139.643
ก 6487

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2538

การแยกบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของไวเทลลินในรังไข่ของกุ้งก้ามกราม

12 ต.ค. 2541

Preliminary Purification and Characterization of Vitellin in the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*

วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล ขจีนาฏ โพธิเวชกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

108412

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1-1
บทคัดย่อ	1-2
Abstract	1-3
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	9
ผลการทดลอง	26
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	43
หนังสืออ้างอิง	48

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิยาลัยมหิดล ที่อนุเคาะห์ให้ใช้เครื่อง Microplate Reader สำหรับโครงการวิจัยนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบ์ประมาณแผ่นดินปี 2538 และภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2538

บทคัดย่อ

ได้ผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินโดยการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยสารสกัดจากรังไข่กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อแอนติเจนจากกุ้งชนิดต่าง ๆ โดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่าแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่หรือจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งทั้งสองชนิดคือ กุ้งก้าม-กราม และกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) มีลักษณะคล้ายคลึงกันมากกว่าแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่หรือจากตัวอย่างเลือดของกุ้งฝอยน้ำเค็มเพศเมีย (*Palaemon serrifer*) แต่จะไม่พบปฏิกิริยาของแอนติซีรัมกับสารสกัดจากรังไข่หรือจากเลือดของกุ้งตะกาดเพศเมีย 2 ชนิด (*Metapenaeus affinis* และ *Metapenaeus ensis*) สารสกัดจากอัณฑะและตัวอย่างเลือดของกุ้งก้าม-กรามเพศผู้ จากการทดสอบโดยวิธีอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีส พบว่าแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่และจากเลือดเพศเมียของกุ้งก้ามกราม มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าคล้ายคลึงกัน แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่ผลิตได้นี้มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนประกอบอื่น ๆ ในรังไข่ปะปนอยู่ด้วย แต่สามารถกำจัดแอนติบอดีที่ปะปนมาโดยการดูดซับแอนติซีรัมด้วยเลือดกุ้งก้ามกรามเพศผู้ และสารสกัดจากตับ-ตับอ่อน การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี พบว่าเซลล์ไข่ระยะที่มีการสะสมของไข่แดงตั้งแต่ระยะต้นขึ้นไป จะพบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับไวเทลลิน แต่ไม่พบปฏิกิริยาของแอนติบอดีในเซลล์ไข่ระยะก่อนการสะสมไข่แดงและเซลล์ชนิดอื่น ๆ ในรังไข่

ในการใช้วิธี competitive ELISA ตรวจหาระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามหลังวางไข่ในเวลาต่าง ๆ พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินจะอยู่ในระดับต่ำและค่อนข้างคงที่ในช่วง 4-10 วันหลังจากวางไข่ และในช่วงต่อมา 12-26 วัน ระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินของกุ้ง บางส่วนจะเพิ่มขึ้นในอัตราต่าง ๆ กัน สำหรับในกุ้งที่ตัดตาออกทั้งสองข้างหลังจากวางไข่ 4 วัน ปริมาณไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูงสุดประมาณ 18 วันหลังจากวางไข่ หลังจากนั้นระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว และกุ้งวางไข่อีกครั้งในวันที่ 23 และ 24 หลังจากวางไข่ครั้งแรก

จากการฉีดสารสกัดจากก้านตา 2 ครั้ง (0 และ 12 ชั่วโมง : 1 ก้านตา/ตัว/ครั้ง) ในกุ้งหลังจากตัดตาได้ 7 วัน ปริมาณไวเทลโลเจนินจะค่อย ๆ ลดลงถึงระดับต่ำสุดประมาณชั่วโมงที่ 28 และหลังจากนั้นระดับไวเทลโลเจนินก็จะเพิ่มสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับระดับไวเทลโลเจนินเมื่อเริ่มต้นทดลองที่เวลา 44 ชั่วโมง ซึ่งต่างจากกุ้งที่ฉีดด้วยน้ำเกลือที่ระดับของไวเทลโลเจนินในเลือดเพิ่มขึ้นตลอดเวลาที่ทดลอง

ABSTRACT

The vitellin specific antisera were obtained from mice immunized with ovarian extracts of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* prepared by ammonium sulfate precipitation. Specificity of the antisera was determined by double immunodiffusion againt antigens from various shrimp species. The antigens from ovarian extracts or from female hemolymph of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* and *Macrobrachium lanchesteri* show higher degree of similarity than the antigens from ovarian extracts and from female hemolymph of *Palaemon serrifer*. The cross-reactivity of antisera to the antigens from ovarian extracts or from female hemolymph of *Metapenaeus affinis* and *Metapenaeus ensis*, and from testicular extract and male hemolymph of *M. rosenbergii* was not observed. On immunoelectrophoresis, at least two antigens from ovarian extract and female hemolymph of *M. rosenbergii* showed similar mobility. The anti-vitellin antiserum also contain antibodies against other components in the ovarian extract. However, those contaminant antibodies in the anti-vitellogenin antiserum could be eliminated by absorption of the antiserum with the male hemolymph and hepatopancreas extract.

Specificity of the antisera was also shown by immunocytochemistry. The antiserum recognized only the primary vitellogenesis and older oocytes, but did not recognize earlier stage of oocytes and other cells.

The vitellogenin levels in the hemolymph of *M. rosenbergii* was determined by competitive ELISA. In post-spawn prawn, the hemolymph vitellogenin levels were low and remained unchange during 4 to 10 days after spawn, then increased at variable rates and times in some prawns during 12-26 days after spawn. In eye-ablated prawns (4 days after spawn) the vitellogenin levels increased rapidly until reaching the highest level on day 18, then decreased rapidly during the next pre-spawn period. All of the prawns in this group respawned on day 23 and 24.

The effect of eyestalk extract on the haemolymph vitellogenin levels was performed by twice injections of crude eyestalk extract (at 0 and 12 hours) approximately about 1 eyestalk/ prawn/injection) into eye-ablated prawns on day 7 after eye-ablation. The vitellogenin levels of the prawns gradually decreased to the lowest levels at 28 hours then gradually increased to the original level at 44 hours. In the parallel experiment, the prawns injected with saline, the vitellogenin levels gradually increased through experimental period.

บทนำ

จากรายงานสถานภาพของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งสำหรับการเลี้ยงกุ้งทะเล เช่น กุ้งกุลาดำ คือการขาดแคลนแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์กุ้งสำหรับเพาะพันธุ์กุ้งวัยอ่อน โดยเฉพาะแม่พันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพดีส่วนใหญ่ต้องจับจากทะเลซึ่งหายากและมีราคาค่อนข้างสูง ต้องนำมาบีบตาเพื่อชักนำให้รังไข่เจริญ (Menasvet, 1990) วิธีการนี้นอกจากผลที่ได้จะไม่แน่นอน เพราะเป็นการทำลายสมดุลของฮอร์โมนต่าง ๆ ในตัวกุ้งอย่างรุนแรง ยังผลให้การผลิตไข่ไม่สมบูรณ์ อัตราการผสม อัตราการรอดของลูกกุ้งต่ำ และแม่พันธุ์กุ้งตาย (Primavera, 1985) ต้องหาแม่พันธุ์กุ้งมาทดแทนตลอดเวลา เป็นผลให้เพิ่มต้นทุนผลิตกุ้งวัยอ่อนและขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งอยู่เสมอ

ในก้านตา (eyestalk) ของสัตว์พวกครัสตาเซียน (crustacean) ประกอบด้วย neuroendocrine cell ซึ่งเป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนและ neurohemal organ เช่น sinus gland ซึ่งเป็นแหล่งสร้างและเก็บสะสมฮอร์โมนที่สำคัญหลายชนิด (Josefsson, 1983) เช่น ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (Molt Inhibiting Hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb, 1987) ฮอร์โมนควบคุมการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) (Huberman and Aquilar, 1988) ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์ (Pigment Dispersing Hormone-PDH) (Rao and Riehm, 1988) ฮอร์โมนที่ช่วยในการรวมตัวของเม็ดสีภายในตาประกอบของสัตว์ต่อที่มืด (Red Pigment Concentrating Hormone-RPCH) (Fernlund and Josefsson, 1972) และฮอร์โมนที่มีหน้าที่ยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH or Gonad Inhibiting Hormone-GIH) (Soyez et al., 1987) ในช่วงที่มีการเจริญหรือพัฒนาการของรังไข่ พบว่าจะมีการสะสมไวเทลลิน (vitellin) ภายในรังไข่ (ovary) ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ เช่น ในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* (Soyez et.al., 1987) กุ้ง *Procambarus bouvieri* (Aguilar et al., 1992) และจากการศึกษาที่แล้วมาพบว่าในสัตว์จำพวกครัสตาเซียน เช่น กุ้ง และปูชนิดต่าง ๆ มีฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่อยู่ในก้านตา เมื่อทำลายก้านตาโดยวิธีบีบตาหรือวิธีการอื่น ๆ จะมีผลชักนำให้เกิดพัฒนาการของรังไข่ (Anilkumar and Adiyodi, 1980; Emmerson, 1983) และเมื่อฉีดสารสกัดจากก้านตากลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกทำลายก้านตาจะมีผลยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ เช่น ในกุ้ง *Parapenaeopsis hardwickii* (Kulkarni and Nagabhushanam, 1980) กุ้งมังกร *(Panulirus argus)* (Quackenbush and Herrnkind, 1981) ปูก้ามดาบ (fiddler crab) *Uca pugilator* (Quackenbush and Keeley, 1988) ส่วนในกุ้ง *Palaemon serratus* ตัวเมียจะไม่มีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin)

ในช่วงระยะพักการสืบพันธุ์ แต่ถ้าตัดก้านตาออกซึ่งเป็นแหล่งของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ก็จะกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน และยังพบว่าฮอร์โมนนี้จะไปยับยั้งกระบวนการสร้างไวเทลโลเจนินระยะที่ 2 (secondary vitellogenesis) ระหว่างฤดูการสืบพันธุ์ (Charniaux-Cotton, 1980) ส่วนฮอร์โมนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของรังไข่อาจจะพบในแหล่งอื่น ๆ ซึ่งยังไม่มีรายงานหรือหลักฐานแน่ชัดว่ามีอยู่กี่ชนิดและสร้างจากส่วนใดของระบบประสาท

ส่วนความพยายามที่จะชักนำให้กุ้งทะเลวางไข่โดยวิธีอื่นที่ไม่กระทบกระเทือนหรือทำลายระบบฮอร์โมนอื่น ๆ ในก้านตาอย่างถาวร ทำโดยการปรับสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ความเข้มของแสง ความยาวช่วงแสง คลื่นแสงช่วงต่าง ๆ อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล และสภาวะโภชนาการต่าง ๆ (Crocox and Kerr, 1986; Hillier, 1984; Wurts and Stickney, 1984) ในกุ้งทะเลผลการทดลองที่ได้ส่วนใหญ่ยังไม่เป็นที่น่าพอใจถ้าไม่มีการทำลายก้านตาควบคู่กันไป ความพยายามอีกวิธีโดยอาศัยหลักที่ว่า การควบคุมพัฒนาการของรังไข่อาจอยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนอื่นซึ่งอยู่ภายนอกก้านตาที่ทำหน้าที่กระตุ้นพัฒนาการของรังไข่ ได้มีการใช้สารสกัดจากระบบประสาทส่วนต่าง ๆ เช่น จากสมองและปมประสาทส่วนอก (Eastman-Reks and Fingerman, 1984; Takayanagi et al., 1986) หรือฮอร์โมนที่พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เช่น 17α-hydroxyprogesterone (Yano, 1984) และ Human Chorionic Gonadotropin (HCG) (Bomirski and Klek-Kawinska, 1976; Nagabushanum and Serojini, 1978), Hypophyseal Gonadotropins (Reddy et al., 1987) และ 5 Hydroxytryptamine (Kulkarni et al., 1992) ทดลองฉีดในกุ้งชนิดต่าง ๆ แต่ผลการทดลองยังไม่เป็นที่ยืนยันชัดว่าฮอร์โมนเหล่านี้สามารถใช้เร่งการพัฒนาของรังไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังที่กล่าวแล้วว่าฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ (VIH) หรือฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (GIH) เป็นตัวหลักในการควบคุมพัฒนาการของรังไข่ ดังนั้นการลดอิทธิพลของ VIH หรือ GIH นี้ชั่วคราวอาจเป็นไปได้โดยการใช้กระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพราะเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่าการใช้แอนติบอดีทั้งภายนอกและภายในร่างกายสามารถหยุดยั้งกิจกรรมของสารต่าง ๆ รวมทั้งฮอร์โมนได้อย่างเฉพาะเจาะจง (Harper et al., 1983; Nagayama et al., 1982; Thanos et al., 1984) ดังนั้นการใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อ VIH หรือ GIH เพื่อลดปริมาณของฮอร์โมนนี้ในตัวกุ้งจึงอาจเป็นแนวทางใหม่ในการชักนำพัฒนาการของรังไข่ในกุ้ง เพราะวิธีนี้นอกจากจะไม่เป็นการกระทบกระเทือนต่อสภาพการทำงานของฮอร์โมนอื่น ๆ แล้ว คาดว่าผลการยับยั้งเป็นการเกิดแบบชั่วคราว กุ้งสามารถกลับมามีสภาพเหมือนปกติได้ มีรายงานการสร้างแอนติบอดีต่อ HCG เพื่อใช้ในการคุมกำเนิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมนั้นได้สำเร็จเป็นอย่างดี (Stevens, 1986) แอนติบอดีนี้

สามารถจะถูกผลิตในรูปของ monoclonal antibodies ซึ่งจะสามารถผลิตได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการและในราคาไม่แพงนัก นอกจากนี้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VIH หรือ GIH ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาถึงหน้าที่และกิจกรรมต่าง ๆ ของฮอร์โมนนี้ในกุ้งได้ด้วย ทั้งนี้แนวทางการวิจัยนี้ยังไม่มีผู้ใดเริ่มดำเนินการในประเทศไทย (Menasvet, 1990)

ในการศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่นั้น ได้มีรายงานทำการแยกสกัดฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้านตาของปู *Cancer magister* เพศเมียโดยการต้ม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ชนิด Sephadex G-25 และทดสอบสารสกัดที่ได้ในกุ้ง *Crangon crangon* เพศเมียที่ตัดตา โดยตรวจหาดัชนีของรังไข่ (ovarian index-OI) เปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้ตัดตาและกุ้งที่ตัดตาที่ไม่ได้ฉีดสารสกัด พบว่าฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่เป็นสารจำพวกเปปไทด์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,000 ดาลตัน (Bomirski et al., 1981)

ส่วนในปี 1983 Quackenbush and Herrnkind ได้แยกสกัดฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้านตากุ้งมังกร (*Panulirus argus*) ด้วยวิธีการ 2 ขั้นตอน โดยใช้ Sephadex gel chromatography และ polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเป็นสารจำพวกเปปไทด์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 ดาลตัน โดยทดสอบผลการยับยั้งของฮอร์โมนนี้ในปูก้ามดาบ (*Uca pugilator*) ที่ตัดก้านตา และต่อมาในปี 1989 Quackenbush ได้แยกสกัดฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้านตาของกุ้ง *Penaeus vannamei* โดยใช้ Sephadex gel chromatography (Sephadex G-25) พบว่าเป็นเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,300 ดาลตัน โดยทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนในรังไข่และในตับ-ตับอ่อนของกุ้ง *Penaeus vannamei*

ในการแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่นั้น ได้มีรายงานการแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนนี้จากก้านตากุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* ด้วยวิธีการ 2 ขั้นตอนคือ reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) และ sodium dodecyl sulfate-urea-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-urea-PAGE) และทดสอบสารสกัดที่ได้ในกุ้ง *Palaemonetes varians* เพศเมียที่ตัดตา โดยตรวจดูประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ (oocyte) เปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ตัดตาและกุ้งที่ตัดตาที่ไม่ได้ฉีดสารสกัด พบว่าฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่เป็นสารจำพวกเปปไทด์มีน้ำหนักโมเลกุล 7,000-8,000 ดาลตัน (Soyez et al., 1987) ต่อมาในปี 1991 Soyez et al. ได้แยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนชนิดนี้จากก้านตากุ้งชนิดเดียวกันเพื่อศึกษาถึงลักษณะโครงสร้าง ส่วนประกอบและลำดับของกรดอะมิโน (amino acid) โดยใช้ gas-phase microsequencing และ fast-atom bombardment mass spectrometry พบว่าฮอร์โมนนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 9135 ดาลตัน ประกอบไปด้วย

กรดอะมิโน 77 หน่วย ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) และฮอร์โมนยับยั้งการลอบครบของกุ้ง (MIH)

ต่อมาในปี 1992 Aguilar et al. ได้แยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่จากก้านตาของกุ้ง Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* ด้วยวิธีการขั้นตอนเดียวโดยใช้ RP-HPLC พบว่าเป็นสารจำพวกเปปไทด์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8388 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72-74 หน่วย ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด และจากการทดสอบในหลอดทดลองเกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนภายในรังไข่ของกุ้ง *Penaeus vannamei* พบว่าฮอร์โมนนี้สามารถที่จะยับยั้งได้ถึง 100 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้สารสกัดจำนวน 10 ก้านตา

การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกเอากุ้งก้ามกราม เป็นต้นแบบเพราะว่ากุ้งก้ามกรามมีลักษณะได้เปรียบกว่ากุ้งชนิดอื่น ๆ คือ มีขนาดใหญ่ สะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดและการฉีดสารสกัดและเป็นกุ้งที่เจริญเติบโตในน้ำจืดจึงทำให้สะดวกในการเลี้ยงดู อีกทั้งยังมีข้อมูลค่อนข้างพร้อมในการเลี้ยงและยังสามารถวางไข่ได้เองตามธรรมชาติ จึงหาตัวอย่างได้ทุกระยะการเจริญ นอกจากนี้กุ้งตัวเมียยังมีราคาถูก เพราะว่าในการทดลองแต่ละครั้งต้องใช้กุ้งตัวเมียเป็นจำนวนมากเพื่อแยกสกัด วิเคราะห์และทดสอบ แต่เนื่องจากวิธีการทดสอบฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่โดยตรงโดยการฉีดสารสกัดจากก้านตาให้กุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง แล้วตรวจสอบพัฒนาการของรังไข่โดยดูจากดัชนีรังไข่ (ovarian index) เป็นวิธีการที่ต้องใช้กุ้งจำนวนมากสำหรับทดสอบตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง (ประมาณ 30 ตัว/ตัวอย่าง) และสิ้นเปลืองสารสกัดจำนวนมาก ต้องฉีดสารสกัดจากก้านตาหลายครั้งเป็นเวลาหลายวัน (ทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 5-6 วัน) อีกทั้งการชั่งน้ำหนักรังไข่เป็นวิธีที่หยาบ มีความแปรปรวนสูง (วีระวรรณ สิทธิกรกุลและคณะ 2532) ไม่เหมาะสำหรับการทดสอบฮอร์โมนระหว่างการแยกบริสุทธิ์ซึ่งต้องทำหลายขั้นตอนและแยกตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นจึงพยายามหาวิธีทดสอบฮอร์โมนโดยการตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนินในเลือด ไวเทลโลเจนินเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของโปรตีนหลักในรังไข่คือ ไวเทลลิน

