ความสัมพันธ์ของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ของปูทะเล *Scylla serrata* (FÖrskal, 1775) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่เสียสภาพ

นางสาวดวงใจ งามสม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-917-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RELATIONSHIP BETWEEN HAEMOLYMPH VITELLOGENIN LEVELS AND OVARIAN DEVELOPMENT OF MUD CRAB *Scylla serrata* (FÖrskal, 1775) USING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST DENATURED VITELLIN

Miss Duangjai Ngamsom

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology

Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2000
ISBN 974-346-917-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ของปูทะเล *Scylla serrata* (Forskal, 1775) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่เสียสภาพ
โดย	นางสาวดวงใจ งามสม
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ สัตยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ)

....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ สัตยาลัย)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พงชัย หาญยุทธนากร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดวงใจ งามสม: ความสัมพันธ์ของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ของปูทะเล *Scylla serrata* (Forskal, 1775) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่เสียสภาพ (RELATIONSHIP BETWEEN HAEMOLYMPH VITELLOGENIN LEVELS AND OVARIAN DEVELOPMENT OF MUD CRAB *Scylla serrata* (Forskal, 1775) USING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST DENATURED VITELLIN) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. อรวรรณ สัตยาลัย, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล; 104 หน้า. ISBN 974-346-917-6.

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่ถูกทำให้เสียสภาพของ ปูทะเล โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูขาว (swiss mouse) ด้วยสารสกัดจากรังไข่ของปูทะเลที่ถูกทำให้เสียสภาพ นำเซลล์ม้ามของหนูขาวมารวมกับเซลล์ myeloma P3X และจากการคัดเลือก hybridoma clone โดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA โดยใช้สารสกัดจากรังไข่ของปูทะเลเป็นแอนติเจน และ dot-ELISA โดยใช้สารสกัดจากรังไข่ เลือดตัวเมียที่รังไข่กำลังเจริญ เลือดตัวผู้ ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ และเสียสภาพ และหน่วยย่อย 2 หน่วยของไวเทลลินจากรังไข่ที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE (ขนาด 107 และ 78 กิโลดาลตัน) เป็นแอนติเจน สามารถแยก hybridoma ได้ 14 โคลน จากการตรวจความจำเพาะของ MAb โดยวิธี dot-blot และ Western blot พบว่ามี 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 สร้าง MAb ที่สามารถจับได้กับทั้งสองหน่วยย่อยของไวเทลลินจากรังไข่ (107 และ 78 กิโลดาลตัน) กลุ่มที่ 2 สร้าง MAb ที่สามารถจับได้กับหน่วยย่อยขนาด 78 กิโลดาลตัน กลุ่มที่ 3 สร้าง MAb ที่สามารถจับได้กับหน่วยย่อยขนาด 107 กิโลดาลตัน กลุ่มที่ 4 สร้าง MAb ที่สามารถจับได้กับโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลสูงในรังไข่และในเลือดปูเพศเมีย แต่ไม่จับกับโปรตีนในเลือดปูเพศผู้ Mab ที่ผลิตได้เป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG_1 12 โคลน ชนิด IgG_{2b} 1 โคลน และชนิด IgM 1 โคลน MAb ที่ผลิตได้สามารถจับกับไวเทลลินและ ไวเทลโลเจนินที่ถูกทำให้เสียสภาพได้ดีกว่าไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ และสามารถนำมาใช้ศึกษาลักษณะโมเลกุลของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของปูชนิดนี้ได้ ซึ่งพบว่าโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ มี 2 หน่วยย่อย (107 และ 78 กิโลดาลตัน) ส่วนโปรตีนไวเทลโลเจนินในเลือดเพศเมียประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย (190, 107 และ 78 กิโลดาลตัน)

การตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดด้วยวิธี indirect immunoperoxidase competitive ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (นุชนาถ เกษมวงศ์, 2542) เพื่อตรวจดูความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงไวเทลโลเจนินในเลือดระหว่างการเจริญของรังไข่ พบว่าระดับไวเทลโลเจนินของปูแต่ละตัวที่ถูกชักนำให้รังไข่เจริญโดยการตัดตาทั้ง 2 ข้างให้ความสัมพันธ์ในรูปแบบที่คล้ายกันคือ หลังจากตัดตาได้ 2 วัน (ระยะแรกของการเจริญของรังไข่) ปริมาณไวเทลโลเจนินเฉลี่ยยังอยู่ในระดับต่ำ และค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในวันต่อมา จนกระทั่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง 10-18 วันหลังจากตัดตา และลดลงอย่างรวดเร็วก่อนปูวางไข่ ค่าสูงสุดของปริมาณไวเทลโลเจนินของปูทั้ง 8 ตัว อยู่ระหว่าง 1-3.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาควิชา	ชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต...
สาขาวิชา	สัตววิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.............................
ปีการศึกษา	2543	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม........................

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4172286223 : MAJOR ZOOLOGY
KEY WORD: CRUSTACEAN / MONOCLONAL ANTIBODIES / *Scylla serrata* / VITELLIN / VITELLOGENIN

DUANGJAI NGAMSOM : RELATIONSHIP BETWEEN HAEMOLYMPH VITELLOGENIN LEVELS AND OVARIAN DEVELOPMENT OF MUD CRAB *Scylla serrata* (Forskal, 1775) USING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST DENATURED VITELLIN.
THESIS ADVISOR: Asist. Prof. Orawan Satayalai, Ph.D.; THESIS CO-ADVISOR: Assoc. Prof. Paisarn Sithigorngul, Ph.D. 104 pp. ISBN 974-346-917-6.

Monoclonal antibodies (MAbs) specific to vitellin and vitellogenin of *Scylla serrata* were produced by fusion of P3X myeloma and spleen cells of a mouse immunized with denatured crude ovarian extract isolated from gravid *S. serrata* ovaries. Hybridoma were selected by indirect immunoperoxidase ELISA against ovarian extract, followed by dot-blot against native and denatured protein from ovarian extract, female haemolymph, male haemolymph and 2 vitellin subunits (78 and 107 kD). Fourteen hybridoma clones were selected. After dot-ELISA and Western blot analysis these hybridoma clones were divided into four groups. MAbs in the first group bind specifically with both 78 kD and 107 kD protein subunits of the ovarian extract, MAbs in the second group bind only with 78 kD subunit. MAbs in the third group bind only with 107 kD subunits and MAbs of the fourth group bind with high molecular weight protein in ovary and haemolymph. MAbs from twelve hybridoma clones belong to the IgG_1 subclass and one each belongs to IgM and IgG_{2b} subclasses. All MAbs preferentially bind to denatured vitellin and vitellogenin. These MAbs were used for molecular characterization of vitellin and vitellogenin in this crab species. Vitellin derived from ovary consists of two subunits (107 and 78 kD), while three subunits (190, 107 and 78 kd) of vitellogenin were found in the haemolymph.

Indirect immunoperoxidase competitive ELISA using monoclonal antibodies specific to native vitellin and vitellogenin (Nuchanath Kasemwong, 1999) was applied for determination of vitellogenin levels in haemolymph in order to determine the alteration of vitellogenin in the haemolymph during ovarian development. From 2 days after eye-ablation (early vitellogenesis), vitellogenin was detected at low levels then gradually increased to their zenith during 10-18 days and abruptly dropped to a low level few days before spawning. The maximum vitellogenin concentration of individual crab ranged from 1 to 3.5 mg/ml.

Department	Biology	Student's signature……………………………….
Field of study	Zoology	Advisor's signature……………………………….
Academic year	2000	Co-advisor's signature…………………………...

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้ทรงคุณวุฒิหลายท่านที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงต่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ สัตยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้การสนับสนุนในทุกด้าน รวมทั้งช่วยแก้ไขข้อบกพร่อง ตั้งแต่เริ่มแรกจนกระทั่งสำเร็จเรียบร้อยทุกประการ

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาและประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล อาจารย์ ดร. พงชัย หาญยุทธนากร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ที่ได้ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเทคนิคที่ใช้ในการศึกษารวมทั้งความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ อาจารย์ ดร. สุกมล ศรีขวัญ อาจารย์นพดล กิตนะ และอาจารย์จิรารัช ศรีจันทร์งาม สำหรับความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และข้อแนะนำที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณชำนาญ ประกอบกิจ และ ครอบครัวสวัสดี ที่ได้ให้ความสนใจคัดเลือกปูให้คำแนะนำต่าง ๆ และเอื้อเฟื้อขายปูทะเลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ในราคาย่อมเยา

ขอขอบคุณ คุณนุชนาถ เกษมวงศ์ คุณปรเมษฐ์ บุญกุศล คุณอดุลย์ จุงน้อย คุณเสรี ดอนเหนือ คุณธงชัย งามประเสริฐวงศ์ คุณสิริรักษ์ อารทรากร คุณพิมพรรณ เงินเทศ คุณภัทรา พลับเจริญสุข คุณปิยมาศ การสมดี คุณจันทิมา ปิยะพงษ์ คุณนันทน์ นนทปัทมดุลย์ คุณนันทิกา ปานจันทร์ คุณปิยนาถ เกียรติสมชาย ที่ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ สำหรับการศึกษาครั้งนี้ และเป็นกำลังใจให้เสมอมาตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปูทะเล

ขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ใช้ไนโตรเจนเหลวตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณทบวงมหาวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาในโครงการพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิตติกรรมประกาศ.. .... ฉ

สารบัญ... .... ช

สารบัญตาราง.. ซ

สารบัญภาพ.. ฌ

บทที่

1 บทนำ.. 1

2 สอบสวนเอกสาร 4

3 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา.. 26

4 ผลการศึกษา และอภิปรายผลการศึกษา.. 47

5 สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ... 71

รายการอ้างอิง.. 74

ภาคผนวก.. 84

ภาคผนวก ก อุปกรณ์... 85

ภาคผนวก ข สารเคมีและการเตรียมสารเคมี.. 88

ภาคผนวก ค ข้อมูล การวัดปริมาณไวเทลโลเจนิน... 99

ประวัติผู้เขียน.. 104

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	การศึกษาเกี่ยวกับแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน...............	23
2-2	การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน..	25
4-1	คุณสมบัติและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน..	58
4-2	การศึกษาไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของปู 5 ชนิด..................................	59
4-3	ปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดปูทะเล *S. serrata* หลังจากตัดตา......................	68
4-4	การศึกษาปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของครัสตาเชียน................................	70
ค-1	ค่าความแม่นยำของวิธี competitive ELISA..	100

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ภาพวาดโครงสร้างภายนอก รยางค์ และบริเวณต่าง ๆ ของด้านหลัง (dorsal) และด้านท้อง (ventral) ของปูกลุ่ม Branchyuran ครอบครัว Portunidae	6
2-2	ภาพถ่ายของปูทะเลเพศเมีย ด้านหลัง (dorsal) และด้านท้อง (ventral)	7
2-3	โครงสร้างของ chemosensory hair บน antenna ของกุ้ง lobster *Panulirus* ภาพ SEM ของ chemoreceptive setae บนผิวลำตัวของกุ้ง *Stenopus hispidus* และบนขาเดินของกุ้ง lobster	8
2-4	ตัวอ่อนของปูทะเลระยะซูเอีย และระยะเมกาโลปา	10
3-1	ฟาร์มเลี้ยงปูทะเล ตำบลบางแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม และการจับปูโดยใช้จั่น	26
3-2	สรุปขั้นตอนดำเนินการศึกษา	28
3-3	รูปแบบการหยอดแอนติซีรัมและแอนติเจนบนวุ้นสำหรับการทำ double immunodiffusion	30
3-4	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่เสียสภาพ	32
3-5	การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA (Indirect Immunoperoxidase)	35
3-6	รูปแบบการหยดแอนติเจนชนิดต่าง ๆ บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส	36
3-7	การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot-blotting	37
3-8	การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot	41
3-9	การตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA	42
3-10	แผนผังการหา class และ subclass ของ hybridoma conditioned media ด้วยวิธี ELISA	43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

3-11 การตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนินในเลือดปูทะเลโดยวิธี competitive ELISA......... 46

4-1 การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแอนติซีรัมของหนูขาว 4 ตัวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดจากรังไข่ที่เสียสภาพธรรมชาติต่อแอนติเจนต่าง ๆ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น.. 48

4-2 การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (SSVS-....) โดยวิธี dot-blotting ... 50

4-3 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อโปรตีนแอนติเจนในสภาพธรรมชาติโดยวิธี Western blot.................................... 51

4-4 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อโปรตีนแอนติเจนที่ถูกทำให้เสียสภาพโดยวิธี Western blot.................................... 54

4-5 การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแอนติซีรัมของหนูขาว 4 ตัว ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดรังไข่ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ ต่อแอนติเจนต่างๆ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น.. 56

4-6 Western blot analysis ภายหลังนำสารสกัดจากรังไข่และเลือดของปูทะเลเพศเมียไปตกตะกอนด้วย mouse antivitellin antiserum................................ 57

4-7 ผล competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและตัวอย่างเลือดปูทะเล *S. serrata* เพศเมียและเพศผู้โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (SSV-71) 61

4-8 การวางไข่ของปูทะเล *S. serrata* ที่ถูกกระตุ้นให้รังไข่เจริญโดยการตัดตา............ 64

4-9 ลักษณะของไข่ที่ปล่อยออกนอกร่างกายของปูเพศเมียบางส่วนติดอยู่ที่ pleopod...... 64

4-10 การเปลี่ยนแปลงระดับไวเทลโลเจนินในเลือดปูทะเลแต่ละตัวภายหลังการกระตุ้นให้รังไข่เจริญโดยการตัดตา.. 69

ค-1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเล *Scylla. serrata* เพศเมียกับดัชนีของรังไข่ของปูแต่ละตัว.. 101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ค-2 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กับดัชนีของรังไข่ของปูแต่ละตัว 101

ค-3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กับระยะการเจริญของรังไข่................. 102

ค-4 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กับระยะการลอกคราบ........... 102

ค-5 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กับระยะการเจริญของรังไข่ของปูแต่ละตัว 103

ค-6 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กับการเจริญของรังไข่หลังจากตัดตา...................... 103

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปูทะเล *Scylla serrata* (Forskal, 1775) มีการแพร่กระจายตัวอยู่ในภาคใต้ และฝั่งตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นพื้นที่ป่าชายเลน และบริเวณปากแม่น้ำ ปูทะเลจัดเป็นสัตว์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของไทยชนิดหนึ่ง มีผู้นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเนื้อมีรสชาดดี และมีความต้องการบริโภคอย่างสูงในหลาย ๆ ประเทศ ได้แก่ มาเลเซีย สิงคโปร์ ไต้หวัน และฮ่องกง (Liong, 1993) โดยจะนิยมกินไข่ของปูทะเลเพศเมีย และเนื้อของปูทะเลเพศผู้เพราะมีก้ามใหญ่ อัตราการจำหน่ายปูทะเลของประเทศไทยในแต่ละปี อยู่ในช่วง 4,200-6,200 ตัน มีมูลค่า 168.4-496.0 ล้านบาท (Pripanapong และ Tongdee, 1988) ปูทะเลที่ใช้ในการบริโภคในปัจจุบันได้มาจากการจับตัวเต็มวัยจากธรรมชาติโดยตรง หรือนำลูกปูจากธรรมชาติมาเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัย แล้วจึงนำมาขาย เห็นได้ว่าปูทะเลทั้งที่บริโภคในประเทศและส่งเป็นสินค้าออกทุกวันนี้ ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติทั้งสิ้นทำให้ในปัจจุบันประชากรปูทะเลของประเทศไทยมีปริมาณลดน้อยลง และยังพบว่าปูทะเลที่จับได้ในปัจจุบันมีขนาดตัวเล็กลงหลังจากปี 2532 ตามรายงานขนาดของปูทะเลที่จับได้ในจังหวัดระนองและจังหวัดใกล้เคียงในระหว่างปี 2532-2536 (ชลธิ, 2533; สุภาพ, 2536; สุภาพ, 2539 อ้างถึงใน บรรจง เทียนส่งรัศมี และคณะ, 2541) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ทำให้ปูทะเลมีขนาดลดลง ได้แก่ การลดลงของจำนวนป่าชายเลนซึ่งเป็นที่อาศัยและแหล่งหากินของปูทะเล รวมทั้งสิ่งแวดล้อมของป่าชายเลนที่เปลี่ยนแปลงไป (Liong, 1993) ข้อมูลดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการใช้ทรัพยากรปูทะเลอย่างหนักจนเกินกำลังที่ประชากรปูทะเลในธรรมชาติจะมีการเจริญทดแทนได้ทันดังนั้นจึงมีผู้ให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ รวมทั้งนิเวศวิทยาของปูทะเล เพื่อนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตปูทะเลให้มีมากพอกับการบริโภคและเปิดโอกาสให้ประชากรปูทะเลในธรรมชาติได้มีโอกาสฟื้นตัว

การเพาะเลี้ยงปูทะเลยังอยู่ในขั้นเริ่มต้น และยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าการเพาะเลี้ยงกุ้ง การเพาะเลี้ยงปูทะเลยังมีอุปสรรคอีกหลายขั้นตอน เนื่องจากไม่สามารถติดตามการเจริญของรังไข่ปูในระยะต้นโดยดูจากภายนอกได้เช่นในกุ้ง ดังนั้นการติดตามการเจริญของรังไข่โดยเฉพาะในระยะต้น ๆ จำเป็นต้องฆ่าแม่ปู การศึกษาการเจริญของไข่ในสัตว์กลุ่ม decapod นี้ทำได้หลายแบบ เช่น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีของรังไข่ โดยมองผ่านกระดอง (carapace) ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้กับเฉพาะในกุ้ง เพราะมี carapace บาง การศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในรังไข่โดยใช้

เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) และ/หรือ อิมมูโนไซโตเคมิสทรี (immunocytochemistry) นอกจากนี้การเจริญของรังไข่สามารถตรวจสอบได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไวเทลโลเจนินในเลือดได้ (ศิวาพร และคณะ, 2537; Byard และ Aiken, 1984; Okumura และคณะ, 1992; Lee และคณะ, 1996; Lee และ Chang, 1997) เนื่องจากในขณะที่รังไข่มีการเจริญจะตรวจพบโปรตีนในเลือด ที่เรียกว่า ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) ซึ่งพบเฉพาะในเลือดของเพศเมีย (female specific protein) ที่มีการเจริญของรังไข่เท่านั้น ไม่พบในเพศผู้และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่มีการเจริญ (Kerr, 1969; Tom, และคณะ, 1987b) ไวเทลโลเจนินเป็นสารตั้งต้นของไวเทลลิน (vitellin) ซึ่งเป็น lipoglyco-carotenoprotein ที่สะสมในเซลล์ไข่ที่กำลังมีการเจริญ โดยเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของไข่แดง (Kerr, 1969) ดังนั้นไวเทลลินและไวเทลโลเจนินจึงมีความเหมือนกันในด้านอิมมูโน (Wolin และคณะ, 1973; Fyffe และ O' Connor, 1974) กระบวนการสร้างและสะสมไข่แดงนี้เรียกว่า ไวเทลโลเจนีซิส (vitellogenesis)

จากการศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของครัสตาเชียนพบว่ามีทั้งชนิดที่สร้างภายในรังไข่เอง (Dehn และคณะ, 1983; Yano และ Chinzei,1987; Quackenbush, 1989; Browdy และคณะ, 1990; Lee และ Watson, 1995) และชนิดที่มีการสร้างจากแหล่งอื่นนอกรังไข่ (Kerr, 1969; Tom และคณะ, 1987a; Rani และ Subramoniam, 1997) แล้วปล่อยออกสู่กระแสเลือด จากนั้นถูกนำเข้าสะสมในเซลล์ไข่ที่กำลังมีการเจริญในรูปของไวเทลลินโดยวิธี endocytosis (Wallace และคณะ, 1967; Horn และ Kerr, 1969; Derelle และคณะ, 1986; Chang และคณะ, 1994) ซึ่งพบกระบวนการนี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ออกไข่ รวมทั้งแมลงส่วนใหญ่ด้วยเช่นกัน (Carlson, 1988) ข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งที่สังเคราะห์ไวเทลโลเจนินและกลไกการสะสมไวเทลลินของปูทะเลยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในกุ้งพบว่าการเจริญของรังไข่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือด (Byard และ Aiken, 1984; Lee และ Chang, 1997) ดังนั้นจึงเชื่อว่าการติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของแม่ปูจะสามารถบ่งชี้ระยะการเจริญของรังไข่ได้โดยไม่ต้องฆ่าแม่ปู ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนและจัดการการเพาะเลี้ยงปูทะเลเพื่อผลิตลูกปูวัยอ่อน การศึกษาครั้งนี้จะศึกษาติดตามการเจริญของรังไข่ปูทะเลโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินในการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเล โดยคาดว่าจะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการติดตามการเจริญของรังไข่เพื่อคัดเลือดแม่ปูทะเลที่อยู่ในระยะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะฟักลูกปูวัยอ่อนต่อไป ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่เป็นทางเลือกที่ดีกว่าการสังเกตสีและขนาดของรังไข่เพราะสามารถติดตามการเจริญพันธุ์ของปูทะเลโดยไม่ต้องเปิดกระดองแม่ปู นอกจากนี้การ

ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของรังไข่กับระดับไวเทลโลเจนินในเลือดได้นั้นจะนำไปสู่ความเข้าใจวงจรการสืบพันธุ์ของปูทะเลได้

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่ถูกทำให้เสียสภาพ และนำไปใช้ในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนนินในเลือดของปูทะเลที่มีการเจริญของรังไข่ในระยะต่างๆ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของปูทะเล Scylla serrata (Forskal, 1775)

2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดปูทะเลโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ระยะต่างๆ ของปูทะเลที่ถูกชักนำให้รังไข่เจริญโดยการตัดตา

สมมติฐานของการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดมีความสัมพันธ์กับการเจริญของรังไข่ระยะต่างๆ ของปูทะเล Scylla serrata (Forskal, 1775)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

สอบสวนเอกสาร

2.1 อนุกรมวิธานของปูทะเล *Scylla serrata* (Forskal, 1775)

ปูทะเล *S. serrata* มีลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Pleocyemata

Infraorder Brachyura

Family Portunidae

ปูทะเลเป็นปูชนิดเดียวในครอบครัว Portunidae ที่อาศัยอยู่ในป่าชายเลน จึงมีชื่อสามัญว่า mud crab หรือ mangrove crab

Keenan และคณะ (1998) ได้ศึกษาปูทะเลในสกุล *Scylla* ในทะเลแดง (Red Sea) และทะเลในเขตอินโดแปซิฟิก (Indo-Pacific) สามารถจำแนกปูทะเลในสกุล *Scylla* ได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ *Scylla serrata* (Forskal, 1775), *Scylla olivacea* (Herbst, 1796), *Scylla tranquebarica* (Fabricius, 1798), และ *Scylla paramamosain* Estampador, 1949 โดยใช้ความแตกต่างของเอนไซม์ (allozyme)ซึ่งจะสามารถบ่งบอกถึงสภาพจีโนไทป์ (genotype) ของแอลลีล (allele) ที่ควบคุมเอนไซม์นั้นได้ และใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (gene) ที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitocondrial DNA) 2 ยีน คือ cytochrome oxidase I และ 16s RNA ประกอบกับการวิเคราะห์
ข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา (morphometry)

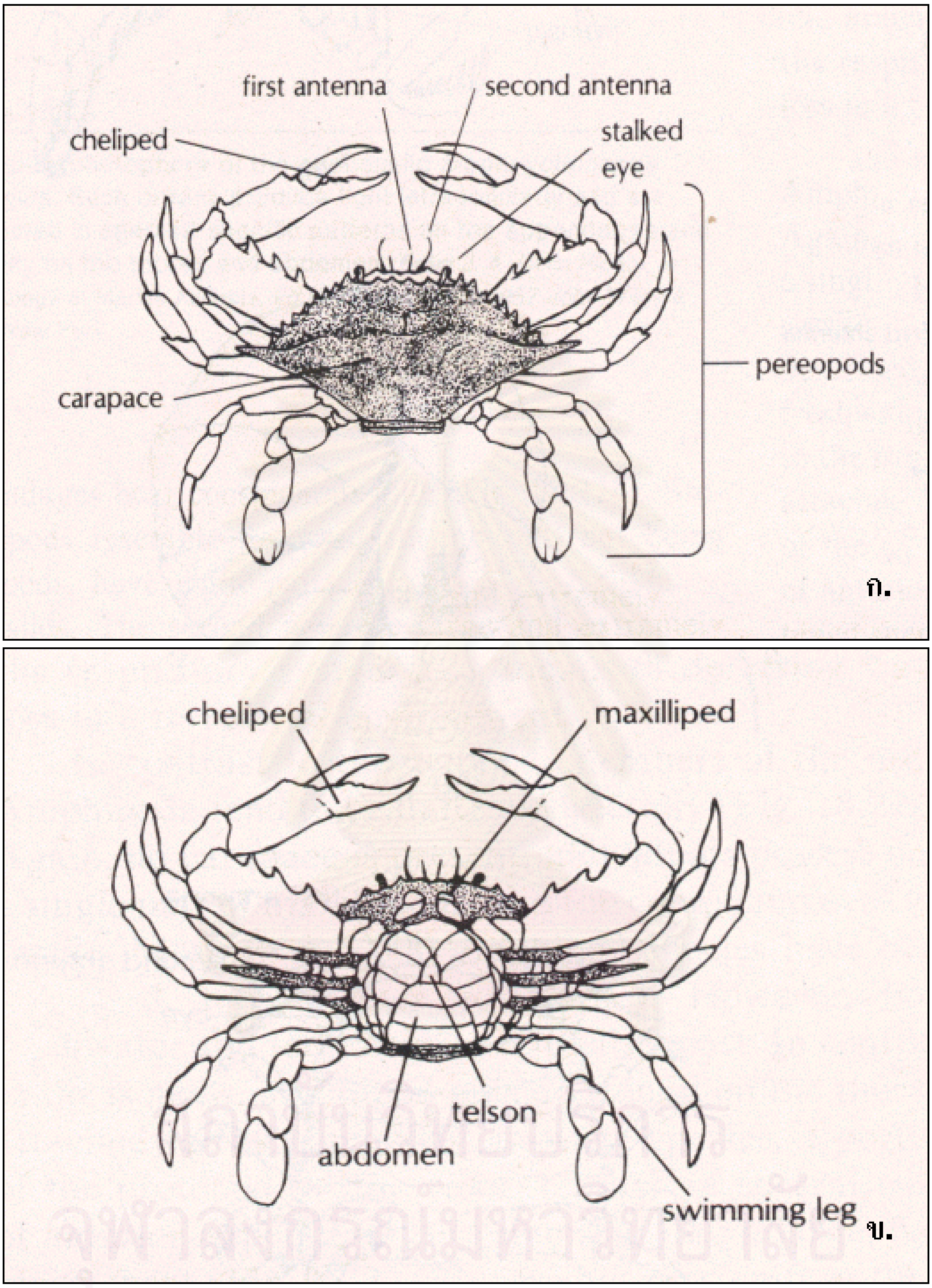
Klinbunga และคณะ (2000) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูทะเล (genus Scylla) ในภาคตะวันออกของประเทศไทย (จังหวัดจันทบุรี และตราด) ด้วยวิธี randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) โดยใช้ primer 3 ตัว คือ UBC456, UBC457 และ YNZ22 สามารถแบ่งแยกปูทะเลออกได้เป็น 3 species อย่างชัดเจน ได้แก่ ปูแดง หรือปูดำ *Scylla serrata* ปูขาว *S. oceanica* และปูเขียว *S. tranquebarica*

