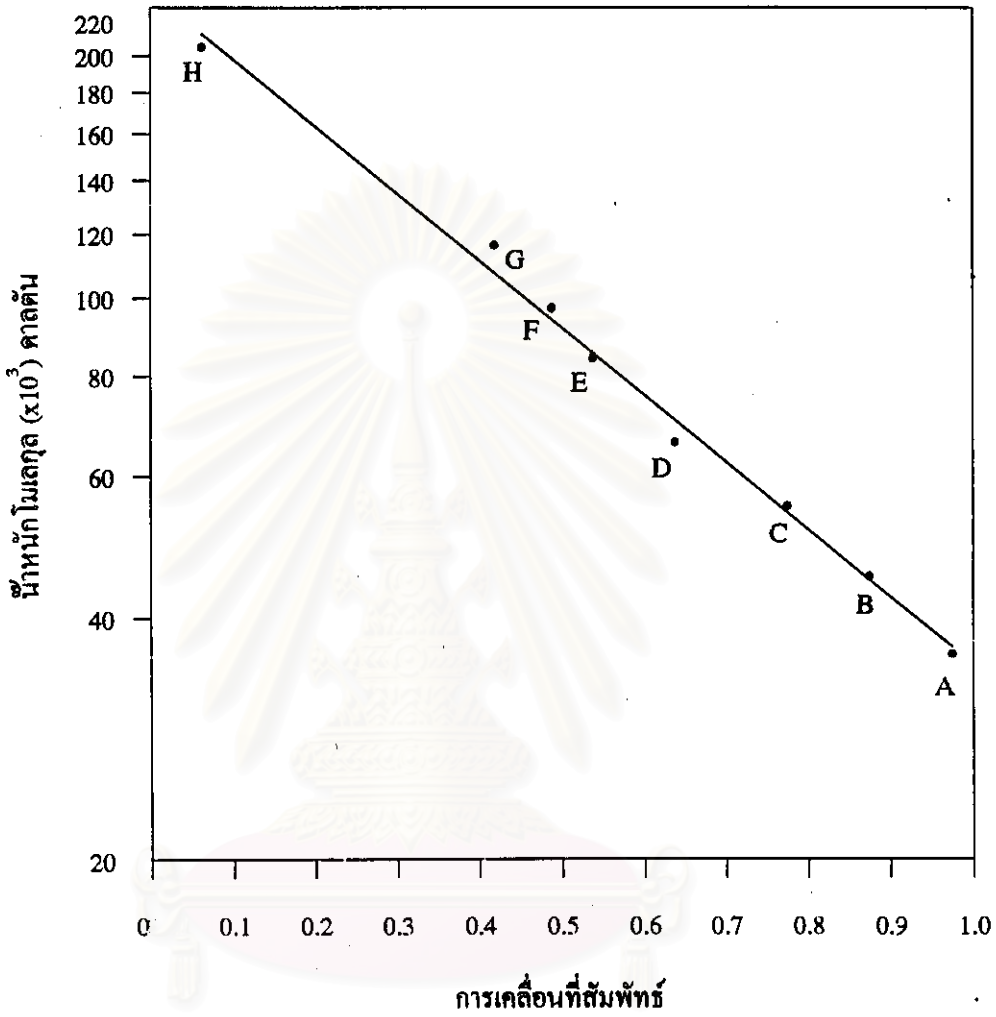


รูปที่ 8 รูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง ซึ่งเก็บไว้เป็นสารมาตรฐาน แยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส

แถวที่ 1 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะพงแดง (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากไข่ของปลากะพงแดง (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 โปรตีนมาตรฐาน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), ovalbumin (45 kDa), glutamic dehydrogenase (55 kDa), albumin (66 kDa), fructose-6-phosphate kinase (84 kDa), phosphorylase b (97 kDa), β-galactosidase (116 kDa) และ myosin (205 kDa)



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility) กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

A = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), B = ovalbumin (45 kDa),

C = glutamic dehydrogenase (55 kDa), D = albumin (66 kDa),

E = fructose-6-phosphate kinase (84 kDa), F = phosphorylase b (97 kDa),

G = β-galactosidase (116 kDa) และ H = myosin (205 kDa)

3.4 คุณสมบัติความเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีนของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน)

เมื่อนำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง มาแยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ตามวิธีในข้อ 2.4.4 และนำไปย้อมด้วยสีต่าง ๆ พบว่า โปรตีนที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงมีคุณสมบัติความเป็นไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีน เช่นเดียวกับไวเทลโลเจนิน ดังนี้