ไวเทลลิน (vitellin) หรือไลโปไวเทลลิน (lipovitellin) จัดเป็นโปรตีนที่จำเพาะซึ่งสะสมอยู่ในไข่แดง (yolk) ระหว่างที่มีการเจริญหรือพัฒนาการของรังไข่ในวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสตาเซียน ไวเทลลินเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยอยู่รวมกันกับไขมัน (lipid) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และคาร์โรทีนอยด์ (carotenoid) ในรูป lipo-glyco-carotenoprotein น้ำหนักโมเลกุลของไวเทลลินส่วนมากจะอยู่ระหว่าง 300-500 กิโลดาลตัน (kD) (Zagalsky, 1985; Chang et al., 1993 a) ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) ที่มีจำนวนตั้งแต่ 2-11 หน่วยย่อย จัดเป็นสารจำพวก

เปปไทด์ (peptide) (Lui and Connor, 1977; Eastman-Reks and Fingerman, 1985) ซึ่งคาร์โรทีนอยด์จะเป็นส่วนประกอบที่ทำให้ไวเทลลินจากรังไข่มีสีแตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์นั้น ๆ เช่น สีเหลืองในปูม้า (blue crab) *Callinectes sapidus* (Kerr, 1969) สีม่วงในปูเสฉวน (hermit crab) *Eupagurus bernhardus L.* (Cheesman and Prebble. 1966) สีเขียวในกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon)* (Quinitio et al., 1990) สีส้ม หรือส้มแดงในกุ้งก้ามกราม *(Macrobrachinum rosenbergii)* (Chang et al., 1993b) และยังพบโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายโปรตีนชนิดนี้ในเลือดของสัตว์เพศเมียขณะที่มีการเจริญหรือพัฒนาการของรังไข่ในรูปของไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) ซึ่งระดับปริมาณของไวเทลโล-เจนินจะเพิ่มขึ้นในขณะที่รังไข่กำลังเจริญ แต่ไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียนเพศผู้ และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่เจริญ เมื่อศึกษาด้วยกระบวนการทางอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีส (immunoelectrophoresis) และอิมมูโนดิฟฟิวชัน (immunodiffusion) พบว่าไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับไวเทลลินจากรังไข่ (Wollin, Laufer and Albertini, 1973; Quinitio et al., 1990) ดังนั้นไวเทลโลเจนินจึงเป็นโปรตีนที่จำเพาะในเลือดซึ่งพบในกุ้งเพศเมียที่มีการเจริญของรังไข่ ซึ่งระดับไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดในระยะช่วงก่อนการลอกคราบและลดลงทันทีที่กุ้งวางไข่ เช่นในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Derelle et al., 1986) กุ้ง *Pandalus kessleri* (Quinitio et al., 1989) ไวเทลโลเจนินอาจสร้างมาจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ตับ-ตับอ่อน (hepatopancreas) เช่นในปูแมงมุม (spider crab) *Libinia enorginata* ปู *Carcinus maenas* (Paulus and Laufer, 1987) และในกุ้ง *Penaeus japonicus* (Yano and Chinzei, 1987) หรือสร้างมาจาก fatbody เช่นในสัตว์พวก amphipod และ isopods ไวเทลโลเจนินจะถูกลำเลียงมายังรังไข่โดยทางระบบหมุนเวียนของโลหิตแล้วเปลี่ยนรูปไปเป็นไวเทลลิน ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับพัฒนาการของรังไข่ (Charniaux-Cotton, 1985; Tom, Goren and Ovadia, 1987; Suzuki, Yamazaki and Katakura, 1989)

ในการศึกษาถึงวิธีการแยกบริสุทธิ์ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้ง ได้มีรายงานการแยกบริสุทธิ์ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้ง *Pandalus kessleri* ด้วยการใช้คอลัมม์โครมาโตกราฟี 3 ขั้นตอนคือ hydroxylapatite, DEAE (diethylamino ethyl) cellulose และ Sepharose 6B ตามลำดับ พบว่าไวเทลลินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 560 กิโลดาลตัน (kD) ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunits) โดยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 81 และ 110 กิโลดาลตันตามลำดับ และยังพบว่าโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมียในเลือดหรือไวเทลโลเจนินของกุ้ง *Pandalus kessleri* เพศเมียจะมีลักษณะคล้ายกับไวเทลลินที่สกัดมาจากรังไข่โดยศึกษาด้วยวิธีทางอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีส (immunoelectrophoresis) และอิมมูโนดิฟฟิวชัน นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของไวเทลโลเจนิน

ในเลือดจะเพิ่มขึ้นในขณะที่มีการสะสมไข่แดงในรังไข่และจะลดลงหลังจากกุ้งวางไข่แล้ว (Quinito et al., 1989) ต่อมาในปี 1990 Quinitio et al. ได้แยกบริสุทธิ์ไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยใช้คอลัมม์โครมาโตรกราฟี hydroxylàpatite และ Sepharose 6B พบว่าไวเทลลินที่แยกได้นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 540 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ 4 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 74, 83, 104 และ 168 กิโลดาลตันตามลำดับ และยังประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดเล็ก 1 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 90 กิโลดาลตันซึ่งเป็นโปรตีนชนิด glycolipo-protein เมื่อศึกษาไวเทลโลเจนินของกุ้งกุลาดำตัวเมียด้วยกระบวนการทางอีเล็กโตรโฟรีซีส และอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่ามีลักษณะคล้ายกับไวเทลลินและโปรตีนชนิดนี้ไม่พบในกุ้งกุลาดำเพศผู้ และยังได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบไวเทลลินของกุ้งกุลาดำกับไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งทะเลชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่าแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งกุลาดำ สารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งแชบ๊วยดำ (*Penaeus indicus*) กุ้งแชบ๊วยขาว (*Penaeus merguiensis*) และกุ้งกุลาลาย (*Penaeus semisulcatus*) แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้ง *Pandalus kessleri* จากการทดสอบครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งใน family Penaeidae แต่อาจแตกต่างจากไวเทลลินในรังไข่ของกุ้งที่ต่าง family กัน

ในปี 1993 ชางและคณะ (Chang et al., 1993a) ได้แยกบริสุทธิ์ไวเทลลินจากรังไข่ที่เจริญเต็มที่ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ด้วยวิธีการ 4 ขั้นตอน โดยใช้เจลฟิลเตชัน (gel filtration), hydroxylapatite, DEAE-Sephacel และ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) พบว่าไวเทลลินมีน้ำหนักโมเลกุล 492 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ 8 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 91, 82, 68, 64, 58, 49, 45 และ 35 กิโลดาลตันตามลำดับ ซึ่งจัดเป็นโปรตีนในรูป lipo-glyco-caroteno-protein ในปีเดียวกัน Chang et al., (1993b) ก็ได้แยกบริสุทธิ์ไวเทลลินจากรังไข่ที่เจริญเต็มที่ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) โดยใช้เจลฟิลเตชัน DEAE-Sephacel, HPLC และ PAGE พบว่ามีไวเทลลิน 3 กลุ่ม (ไวเทลลิน 1 เป็นโปรตีนหลัก ไวเทลลิน 2 และไวเทลลิน 3) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีน้ำหนักโมเลกุล 240, 450 และ 780 กิโลดาลตันตามลำดับ และแต่ละกลุ่มนั้นประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ 2 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 90 และ 104 กิโลดาลตัน อยู่ในรูปของ lipo-glyco-carotenoprotein เมื่อทดสอบด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่าแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลิน 1 และแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินรวม (ไวเทลลิน 1 + ไวเทลลิน 2 + ไวเทลลิน 3) ทำปฏิกิริยากับเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศเมียที่โตเต็มวัย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมียที่ยังไม่โตเต็มวัย โดยให้แนวตะกอนที่เชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันกับแนวตะกอน

ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินรวมกับไวเทลลิน 1 และกับไวเทลลินรวม ก็ให้แนวตะกอนที่เชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์เช่นกัน

ต่อมาในปี 1994 Chang et al. ได้แยกบริสุทธิ์โปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมียหรือไวเทลโลเจนิน ในเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เพศเมียที่โตเต็มวัยโดยการย้อมสี Sudan Black B (SBB) และแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดความเร็วสูง (ultracentrifuge) หลังจากนั้นทดสอบด้วยวิธี Western blotting และ SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่จำเพาะสำหรับเพศเมีย หรือไวเทลโลเจนินประกอบด้วย โพลีเปปไทด์ 2 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 170 และ 82 กิโลดาลตันตามลำดับ จัดอยู่ในรูป lipo-glycophosphoprotein ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะไม่พบในเลือดของกุ้งเพศผู้ และเพศเมียที่ยังไม่โตเต็มวัย หรือที่รังไข่ยังไม่เจริญ

ส่วนรายงานเกี่ยวกับการตรวจวัดระดับของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี ELISA นั้น ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) และแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) และได้ใช้วิธี sandwich ELISA ในการตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามตัวเมียในช่วงต่าง ๆ ของวงจรสืบพันธุ์และการลอกคราบ พบว่าระดับไวเทลโลเจนินอยู่ในระดับต่ำประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเริ่มต้นของวงจรสืบพันธุ์ และระดับไวเทลโลเจนินนี้จะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดประมาณ 10-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในช่วงกุ้งใกล้ที่จะลอกคราบ ต่อจากนั้นระดับไวเทลโลเจนินจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากกุ้งวางไข่ และยังพบว่าไวเทลลินในรังไข่ของกุ้งก้ามกรามมีน้ำหนักโมเลกุล 330 กิโลดาล-ตัน โดยใช้เจลฟิลเตชันชนิด SephadexG-200 เมื่อแยกสกัดไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของกุ้งนี้ด้วย SDS-PAGE electrophoresis พบว่าเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 84 และ 92 กิโลดาลตันตามลำดับ (Derelle et al., 1986)

จากรายงานการศึกษาที่เกี่ยวกับไวเทลลิน ไวเทลโลเจนิน และฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ในวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสตาเซียนนั้น พบว่าในเลือดของสัตว์พวกนี้เพศเมียจะมีไวเทลโลเจนินซึ่งจัดเป็นโปรตีนที่จำเพาะในเลือดของเพศเมีย และจากการศึกษาโดยกระบวนการทางอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีสและอิมมูโนดิฟฟิวชัน จะมีลักษณะเหมือนกับไวเทลลินในรังไข่ และระดับไวเทลโลเจนินนี้มีความสัมพันธ์กับฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ในวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์พวกครัสตาเซียน ดังนั้นกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) น่าจะมีโปรตีนที่จำเพาะในเลือดของเพศเมียที่มีลักษณะเหมือนกับไวเทลลินในรังไข่ และการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนในเลือดก็สัมพันธ์กับวงจรสืบพันธุ์ ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ที่อยู่ในก้านตาของกุ้งชนิดนี้เช่นกัน

การศึกษาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะต่อไวเทลลินที่สกัดจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม แล้วใช้แอนติบอดีนี้ตรวจวัดระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งที่มีพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ทั้งนี้ก็เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับพัฒนาวิธีทดสอบผลของฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH) หรือฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ (Gonad Inhibiting Hormone-GIH) ในระหว่างการแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนกลุ่มนี้จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามต่อไป

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองคือ กุ้งก้ามกราม เป็นกุ้งที่ใช้สำหรับการทดลองส่วนใหญ่ในการทดลองนี้ ส่วนกุ้งอีก 4 ชนิดคือ กุ้งฝอยน้ำจืด กุ้งฝอยน้ำเค็ม กุ้งตะกาด 2 สปีชีส์ (species) เป็นกุ้งที่ใช้เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ได้ และหนูขาวเป็นสัตว์ที่ใช้สร้างแอนติบอดีต่อไวเทลลิน

1. กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-40 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (ภาพประกอบ 1) นำมาเลี้ยงให้วางไข่และผสมพันธุ์ในบ่อซีเมนต์ขนาด 100X250X50 เซนติเมตร กุ้งตัวเมียที่วางไข่จะถูกคัดแยกออกไปตอนเช้าของทุกวัน การนับอายุของกุ้งหลังวางไข่ โดยนับวันที่พบว่ากุ้งวางไข่เป็นวันที่ 1 หลังจากวางไข่

อาหารที่เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จชนิดเม็ดสำหรับกุ้งก้ามกราม ผลิตโดยบริษัทเครือ ป. เจริญพันธุ์ โดยเลี้ยงอาหารวันละ 2 ครั้ง ตอนเช้าและตอนเย็น น้ำและอาหารที่เหลือจะถูกดูดทิ้งและเปลี่ยนน้ำในตอนเช้าของทุกวัน อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงและทดลองอยู่ในระหว่าง 26-28 ^{o}C ความยาวช่วงแสงตามธรรมชาติ

2. กุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี (ภาพประกอบ 2)

3. กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี (ภาพประกอบ 3)

4. กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-25 กรัม (ภาพประกอบ 4) และ กุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-25 กรัม (ภาพประกอบ 5) จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

5. หนูขาว (Swiss mouse) จากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ (สรุปแผนผังการทดลองดังภาพประกอบ 6)

1. การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม

1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากรังไข่

1.2 การสกัดไวเทลลินโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

1.3 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดไวเทลลินโดย SDS-PAGE

2. การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินในหนูขาว

3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวด้วยวิธี

3.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion)

3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีส (immuno-electrophoresis)

3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรี (immunocyto-chemistry)

3.4 การตรวจหาไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินด้วยวิธี competitive ELISA

5. การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ในระยะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามตัวเมียหลังวางไข่

6. การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

7. การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากก้านตาในการยับยั้งพัฒนาการของรังไข่โดยตรวจดูจากระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนิน

1. การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม

1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากรังไข่ (ovarian crude extract)

นำกุ้งก้ามกรามที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3 และที่ 4 (โดยสังเกตดูบริเวณส่วนหัวของกุ้งจะพบว่ารังไข่จะมีสีเหลืองส้ม (ภาพประกอบ 7) มาสลบในน้ำเย็นจัด จากนั้นผ่าตัดรังไข่ออกมาแช่แข็งทันทีบนน้ำแข็งแห้ง (dry ice) และเก็บรวบรวมไว้ในตู้เย็น (Revco ultrafreezer) ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นำรังไข่ที่ได้มาบดใน 0.15 M phosphate buffered saline (PBS-Hudson and Hay, 1976) pH 7.2 ที่มี 0.5 mM EDTA (Ethylenediamine tetra-acetic acid, sigma) ในอัตราส่วนรังไข่หนัก

1 กรัมต่อสารละลาย PBS 2 มิลลิลิตรด้วยเครื่อง homogenizer (Janke and Kunkel model Ultra-Turrax T25) แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge, Beckman model J2-21) ที่ความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนที่เป็นไขมันและตะกอน (pellet) ทิ้งไป เก็บส่วนที่เป็นสารละลายสีส้มเข้ม (สารสกัดหยาบจากรังไข่) มาวัดปริมาตรที่ได้ และนำไปสกัดต่อในข้อ 1.2

1.2 การสกัดไวเทลลินโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate-$(NH_4)_2SO_4$)

นำสารละลายสีส้มเข้มที่สกัดได้จากข้อ 1.1 มาตกตะกอนด้วย 45% ของสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต (saturated ammonium sulfate) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที แยกส่วนที่เป็นสารละลายสีส้มใสไปตกตะกอนต่อด้วย 65% ของสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นอีกครั้งที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที แยกส่วนที่เป็นตะกอนเก็บไว้ สำหรับส่วนที่เป็นสารละลายสีส้มใสนำไปปั่นซ้ำอีกครั้ง ทั้งนี้เพื่อแยกตะกอนที่หลงเหลืออยู่ออก แล้วละลายส่วนที่เป็นตะกอนที่ได้จากการปั่น 2-3 ครั้งใน PBS นำมาใส่ถุงไดอะไลซีส (dialysis tube) และทำ dialysis ใน PBS 3 ครั้งนานเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งสารสกัดไวเทลลินที่ได้เก็บไว้ในหลอดที่มีฝาปิด (microcentrifuge tube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

นำสารสกัดไวเทลลินที่ได้มาตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976) เทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) การตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford (1976) มีรายละเอียดดังนี้คือ

ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง (test tube) ปริมาตร 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตรตามลำดับ แล้วเติมน้ำกลั่น (double distilled water) ลงทุกหลอดจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลาย Bradford ลงไปในแต่ละหลอดปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 5-10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer Shimadsu UV-visible UV-240) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟเทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ใช้

ส่วนการตรวจหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดไวเทลลินจะทำเช่นเดียวกัน โดยใช้สารสกัดไวเทลลินที่เจือจางอยู่ในช่วงเดียวกับกราฟมาตรฐาน BSA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดไวเทลลินที่ได้

การเตรียมสารสกัดหยาบจากอัณฑะ (testis) ของกุ้งก้ามกรามและจากรังไข่ของกุ้งชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) และกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*)เพื่อใช้ตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมต่อไวเทลลินเตรียมตามวิธีในข้อ 1.1 การเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งชนิดต่าง ๆ เพื่อการทดสอบปฏิกิริยาแอนติซีรัม เก็บโดยการใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 22-26 ดูดเลือดจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 หรือคู่ที่ 5 เก็บไว้ในหลอดที่มีฝาปิด แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

1.3 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดไวเทลลินโดย SDS-PAGE

การตรวจความบริสุทธิ์ของสารสกัดไวเทลลินและน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลลินโดย SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel-Electrophoresis) โดยนำสารสกัดจากรังไข่และไวเทลลินผสมกับ treatment buffer (0.125 M tris-Cl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 10 % 2-mercaptoethanol) ต้มในน้ำเดือด 1 นาที ใช้โปรตีนปริมาณ 50-70 ไมโครกรัม นำมาแยกใน SDS-PAGE ระบบ gradient โดยความเข้มข้นของ polyacrylamide เท่ากับ 5-15 % (acrylamide, 2.7 % Bis) ละลายใน 0.1 % SDS, 0.25 M tris-glycine buffer pH 8.3 จากนั้นย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 น้ำหนักโมเลกุลของไวเทลลินคำนวณโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 14,000, 18,000, 25,000 43,000, 68,000, 97,000 และ 200,000 ดาลตัน