2.2 ชีววิทยาของปูทะเล

2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

ปูทะเลมีส่วนประกอบของร่างกาย คือ มีส่วนหัวกับส่วนอกรวมกันเรียกว่า cephalothorax ส่วนนี้จะมีกระดองห่อหุ้มไว้ ลักษณะภายนอกที่สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนคือ ส่วนท้อง (abdomen) ของปูได้วิวัฒนาการโดยเปลี่ยนแปลงไปเป็นแผ่นบางๆเรียกว่า จับปิ้ง พับอยู่ใต้กระดอง (abdomen)จับปิ้งเป็นอวัยวะที่ใช้เป็นที่อุ้มพยุงไข่ของแม่ปู (ในระยะที่มีไข่นอกกระดอง) นอกจากนี้ยังเป็นอวัยวะที่ใช้แยกเพศได้อีกด้วย กล่าวคือ ในเพศเมียจับปิ้งจะมีลักษณะกว้างปลายมนกลมกว่าของเพศผู้ซึ่งมีจับปิ้งรูปเรียวและแคบ กระดองของปูทะเลมีลักษณะเป็นรูปไข่มีส่วนยาวแคบกว่าส่วนกว้างของกระดองด้านหน้า ระหว่างตามีหนามแหลม 6 อันเรียงกัน และมีหนามเรียงทางด้านนอกของตาไปทางด้านซ้ายและขวาของกระดองด้านละ 9 อัน ปูทะเลมีขา 5 คู่ ขาคู่แรกอยู่หน้าสุดมีขนาดใหญ่มากเป็นพิเศษเรียกว่า ก้าม ปลายของก้ามปูแยกเป็น 2 ง่าม มีลักษณะคล้ายคีม ใช้จับเหยื่อกินและป้องกันตัว ส่วนปลายสุดของขาคู่ที่ 2-4 มีลักษณะแหลมเรียกว่า ขาเดิน เพราะทำหน้าที่ในการเดินเคลื่อนที่ ส่วนขาคู่ที่ 5 ซึ่งเป็นคู่สุดท้ายเรียกว่า ขาว่ายน้ำ ตอนปลายสุดของขาคู่นี้ มีลักษณะแบนคล้ายใบพาย เพื่อความสะดวกในการว่ายน้ำ (เสน่ห์ ผลประสิทธิ์, 2541)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2-1 ภาพวาดโครงสร้างภายนอก รยางค์ และบริเวณต่าง ๆ ของปูกลุ่ม Branchyuran ครอบครัว Portunidae (Pechenik, 1991)

ก. ด้านหลัง (dorsal) ข. ด้านท้อง (ventral)

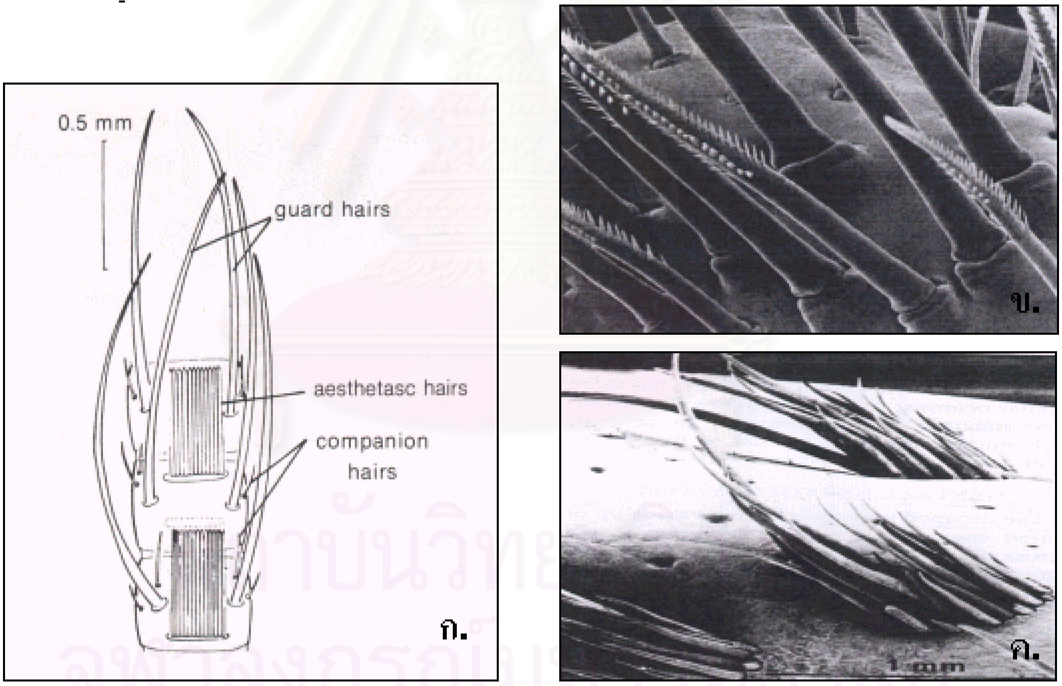
ภาพที่ 2-2 ภาพถ่ายของปูทะเล *Scylla serrata* เพศเมีย ตัวเต็มวัย

ก. ด้านหลัง (dorsal)

ข. ด้านท้อง (ventral)

2.2.2 อวัยวะรับความรู้สึก (Sense Organ)

ตาของปูทะเลเป็นตารวม ประกอบด้วยตาเล็ก ๆ เป็นจำนวนมาก ซึ่งไวต่อสิ่งเคลื่อนไหวที่อยู่รอบตัว และยังมีก้านตาช่วยในการชูลูกตาออกมาภายนอกเบ้า และหดกลับเข้าไปได้ทำให้มันมองเห็นสิ่งต่าง ๆ รอบตัวได้ดียิ่งขึ้น ปูบางชนิดสามารถมองเห็นได้ไกลถึง 20-30 กิโลเมตร ปูสามารถได้ยิน และสร้างเสียงได้หลายแบบ เช่น การเกี้ยวพาราสี ปูเพศผู้จะเรียกร้องความสนใจของปูเพศเมียโดยใช้ก้ามตีพื้น หรือสั่นขาเดิน เพื่อให้เกิดเสียงดัง ปูแต่ละชนิดจะมีเสียงเฉพาะภายในชนิดของตัวเอง สำหรับการดึงดูดเพศตรงข้าม หรือการข่มขู่คู่ต่อสู้ ปูมีขนแข็ง (bristle) และขน (hair) ทำหน้าที่รับความรู้สึกสัมผัส bristle มักพบทั่วตัว แต่จะพบมากบริเวณขาเดิน ทำหน้าที่รับสัมผัสพื้นผิว หรือวัสดุที่แข็ง ส่วน hair มีความไวในการรับสัมผัสกระแสน้ำ นอกจากนี้ปูยังใช้ smell detector ที่มีอยู่บน antennae และขาเดินในการหาอาหาร และเมื่อ smell detector ซึ่งมีอยู่บนขาเดินได้รับสัญญาณเคมีจากอาหาร ก้ามหนีบจะจับอาหารเข้าปากทันทีอย่างสัมพันธ์กัน ซึ่งปูได้อาศัยการทำงานร่วมกันของอวัยวะรับความรู้สึกเหล่านี้ในการหาอาหาร การผสมพันธุ์และการหลบหลีกจากศัตรู (Poore และ Taylor, 2000)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของ chemosensory hairs ซึ่งเรียกว่า aesthetascs ที่อยู่บน antenna ของกุ้ง lobster *Panulirus sp.* (ก.) (Barnes, 1987) ภาพ SEM ของ chemoreceptive setae บนผิวลำตัวของ banded coral shrimp *Stenopus hispidus* x230 (ข.) และบนขาเดินของกุ้ง lobster (ค.) (Harrison and Humes, 1992)

2.2.3 ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล (Reproduction Biology)

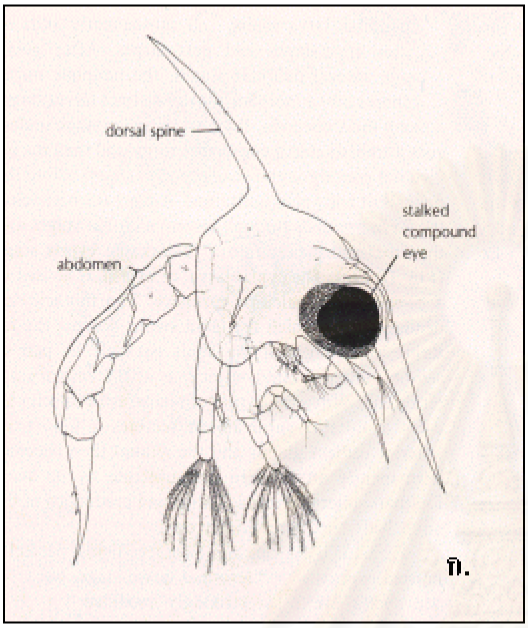
(1) การจับคู่ และการผสมพันธุ์ (Copulation and Mating)