3.4.1 ไวเทลโลเจนินประกอบด้วยโปรตีน

เมื่อนำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ จะแยกออกเป็น 4 แถบ และติดสีน้ำเงินของ coomassie brilliant blue R-250 เหมือนกับ BSA ซึ่งเป็นโปรตีน (รูปที่ 10) แสดงว่าโปรตีนที่แยกได้มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนเหมือนไวเทลโลเจนิน

3.4.2 ไวเทลโลเจนินประกอบด้วยไลโปโปรตีน

โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ จะมี 3 แถบ ที่ติดสีดำของซูดาน แบล็ค บี ซึ่งเหมือนกับอะโปไลโปโปรตีน ซึ่งเป็นไลโปโปรตีน (รูปที่ 11) แสดงว่า โปรตีนที่แยกได้มีไลโปโปรตีนเป็นองค์ประกอบเหมือนไวเทลโลเจนิน

3.4.3 ไวเทลโลเจนินประกอบด้วยไกลโคโปรตีน

โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ จะมี 2 แถบ ที่ติดสีชมพูของ periodic acid-Schiff's reagent เหมือนกับโคริออนิกโกนาโดโทรปินซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน (รูปที่ 12) แสดงว่าโปรตีนที่แยกได้มีไกลโคโปรตีนเป็นองค์ประกอบเหมือนไวเทลโลเจนิน

3.4.4 ไวเทลโลเจนินประกอบด้วยฟอสโฟโปรตีน

โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ จะมี 2 แถบ ที่ติดสีเขียวของเมธิลกรีน เหมือนกับเคซีน ซึ่งเป็นฟอสโฟโปรตีน (รูปที่ 13) แสดงว่าโปรตีนที่แยกได้มีฟอสโฟโปรตีนเป็นองค์ประกอบเหมือนไวเทลโลเจนิน

รูปที่ 10 รูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตร-โฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน (coomassie blue R-250)

แถวที่ 1 BSA (มีโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากพลาสมา (มีโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากไข่ (มีโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 2 3

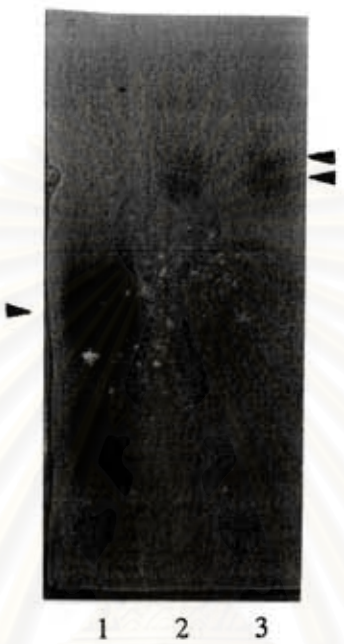
รูปที่ 11 รูปแบบของไลโปโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมไลโปโปรตีน (sudan black B)

แถวที่ 1 อะโปไลโปโปรตีน (มีโปรตีน 4.8 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากพลาสมา (มีโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน)ที่ได้จากไข่ (มีโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 รูปแบบของไกลโคโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมไกลโคโปรตีน (periodic acid-Schiff's reagent)

แถวที่ 1 โคริออนิกโกนาโดโทรปิน (มีโปรตีน 26 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากพลาสมา (มีโปรตีน 54 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากไข่ (มีโปรตีน 54 ไมโครกรัม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 รูปแบบของฟอสโฟโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมฟอสโฟโปรตีน (methyl green)

แถวที่ 1 เคซีน (มีโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากไข่ (มีโปรตีน 54 ไมโครกรัม)

แถวที่ 3 โปรตีน(ไวเทลโลเจนิน)ที่ได้จากพลาสมา (มีโปรตีน 64.8 ไมโครกรัม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