สำหรับการใช้แอนติซีรัมตกตะกอนไวเทลลินจากสารสกัดไวเทลลิน ทำโดยผสมแอนติซีรัมกับสารสกัดไวเทลลินในอัตราส่วน 2:1 บ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 8000 g เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ได้โดยวิธี Bradford นำมาแยกใน SDS-PAGE เช่นเดียวกับสารสกัดไวเทลลิน ปริมาณโปรตีนที่ใช้ประมาณ 5-10 ไมโคร-กรัม/แถว

2. การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินในหนูขาว (mouse anti-vitellin antiserum)

นำสารสกัดไวเทลลินที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ผสมกับ complete Freund's adjuvant (Sigma) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วฉีดเข้าในช่องท้องของหนูขาวในปริมาตร 100-150 ไมโครลิตร (ประมาณ 3 มิลลิกรัม/ตัว) ต่อ 1 ตัว หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีก 2 ครั้งทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยการฉีดครั้งที่ 2 จะผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดครั้งที่ 3 โดยไม่ต้องผสม adjuvant ในปริมาณเท่าเดิมกับการฉีดครั้งแรก หลังจากฉีดครั้งที่ 3 ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ เก็บรวบรวมซีรัมจากหนูโดยการเจาะเลือดทางเบ้าตาใส่หลอดที่มีฝาปิด แล้วนำไปปั่นที่ 5,000 g เป็นเวลานาน 15 นาทีเพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม แบ่งเก็บซีรัมเป็นส่วน ๆ ในหลอดที่มีฝาปิดและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดลอง การเก็บเลือดครั้งต่อ ๆ ไปจะเก็บทุก ๆ 1-2 เดือน ซึ่งก่อนการเก็บเลือดจะฉีดสารสกัดไวเทลลินจากข้อ 1.2 โดยไม่ต้องผสม adjuvant 1 สัปดาห์ก่อนจะเก็บเลือด

3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว

3.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชั่น (double immunodiffusion)

เทวุ้น (agar-difco) 1.2% ที่ละลายใน PBS ลงบนแผ่นสไลด์ปริมาตร 4.5-5.0 มิลลิลิตร จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นจนวุ้นแข็งตัวแล้ว เจาะวุ้นเป็นหลุมตามแบบที่ต้องการ หยดแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบลงไปในหลุมกลางปริมาตร 10 ไมโครลิตร และหยดแอนติเจนชนิดต่าง ๆ คือ สารสกัดหยาบจากรังไข่ของกุ้ง 5 ชนิดคือ กุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยน้ำจืด กุ้งฝอยน้ำเค็ม กุ้งตะกาด (*M.affinis*) และกุ้งตะกาด (*M.ensis*) หรือตัวอย่างเลือดตัวเมียของกุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยน้ำจืด กุ้งฝอยน้ำเค็ม กุ้งตะกาด (*M.affinis*) และกุ้งตะกาด (*M.ensis*) หรือสารสกัดหยาบจากอัณฑะ และตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ที่ต้องการทดสอบลงในหลุมที่ล้อมรอบหลุมกลางนั้นปริมาตรอย่างละ 10 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในกล่องชื้นที่มีฝาปิดเป็นเวลานาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจดูผลโดยการดูลักษณะของแนวตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจน แล้วล้างโปรตีนส่วนที่ไม่เกิดแนวตะกอนออก โดยแช่ในสารละลาย PBS หลาย ๆ ครั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปย้อมสี 0.1% Coomassie brillant blue ที่ละลายใน 50% methanol และ 10% acetic acid เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง และล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วย destain I (50% methanol + 10% acetic acid) เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงและล้างครั้งที่ 2 ด้วย destain II (5% methanol + 7% acetic acid) จนกระทั่งวุ้นใส และนำไปตากให้วุ้นบนแผ่นสไลด์แห้ง

3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีส (immuno-electrophoresis)

เทวุ้น 1.2% ที่ละลายใน borate buffered saline pH 8.6 ปริมาตร 4.5-5.0 มิลลิลิตรลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้เย็นจนวุ้นแข็งตัว แล้วเจาะวุ้นให้เป็นหลุมกลม ๆ 2 หลุม และเป็นร่องตรงกลางสไลด์ หยดสารสกัดหยาบจากรังไข่และตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศเมียลงในหลุมแต่ละหลุม แล้วหยดสีฟีนอลเรด (phenol red) ลงไปหยดเล็ก ๆ เพื่อเป็นเครื่องหมายสำหรับการเคลื่อนที่ของโปรตีนลงในหลุมใดหลุมหนึ่ง หลังจากนั้นวางแผ่นสไลด์ลงบนอีเล็กโตรโฟรีซีสแชมเบอร์ (EP chamber) ที่มี borate buffered saline pH 8.6 ปล่อยกระแสไฟจำนวน 10 มิลลิแอมแปร์ (10 mA) ต่อสไลด์ 1 แผ่นให้กระแสไฟฟ้าผ่านเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จนกระทั่งพบว่าสีฟีนอลเรดเคลื่อนที่เกือบถึงปลายสไลด์อีกด้านหนึ่ง จากนั้นนำสไลด์ออกจาก EP chamber ดูดวุ้นออกจากรางตรงกลางสไลด์ แล้วเติมแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบลงไปในรางนั้น นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 48-72 ชั่วโมงในกล่องชื้นที่มีฝาปิด หลังจากนั้นดูแนวตะกอนที่เกิดขึ้น แล้วล้างด้วย PBS หลาย ๆ ครั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เพื่อล้างโปรตีนส่วนที่ไม่เกิดแนวตะกอนออก นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสีตามขั้นตอนเหมือนกับการย้อมสีในข้อ 3.1

3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรี (immunocyto-chemistry)

ผ่าตัดรังไข่ของกุ้งก้ามกรามระยะที่ 2 จากกุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยการสลบในน้ำที่เย็นจัด แล้วทำให้รังไข่คงรูปด้วย Bouin's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างน้ำโดยการล่อยให้น้ำไหลผ่านนาน 24 ชั่วโมง และดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยเริ่มจากความเข้มข้น 70%, 90% และ 95% ethyl alcohol และ n-buthyl alcohol ตามลำดับ จากนั้นฝังรังไข่ในพาราพลาสต์ (paraplast) แล้วนำรังไข่มาตัดเป็นชิ้นบาง ๆ (section) ให้มีความหนาขนาด 8 ไมโครเมตรด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) และนำเซคชั่นที่ได้มาเรียงติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วย gelatin หลังจากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาผ่านกระบวนการทางอิมมูโนไซโตเคมีสทรี (immunocytochemistry) ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase โดยเริ่มต้นจากนำสไลด์มาละลายพาราพลาสต์ออกด้วยไซลีน (xylene) ผ่านแอลกอฮอล์ในความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจาก n-buthyl alcohol, 95%, 90% และ 70% alcohol ตามลำดับ ผ่านน้ำกลั่นและครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS จากนั้นหยดด้วย 10% calf serum (Sigma) ที่ละลายใน PBS ลงบนเซคชั่น ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อป้องกันการจับตัวของโปรตีนแบบไม่จำเพาะเนื้อเยื่อ จากนั้นหยด mouse anti-

vitellin antiserum (ที่ได้จากข้อ 2) ที่มีความเจือจาง 1 ต่อ 4,000 ใน 10% calf serum ที่รวมกับเลือดของกุ้งก้ามกรามตัวผู้ และสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ลงบนเนื้อเยื่อ สลับกับหยด mouse anti-vitellin antiserum ดังกล่าวที่ดูดซับเพิ่มเติมด้วยสารสกัดไวเทลลิน (ความเข้มข้นของสารสกัดไวเทลลิน 5 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) แล้วนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 4,000 เช่นกัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงในจานแก้วชื้น ล้างด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ15 นาที หลังจากนั้นหยด GAM-HRP (goat anti-mouse IgG H-and L chain horseradish peroxidase conjugate-Biorad) ที่เจือจาง 1 ต่อ 1,000 ใน 10% calf serum บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงในจานแก้วชื้น และนำมาล้างด้วย 0.5% blotto (Carnation non-fatdry milk ที่ละลายใน PBS) 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ผ่าน PBS ก่อนจุ่มลงในสารละลายซับสเตรท (substrate) ซึ่งประกอบด้วย 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2-Sigma) ที่มี 0.03% diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB-Sigma) ที่ละลายใน PBS เป็นเวลานาน 5 นาทีจากนั้นดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน นำมาย้อมสีด้วย 0.02% eosin ที่ละลายในแอลกอฮอล์ 95% และทำเป็นสไลด์ถาวร (ขั้นตอนของปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 7)

3.4 การตรวจหาไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี ELISA (indirect immuno-peroxidase method)

การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติซีรัมทำใน Nunc Maxisorp 96 well microtiter plate โดยใส่สารสกัดไวเทลลินจากข้อ 1.2 ที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมของ microtiter plate บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 12-24 ชั่วโมงในกล่องชื้นที่มีฝาปิด ทิ้งให้ไวเทลลินจับกับก้นหลุมของ plate จากนั้นเติม 0.2% glutaraldehyde ที่ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุมของ plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุมจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วย 0.5% blottoใน PBS ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติมแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวแต่ละตัวซึ่งเจือจางด้วย 5% blotto อัตราส่วน 1:2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำ serial dilution บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมงเหมือนกับครั้งแรก เมื่อได้เวลานำออกมาล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วหยด GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horse peroxidase conjugate-Biorad) ที่เจือจาง 1:1000 ใน 5% blotto ที่ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมทุกหลุม บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ

4 องศาเซลเซียสนาน 12-24 ชั่วโมงเหมือนเช่นเดิม จากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และครั้งสุดท้ายด้วยสารละลาย PBS เติมสารละลาย O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD-Sigma) ที่ละลายใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ในอัตราส่วน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มี 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2) ผสมอยู่ลงไปหลุมละ 70 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกริยาด้วย 1N sulphuric acid (H_2SO_4) ปริมาตร 70 ไมโครลิตรต่อหลุมทันทีเมื่อครบเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader, BIO-TEK instruments EL 312 e คำนวณหาไตเตอร์ของแอนตีซีรัม (ขั้นตอนของปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 8)

4.การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินด้วยวิธี competitive ELISA

ใส่สารสกัดไวเทลลินที่ได้จากข้อ 01.2 ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของถาด ELISA บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 12-24 ชั่วโมงในกล่องชื้นที่มีฝาปิด หลังจากนั้นตรึงด้วย 0.2% glutaraldehyde และบล็อกด้วย 0.5% blotto ตามกระบวนการเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4 เติมสารสกัดไวเทลลินที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำมาเจือจางให้อยู่ในช่วง 1:10 ไปจนถึง 1:2,500,000 ใน 5%blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม หรือตัวอย่างเลือดของกุ้งเพศผู้ที่โตเต็มวัย และตัวอย่างเลือดของกุ้งเพศเมียที่มีรังไข่เจริญระยะที่ 3-4 ของกุ้งก้ามกราม โดยตัวอย่างเลือดทั้ง 2 ชนิดนี้นำมาเจือจางให้อยู่ในช่วง 1:10 ไปจนถึง 1:2,500,000 เช่นเดียวกัน จากนั้นเติมแอนติซีรัมต่อไวเทลลินที่เจือจาง 1:80,000 ใน 5% blotto ที่ละลายใน PBS (ซึ่งหาได้จากข้อ 3.4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ เหมือนข้อ 3.4 เขียนกราฟเปรียบเทียบระหว่างปริมาณไวเทลลินมาตรฐานกับปริมาณไวเทลโลเจนินในตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมีย (ขั้นตอนของปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 9)

5. การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดกับการพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามตัวเมียหลังวางไข่

นำกุ้งหลังวางไข่จำนวน 40 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่ตัดตาและกลุ่มที่ตัดตา เก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 50-100 ไมโครลิตรต่อตัวจากกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกที่ไม่ตัดตา เก็บ

ตัวอย่างเลือดครั้งแรกหลังจากกุ้งวางไข่ได้ 4 วัน และครั้งต่อ ๆ ไปจะเก็บเลือดอีกจำนวน 11 ครั้ง ติดต่อกันทุก ๆ 2 วัน รวมเวลาได้ 26 วันหลังจากวางไข่ สำหรับกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มตัดตาจะเก็บตัวอย่างเลือดครั้งแรกหลังวางไข่ได้ 4 วันเหมือนกับกลุ่มแรก หลังจากนั้นจะตัดตา และครั้งต่อ ๆ ไปจะเก็บตัวอย่างเลือดเหมือนเช่นเดียวกับกลุ่มแรก การเก็บตัวอย่างเลือดทำโดยเจาะเก็บเลือดจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 หรือคู่ที่ 5 ปริมาณ 50-100 ไมโครลิตรใส่หลอดที่มีฝาปิดแล้วแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง จากนั้นเก็บรวบรวมไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาตรวจสอบ เมื่อเจาะเลือดครบกำหนดเวลาแล้ว นำกุ้งมาสลบในน้ำเย็นจัดเพื่อชั่งน้ำหนักตัว ผ่าตัดรังไข่กับตัวอ่อนหน้าท้องออก ชั่งน้ำหนักรังไข่และตัวอ่อนหน้าท้อง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาดัชนีของรังไข่ (ovarian index-OI) แล้วบันทึกลักษณะสีและระยะการเจริญของรังไข่

น้ำหนักตัวสุทธิ = น้ำหนักตัวทั้งหมด - น้ำหนักตัวอ่อนหน้าท้อง
ดัชนีของรังไข่ = น้ำหนักของรังไข่ / น้ำหนักตัวสุทธิ x 100 เปอร์เซนต์

สำหรับตัวอย่างเลือดที่เก็บได้จะนำมาตรวจหาระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA ตามวิธีในข้อ 4 โดยเทียบกับสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งเจือจาง 1:10 ถึง 1:2,500,000 เท่า คำนวณหาปริมาณของไวเทลโลเจนินในตัวอย่างเลือดของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม และเขียนกราฟเปรียบเทียบระดับปริมาณของไวเทลโลเจนิน

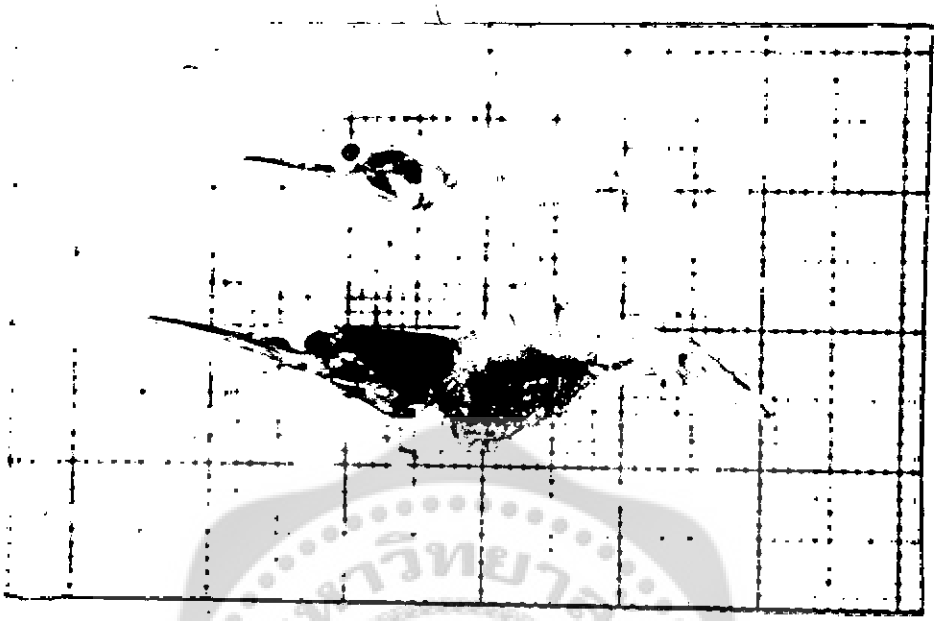
6. การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

ตัดก้านตากุ้งก้ามกรามตัวเมีย โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของก้านตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่แล้วแช่แข็งทันทีในน้ำแข็งแห้ง รวบรวมก้านตากุ้งเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำก้านตาที่ตัดได้จำนวน 250 ก้านตามาผ่าตัดเปลือกหุ้มตาออก แล้วนำมาบดในหลอดแก้วบด (glass homogenizer) ในน้ำเกลือสำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*-isotonic physiological saline pH 7.6, Nagamine et al., 1980) ในอัตราส่วน 1 ก้านตาต่อสารละลายน้ำเกลือ 50 ไมโครลิตรและนำไปปั่นที่ความเร็วที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำใสเก็บไว้ แล้วสกัดส่วนที่เป็นตะกอนซ้ำด้วยสารละลายน้ำเกลือและนำไปปั่นเช่นเดียวกันกับตอนแรก แยกส่วนน้ำใสที่ได้รวมกับส่วนแรกโดยปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 10 ก้านตา/มิลลิลิตร และแบ่งออกเป็นส่วนย่อย ๆ ใส่ในหลอดขนาดเล็กที่มีฝาปิดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

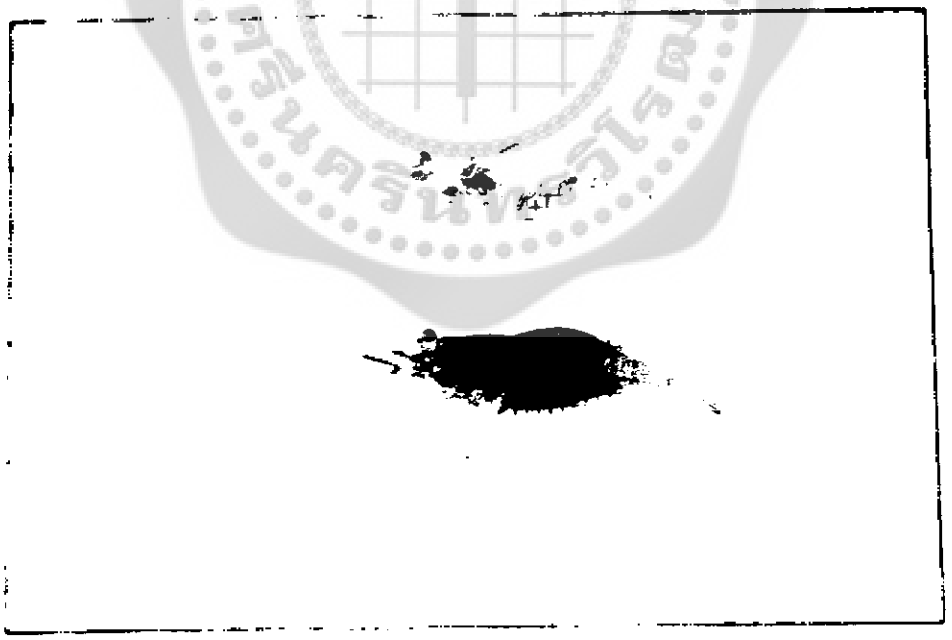
7. การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากก้านตาในการยับยั้งพัฒนาการของรังไข่โดยตรวจดูจากระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือด

นำกุ้งหลังจากวางไข่ได้ 4 วันมาตัดตาจำนวน 40 ตัว จากนั้นเลี้ยงต่อไปอีกประมาณ 7 วันเพื่อให้รังไข่อยู่ในระยะกำลังเจริญ แล้วแบ่งกุ้งออกเป็น 2 กลุ่มเท่า ๆ กัน เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งทั้ง 2 กลุ่มปริมาตร 50-100 ไมโครลิตรต่อตัว หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดครั้งแรกเสร็จแล้ว กลุ่มที่ 1 ฉีดสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) จากข้อ 6 ในอัตราส่วน 1 ตาต่อตัวในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว แล้วทิ้งระยะไว้นาน 12 ชั่วโมงจึงเก็บตัวอย่างเลือดอีกครั้ง และฉีดสารสกัดจากก้านตาอีกครั้งในปริมาณเท่าเดิม จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือด 4 ครั้งทุก ๆ 4 ชั่วโมง และเก็บอีก 2 ครั้งทุก 8 ชั่วโมง สำหรับกุ้งในกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดน้ำเกลือปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัว การฉีดและการเก็บตัวอย่างเลือดทำเหมือนกับกลุ่มที่ 1 หลังการเก็บตัวอย่างเลือดครั้งสุดท้ายจะนำกุ้งมาสลบในน้ำเย็นจัด ชั่งน้ำหนักตัว ผ่าตัด ชั่งน้ำหนักตัวอ่อนที่ติดหน้าท้องและรังไข่ คำนวณหาดัชนีของรังไข่ ตรวจหาปริมาณของไวเทลโลเจนินในตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ในแต่ละตัวของกุ้งทั้ง 2 กลุ่มโดยวิธี competitive ELISA เช่นเดียวกับข้อ 5

ภาพประกอบ 1 แสดงภาพกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)
รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

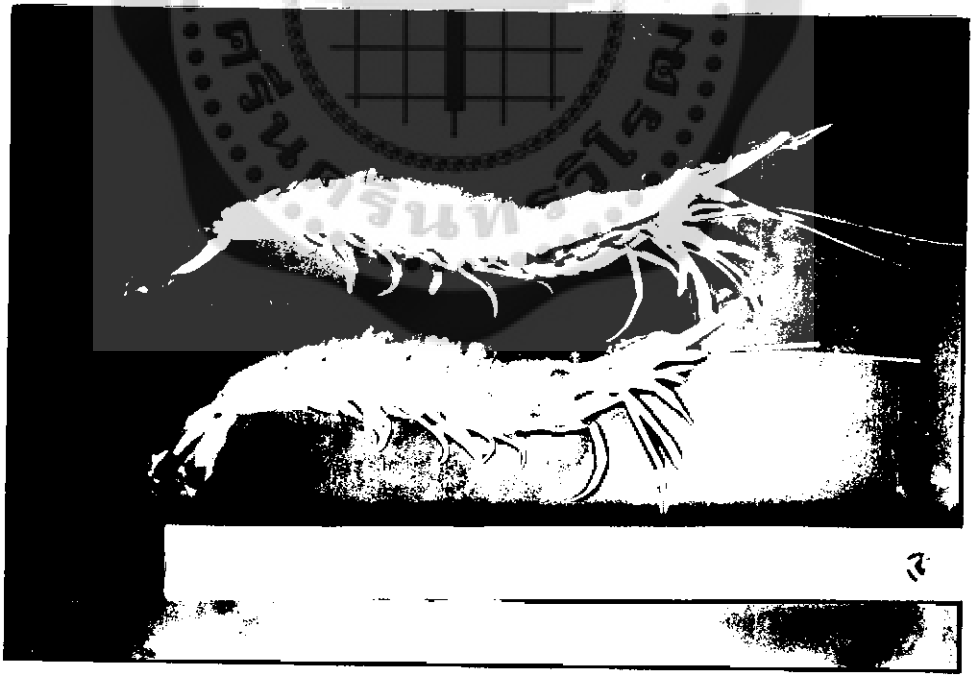


ภาพประกอบ 2 แสดงภาพกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*)
รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

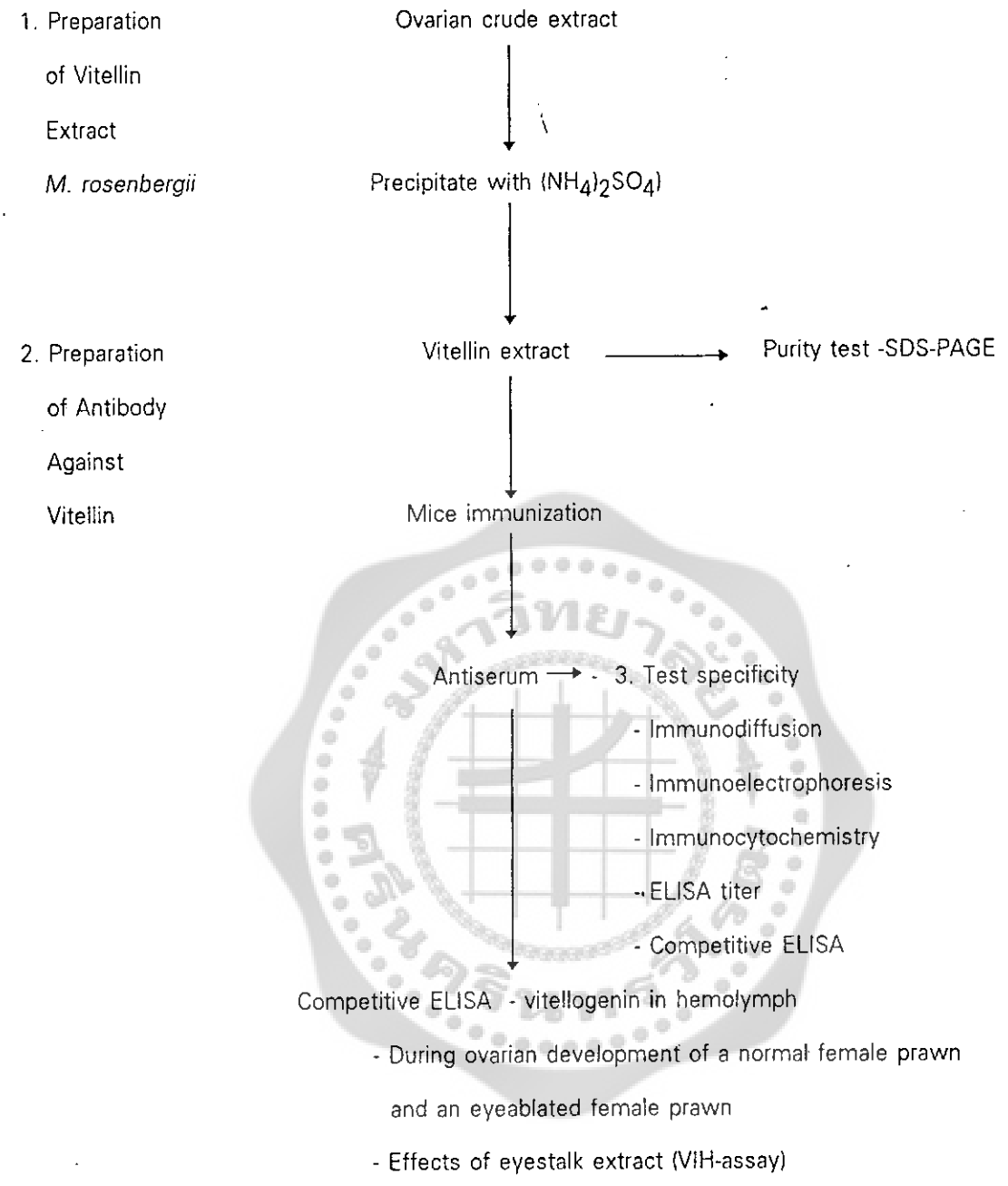


ภาพประกอบ 3 แสดงภาพกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*)
รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

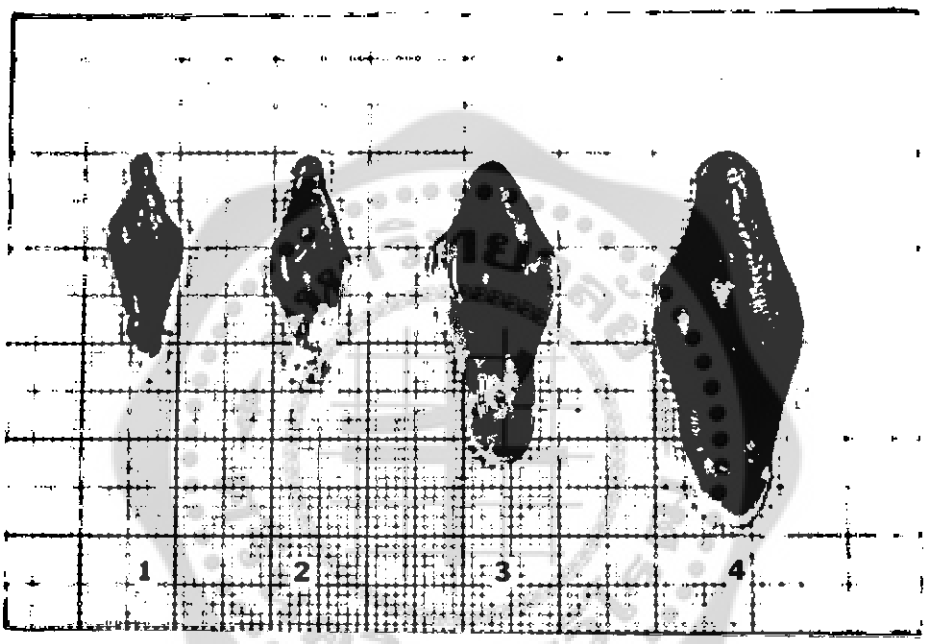
ภาพประกอบ 4 แสดงภาพกุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*)
รูปบน เพศเมีย รูปล่าง เพศผู้



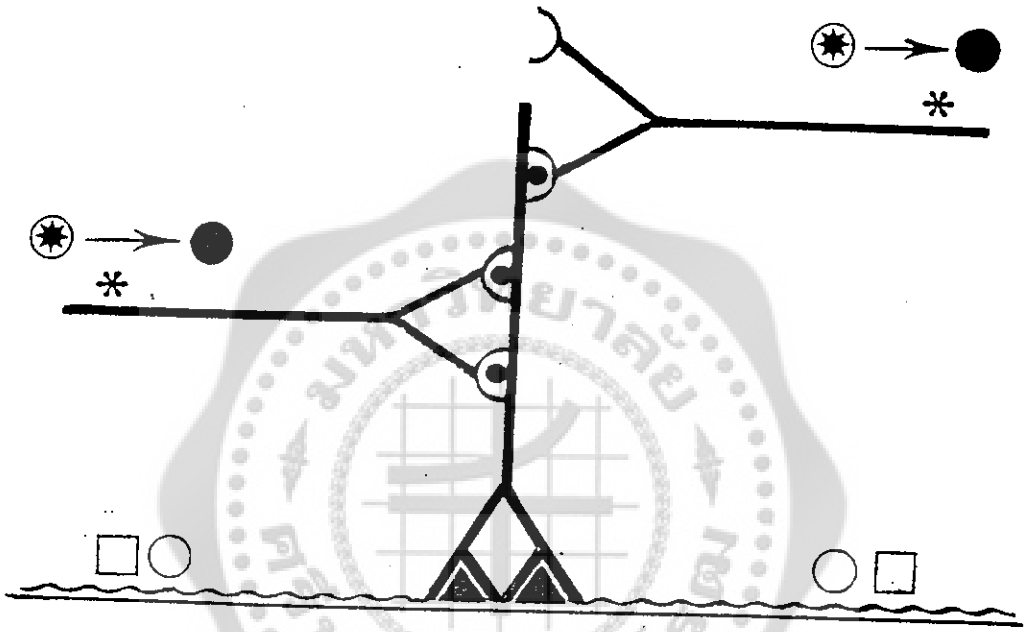
ภาพประกอบ 5 แสดงภาพกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*)
รูปบน เพศเมีย รูปล่าง เพศผู้



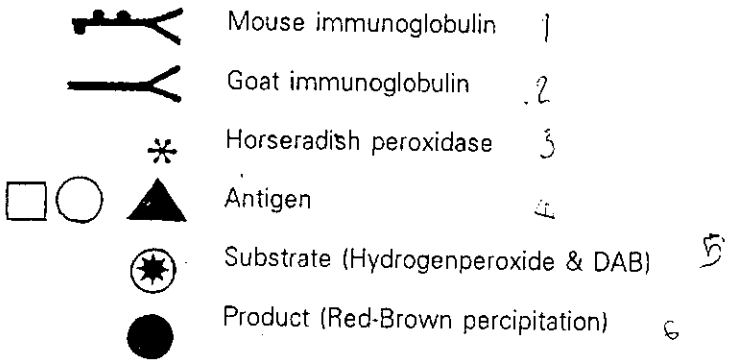
ภาพประกอบ 6 แสดงขั้นตอนการผลิตและทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินจากรังไข่ เพื่อใช้ในการตรวจวัดระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามโดยวิธี competitive ELISA

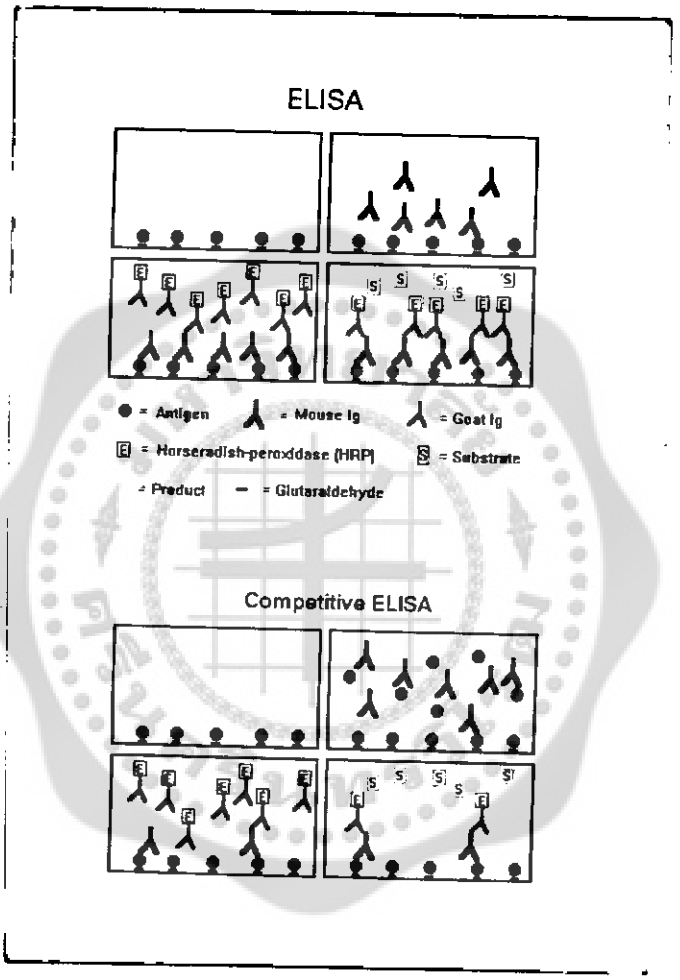


ภาพประกอบ 7 แสดงลักษณะการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 ของกุ้งก้ามกราม (จากซ้ายไปขวา)



ภาพประกอบ 8 แสดงปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีโดยวิธีอินไดเรคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method) (สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์. 2535)





ภาพประกอบ 9 แสดงหลักการของ (1) ELISA (indirect immunoperoxidase method) และ (2) competitive ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีและแอนติเจน โดยใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase ติดกับแอนติบอดีตัวที่ 2 (enzyme-labelled secondary antibody)

ผลการวิจัย

1. การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดไวเทลลินโดย SDS-PAGE

จาก SDS-PAGE (รูปที่ 10) จะเห็นได้ว่าไวเทลลินที่แยกโดยการตกตะกอนสารสกัดจากรังไข่ด้วยแอนติซีรัมต่อไวเทลลินประกอบด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อย น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97, 81, 76 และ 73 ตามลำดับ ซึ่งการเคลื่อนที่ตรงกับไวเทลลินในสารสกัดจากรังไข่

สำหรับหน่วยย่อยที่ 3 ของไวเทลลินพบว่า แถบการติดสีกว้างและเข้มกว่าหน่วยย่อยอื่นในทุก ๆ แนวโปรตีนที่แยกได้ คาดว่าในองค์ประกอบของไวเทลลินรูปแบบต่าง ๆ อาจมีหน่วยย่อยที่ 3 เป็นองค์ประกอบหลักและโปรตีนอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบรอง

ในสารสกัดหยาบจากรังไข่จะพบแนวตะกอนบาง ๆ ติดสีระดับต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนหลักในสารสกัดจากรังไข่เป็นไวเทลลินประมาณได้มากกว่า 90 % และการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้กับไวเทลลินมากขึ้น เพราะแนวตะกอนจางเหล่านั้นส่วนใหญ่หายไปหรือจางลงมาก

2. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้ในหนูขาว (mouse anti-vitellin antiserum)

2.1 การตรวจความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immuno-diffusion)