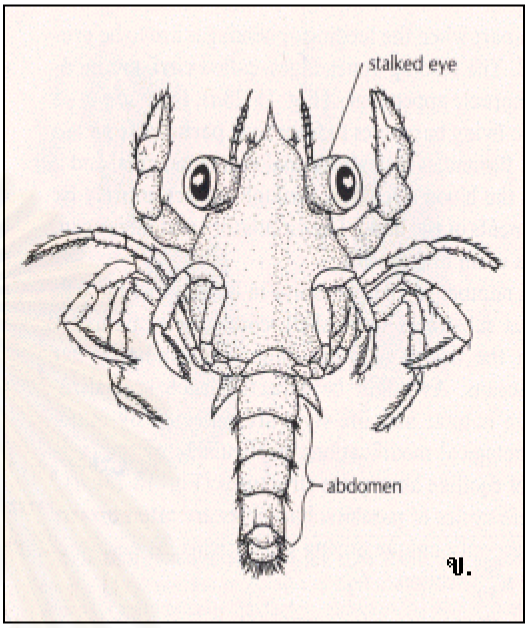
ปูทะเลเพศผู้จะจับคู่กับเพศเมียที่มีความสมบูรณ์ทางเพศพร้อมที่จะสืบพันธุ์โดยปูทะเลเพศผู้จะเกาะอยู่ด้านบนของปูทะเลเพศเมียและใช้ขาเดิน (pereopods) คู่ที่ 2-4 กอดรัดเอาไว้ ปูทะเลเพศผู้ที่จับคู่อยู่จะรอจนกระทั่งปูทะเลเพศเมียลอกคราบ แล้วจึงทำการผสมพันธุ์ โดยจับปูทะเลเพศเมียที่อยู่ด้านล่างหงายเอาด้านท้องขึ้น และส่วนของจับปิ้ง (abdomen) ของปูทั้งคู่จะเปิดอ้าออกเพื่อผสมพันธุ์ ปูทะเลเพศผู้จะผสมพันธุ์กับปูทะเลเพศเมียที่ผ่านการลอกคราบภายในระยะเวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมง โดยจะสอดอวัยวะเพศ (pleopod) และปล่อยถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) ผ่านเข้าไปในแอ่งเก็บน้ำเชื้อ (sperm receptacle) ของปูทะเลเพศเมีย สเปิร์มจะมีชีวิตอยู่ในปูทะเลเพศเมียได้หลายเดือน การผสมพันธุ์นี้อาจใช้เวลามากกว่า 8 ชั่วโมง หลังจากการผสมพันธุ์ปูทะเลเพศเมีย จะคว่ำตัวอยู่ในสภาพปกติ และอาจอยู่กับปูทะเลเพศผู้อีก 2 –3 วัน จนกระทั่งกระดองแข็งแล้วจึงแยกออกมา (สุรชาติ และคณะ, 2538)

(2) การวางไข่ และการเจริญของตัวอ่อน (Spawning and Larval Development)

ปูทะเลเพศเมียมีพฤติกรรมอพยพออกจากชายฝั่งไปสู่ทะเลลึก เพื่อหาที่วางไข่ในทะเลหลังจากที่ได้รับการผสมพันธุ์จากปูทะเลเพศผู้ และไข่มีการเจริญเต็มที่แล้ว พบว่าปูทะเลเพศเมียจะออกไปวางไข่ห่างจากชายฝั่งประมาณ 30-50 กิโลเมตร และอยู่ในระดับน้ำลึก 300 เมตร การวางไข่ของปูทะเลในแต่ละครั้ง จะให้ไข่คราวละไม่ต่ำกว่า 2 ล้านฟอง (Cheewasedtham, 1989) ปูทะเลเพศเมียเมื่อสร้างไข่ในกระดองจนถึงระยะสุดท้ายแล้ว จะปล่อยไข่ออกมาผสมกับน้ำเชื้อ โดย Fielder and Heasman (1978) อ้างถึงใน ชลธี (2539) กล่าวว่า ปูทะเลเพศเมียจะปล่อยไข่ออกมาผ่านท่อนำไข่ (oviduct) และไข่จะถูกปฏิสนธิโดยสเปิร์มที่ถูกเก็บไว้ระหว่างการผสมพันธุ์ ไข่ที่ถูกผสมแล้วจะออกมาติดอยู่ตรงรยางค์ส่วนท้อง (pleopods) ซึ่งติดอยู่กับส่วนปล้องท้อง ปล้องที่ 2-5 รวม 4 คู่ โดย pleopods จะมีขนยาวอยู่เป็นจำนวนมาก และไข่จะออกมาติดกับขนเหล่านี้ ไข่ที่ติดอยู่นอกกระดองจะมีการแบ่งเซลล์และเจริญเป็นเอ็มบริโอ (embryo) แล้วจึงฟักออกเป็นตัวอ่อน (larva) ระยะซูเอีย (zoea) ภายในเวลา 2-4 สัปดาห์ และมีการเจริญต่อไปอีกประมาณ 10-12 วัน จึงเข้าสู่ตัวอ่อนระยะเมกาโลปา (megalopa) ซึ่งมีความยาวประมาณ 4.5 มิลลิเมตร มีลักษณะคล้ายปูมากขึ้น ตัวอ่อนของปูในระยะนี้จะมีการอพยพเข้าใกล้ชายฝั่งทะเลมากขึ้นซึ่งอาศัยทั้งการว่ายน้ำ และกระแสน้ำพัดพาให้กลับเข้าสู่ชายฝั่ง ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 8-10 วัน จึงจะมีการ

เจริญไปเป็นลูกปูทะเลระยะแรก (1st crab instar) มีลักษณะเหมือนปูทะเลตัวเต็มวัย ขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระยะนี้ลูกปูจะเริ่มจมตัวลงสู่พื้นดิน และพากันอพยพกลับเข้าไปอาศัยหากิน และหลบภัยอยู่ในบริเวณป่าชายเลน





ภาพที่ 2-4 ตัวอ่อนในระยะซูเอีย (ก.) และ ตัวอ่อนระยะเมกาโลปา (ข.) (Pechenik, 1991)

(3) การเจริญของรังไข่ (Ovarian Development)

ในปูทะเลเพศเมียเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์และมีความสมบูรณ์เพศ (sexual maturity) รังไข่จะเจริญและเปลี่ยนแปลงอย่างมาก จากการศึกษาพบว่ารังไข่ของปูทะเลที่มีอายุยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์มักจะมีลักษณะเป็นเส้นยาวและใสไม่มีสี แต่เมื่อถึงวัยที่พร้อมจะได้รับการผสมพันธุ์แล้ว รังไข่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งเราสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าเมื่อเปิดกระดองปูออก เนื่องจากรังไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสัณฐานภายนอกรวมทั้งสีและขนาด ปูทะเลที่เริ่มจะมีความสมบูรณ์ทางเพศ รังไข่จะเริ่มเปลี่ยนแปลงจากที่ไม่มีสีกลายเป็นสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อนตามลำดับ จากนั้นรังไข่จะเริ่มขยายตัวเนื่องจากมีการสะสมอาหารภายในเซลล์ไข่ (oocyte) และรังไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงสีและขนาดต่อไป กลายเป็นสีเหลืองส้มและสีส้มแดงตามลำดับ ซึ่งในขั้นนี้จะเป็นขั้นตอนการเจริญขั้นสุดท้ายของรังไข่ Quinn and Kojis (1987) และ Heasman, 1985 อ้างถึงใน ชลธี, 2539 ได้ตั้งข้อสังเกตว่า การเปลี่ยนสีและขนาดของรังไข่จะไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของปูทะเล และจากการศึกษาของ Prasad and Neelakantan, 1989 อ้างถึงใน ชลธี, 2539 เกี่ยวกับขนาดของปูทะเลเพศเมียที่มีระบบสืบพันธุ์สมบูรณ์และสามารถผสมพันธุ์ได้ จะมีขนาด

ตั้งแต่ 80 มิลลิเมตร ขึ้นไป สำหรับปูทะเลเพศเมียที่มีขนาดความกว้างกระดองระหว่าง 91-100 มิลลิเมตร พบว่ามีความสมบูรณ์ทางเพศ โดยการศึกษาในครั้งนี้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ตามสี ขนาดและลักษณะของรังไข่ตามใช้วิธีของ Quinn and Kojis (1987) ซึ่งแบ่งการเจริญของรังไข่ของปูทะเลได้ 5 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 รังไข่จะมีขนาดเล็ก ลักษณะเป็นเส้นบางใส

ระยะที่ 2 รังไข่จะมีขนาดเล็ก ลักษณะสีขาวขุ่นหลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน

ระยะที่ 3 รังไข่ขยายขนาด มีรอยหยัก และมีสีเหลืองอ่อน

ระยะที่ 4 รังไข่ขยายใหญ่มากขึ้น มีรอยหยักเพิ่ม และมีสีเหลืองส้ม ปกคลุมประมาณ 1/2-3/4 ส่วนของตับ-ตับอ่อน (hepatopancreas)

ระยะที่ 5 รังไข่เจริญเต็มที่ ขยายขนาดเกือบเต็มกระดอง มีสีส้มหรือส้มแดง ปกคลุมส่วนของตับ-ตับอ่อนเกือบหมด

(4) **การเจริญของไข่** (oocyte development)