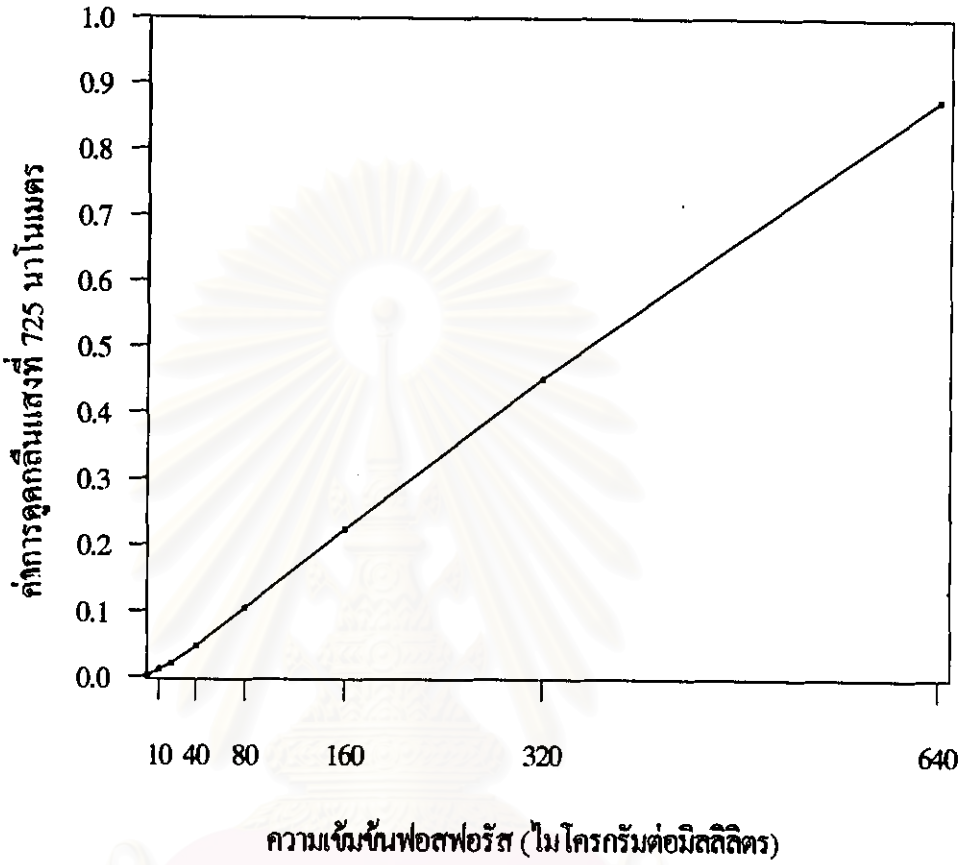
3.5 ปริมาณฟอสฟอรัสในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน)

จากการนำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง มาหาปริมาณฟอสฟอรัส ในรูปของอัลคาไลน์ เลบายล์ ฟอสฟอรัส ตามวิธีในข้อ 2.4.5.2 โดยหาค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานฟอสฟอรัส (รูปที่ 14) พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสในรูปของอัลคาไลน์-เลบายล์ ฟอสฟอรัส เป็น 0.13% และ 0.11% ของมิลลิกรัมโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมาและไข่ตามลำดับ

3.6 ผลการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

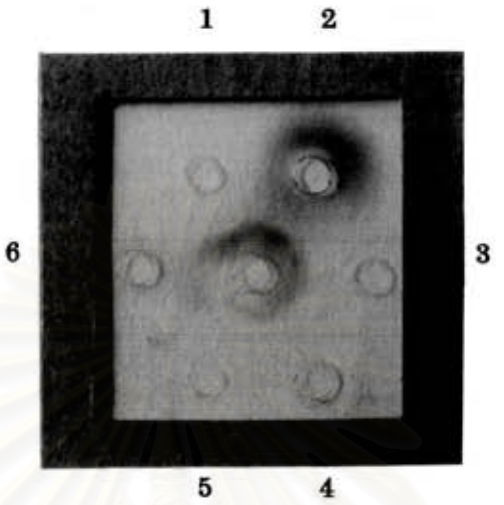
นำแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินที่ได้ในข้อ 2.4.6 มาทำปฏิกิริยากับโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ (หลุมที่ 1 และ 3), พลาสมาของปลากะพงแดงที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล (หลุมที่ 2), พลาสมาของปลากะพงแดงเพศผู้ (หลุมที่ 5), พลาสมาของปลากะพงแดงเพศเมีย (หลุมที่ 6), และไข่สกัดที่ได้จากวิธีในข้อ 2.4.1 (หลุมที่ 3) ได้ผลดังรูปที่ 15 พบว่า แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง (หลุมที่ 1 และ 3) คือ ปรากฏเป็นเส้นตะกอนสีน้ำเงิน (precipitin line) ระหว่างหลุมที่ใส่แอนติบอดีที่นำมาทดสอบ (หลุมตรงกลาง) กับหลุมที่ 1 และ 3 และเกิดเส้นตะกอนสีน้ำเงินระหว่างหลุมตรงกลางกับหลุมที่ 2, 4 และ 6 แสดงถึงปฏิกิริยาของไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงแดงที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล, ไข่สกัด และพลาสมาของปลากะพงแดงเพศเมียกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน แต่ไม่พบเส้นตะกอนเกิดขึ้นระหว่างหลุมที่ 5 กับหลุมตรงกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานฟอสฟอรัส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 ผลการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน กับไวเทลโลเจนิน โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