จากการนำแอนติซีรัมที่ได้จากการปลูกภูมิคุ้มกัน (immunize) ในหนูขาว มาทำปฏิกิริยาตกตะกอนในวุ้นกับแอนติเจนที่ได้จากสารสกัดชนิดต่าง ๆ คือ สารสกัดหยาบจากรังไข่ของกุ้งชนิดต่าง ๆ หรือจากตัวอย่างเลือดของกุ้งตัวเมีย ได้แก่ กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) กุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*) กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) และสารสกัดหยาบจากอัณฑะ หรือจากตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ พบว่าแอนติซีรัมที่ได้จากการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูทั้ง 9 ตัวด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกรามนั้น แอนติซีรัมจากหนูเพียง 5 ตัวให้แนวตะกอนชัดเจน การทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้เฉพาะแอนติซีรัมจากหนู 5 ตัวนี้เท่านั้น ซึ่งจะให้แนวตะกอนหลักเชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ระหว่างแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่หรือจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยน้ำจืด (ภาพประกอบ 11.1) และให้แนวตะกอนเชื่อมต่อเพียงบางส่วนระหว่างแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่หรือจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยน้ำเค็ม (ภาพประกอบ 11.1) แต่

ไม่ให้แนวตะกอนกับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ และจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งตะกาด (*M. affinis*) กุ้งตะกาด (*M. ensis*) รวมทั้งสารสกัดจากอัณฑะและจากตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกราม เพศผู้ (ภาพประกอบ 11.1) นอกจากแนวตะกอนหลักแล้วแอนติซีรัมนี้ยังให้แนวตะกอนเล็ก ๆ บาง ๆ กับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยน้ำจืด และจากสารสกัดจากอัณฑะของกุ้งก้ามกราม (ลูกศรในภาพประกอบ 11.1) หรือจากตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศเมีย เพศผู้ และกุ้งฝอยน้ำจืดเพศเมีย (*ในภาพประกอบ 11.1)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นความคล้ายคลึงกันระหว่างแอนติเจนในสารสกัดจากรังไข่ หรือในตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งทั้งสองชนิดคือ กุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยน้ำจืดซึ่งแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินนั้นให้แนวตะกอนหลักเชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ (ภาพประกอบ 11.1) ในขณะที่แนวตะกอนที่เกิดขึ้นจากแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ หรือจากตัวอย่างเลือดของกุ้งฝอยน้ำเค็มเชื่อมต่อกันเพียงบางส่วนกับแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่ หรือในเลือดของกุ้งก้ามกราม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติเจนจากกุ้งฝอยน้ำเค็มมีความคล้ายคลึงเพียงบางส่วนกับแอนติเจนจากกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยน้ำจืด (ภาพประกอบ 11.1) แอนติซีรัมนี้ไม่ให้แนวตะกอนกับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่หรือจากตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งตะกาด 2 ชนิด (*M. affinis* และ *M. ensis*) ซึ่งแสดงว่าไวเทลลินในกุ้งทะเล (family Panaeidae) มีลักษณะแตกต่างจากไวเทลลินของกุ้งใน family Palaemonidae อย่างมาก และแอนติซีรัมนี้ไม่ให้แนวตะกอนกับสารสกัดจากอัณฑะและตัวอย่างเลือดกุ้งก้ามกรามเพศผู้ เป็นการยืนยันว่าในกุ้งเพศผู้ไม่มีการสร้างไวเทลโลเจนินและไวเทลลิน (ภาพประกอบ 11.1)

เมื่อดูดซับแอนติซีรัมนี้ด้วยตัวอย่างเลือดเพศผู้หรือสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามตัวผู้ พบว่าแนวตะกอนเล็ก ๆ บาง ๆ จะหายไป (ภาพประกอบ 11.2 และ ภาพประกอบ 11.3) ดังนั้นการดูดซับแอนติซีรัมต่อไวเทลลินด้วยสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนหรือเลือดกุ้งตัวผู้สามารถกำจัดแอนติบอดีส่วนใหญ่ที่จับกับโปรตีนอื่น ๆ ในรังไข่และเลือดได้

2.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีส (immunoelectrophoresis)

จากการนำแอนติซีรัมที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชันมาทดสอบต่อโดยวิธีอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีส พบว่าจะให้ผลคล้ายกันคือ แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินจากรังไข่

ของกุ้งก้ามกรามจะให้แนวตะกอนหลัก 2 แนวเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจากสารสกัดจากรังไข่และตัวอย่างเลือดเพศเมียของกุ้งก้ามกราม ซึ่งแนวตะกอนหลักนี้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน (ภาพประกอบ 12.1) ในขณะที่มีแนวตะกอนเพิ่มขึ้นอีก 4 แนวในสารสกัดจากรังไข่และมีแนวตะกอนบาง ๆ เล็ก ๆ เพิ่มขึ้นอีก 1 แนวในตัวอย่างเลือด (ภาพประกอบ 12.1)

เมื่อดูดซับแอนติซีรัมนี้ด้วยตัวอย่างเลือดเพศผู้และสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อน พบว่าแนวตะกอนที่เพิ่มขึ้นในสารสกัดจากรังไข่นั้นจะหายไป เหลือเพียงแนวตะกอนหลัก 2 แนวเหมือนกับแนวตะกอนที่พบในเลือดกุ้งเพศเมีย (ภาพประกอบ 12.2 และภาพประกอบ 12.3) และมีแนวตะกอนบาง ๆ ที่พบเฉพาะในสารสกัดจากรังไข่เหลือเพียงแนวเดียว

2.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี (immunocytochemistry)

การทดสอบวิธีนี้เป็นการทดสอบเพื่อตรวจการจับของแอนติบอดีกับไวเทลลินภายในเซลล์ไข่ของกุ้งก้ามกรามโดยวิธี indirect immunoperoxidase method ซึ่งจากการใช้เซคชั่นจากรังไข่ของกุ้งก้ามกรามทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินดูดซับด้วยตัวอย่างเลือดเพศผู้รวมกับสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ พบตำแหน่งที่มีไวเทลลินสะสมอยู่ในเซลล์ไข่ตั้งแต่ระยะที่ 1 (primary vitellogenesis oocyte) ขึ้นไป (ภาพประกอบ 13.1 และ 14.1) แต่จะไม่พบปฏิกิริยาของแอนติซีรัมใน oogonia และ primary oocyte ซึ่งเป็นระยะของเซลล์ไข่ที่ยังไม่มีการสร้างหรือสะสมไวเทลลินในเซลล์

เมื่อใช้แอนติซีรัมที่ดูดซับด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ทำปฏิกิริยากับเซคชั่นของรังไข่ที่อยู่ถัดไป พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดจากแอนติซีรัมจำเพาะต่อไวเทลลินในเซลล์ไข่หายไปทั้งหมด (ภาพประกอบ 13.2 และ 14.2) แสดงว่าสารสกัดจากรังไข่สามารถดูดซับแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลลินออกทั้งหมด ดังนั้นปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อเซลล์ไข่ระยะตั้งแต่ระยะที่มีการสะสมไข่แดงระยะที่ 1 เป็นต้นไป เกิดเนื่องจากการจับตัวอย่างจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลลินกับไวเทลลินในเซลล์ไข่

2.4 การตรวจหาคุณภาพของแอนติซีรัมโดยวิธี ELISA (indirect immunoperoxidase method)

การทดสอบวิธีนี้เป็นการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมจำเพาะต่อไวเทลลินโดยวิธี ELISA พบว่า mouse anti-vitellin antiserum ที่ได้จากหนูทั้ง 9 ตัว ซึ่งปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ ซีรัมจากหนู 5 ตัว มีค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมใกล้เคียงกันคือ สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไวเทลลินในซีรัมที่เจือจางสูงสุดที่ตรวจพบได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ 0.1 เมื่อเจือจาง

แอนติซีรัม 10-20 ล้านเท่า และแอนติซีรัมจากหนูเหล่านี้ให้ผลจากการทดสอบด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชันคล้ายคลึงกัน จึงนำมาผสมรวมกันเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนหนูที่เหลืออีก 4 ตัวนั้น ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 0.1 เมื่อเจือจางน้อยกว่าประมาณ 2.5 ล้านเท่า จึงไม่นำมาใช้ในการทดลอง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการวัดปริมาณของไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA

จากการใช้สารสกัดไวเทลลินแทนที่การจับของแอนติบอดีกับไวเทลลินที่ติดอยู่บนถาด ELISA พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารสกัดไวเทลลินที่ให้กราฟเส้นตรงอยู่ในช่วง 100 นาโนกรัมถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่สามารถใช้วัดปริมาณไวเทลลินได้ และจากการทดสอบโดยการใช้ตัวอย่างเลือดเพศเมีย หรือตัวอย่างเลือดเพศผู้ของกุ้งก้ามกรามในความเข้มข้นต่าง ๆ แทนสารสกัดไวเทลลินมาตรฐาน (ภาพประกอบ 10) พบว่าตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศเมียที่ระดับความเข้มข้นสูงจะสามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ติดอยู่บนถาด ELISA ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้นั้นพบว่าจะไม่มีผลต่อการจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนบนถาด ELISA ไม่ว่าจะใช้เลือดที่ระดับความเข้มข้นสูงเท่าไรก็ตาม (ภาพประกอบ 15) แสดงให้เห็นถึงลักษณะทางอิมมูโนเคมีสทรีของไวเทลลินในรังไข่กับไวเทลลินในเลือดกุ้งเพศเมียมีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นแอนติซีรัมนี้จึงสามารถใช้ในการตรวจวัดระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศเมียโดยเทียบกับปริมาณไวเทลลินมาตรฐานได้

4. การตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ระยะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามหลังวางไข่

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกรามตัวเมียปกติและที่ตัดตา มาตรวจหาระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA พบว่าในกลุ่มของกุ้งปกติหลังจากวางไข่ได้ 4-10 วัน ปริมาณของไวเทลโลเจนินจะอยู่ในระดับต่ำและค่อนข้างคงที่ (น้อยกว่า 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนในช่วงหลังวางไข่ 12-26 วัน ระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ภาพประกอบ 16, ตาราง 1) ค่าดัชนีของรังไข่อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งการเจริญของรังไข่อยู่ในระยะที่ 1 และเริ่มต้นของระยะที่ 2 เท่านั้น

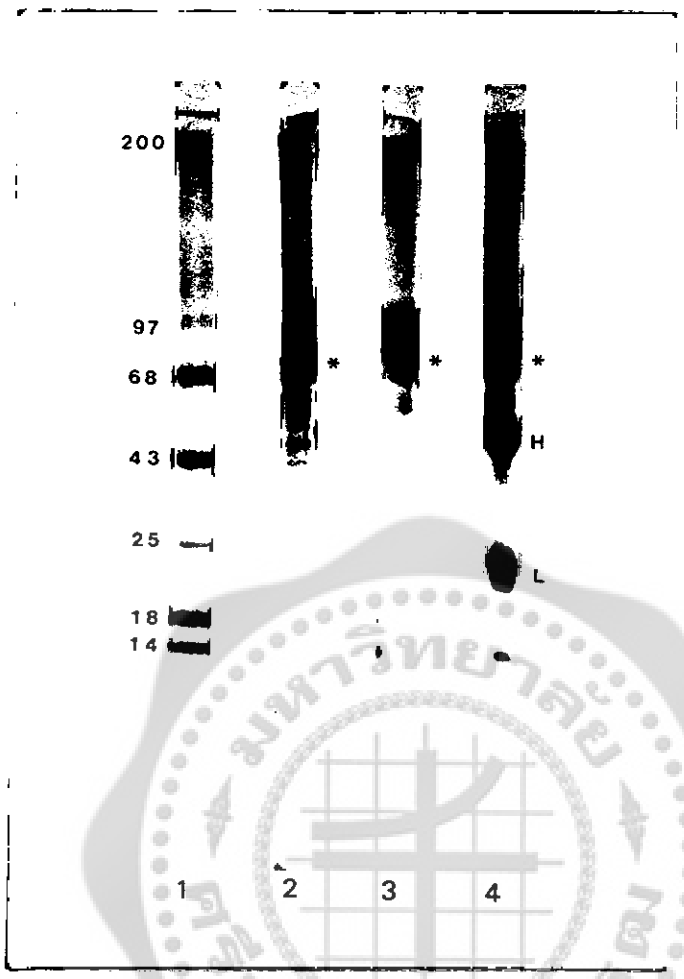
สำหรับกุ้งกลุ่มที่ตัดตาหลังจากวางไข่ 4 วัน พบว่าปริมาณของไวเทลโลเจนินเริ่มต้นจะอยู่ในระดับต่ำมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับกุ้งกลุ่มแรก คือเท่ากับ 0.215 $\pm$ 0.133 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นปริมาณของไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดมีค่าเฉลี่ยเท่า

กับ 8.374 ± 2.611 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหลังจากวางไข่ 18 วัน หลังจากนั้นก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว กุ้งลอกคราบและวางไข่ครั้งต่อไปในวันที่ 23-24 (ภาพประกอบ 16, ตาราง 2) เป็นที่น่าสังเกตุว่า ในกุ้งที่ตัดตาออกทั้งสองข้างนั้นระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีความแปรปรวนสูงกว่ากุ้งปกติหลังจากวางไข่ เนื่องจากอัตราการเพิ่มขึ้นของไวเทลลินในกุ้งแต่ละตัวมีอัตราต่างกัน (ตาราง 2)

5. การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากก้านตาในการยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ โดยตรวจดูจากระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนิน

จากการตรวจวัดปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดโดยวิธี competitive ELISA จากตัวอย่างเลือดของกุ้งเพศเมียที่ตัดตาออกทั้งสองข้างหลังจากวางไข่ 4 วัน ในกลุ่มที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ พบว่าหลังจากตัดตาได้ 7 วัน ปริมาณของไวเทลโลเจนินเริ่มต้น (ที่เวลา 0 ชั่วโมง) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.356 ± 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 3) และเมื่อฉีดด้วยน้ำเกลือในปริมาณ 100 ไมโครลิตร/ตัว 2 ครั้ง พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดยังคงเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง (ภาพประกอบ 17, ตาราง 3)

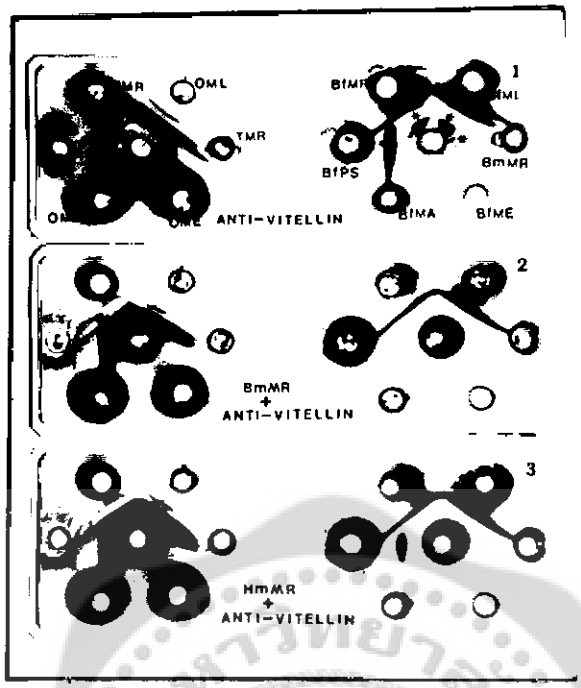
ส่วนในกลุ่มที่ฉีดสารสกัดจากก้านตาหลังจากวางไข่ 11 วัน พบว่าปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดเมื่อเริ่มทดลอง (ที่ 0 ชั่วโมง) มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับไวเทลโลเจนินของกุ้งกลุ่มแรก คือเท่ากับ 4.748 ± 1.067 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4) เมื่อฉีดสารสกัดจากก้านตาในปริมาณ 1 ก้านตา/ตัว/ครั้ง และเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากฉีดสารสกัด 12 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของไวเทลโลเจนินลดลงจากระดับเริ่มต้นประมาณ 0.584 ± 0.855 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4) หลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาครั้งที่ 2 ในปริมาณเท่าเดิม พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดจะลดลงถึงระดับต่ำสุดประมาณชั่วโมงที่ 28 ลดลงประมาณ 2.412 ± 1.245 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเทียบกับชั่วโมงที่เริ่มต้น และหลังจากนั้นระดับไวเทลโลเจนินจะเพิ่มสูงขึ้นจนมีระดับใกล้เคียงกับระดับไวเทลโลเจนินเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (ภาพประกอบ 17, ตาราง 4)



รูปที่ 10 แสดง SDS-PAGE

1. โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลขนาดต่าง ๆ (กิโลดาลตัน)
2. สารสกัดหยาบจากรังไข่
3. สารสกัดไวเทลลิน
4. ตะกอนที่ได้จากปฏิกิริยาของแอนติซีรัมกับสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่

* ไวเทลลิน, (H)-heavy chain (L)-light chain ของแอนติบอดี



ภาพประกอบ 11 แสดงดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion) ระหว่างแอนติซีรัม (หลุมกลาง) กับแอนติเจนต่าง ๆ

9.1 anti-vitellin antiserum

9.2 anti-vitellin antiserum ดูดซับด้วยเลือดกุ้งเพศผู้

9.3 anti-vitellin antiserum ดูดซับด้วยสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งเพศผู้

OMR สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

OML สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*)

TMR สารสกัดจากอัณฑะของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

OME สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*)

OMA สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*)

OPS สารสกัดจากรังไข่ของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*)

BfMR เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

BfML เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*)

BmMR เลือดจากกุ้งเพศผู้ของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

HmMR สารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนจากกุ้งเพศผู้ของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*)

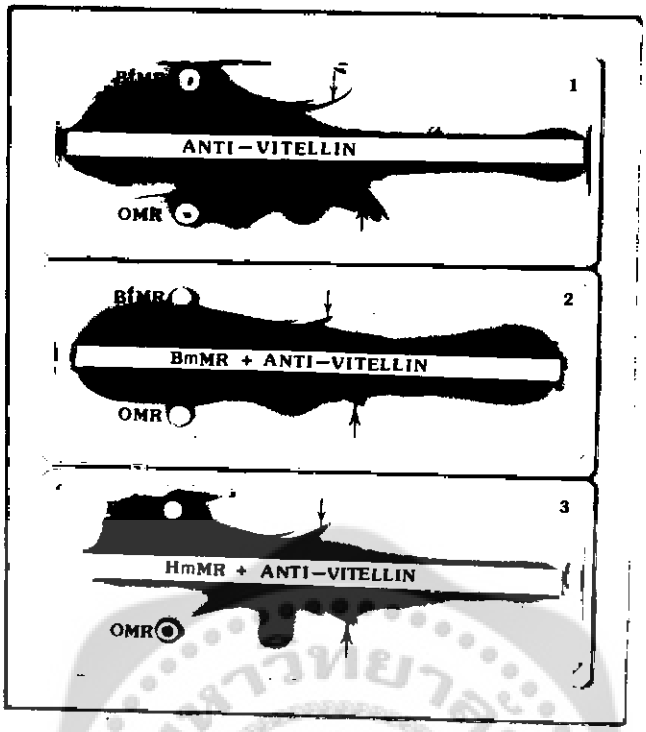
BfME เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งตะกาด (*M. ensis*)