แบ่งออกเป็น 2 ระยะใหญ่ ๆ (Harrison และ Humes, 1992) ได้แก่

1. ระยะ Previtellogenesis ป็นระยะที่มีการสะสมโมเลกุลหลายชนิดในเซลล์ไข่เกิดกิจกรรมหลายอย่างของออร์กาเนลในไซโตพลาสซึม อัตราการสร้างไรโบโซม และ rough Endoplasmic Recticulum (RER) สูงมาก

2. Vitellogenesis เป็นระยะที่มีการสร้างและสะสมไข่แดง (yolk) และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าใน decapods บางชนิด มีการเคลื่อนที่ของสารภายในนิวเคลียสออกสู่ไซโตพลาสซึม ซึ่งปรากฏการณ์นี้อาจจะเป็นการส่งผ่าน RNA หรือ mRNA จากนิวเคลียสสู่ไซโตพลาสซึม และยังมีลักษณะบางอย่างที่สามารถนำมาใช้บ่งบอกว่าไข่อยู่ในระยะที่มีการสร้างและสะสมไข่แดง (vitellogenic oocyte) เช่น microvilli ที่ยื่นออกมาจากเซลล์ไข่จำนวนมาก

กระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง หรือไวเทลโลเจนีซีส (vitellogenesis) เป็นกระบวนการที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของไข่ (oocyte) ในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียนซึ่งมีไข่ชนิดที่มีไข่แดงสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์จำนวนมาก (polylecithal egg) ไข่แดงประกอบด้วย น้ำ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารอาหารอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเอ็มบริโอ ส่วนประกอบของไข่แดงจะแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิดโปรตีนหลักที่สะสมในระหว่างกระบวนการสะสมไข่แดงของไข่ที่กำลังเจริญ คือ ไวเทลลิน(vitellin) หรือไลโปไวเทลลิน (lipovitellin) ไวเทลลินเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) จำนวนตั้งแต่ 2-11 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 40-200 กิโลดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของครัสตาเชียน (Eastman-Reks and Fingerman, 1985) จากรายงานการศึกษาในครัสตาเชียนขณะที่รังไข่มีการเจริญจะตรวจพบโปรตีนในเลือดซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไวเทลลิน เรียกว่า ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) โดยจะพบเฉพาะในเลือดของเพศเมีย (female specific protein) ที่รังไข่กำลังมีการเจริญเท่านั้น ไม่พบในเพศผู้และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่มีการเจริญ (Kerr, 1969; Tom, Goren and Ovadia, 1987b) และจากการศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของครัสตาเชียนพบว่ามีทั้งชนิดที่สร้างภายในรังไข่เองและ/หรือสร้างจากแหล่งอื่นนอกรังไข่ (heterosynthetic vitellogenesis) เช่น ตับ-ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง (subepidermal adipose tissue) จะมีการสร้างออกมาในรูปของไวเทลโลเจนิน หลังจากนั้นปล่อยออกสู่กระแสเลือด และถูกนำเข้าสะสมในรังไข่ที่กำลังมีการเจริญในรูปของไวเทลลินหรือไลโปไวเทลลิน (Kerr,1969) ส่วนรายงานการศึกษาในครัสตาเชียนที่พบว่าไวเทลลินสร้างภายในรังไข่ มีดังนี้

Lui และ O' Connor (1976) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลลินของกุ้ง crayfish *Procambarus sp.* โดยบ่มรังไข่ในอาหารเลี้ยงที่มี ^{3}H leucine และแยกโปรตีนจากสารสกัดรังไข่โดย polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นตรวจวัด ^{3}H leucine บนเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยวิธี densitometry และเทียบกับ densitometric tracing ของไวเทลลินที่ purify แล้ว พบว่ารังไข่สามารถสังเคราะห์ไลโปไวเทลลินได้เอง ซึ่งในปีต่อมา (1977) ศึกษาโดยใช้เทคนิคเดียวกันพบว่ารังไข่ของปูแสม (lined shore crab) *Pachygrapsus crassipes* สามารถสร้างไวเทลลินได้เช่นกัน

Eastman-Reks และ Fingerman (1985) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลลินของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* โดยติดตามการสร้างไวเทลลินด้วย 4,5-^{3}H leucine แยกโปรตีนโดย PAGE และ SDS-PAGE พบว่ารังไข่เป็นแหล่งสร้างไวเทลลินเช่นกัน

Yano และ Chinzei (1987) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลลินของกุ้งคุรุมะ (kuruma) *Penaeus japonicus*โดยการนำเนื้อเยื่อรังไข่และตับ-ตับอ่อนบ่มในอาหารเลี้ยงที่มี ^{14}C-amino acid และติดตามการสังเคราะห์ไวเทลลินด้วยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซีส (immunoelectrophoresis) และ SDS-PAGE (sodium dodesyl-polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่าเฉพาะรังไข่เท่านั้นที่สามารถสร้างไวเทลลินได้

Rankin และคณะ (1989) ศึกษาอัตราการสร้างโปรตีนของรังไข่ และตับ-ตับอ่อนระหว่างการเจริญของรังไข่ใน South American white prawn *Penaeus vannamei* ด้วยวิธี radiolabelled amino acid (^{14}C leucine) จากนั้นตวจสอบผลโดยวิธี autoradiography พบว่าเฉพาะรังไข่ที่เป็นแหล่งสร้างโปรตีนไวเทลลิน

Browdy และคณะ (1990) ศึกษาการสร้างไวเทลลินของรังไข่ในกุ้ง *Penaeus semisulcatus* โดยนำรังไข่ที่อยู่ในระยะต่าง ๆ มาบ่มในอาหารเลี้ยงที่มี ^{14}C leucine และตรวจวัดโปรตีนไวเทลลินที่สร้างโดยรังไข่ด้วยวิธี radioimmunoprecipitation พบว่าปริมาณการสร้างไวเทลลินมีความสัมพันธ์กับระยะของรังไข่เมื่อรังไข่มีเซลล์ไข่ (oocyte) ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 100-380 μm และยังพบว่ารังไข่มีเซลล์ไข่ที่มีขนาด 100-300 μm สามารถสร้างไวเทลลินได้ถึง 40-60% ของโปรตีนทั้งหมดที่รังไข่สร้างขึ้น

Lee และ Walker (1995) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ lipoprotein I และ II ซึ่ง lipoprotein 2 รูปนี้ได้พบและแยกไว้โดย Lee และ Pupione, 1988 เพื่อใช้ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโล-เจนินของเนื้อเยื่อรังไข่ และตับ-ตับอ่อนของปู *Callinectes sapidus* ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรี พบว่าเฉพาะรังไข่ที่สามารถสร้างไวเทลลินได้เนื่องจากพบปฏิกิริยาทางอิมมูโนต่อไลโปไวเทลลินเกิดขึ้นในเซลล์ไข่ที่กำลังมีการเจริญเท่านั้น

Lee และ Watson (1995) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลลินของปูม้า *Callinectes sapidus* โดยนำเนื้อเยื่อรังไข่ ตับ-ตับอ่อน และเหงือกมาบ่มใน ^{35}S methionine จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปสกัด

และตรวจสอบคุณลักษณะโดย SDS-PAGE, Western blotting และ autoradiography พบว่ารังไข่เป็นแหล่งสร้างไวเทลลิน

ครัสตาเชียนชนิดที่มีการสร้างไวเทลลินจากแหล่งอื่นนอกรังไข่มีรายงานการศึกษาโดย Wolin และ คณะ (1973) ได้ศึกษาติดตามการนำเข้าของไลโปไวเทลลินของเซลล์ไข่โดยใช้สารเรืองแสงในปูก้ามดาบ (fiddler crab) *Uca pugilator* กุ้ง crayfish *Cambarus clarkii* และปูแมงมุม (short-clawed spider crab) *Libinia emarginata* พบว่าเกิดพิโนไซโตซีส (pinocytosis) ของไลโปไวเทลลินโดยเซลล์ไข่ที่กำลังมีการเจริญ

Paulus และ Laufer (1987) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลลินของเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อนของ green crab *Carcinus maenas* และ short-clawed spider crab *Libinia emarginata*โดยวิธีอิมมูไซโตเคมิสทรี (immunocytochemistry) และพบเซลล์ที่เชื่อว่าทำหน้าที่สร้างไวเทลโลเจนินในตับ-ตับอ่อน ซึ่งเรียกว่า vitellogenocytes

Tom และคณะ (1987a) ศึกษาโดยใช้วิธีอิมมูไซโตเคมิสทรี และรายงานว่าพบสารตั้งต้นของไวเทลลินในเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนังของกุ้ง *Parapenaeus longirostris.*

Charniaux-Cotton และ Payen (1988) ได้รวบรวมข้อมูลแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินซึ่งได้จากการศึกษาด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ autoradiography โดยบ่มเนื้อเยื่อไว้ในอาหารที่มี ^{14}C-leucine-labelled และ immunofluorescence รายงานว่าไขมัน (fat body) ของ *Orchestia gammarella* (amphipod), *Porcellio dilatatus* (isopods), *Idotea balthica* และกุ้ง *Palaemon serratus* เป็นแหล่งสร้างไวเทลโลเจนิน โดยที่ fat body จะสะสมและปล่อยไวเทลโลเจนินสู่รังไข่เฉพาะเมื่อถึงระยะที่ 2 ของไวเทลโลเจนีซีสเท่านั้น