หลุมตรงกลาง คือ แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน

หลุมที่ 1 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากพลาสมา

หลุมที่ 2 พลาสมาของปลากะพงแดงหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล

หลุมที่ 3 โปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากไข่

หลุมที่ 4 ไข่สกัด

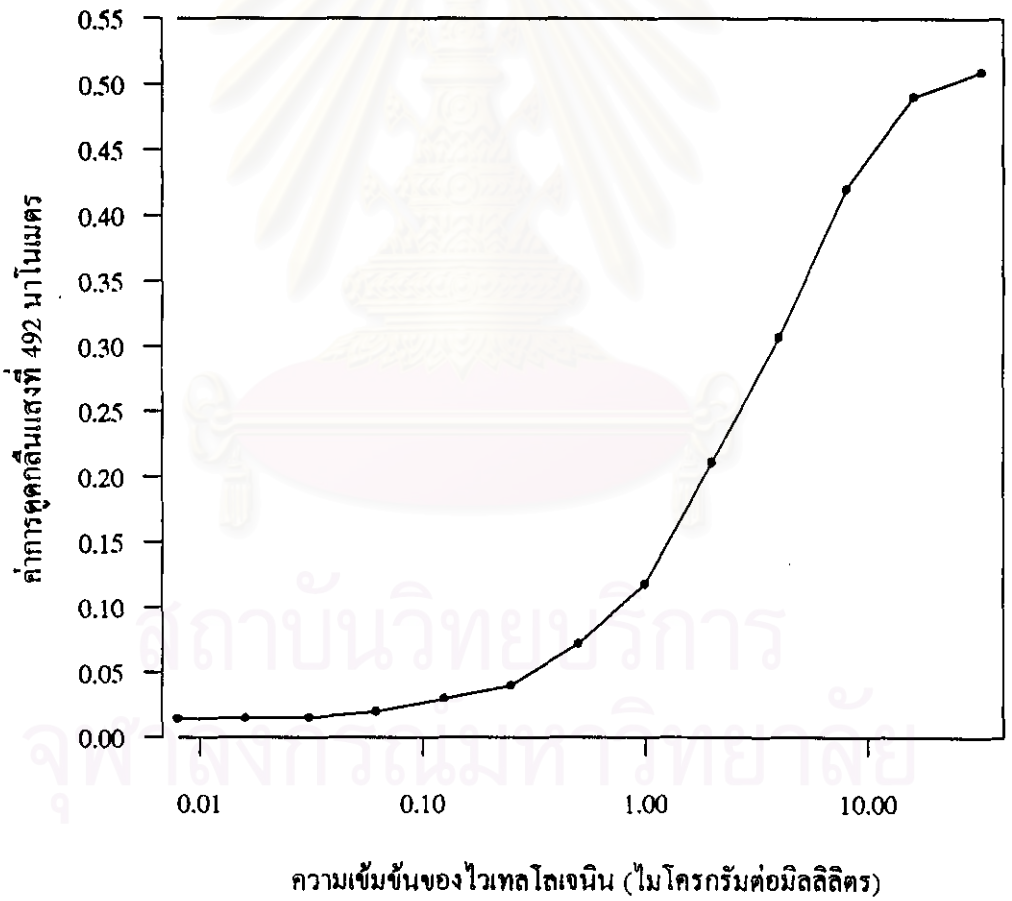
หลุมที่ 5 พลาสมาของปลากะพงแดงเพศผู้

หลุมที่ 6 พลาสมาของปลากะพงแดงเพศเมียที่สมบูรณ์เพศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 ผลการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลโลเจนิน โดยวิธี ELISA

จากการนำไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาตามวิธีในข้อ 2.4.2.2 มาเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินโดยวิธี ELISA แบบ sandwich technique แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของผลที่เกิดขึ้นแปรตามความเข้มข้นของไวเทลโลเจนิน ซึ่งเมื่อนำค่าความเข้มข้นของไวเทลโลเจนินมาพลอตกับค่าการดูดกลืนแสง สามารถสร้างเป็นกราฟมาตรฐานได้ ดังรูปที่ 16 ซึ่งกราฟมาตรฐานนี้สามารถนำไปพัฒนาเทคนิค ELISA มาเพื่อใช้วัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงแดงได้ต่อไป



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานของไวเทลโลเจนินโดยวิธี ELISA