BfMA เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งตะกาด (*M. affinis*)

BfPS เลือดจากกุ้งเพศเมียของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*)

ลูกศร แสดงแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่น ๆ จากรังไข่และสารสกัดจากอัณฑะ

* แสดงแนวตะกอนที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ในเลือด



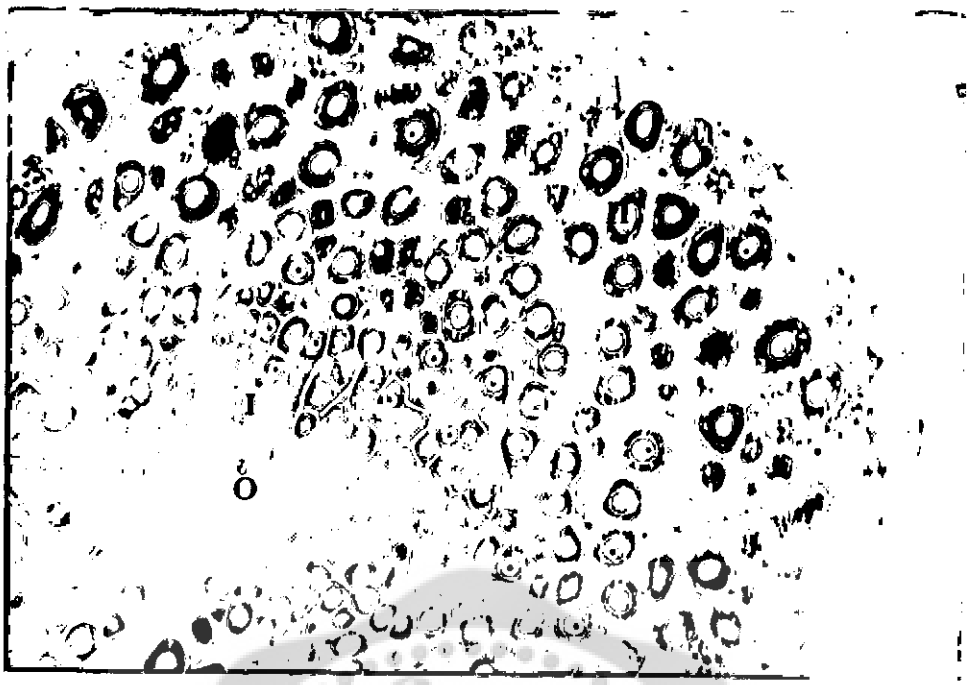
ภาพประกอบ 12 แสดงอิมมูโนอีเล็กโตรโฟรีซีส (immunoelectrophoresis) ของแอนติซีรัม (ในร่อง) กับตัวอย่างเลือดของกุ้งเพศเมีย (BfMR) และสารสกัดจากรังไข่ (OMR) ของกุ้งก้ามกราม

10.1 Anti-vitellin antiserum

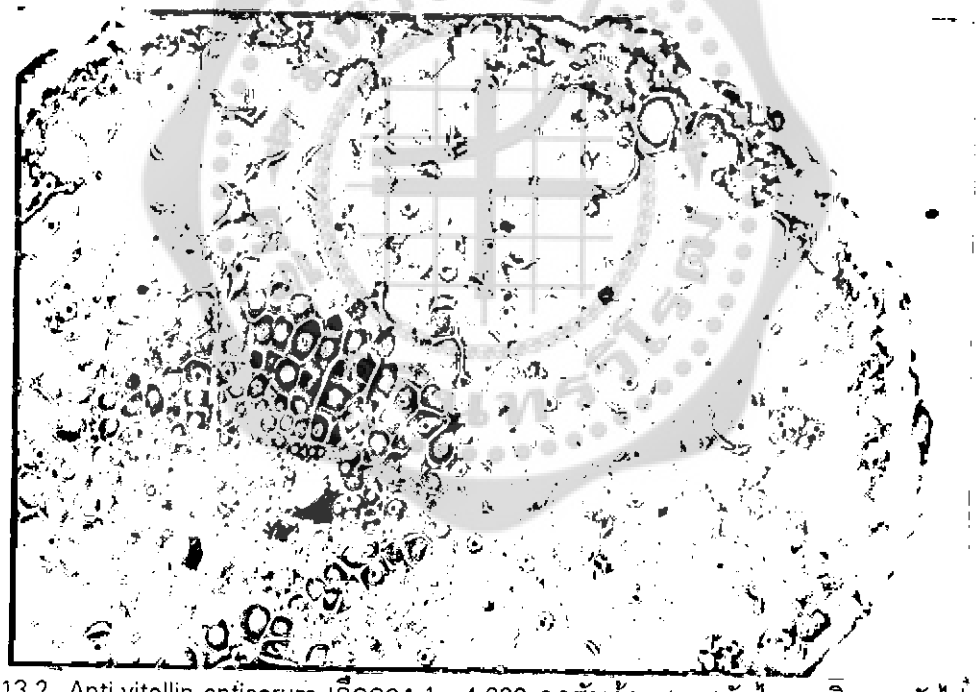
10.2 Anti-vitellin antiserum ดูดซับด้วยเลือดกุ้งเพศผู้ (BmMR)

10.3 Anti-vitellin antiserum ดูดซับด้วยสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งเพศผู้ (HmMR)

ลูกศร แสดงแนวตะกอนหลักที่เกิดจากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับไวเทลลินจากรังไข่ และกับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศเมีย



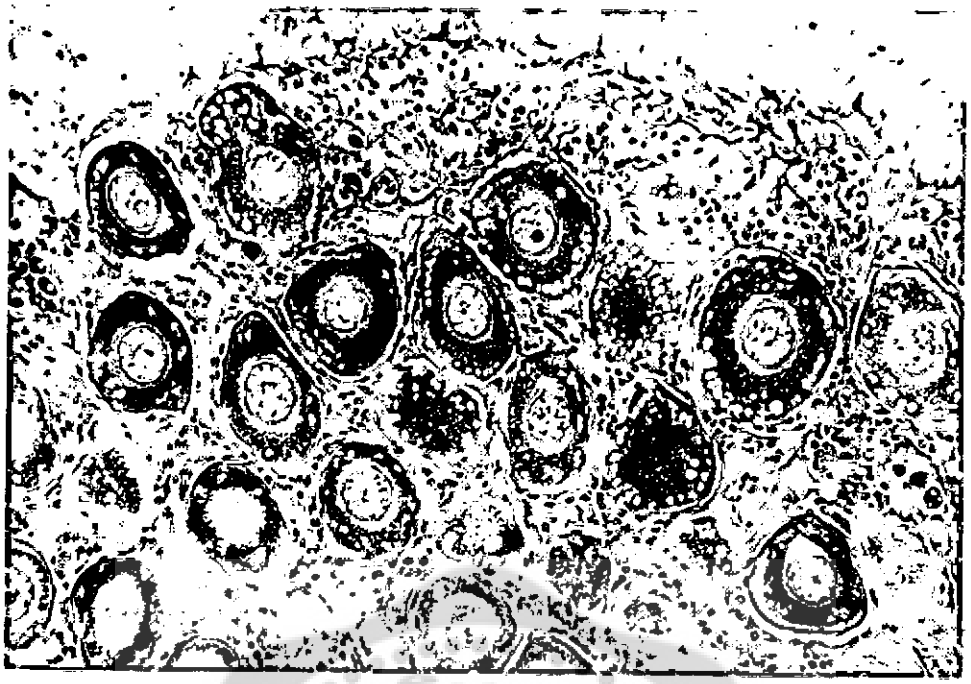
13.1 Anti-vitellin antiserum เจือจาง 1 : 4,000



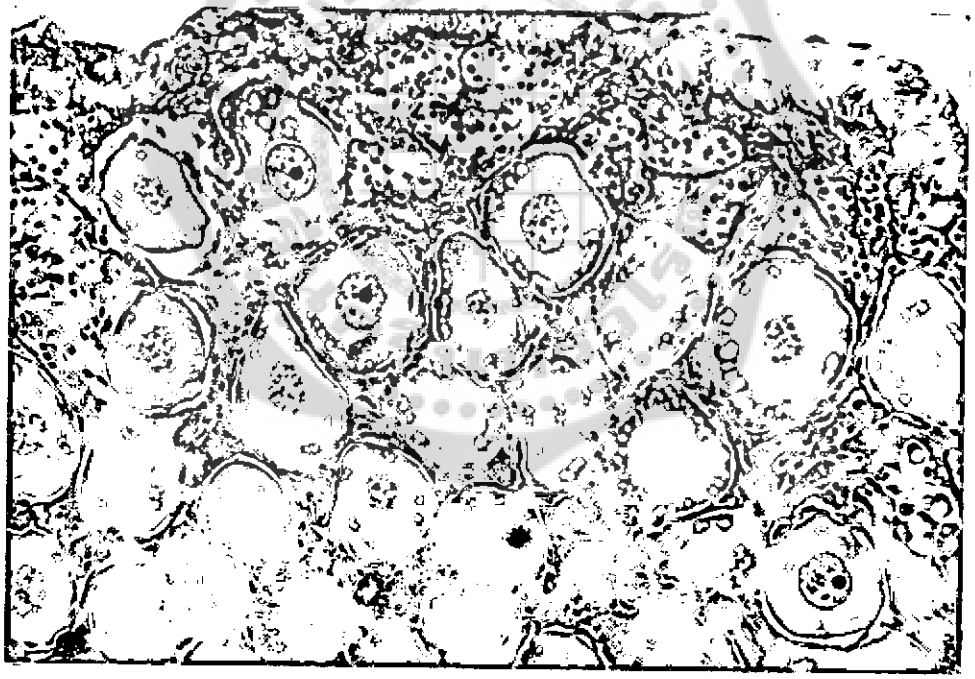
13.2 Anti-vitellin antiserum เจือจาง 1 : 4,000 ดูดซับด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่

O = Oogonia I = Primary oocyte II = Secondary oocyte

ภาพประกอบ 13 ภาพกำลังขยายต่ำของเซลล์ภายในรังไข่ระยะที่ 2 ของกุ้งก้ามกรามย้อมด้วยแอนติไวเทลลิน (anti-vitellin) โดยวิธีอินไดเรคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method)

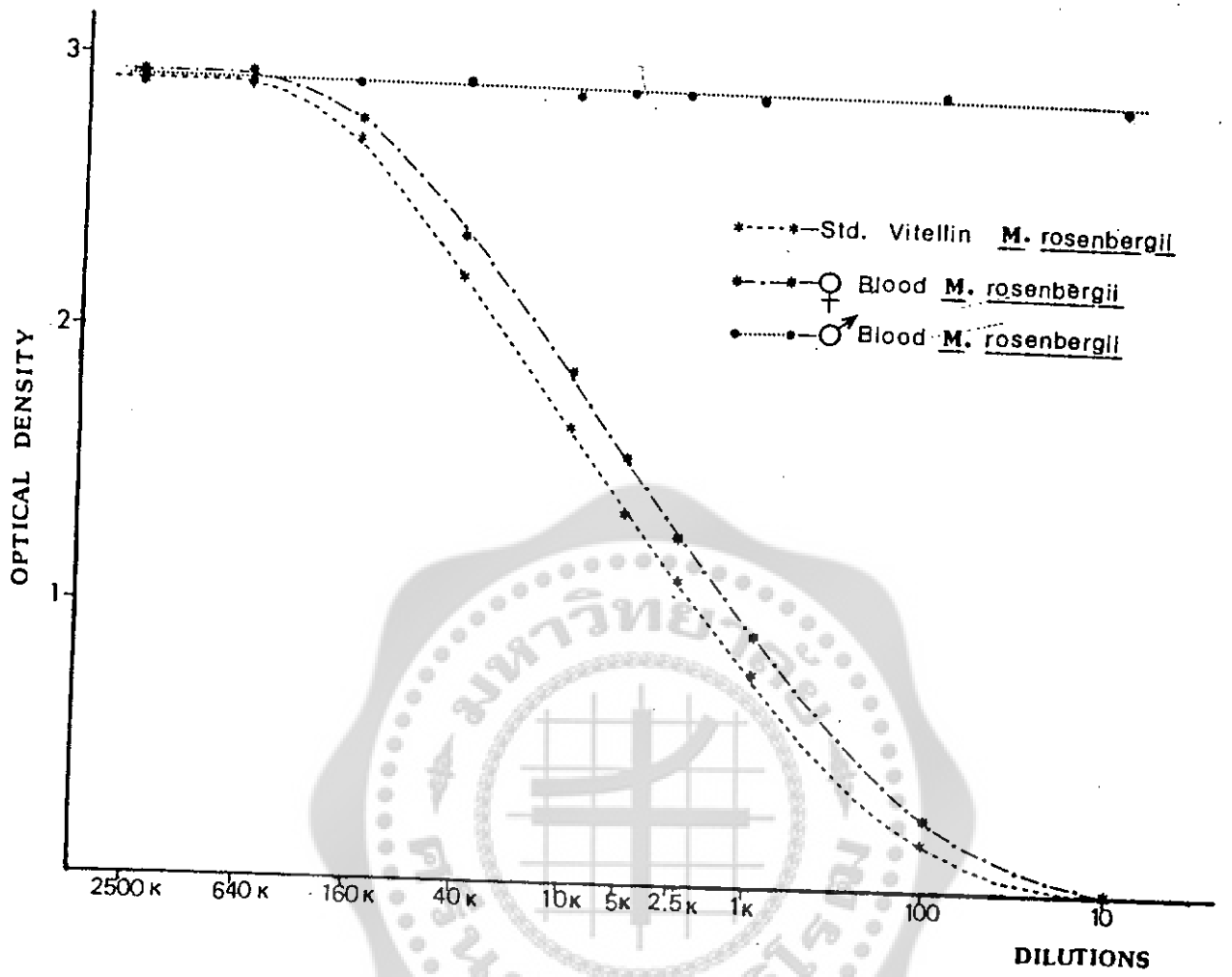


14.1 Anti-vitellin antiserum เจือจาง 1 : 4,000



14.2 Anti-vitellin antiserum เจือจาง 1 : 4,000 ดูดซับด้วยสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่

ภาพประกอบ 14 ภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ภายในรังไข่ระยะที่ 2 ของกุ้งก้ามกรามย้อมด้วยแอนติไวเทลลิน (anti-vitellin) โดยวิธีอินไดเรคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method)

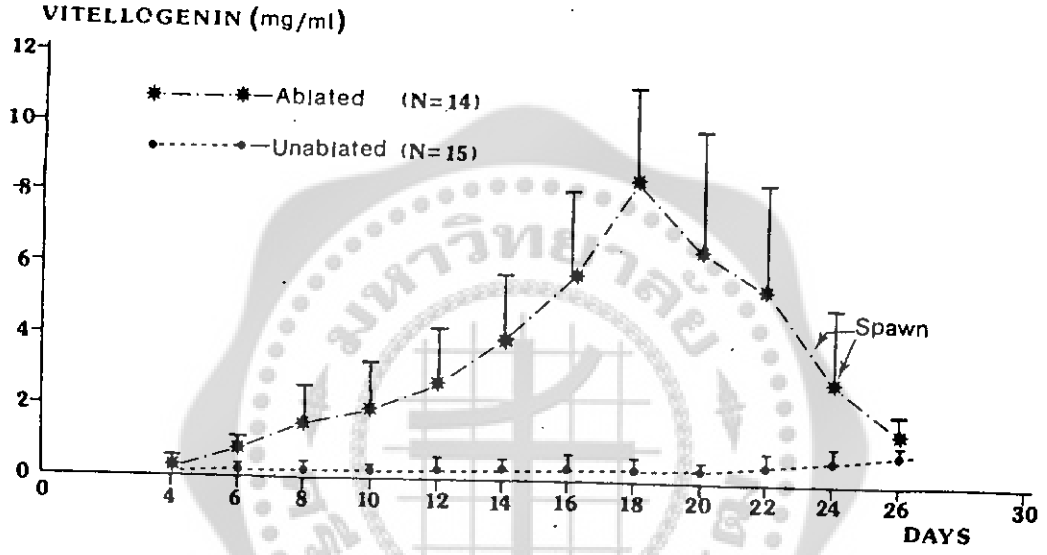


ภาพประกอบ 15 แสดง competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและตัวอย่างเลือดกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) เพศเมียและเพศผู้ที่ระดับเจือจางต่าง ๆ โดยใช้ mouse anti-vitellin antiserum ที่ เจือจาง 1 : 80,000

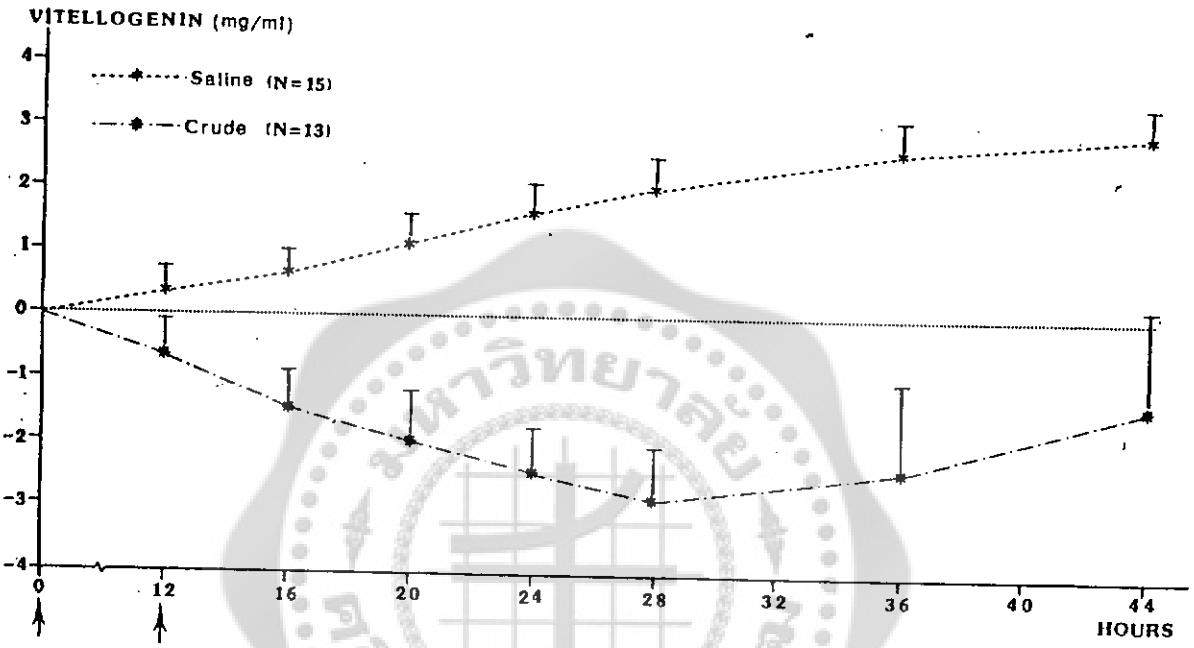
—·— ไวเทลลินมาตรฐาน ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