Fainzilber และคณะ (1992) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลลินของเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนังและเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อนของกุ้ง *Penaeus semisulcatus* โดยบ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงที่มี ^{14}C leucine และตรวจสอบการสังเคราะห์ไวเทลลินโดยวิธี immunoprecipitation โดยใช้แอนติซีรัมต่อไวเทลลินพบว่าเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนังไม่มีการสร้างไวเทลโลเจนิน ในขณะที่เนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อนมีการสร้างไวเทลโลเจนิน และสรุปว่ามีอัตราการสร้างที่ต่ำมาก เนื่องจากได้นำผลการศึกษาการสร้างไวเทลโลเจนินในตับ-ตับอ่อนมาเทียบกับรังไข่ซึ่งศึกษาไว้โดย Browdy และคณะ (1990)พบว่าตับ-ตับอ่อนมีอัตราการสร้างไวเทลโลเจนินน้อยกว่ารังไข่ถึง 23 เท่า

Han และคณะ (1994) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของกุ้ง *Macrobrachium nipponense* ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรี ในเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง กล้ามเนื้อ และรังไข่ พบว่าตับ-ตับอ่อน และเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง เป็นแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินจากภายนอกรังไข่

Vafopoulou และ Steel (1995) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของ *Oniscus asellus* (isopod)โดยบ่มเนื้อเยื่อที่ศึกษาในอาหารเลี้ยงที่มี ^{3}H-leucine และตรวจสอบการสังเคราะห์ไวเทล-ลินโดยวิธี immunoprecipitation โดยใช้แอนติซีรัมต่อไวเทลลินพบว่ารังไข่และ fat body เป็นแหล่งสร้างไวเทลโลเจนิน

Rani และ Subramoniam (1997) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของปูทะเล *Scylla serrata* ซึ่งเป็นการศึกษาแบบ *in vivo* โดยใช้ ^{14}C phenylalanine เป็นตัวติดตามการสร้างไลโปไวเทลลินในเนื้อเยื่อรังไข่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง เนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน และเลือด โดยเก็บเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ มาตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ trichloroacetic acid จากนั้นนำโปรตีนไปแยกใน 3-MM Whatman chromatography paper discs (filter-paper disc method) และตรวจวัด isotope บนกระดาษโดย Liquid Scintillation Counter พบว่าเนื้อเยื่อรังไข่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน สามารถสร้างไวเทลโลเจนินได้โดยขณะที่รังไข่มีการเจริญอยู่ในระยะที่ 1 พบว่าเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน มีการสร้างไวเทลโลเจนินในระดับที่สูงกว่าในรังไข่ ในการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 2 ระดับของ ^{14}C phenylalanine ในรังไข่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ในขณะที่ในเลือดมีระดับ ^{14}C phenylalanine ลดลง ดังนั้นจึงสรุปว่า เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน มีบทบาทในการสร้างและส่งมาตามกระแสเลือดเพื่อเข้าสะสมเป็นไวเทลลินในรังไข่

Lee และ Chang (1999) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* โดยใช้วิธีอิมมูไซโตเคมิสทรี และเทคนิค tracer พบว่าเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนกับแอนติบอดีต่อไวเทลลินในทุกระยะของการเจริญของรังไข่ ในขณะที่พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนกับแอนติบอดีต่อไวเทลลินของเซลล์ไข่เฉพาะในระยะที่มีการสะสมไข่แดง (vitellogenic phase) เท่านั้น และจากการติดตามการสร้างไวเทลโลเจนินโดยบ่มเนื้อเยื่อใน ^{14}C -glycine จากนั้นนำมาตรวจสอบผลโดยวิธี immunoprecipitation พบว่าเฉพาะสารสกัดจากตับอ่อนที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัมต่อไวเทลลิน ดังนั้นจึงสรุปว่า ตับ-ตับอ่อนเป็นแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินที่สำคัญ

ในปีเดียวกัน (1999) Chen และคณะ ศึกษาโดยใช้ mRNA ของไวเทลโลเจนินในการติดตามแหล่งสร้างไวเทโลเจนินของ *M. rosenbergii* โดยวิธี Northern blot และพบว่าเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน เป็นแหล่งสร้างไวเทลโลเจนิน เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Lee และ Chang (1999)

Tsutsui และคณะ (2000) ได้ติดตามแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินใน *Penaeus japonicus* (kuruma prawn) โดยวิธี Northern blot และ *In situ* hybridization ด้วย mRNA ของไวเทลโลเจนิน ของกุ้งชนิดนี้ และได้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ตามค่าดัชนีรังไข่ (GSI) ดังนี้ GSI เท่ากับ 0.2-0.5% เป็นระยะ previtellogenesis (ระยะที่ 1) GSI เท่ากับ 1.2-3.7% เป็นระยะ early exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 2) GSI เท่ากับ 4.4-7.2% เป็นระยะ late exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 3) และ GSI เท่ากับ 7.7-8.9% เป็นระยะ late exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 4) พบ mRNA ที่ code ไวเทลโลเจนินทั้งในเซลล์ฟอลลิเคิล และเซลล์ของตับ-ตับอ่อนของกุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะที่มีการสร้างและสะสมไวเทลลิน (vitellogenic female) และระดับของ mRNA ที่พบในรังไข่มีค่าสูงที่สุดในระยะที่ 2 และลดลงอย่างรวดเร็วในระยะที่ 3 และ 4 ในขณะที่ในตับ-ตับอ่อนปริมาณ mRNA มีค่าเพิ่มสูงขึ้นในระยะที่ 2 จนกระทั่งถึงระยะที่ 3 และเริ่มลดลงในระยะที่ 4 แสดงว่ากุ้งชนิดนี้
มีการสร้างไวเทลโลเจินภายในรังไข่ก่อนที่จะมีการสร้างจากตับ-ตับอ่อน

(5) การควบคุมไวเทลโลเจนีซีสในครัสตาเชียน

การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินและไวเทลลินในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนหลายกลุ่ม เช่น ฮอร์โมนยับยั้งการเจริญของรังไข่ หรือการสะสมไข่แดงของรังไข่ (Gonad or Vitellogenesis Inhibiting Homone, GIH or VIH) ฮอร์โมนนี้สร้างจาก X-organ และเก็บสะสมใน sinus gland ซึ่งอยู่ในก้านตา โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกุ้งและปูชนิดต่างๆ มีฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่แดงของรังไข่อยู่ในส่วนของก้านตา เมื่อมีการทำลายก้านตา จะมีผลทำให้เกิดการเจริญของรังไข่อย่างรวดเร็ว (Anikumar and Adiyodi, 1980)

วิมล สุขตั้งมั่น และคณะ (2539) พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* ค่อย ๆ ลดลงถึงระดับต่ำสุด หลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตากุ้ง แสดงว่าในสารสกัดจากก้านตามีสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน และเมื่อเวลาผ่านไป 28 ชั่วโมง ระดับไวเทลโลเจนินเพิ่มสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับระดับไวเทลโลเจนินเมื่อเริ่มต้นทดลอง

Meusy และคณะ (1987) ศึกษา VIH ในครัสตาเชียนโดยวิธี dot-immunobinding, ELISA และอิมมูโนไซโตเคมิสทรี และพบว่าโครงสร้างของ VIH ไม่ได้เป็นแบบที่เฉพาะเจาะจงสำหรับ ครัสตาเชียนชนิดใดชนิดหนึ่ง เนื่องจากเขาพบว่าแอนติซีรัมต่อ VIH ของ *Homarus americanus* สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับสารสกัดจากต่อมไซนัสของ *Palaemonetes varians, Palaemon serratus, M. rosenbergii, Carcinus maenas* และ *Porcellio dilatatus*

Quackenbush และ Keeley (1988) พบว่าสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้ง *Penaeus setiferus* สามารถยับยั้งการเพิ่มน้ำหนักของรังไข่ของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ที่ถูกตัดตาได้

นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเมื่อทำการศึกษาในสภาพ *in vitro* ของรังไข่ของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ที่ถูกตัดตา

Chen และ Chen (1994) พบว่ากระบวนการสร้างและสะสมไข่แดงของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ถูกกระตุ้นได้โดยการตัดตา ซึ่ง 80% ของกุ้งที่ตัดตาจะวางไข่หลังจากตัดตาแล้ว 7 วัน

Lee และ Watson (1995) พบว่าเมื่อใส่สารสกัดจากก้านตาในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ของปู *Callinectus sapidus* สารสกัดจากก้านตามีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนต่าง ๆ ในส่วนของเนื้อเยื่อรังไข่ โดยผลของการยับยั้งนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัดจากก้านตาด้วย

ส่วน VIH ของครัสตาเชียนมีรายงานว่า มีขนาดอยู่ระหว่าง 2-7.5 กิโลดาลตัน VIH ของ *Homarus americanus* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 77 ตัว (ขนาด 9.135 กิโลดาลตัน) (Soyez และคณะ, 1991)