------ ตัวอย่างเลือดกุ้งก้ามกรามเพศเมียที่รังไข่กำลังเจริญ

·····● ตัวอย่างเลือดกุ้งก้ามกรามเพศผู้



ภาพประกอบ 16 แสดงปริมาณของไวเทลโลเจนิน (ค่าเฉลี่ย (x) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ในเลือดของกุ้งก้ามกรามระยะหลังจากวางไข่ กลุ่มปกติ (•---•) และกลุ่มที่ตัดตา (*—*) จำนวนกุ้งในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 14-15 ตัว



ภาพประกอบ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนิน (ค่าเฉลี่ย (X) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)) ในเลือดกุ้งก้ามกรามเพศเมียที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง หลังจากฉีดด้วยน้ำเกลือ (✱--) หรือสารสกัดจากก้านตา (✱·—) สองครั้ง (↑)

ตาราง 1 แสดงปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามปกติหลังจากวางไข่ที่เวลาต่าง ๆ

ตัวที่ / วัน	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)												ดัชนีรังไข่ (OI)
	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	
1	0.143	0.151	0.075	0.050	0.036	0.027	0.126	0.210	0.236	1.135	1.197	1.527	0.389
2	0.238	0.482	0.419	0.393	0.451	0.506	0.322	0.412	0.153	0.349	0.250	0.176	0.438
3	0.066	0.165	0.255	0.230	0.335	0.365	0.352	0.428	0.218	0.211	0.472	0.176	0.256
4	0.242	0.230	0.152	0.158	0.137	0.275	0.325	0.412	0.776	0.914	1.094	1.571	0.494
5	0.170	0.137	0.157	0.054	0.024	0.082	0.019	0.025	0.086	0.200	0.430	0.654	0.685
6	0.153	0.258	0.162	0.238	1.315	1.233	1.745	1.354	1.040	1.096	1.496	1.835	0.838
7	0.158	0.152	0.157	0.041	0.020	0.056	0.542	0.040	0.046	0.066	0.075	0.154	0.276
8	0.040	0.029	0.032	0.020	0.022	0.026	0.072	0.308	0.325	0.473	0.665	0.660	0.513
9	0.160	0.163	0.164	0.138	0.103	0.080	0.043	0.051	0.084	0.078	0.162	0.164	0.148
10	0.140	0.086	0.075	0.076	0.027	0.024	0.022	0.029	0.028	0.093	0.233	0.294	0.450
11	0.165	0.173	0.175	0.134	0.113	0.135	0.197	0.236	0.219	0.463	0.678	0.605	0.373
12	0.210	0.189	0.163	0.097	0.121	0.109	0.214	0.230	0.195	0.266	0.469	0.527	0.325
13	0.553	0.308	0.228	0.235	0.415	0.562	0.529	0.435	0.396	0.630	0.701	1.009	0.649
14	0.093	0.104	0.118	0.101	0.237	0.203	0.281	0.326	0.343	0.631	0.764	0.813	0.451
15	0.197	0.153	0.165	0.133	0.349	0.326	0.319	0.408	0.337	0.430	0.514	0.651	0.537
X	0.181	0.185	0.165	0.140	0.247	0.267	0.308	0.327	0.298	0.462	0.605	0.721	0.437
SD	0.114	0.103	0.087	0.096	0.320	0.308	0.410	0.313	0.226	0.339	0.382	0.528	0.152

ตาราง 2 แสดงปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามที่ตัดตาออกทั้งสองข้างในวันที่ 4 หลังจากวางไข่

ตัวที่ \ วัน	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)											
	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
1*	0.209	0.377	0.433	0.617	0.494	2.125	4.545	9.045	9.835	5.808	1.174	0.953
2*	0.438	0.567	0.579	0.795	1.256	1.642	3.374	3.951	6.732	9.583	3.538	1.633
3**	0.467	1.202	1.190	1.252	2.501	2.738	3.468	5.567	4.678	7.322	5.037	2.489
4**	0.039	0.362	1.292	1.427	2.482	5.948	11.21	13.41	15.70	13.12	8.082	2.185
5*	0.300	0.497	0.921	1.147	2.120	3.312	5.162	6.648	2.737	2.600	2.172	1.838
6**	0.115	0.478	1.463	1.892	2.934	6.314	6.515	12.40	5.016	2.510	2.213	1.621
7**	0.046	0.620	0.797	0.366	0.489	1.351	5.002	7.237	4.334	3.475	2.980	1.621
8*	0.317	1.252	3.147	3.645	4.044	4.048	4.464	5.722	3.304	2.857	0.316	0.141
9*	0.145	1.229	3.303	4.475	6.264	7.715	9.688	11.20	9.732	4.534	1.520	0.757
10*	0.081	0.825	2.420	3.566	3.492	4.131	3.057	8.532	2.623	2.147	1.513	0.980
11*	0.135	0.490	0.937	1.118	2.307	2.853	4.991	8.044	8.849	6.974	3.568	1.343
12**	0.252	0.931	1.529	1.947	2.195	4.221	6.903	9.025	5.144	5.015	2.967	1.791
13**	0.136	0.457	1.403	1.525	1.621	3.596	4.135	6.450	4.851	4.709	2.768	1.483
14*	0.323	1.086	2.351	3.055	4.489	5.058	6.751	9.977	7.028	4.886	2.117	1.087
X	0.215	0.741	1.555	1.918	2.653	3.932	5.695	8.374	6.468	5.396	2.855	1.426
SD	0.133	0.324	0.877	1.224	1.474	1.767	2.255	2.611	3.444	2.952	1.839	0.586

หมายเหตุ * ลอกคราบและวางไข่วันที่ 23

** ลอกคราบและวางไข่วันที่ 24

ตาราง 3 แสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามที่ตัดตาและฉีดด้วยน้ำเกลือ

ตัวที่.	ปริมาณไวเทลโลเจนินเมื่อเริ่มการทดลอง	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงในเวลาต่าง ๆ (ช.ม.)							ดัชนีรังไข่ (OI)
		12	16	20	24	28	36	44	
1	4.739	0.219	0.634	0.923	1.379	1.950	2.277	2.771	3.412
2	5.436	0.271	0.708	1.085	2.453	2.285	3.038	3.449	4.329
3	4.890	0.073	0.613	1.666	1.954	2.188	2.805	2.914	3.834
4	3.498	0.311	0.519	0.730	1.049	1.738	2.586	2.835	3.556
5	4.299	0.177	0.431	0.987	1.858	2.505	2.701	2.803	3.425
6	4.103	0.650	1.104	1.815	2.213	2.557	2.699	3.041	2.976
7	4.562	0.907	1.380	1.951	1.871	1.871	2.207	2.550	2.639
8	4.256	0.460	0.601	0.802	1.137	1.344	1.523	1.659	2.420
9	4.367	0.250	0.363	0.700	0.851	1.120	1.783	2.068	4.039
10	4.179	0.119	0.347	0.917	2.018	2.501	2.696	2.955	4.226
11	3.585	0.941	1.579	2.226	2.775	3.110	3.365	3.586	3.691
12	4.106	0.440	0.848	1.327	1.941	2.422	2.712	3.130	3.339
13	4.505	0.459	0.711	1.284	1.641	1.952	2.848	2.672	3.277
14	3.866	0.171	0.750	1.275	1.866	2.344	2.637	2.983	3.014
15	4.946	0.539	0.654	1.135	1.516	1.830	2.357	2.537	4.292
$\bar{X}$	4.356	0.404	0.749	1.255	1.741	2.137	2.548	2.828	3.418
SD	0.500	0.254	0.343	0.451	0.478	0.485	0.434	0.465	0.596

ตาราง 4 แสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงของไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามที่ตัดตาและฉีดด้วยสารสกัดจากก้านตา (- หมายถึง ปริมาณไวเทลโลเจนินที่ลดลง)

ตัวที่.	ปริมาณไวเทลโลเจนินเมื่อเริ่มการทดลอง	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงในเวลาต่าง ๆ (ช.ม.)							ดัชนีรังไข่ (OI)
		12	16	20	24	28	36	44	
1	6.748	-2.084	-2.394	-3.643	-3.678	-3.800	-4.871	-3.806	3.608
2	5.554	-1.270	-2.212	-2.755	-3.142	-3.364	-2.947	-2.328	2.837
3	4.777	0.121	-0.504	-0.913	-2.903	-3.583	-3.393	-2.161	3.458
4	2.867	-0.198	-0.497	-0.786	-1.424	-1.669	-0.468	0.183	3.200
5	5.436	1.434	-0.186	-1.298	-2.133	-2.689	-1.801	-0.914	3.168
6	3.077	-0.265	-1.005	-1.201	-1.621	-1.468	-0.396	0.733	3.808
7	5.657	-0.803	-1.610	-2.492	-3.277	-4.384	-3.577	-1.902	3.318
8	4.603	-0.630	-1.620	-2.298	-2.167	-1.813	-0.451	1.097	4.086
9	5.079	-0.874	-1.718	-2.012	-2.322	-2.576	-2.266	-1.712	2.967
10	5.159	-1.814	-1.994	-2.078	-2.557	-3.571	-3.825	-2.956	2.611
11	3.266	-0.036	-0.574	-0.696	-0.908	-1.478	-1.381	-0.436	3.153
12	4.653	-0.603	-1.253	-1.634	-2.089	-0.487	-0.164	0.802	3.058
13	4.848	-0.574	-1.473	-2.027	-2.564	-0.407	0.174	1.262	3.491
X	4.748	-0.584	-1.362	-1.833	-2.323	-2.412	-1.952	-0.943	3.296
SD	1.067	0.855	0.616	0.824	0.732	1.245	1.591	1.607	0.386

สรุปและอภิปรายผล

การผลิตแอนติซีรัมจำเพาะต่อไวเทลลิน (anti-vitellin antiserum) โดยการนำสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของกุ้งก้ามกรามมาปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว พบว่าแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะสูงต่อไวเทลลินในรังไข่และไวเทลโลเจนินในเลือด แต่แอนติซีรัมที่ได้นี้ยังมีแอนติบอดีต่อสารอื่น ๆ ในรังไข่และเลือดเจือปนอยู่ (ภาพประกอบ 11.1 และ 12.1) เนื่องจากสารสกัดไวเทลลินที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันมีความบริสุทธิ์ไม่สูงพอ อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ปะปนมานี้ส่วนใหญ่สามารถกำจัดออกได้โดยการดูดซับด้วยเลือดและสารสกัดหยาบจากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ (ภาพประกอบ 11.2, 11.3, 12.2 และ 12.3) ในกรณีการเจือปนของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนอื่น ๆ ในแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินนี้พบว่าเกิดขึ้นได้ถึงแม้จะปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดไวเทลลินที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์โดยกระบวนการทางโครมาโตกราฟีหลายขั้นตอนก็ตาม (Quinitio et al., 1989; 1990)

ความจำเพาะของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินของกุ้งก้ามกรามที่ตรวจด้วยวิธีอิมมูโน-ดิฟฟิวชัน โดยใช้แอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้แก่รังไข่ เลือดและอัณฑะของกุ้งใน family เดียวกันและต่าง family กัน พบว่าแอนติซีรัมที่ได้แสดงปฏิกิริยาข้ามอย่างสมบูรณ์ระหว่างไวเทลลินจากรังไข่และไวเทลโลเจนินในเลือด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน ทั้งนี้เนื่องจากไวเทลโลเจนินเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของไวเทลลิน โดยไวเทลโลเจนินที่สร้างมาจากแหล่งต่าง ๆ ภายนอกรังไข่จะถูกลำเลียงมาทางระบบหมุนเวียนของโลหิตเข้าสู่เซลล์ไข่โดยกระบวนการการกลืนกินของเหลวของเซลล์ (pinocytosis) และเปลี่ยนแปลงเป็นไวเทลลินในรังไข่ (Wolin et al., 1973) ในกุ้งชนิดต่าง ๆ มีรายงานยืนยันความคล้ายคลึงกันของสารทั้งสอง เช่นกุ้งลอบสเตอร์ (*Homarus americanus*) (Byard and Aiken, 1984) กุ้ง *Parapenaeus longirostris* (Tom et al., 1987) กุ้ง *Pandalus kessleri* (Quinitio et al., 1989) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Quinitio et al., 1990) กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Derelle et al., 1986)

แต่ในกรณีที่ใช้แอนติเจนจากเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้แก่เนื้อเยื่ออัณฑะและเลือดกุ้งเพศผู้ จะไม่พบแนวตะกอนหลักที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับไวเทลลินหรือไวเทลโลเจนิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองชนิดเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในกุ้งเพศเมียเท่านั้น จะไม่พบในกุ้งเพศผู้หรือกุ้งเพศเมียที่รังไข่ยังไม่เจริญ เช่นเดียวกับสัตว์จำพวกครัสตาเซียนชนิดอื่น ๆ เช่น ในปูม้า *Callinecter sapidus* (Kerr, 1969) กุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* (Nelson, Heyer and Johnson, 1988) กุ้ง *Pandalus kessleri* (Quinitio et al., 1989) กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) (Quinitio et al., 1990) และกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* (ศิวาพร ลงยันต์; 2537)

ในกรณีของแอนติเจนจากกุ้งต่างชนิดกันพบว่าทั้งไวเทลลินและไวเทลโลเจนินจากกุ้งใน genus เดียวกันจะทำปฏิกิริยาข้ามอย่างสมบูรณ์ ได้แก่กุ้งฝอยน้ำจืด *Macrobrachium lanchesteri* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* แต่กรณีของกุ้งที่อยู่ใน family เดียวกันแต่ต่าง genus กันจะแสดงปฏิกิริยาเกิดแนวตะกอนเชื่อมต่อกันไม่สมบูรณ์ เช่นในกุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* และสำหรับกุ้งที่ต่าง family กันเช่นกุ้งตะกาดทั้งสอง species คือ (*Metapenaeus affinis* และ *Metapenaeus ensis*) จะไม่สามารถเห็นปฏิกิริยากับแอนติซีรัมนี้เลย ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่าไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของกุ้งที่อยู่ในกลุ่มที่ใกล้ชิดกันจะมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันและกลุ่มที่มีวิวัฒนาการห่างจากกันจะมีความแตกต่างกันมากขึ้น การทดสอบแอนติซีรัมต่อไวเทลลินในกุ้งชนิดอื่น ๆ ที่ได้ผลในทำนองเดียวกัน เช่นแอนติซีรัมต่อไวเทลลินของกุ้งกุลาดำ (Quinitio et al., 1990) และกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* (ศิวาพร ลงยันต์, 2537)

เมื่อใช้กระแสไฟฟ้าแยกสารสกัดจากรังไข่และเลือดกุ้งเพศเมียก่อนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลิน พบว่าการเคลื่อนของแนวตะกอนหลักสองแนว (เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมต่อไวเทลลินกับไวเทลลินหรือไวเทลโลเจนิน) ในอัตราความเร็วคล้ายคลึงกัน เป็นการยืนยันถึงความคล้ายคลึงกันของโปรตีนทั้งสองชนิดที่กล่าวมานี้ สำหรับองค์ประกอบของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินในกุ้งก้ามกรามมีรายงานว่าเมื่อแยกด้วย SDS-PAGE ประกอบด้วยโปลีเปปไทด์ 2 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 92.2 และ 84.0 กิโลดาลตัน (Derelle et al., 1986) แต่รายงานการแยกบริสุทธิ์ไวเทลลินใน native-PAGE และ HPLC ด้วย TSK G3000SW column พบว่าไวเทลลินปรากฏอยู่ 3 รูปแบบ มีน้ำหนักโมเลกุล 240, 450 และ 780 กิโลดาลตันตามลำดับ ซึ่งทุกรูปแบบจะประกอบด้วยโปลีเปปไทด์ 2 หน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 90 และ 104 กิโลดาลตัน รูปแบบทั้ง 3 นี้อาจเกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อยในจำนวนต่าง ๆ กัน (Chang et al., 1993b) แต่อย่างไรก็ตามข้อแตกต่างเล็กน้อยของน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยในไวเทลลิน อาจเนื่องมาจากข้อผิดพลาดในการคำนวณที่เทียบจากโปรตีนมาตรฐาน อนึ่งการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าในวุ้นที่ใช้สามารถเห็นไวเทลลินชัดเจนเพียง 2 รูปแบบ ทั้งนี้เนื่องจากในวุ้นมีโพรงขนาดใหญ่และระยะทางที่ใช้แยกสั้นอาจทำให้การแยกองค์ประกอบของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินไม่ชัดเจนเท่าที่ควร

จากการใช้แอนติซีรัมนี้ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อของรังไข่โดยกระบวนการทางอิมมูโนไซโตเคมีสทรี พบว่าแอนติซีรัมจะมีปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีระยะการเจริญตั้งแต่ระยะที่มีการสะสมไข่แดงระยะเริ่มแรก (primary vitellogenesis oocyte) ขึ้นไปเท่านั้น จะไม่พบปฏิกิริยาในเซลล์ไข่ระยะต่าง ๆ ก่อนมีการสะสมไข่แดง (previtellogenesis oocyte) และเมื่อใช้แอนติซีรัมนี้ดูดซับด้วยสารสกัดไวเทลลิน

การติดสีของเซลล์ไข่เหล่านั้นจะหายไป ซึ่งเป็นการสนับสนุนความจำเพาะของแอนติซีรัมว่ามีความจำเพาะต่อไวเทลลิน

การใช้กระบวนวิธี competitive ELISA ในการทดสอบการเปรียบเทียบปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน จะเห็นว่าไวเทลโลเจนินในเลือดจากกุ้งเพศเมียสามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับไวเทลลินที่ตรึงอยู่บนถาด ELISA ได้อย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกับไวเทลลินในสารสกัดจากรังไข่ ในขณะที่เลือดจากกุ้งเพศผู้ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาดังกล่าว เป็นการชี้ให้เห็นว่าไวเทลลินและไวเทลโลเจนินมีลักษณะทางอิมมูโนเคมีสทรีเหมือนกัน จึงสามารถใช้แอนติซีรัมนี้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดได้ ถึงแม้ว่าในแอนติซีรัมจะมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อของกุ้งปะปนอยู่บ้างก็ตาม แอนติบอดีที่ปนเปื้อนส่วนใหญ่ก็สามารถกำจัดโดยการดูดซับด้วยเลือดกุ้งเพศผู้และสารสกัดจากตับ-ตับอ่อนจากกุ้งเพศผู้ เนื่องจากแอนติซีรัมที่ใช้มีค่าไตเตอร์สูงจึงสามารถใช้แอนติซีรัมในระดับที่เจือจางมากถึง 1:80,000 เท่า ดังนั้นแอนติบอดีที่ปะปนมาในปริมาณต่ำจึงถูกเจือจางถึงระดับต่ำมาก จนไม่มีผลในการวิเคราะห์

ในทำนองเดียวกันนี้การปะปนของโปรตีนอื่น ๆ ในสารสกัดไวเทลลินจะถูกเจือจางไปด้วย เพราะว่าปริมาณไวเทลลินที่ใช้ในการตรึงอยู่บนถาด ELISA และที่ใช้เป็นสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานอยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำมากจนถึงระดับนาโนกรัม/มิลลิลิตร โปรตีนส่วนอื่น ๆ ที่ปะปนอยู่ในสารสกัดปริมาณน้อยจึงถูกเจือจางลงไปเช่นกัน และจากการทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดไวเทลลินนี้โดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนติดสีเฉพาะหน่วยย่อยของไวเทลลิน 2 หน่วยเท่านั้น ไม่สามารถสังเกตุเห็นแถบโปรตีนชนิดอื่น ๆ แสดงว่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดไวเทลลินที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมีความบริสุทธิ์มากกว่า 90 % ขึ้นไป จึงเชื่อมั่นว่าวิธี indirect competitive ELISA นี้เป็นวิธีที่มีความแม่นยำพอสมควรในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนิน สำหรับการวัดปริมาณไวเทลโลเจนิน โดยวิธี indirect competitive ELISA นี้มีการศึกษาในเห็บ *Dermacentor variabilis* (Rosell and Coons, 1991) การวัดระดับปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามได้มีการวัดโดยใช้โมโนโคลนอล-แอนติบอดีต่อไวเทลลิน และ rabbit anti-vitellin anti-serum โดยวิธี indirect alkaline phosphatase sandwich ELISA (Derelle et al., 1986) และการวัดไวเทล-โลเจนินในกุ้งก้ามกรามโดยวิธี solid phase ELISA โดยใช้ rabbit anti-vitellin antiserum และวิธี indirect alkaline phosphatase (Chang and Shih, 1995) ระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดกุ้งก้ามกรามที่รังไข่กำลังพัฒนาที่คำนวณมีปริมาณอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันกับที่วัดได้ในการทดลองนี้ การวัดระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดกุ้งโดยวิธีอื่น ๆ เช่น ในกุ้งกุลาลาย *Penaeus semisulcatus* โดยใช้วิธี rocket immunoelectrophoresis (Shafir et al., 1992) เป็นวิธีที่มีความไวระดับต่ำกว่าวิธี ELISA

เพราะสามารถวัดได้ในระดับไมโคร กรัม/มิลลิลิตรขึ้นไปและสิ้นเปลืองแอนติซีรัมมากกว่าวิธีนี้มาก

จากการทดลองวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกรามหลังจากวางไข่ พบว่าในกุ้งปกติระดับไวเทลโลเจนินในเลือดจะคงที่ในระดับต่ำกว่า 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในช่วง 10 วันแรก และหลังจากนั้นระดับไวเทลโลเจนินของกุ้งบางตัวยังคงที่ หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระดับต่าง ๆ (ไม่เกิน 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตาราง 1) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการสำรวจพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งก้ามกรามหลังวางไข่โดยการตรวจดูดัชนีของรังไข่ พบว่าในช่วง 10 วันแรกหลังจากกุ้งวางไข่ ค่าดัชนีของรังไข่ค่อนข้างคงที่ หลังจากนั้นค่าดัชนีของรังไข่ของกุ้งกลุ่มหนึ่ง (ประมาณ 50 %) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่กุ้งอีกกลุ่มมีการเจริญของรังไข่เพิ่มขึ้นในอัตราเร็วต่าง ๆ กันและสามารถวางไข่อีกครั้งภายในเวลาเฉลี่ย 30.2 วัน (สันติ เรืองมณีไพฑูรย์และคณะ, 2532) แต่จากการทดลองนี้จะเห็นว่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือดเพิ่มขึ้นค่อนข้างช้า และดัชนีรังไข่ในกุ้งส่วนใหญ่ยังคงมีค่าต่ำในวันที่ 26 หลังจากวางไข่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทดลองมีการเจาะเก็บเลือดทุก ๆ 2 วันตลอดเวลา 26 วัน เป็นการก่อให้เกิดการเสียเลือดและก่อให้เกิดสภาวะกดดันในกุ้งตลอดเวลาจึงทำให้มีผลกระทบต่อพัฒนาการของรังไข่ ซึ่งผลกระทบนี้คล้ายกับการศึกษาในทำนองเดียวกันในกุ้งก้ามกรามที่เก็บเลือดทุก ๆ 3 วัน ทำให้วงจรการวางไข่จะแปรปรวนมากอยู่ในช่วงระหว่าง 24-40 วัน (Chang and Shih, 1995)

ในกรณีของกุ้งที่ชักนำให้มีการเจริญของรังไข่โดยการตัดตาหลังจากวางไข่ได้ 4 วัน ระดับไวเทลโลเจนินของกุ้งทุกตัวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และลดลงในช่วง 2-5 วันก่อนวางไข่อีกครั้งหนึ่ง (ภาพประกอบ 16) ซึ่งช่วงเวลาในการวางไข่ครั้งที่ 2 หลังจากถูกตัดตานี้เร็วกว่ากุ้งปกติใช้เวลาประมาณ 23-24 วันหลังจากวางไข่ครั้งแรก จะเห็นว่ามีผลมาจากการตัดตากระตุ้นให้เพิ่มการเจริญของรังไข่ และการเจริญของรังไข่ของกุ้งทุกตัวค่อนข้างสม่ำเสมอ ถึงแม้ว่ากุ้งทุกตัวจะอยู่ในสภาวะกดดันเนื่องจากการเสียเลือดตลอดเวลาในการทดลองก็ตาม (ตาราง 1) จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของรังไข่ โดยระดับไวเทลโลเจนินในเลือดจะสูงขึ้นในขณะที่รังไข่ของกุ้งกำลังเจริญและเมื่อเจริญพร้อมที่จะวางไข่ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดจะลดลง ดังนั้นจึงสามารถใช้ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดเป็นตัวชี้สถานะภาพการเจริญของรังไข่ได้

สำหรับการฉีดสารสกัดจากก้านตา 2 ครั้งให้กุ้งที่ถูกชักนำให้มีการเจริญของรังไข่โดยการตัดตา พบว่ามีผลทำให้ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดค่อย ๆ ลดลงในการฉีดแต่ละครั้งของการฉีดสารสกัดเป็นเวลานานถึง 12-14 ชั่วโมง หลังจากนั้นระดับไวเทลโลเจนินจึงค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งต่างจาก

กลุ่มที่ฉีดด้วยน้ำเกลือนั้นระดับไวเทลโลเจนินในเลือดมีการเพิ่มขึ้นตลอดเวลาที่ทดลอง เป็นการแสดงให้เห็นว่าพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งก้ามกรามอยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนในก้านตา (วีระวรรณ สิทธิกรกุลและคณะ, 2532) เช่นเดียวกับกุ้ง *Parapenaeopsis hardwickii* (Kulkarni and Nagabhushanam, 1980) กุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* (Soyez et al., 1987) กุ้ง *Penaeus vannamei* (Quackenbush, 1989) กุ้ง *Procambarus bouvieri* (Aguilar et al., 1992) และปูก้ามดาบ (fiddler crab) *Uca pugilator* (Quackenbush and Keeley, 1988) การที่สารสกัดจากก้านตามีผลทำให้ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดลดลง คาดว่าเกิดเนื่องจากฮอร์โมนในสารสกัดจากก้านตาไปยับยั้งการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในอวัยวะอื่น ๆ นอกจากรังไข่เช่น ตับ-ตับอ่อน หรืออาจยับยั้งการหลั่งของไวเทลโลเจนินเข้าสู่กระแสโลหิต จากการทดลองในกุ้งชนิดอื่น ๆ พบว่าสารสกัดจากก้านตาสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในรังไข่ และตับ-ตับอ่อนในกุ้งทะเล *Penaeus vannamei* และปูก้ามดาบ *Uca pugilator* (Quackenbush and Keeley ,1988 และ Quackenbush, 1989) สำหรับค่าดัชนีรังไข่ในกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม (ฉีดสารสกัดจากก้านตาและฉีดน้ำเกลือ) นั้นไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ทำการทดลองเพียงช่วงสั้น ๆ และได้รับการฉีดสารสกัดเพียง 2 ครั้ง ซึ่งเวลาในการทดลองที่จะเห็นความแตกต่างของดัชนีรังไข่ต้องใช้เวลาทดลองไม่ต่ำกว่า 5 วัน และต้องฉีดสารสกัดไม่น้อยกว่า 10 ครั้ง (วีระวรรณ สิทธิกรกุลและคณะ, 2532) ดังนั้นการตรวจดูผลของสารสกัดจากก้านตาต่อระดับไวเทลโลเจนินจึงเป็นวิธีที่ไม่สิ้นเปลืองสารสกัดและเวลาทำการทดลองน้อยกว่า ซึ่งการทดลองนี้ใช้เวลาเพียง 21-24 ชั่วโมงเท่านั้น

ฉะนั้นการทดลองครั้งนี้น่าจะเป็นแนวทางที่ดีสำหรับในการตรวจหาฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่ (VIH assay) ในก้านตาของสัตว์จำพวกครัสตาเซียนเช่นกุ้งด้วยการตรวจวัดระดับปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดโดยวิธี competitive ELISA เพราะจะทำให้การทดสอบมีความไวสูง ใช้เวลาน้อย และสิ้นเปลืองสารสกัดน้อยลง ทั้งนี้จึงน่าจะเป็นแนวทางในการตรวจหา VIH ระหว่างการแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมน (VIH) ได้ง่าย ให้ผลดี และมีประสิทธิภาพดีกว่าการตรวจสอบจากดัชนีรังไข่โดยตรง

บรรณานุกรม

วีระวรรณ สิทธิกรกุล, สันติ เรืองมณีไพฑูรย์, นงลักษณ์ สกุลญานนท์วิทยา, นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และไพศาล สิทธุกรกุล. 2532. ผลของสารสกัดจากก้านตากุ้งที่มีต่อการยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ในกุ้งก้ามกราม วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5(2) : 106-114.

ศิวาพร ลงยันต์. 2537. การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและการตรวจวัดไวเทลโลเจนินในเลือดกุ้งตะกาด. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพ ฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. อัดสำเนา.

สันติ เรืองมณีไพฑูรย์, วีระวรรณ สิทธิกรกุล, นงลักษณ์ สกุลญานนท์วิทยา, นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และไพศาล สิทธุกรกุล. 2532. พัฒนาการของรังไข่ในกุ้งก้ามกรามหลังวางไข่ วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5(2) : 100-105.

สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์. 2537. การตรวจหาพิกเมนต์ดีสเฟอร์ซิงฮอร์โมนในก้านตาของกุ้งก้ามกราม กุ้งกุลาดำ กุ้งตะกาด ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพ ฯ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. อัดสำเนา.

Aguilar, M.B., L.S. Quackenbush, D.T. Hunt, J. Shabanowitz and A. Huberman. 1992. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Comp.Biochem. Physiol. 102B(3) : 491-498.

Anilkumar, G. and K.G. Adiyodi. 1980. Ovarian growth induced by eyestalk ablation during the prebreeding season is not normal in the crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). Inter. J. Invert. Reprod. 2 : 95-105.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the priciple of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.

Bomirski, A., M. Arendarzk, E. Kawinska and L.H. Kleinhilz. 1981. Partial characterization of crustacean gonad inhibiting hormone. Inter. J. Invert. Reprod. 3 : 13-219.

Chang, K.S., M.J. Bruce and R.W. Newcomb. 1987. Purification and amino acid composition of a peptide with molt-inhibiting activity form the lobster, *Homarus americanus*. Gen. Comp. Endocrinol. 65 : 56-64.

Chang, C.F., F.Y. Lee and Y.S. Huang. 1993. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. 105B : 409-414.

Chang, C.F., T.W. Shih and H.H. Hong. 1993. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 105B : 609-615.

Chang, C.F., F.Y. Lee, Y.S. Huang and T.H. Hong. 1994. Purification and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn, *Penaeus monodon*. Invertebrate Reproduction and Development. 25(3) : 185-192.

Chang, C.F. and T.W. Shih. 1995. Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Invertebrate Reproduction and Development. 27(1) : 11-20.

Charniaux-Cotton, H. 1980. Experimental studies of reproduction in Malacostraca Crustaceans. Description of vitellogenesis and its endocrine control. Advances in Invertebrate Reproduction. p.177-186.

Charniaux-Cotton, H. 1985. Vitellogenesis and its control in Malacostracan Crustacea. Amer. Zool. 25 : 197-206.

Cheesman, D.F. and J. Prebble. 1966. Astanxanthin ester as a prosthetic group : a caroteno-protein from the hermit crab. Comp. Biochem. Physiol. 17 : 929-936.

Derelle, E., J. Grosclaudet, J.J. Meusy, H. Junera and M. Martin. 1986. ELISA titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii,* with monoclonal antibody. Comp. Biochem. Physiol. 85B(1) : 1-4.

Emmerson, W.D. 1983. Maturation and growth of ablated and unablated *Peneaus monodon* Fabricius. Aquaculture. 32 : 235-241.

Fernlund, P. and L. Josefsson. 1972. Crustacean color change hormone : Amino acid sequence and chemical synthesis. Science. 177 : 173-175.

Huberman, A. and M.B. Aguilar. 1988. Aneurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish (*Procambarus bouvieri*: Ortmann)-II. Structural comparison of two isoforms of the hormone. Comp. Biochem. Physiol. 91B(2) : 345-349.

Hudson, L. and F. C. Hay. 1976. Practical immunology. Blackwell Scientific Publication, London. 298 p.

Josefsson, L. 1983. Invertebrate neuropeptide hormone. Int. J. Pept.Protein Res. 21 : 459-470.

Kerr, M.S. 1969. The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus.* II. A lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin. Develop. Biol. 20 : 1-17.

Kulkarni, G.K. and R. Nagabhushanam. 1980. Role of ovary inhibiting hormone from eyestalks of marine penaeid prawns, *Parapenaeopsis hardwickii* during ovarian development cycle. Aquaculture. 19 : 13-19.

Lui, C.W. and J.D. O' Conner. 1977. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary II. Characterization of and *In Vitro* incorporation of amino acids into the purified subunits. J. Exp. Zool. 195 : 41-52.

Nagamine, C., A.W. Kinght, A. Maggenti and G. Paxman. 1980. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapod, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. Gen. Comp. Endocrinol. 41 : 423-441.

Nelson, K., B. Heyer and E. Johnson. 1988. Photoperiod-induced changes in hemolymph vitellogenin in female lobsters (*Homarus americanus*). Comp. Biochem. Physiol. 90B : 809-821.

Paulus, J.E. and H. Laufer. 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia enorginata* (Decapoda Brachyura). Int. J. Invert. Rep. Dev. 11 : 29-44.

Quackenbush, L.S. 1989. Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei* : *In Vitro* studies of the isolated hepatopancreas and ovary. Comp. Biochem. Physiol. 94B(2) : 253-261.

Quackenbush, L.S. and L.L. Keeley. 1988. Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Biol.Bull. 175 : 321-331.

Quackenbush, L.S. and W.F. Herrnkind. 1981 Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus* (Crustacea : Palinuridae) : effect of eyestalk ablation. Comp. Biochem.Physiol. 69A : 523-527.

Quackenbush, L.S. and W.F. Herrnkind. 1983. Partial characterization of eyestalk hormone controlling molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Crust. Biol. 3 (1) : 34-44.

Quinitio, E.T., A. Hara, K. Yamauchi, T. Mizushima and A. Fuji. 1989. Identification and characterization of vitellin in a hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*. Comp. Biochem. Physiol. 94B : 445-451.

Quinitio, E.T., A. Hara, K. Yamauchi and A. Fuji. 1990. Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*. Invert. Rep. Dev. 19(3) : 221-227.

Rao, K.R. and J.P. Riehm. 1988. Pigment-dispersing hormone : An novel family of neuropeptides from arthropods. Peptides. 9 : 153-159.

Rosell, R. and L. B. Coons. 1991. Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina:Ixodidae) using an Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay. J. Med. Entomol. 28(1) : 41-44.

Shafir, S., M. Tom, M. Ovada and E. Lubzens. 1992. Protein vitellogenin and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). Biol. Bull. 183 : 394-400.

Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. 1987. Isolation and characterization of a vitellogenesis inhibiting factor form sinus gland of the lobster, *Homarus americanus*. J. Exp. Zool. 244 : 479-484.

Soyez, D., J.P. Le Caer, P.Y. Noel and J. Rossier. 1991. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster, *Homarus americanus*. Neuropeptides. 20 : 25-32.

Suzuki,S., K. Yamasaki and Y. Katakura. 1989. Vitellogenin synthesis by fat body and ovary in the terrestrial Isopod, *Armadillidium vulgare*. Gen. Comp. Endocrinol. 74 : 120-126.

Tom, M., M. Goren and M. Ovadia. 1987. Purificationand characterization of vitellin from the ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Comp. Biochem. Physiol. 87B : 17-23.

Tom, M., M. Goren and M. Ovadia. 1987. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organ of *Parapenaeus longirostris* (Crustacean Decapoda, Penaeidae). Inter. J. Invert, Rep. Dev. 12 : 1-12.

Wollin, E., H. Laufer and D. Albertini. 1973. Uptake of the yolk protein, lipovitellin by developing crustacean oocytes. Develop. Biol. 35 : 160-170.

Yano, I. and Y. Chinzei. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. 86B(2) : 213-218.

Zagalsky, P.E. 1985. A study of the astaxanthin-lipovitellin, ovoverdin, isolated from the ovarian of the lobster, *Homarus gammarus* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 80B : 589-598.