ฮอร์โมนอีกกลุ่มหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไวเทลโลเจนีซีสและออกฤทธิ์ตรงข้ามกับ VIH คือ ฮอร์โมนกระตุ้นพัฒนาการหรือการสะสมไข่แดงของรังไข่ (gonad or vitellogenesis stimulating hormone, GSH or VSH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่พบในสารสกัดจากสมองและปมประสาทส่วนอกของกุ้ง *Paratya compressa* และสารสกัดนี้สามารถกระตุ้นการเจริญของรังไข่ได้ (Takayanagi และคณะ, 1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Eastman-Reks และ Fingerman (1984) พบว่าสารสกัดจาก thoracic ganglion ซึ่งเป็นแหล่งสร้าง VSH ของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* เพศเมียสามารถกระตุ้นให้รังไข่เจริญอย่างรวดเร็วโดยการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนในการกระตุ้นจะแปรผันไปตามระยะการเจริญของรังไข่ ดังนั้นจึงบอกได้ว่า VSH มีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อตัดตาปูสามารถกระตุ้นการเจริญของรังไข่ได้ จากข้อมูลที่ได้ในปูก้ามดาบนี้เป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าการเจริญของรังไข่ในสัตว์กลุ่ม decapod ถูกควบคุมโดย VIH และ VSH

2.3 การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ในครัสตาเชียน (ตารางที่ 2-2)

ศิวาพร ลงยันต์ และคณะ (2537) ได้ประเมินความแน่นอนของวิธี competitive ELISA ในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือด โดยสุ่มตัวอย่างเลือดกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* มาตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลลินหรือแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน ซึ่งทำในถาด ELISA ที่ต่างกันในเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินที่ตรวจวัดได้ในแต่ละครั้งจะมีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละตัวอย่างเลือดที่ใช้ถึงแม้ว่าจะใช้แอนติซีรัมที่แตกต่างกันก็ตาม ดังนั้นจึงเชื่อว่าวิธีที่ใช้ตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดโดยใช้แอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิดมีความแน่นอนมากพอสมควร หลังจากนั้นได้ศึกษาระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ของกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* ด้วยวิธี competitive ELISA พบว่าไวเทลโลเจนินมีปริมาณต่ำในกุ้งที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1 (0.193 $\pm$ 0.167 mg/ml) แต่จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆในระยะที่ 2-3 (2.343 $\pm$ 0.906 ถึง 2.673 $\pm$ 0.951 mg/ml) และในระยะที่ 4 ซึ่งเป็นระยะก่อนวางไข่ระดับไวเทลโลเจนินจะลดลง (0.708 $\pm$ 0.508 mg/ml) และผลจากการฉีดสารสกัดจากก้านตาให้กุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้างจะชักนำให้ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดเพิ่มสูงขึ้น และค่อยๆลดลงด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ กันจนถึงระดับต้นภายใน 24 ชั่วโมง

Byard และ Aiken (1984) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบ วงจรการสืบพันธุ์ และระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* โดยใช้เทคนิคอิมมูโน-อีเล็กโทรโฟรีซิส (immunoclecIrophoresis) และ enzyme-linked immunosorbent assay พบว่าระดับของไวเทลโลเจนินเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ระหว่างกระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง และจะเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในช่วงเวลาก่อนที่กุ้งลอบสเตอร์จะวางไข่ โดยมีค่าตั้งแต่ 0-12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าในช่วงฤดูหนาวซึ่งตรงกับระยะก่อนการลอกคราบจะไม่สามารถตรวจพบไวเทลโลเจนินในเลือดได้

Derelle และคณะ (1986) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และตรวจวัดไวเทลโลเจนินในเลือดกุ้งเพศเมียโดยวิธี indirect ELISA พบว่าในระยะเริ่มต้นของการเจริญของรังไข่และในระยะสุดท้ายของการลอกคราบปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดมีค่าต่ำกว่า 1 mg/ml ส่วนในระยะที่รังไข่กำลังมีการเจริญปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดมีค่าอยู่ในช่วง 10-15 mg/ml และปริมาณไวเทลโลเจนินจะลดลงอย่างรวดเร็วก่อนที่กุ้งจะวางไข่

Lee และ Pupione (1988) สามารถแยก lipoprotein ในเลือดของปู *Callinectes sapidus* ได้เป็น 2 รูปแบบคือ lipoprotein I และ II ซึ่ง lipoprotein II พบเฉพาะในปูเพศเมีย และประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อยได้แก่ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 109, 107 และ 78 กิโลดาลตัน จากนั้นวัดปริมาณ lipoprotein II หลังจากแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสแล้ว ด้วยวิธีของ Lowry (Lowry's method) พบว่าปริมาณ lipoprotein II ของการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1-8 เป็นดังนี้ ระยะที่ 1 และ 8 เท่ากับ 0 mg/ml ระยะที่ 2 เท่ากับ 0.1 $\pm$ 0.1mg/ml ระยะที่ 3 เท่ากับ 0.2 $\pm$ 0.1mg/ml ระยะที่ 4 เท่ากับ 0.3 $\pm$ 0.2 mg/ml ระยะที่ 5 เท่ากับ 1.1 $\pm$ 0.8 mg/ml ระยะที่ 6 เท่ากับ 4.1 $\pm$ 2.1 mg/ml ระยะที่ 7 เท่ากับ 0.2 $\pm$ 0.1 mg/ml

Okumura และคณะ (1992) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับไวเทลโลเจนิน ในเลือดกุ้ง *M. nipponense* โดยใช้เทคนิค rocket immunoelectrophoresis พบว่าระดับไวเทลโลเจนินระหว่างการเจริญของรังไข่ในกุ้งชนิดนี้มีค่าตั้งแต่ 1-9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในปีเดียวกัน Shafir และคณะ (1992) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดและไวเทลลินในรังไข่ระหว่างการเจริญของรังไข่กุ้ง *Penaeus semisulcatus* โดยวิธี rocket immunoelectrophoresis พบว่าระดับไวเทลโลเจนนินระหว่างการเจริญของรังไข่ในกุ้งชนิดนี้มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 0.439 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณไวเทลลินของรังไข่มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 0.0126 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวถึง 4.55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว แต่อย่างไรก็ตาม ไวเทลโลเจนินในเลือดและไวเทลลินในรังไข่ยังไม่มีความสัมพันธ์กันในเชิงปริมาณ

Quinitio และคณะ (1994) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ steroid hormone และปริมาณไวเทลโลเจนินระหว่างการเจริญของรังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยวัดฮอร์โมนในเลือด รังไข่ และตับ-ตับอ่อนโดยวิธี radioimmunoassay (RIA) และวัดไวเทลโลเจนินในเลือดโดยวิธี single radial immunodiffusion ซึ่งใช้ระยะการเจริญของรังไข่เป็นหลักโดยได้แบ่งการเจริญของรังไข่ออกเป็น 6 ระยะ พบว่าปริมาณฮอร์โมน estradiol-17β ในเลือดสามารถตรวจวัดได้เฉพาะในระยะการเจริญของรังไข่ที่ 5 เท่านั้นโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 30.4 pg/ml estradiol-17β ใน

รังไข่สามารถตรวจวัดได้ในระยะที่ 3-6 โดยมีค่าขึ้นลงไม่คงที่ ส่วน estradiol-17β ในตับ-ตับอ่อนตรวจจวัดได้ในปริมาณน้อยในระยะที่ 2-4 (<20-23.8 pg/g) และเพิ่มขึ้นในระยะที่ 5 (752.6 pg/g) จากนั้นลดลงในระยะที่กุ้งวางไข่ (ระยะที่ 6; 225.5 pg/g) ปริมาณ progesterone ในเลือดสามารถวัดได้ในระยะที่ 2 (49.3 pg/ml) ระยะที่ 3 (83.3 pg/ml) มีปริมาณสูงสุดที่ระยะที่ 4 (137.1 pg/ml) และลดลงหลังการวางไข่จนถึงระยะที่ 3 (60.0 pg/ml) ปริมาณ progesterone ในรังไข่มีค่าสูงสุดอยู่ในระยะที่ 5 (234.7 pg/g) ปริมาณ progesterone ในตับ-ตับอ่อนมีปริมาณต่ำในระยะที่ 2 (103.3 pg/g) และ 3 (48.8 pg/g) แต่มีค่าเพิ่มขึ้นในระยะที่ 4 (232.9 pg/g) และ 5 (269.4 pg/g) จากนั้นมีค่าลดลงหลังจากกุ้งวางไข่ (66.2 pg/g) ปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดสามารถวัดได้ในระยะการเจริญของรังไข่ระยะที่ 3 (0.441 mg/ml) และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระยะที่ 4 (2.640 mg/ml) และ 5 (6.973 mg/ml) จากนั้นลดลงมีค่าเท่ากับ 2.546 mg/ml หลังจากที่กุ้งวางไข่

ในปี ค.ศ.1994 Lee และ Watson ได้นำไวเทลลินที่สกัดได้จากรังไข่ของปู *Callinectus sapidus* ไปผลิตแอนติบอดีต่อไวเทลลินเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของปูเพศเมียโดยวิธี ELISA ได้ช่วงกราฟ standard vitellin ที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 62.5-1,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหาค่าความไวในการตรวจวัดได้ในปริมาณ 148 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาในปี ค.ศ.1996 Lee และคณะได้นำวิธี ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นในปี 1994 มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของรังไข่กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของปู *Callinectes sapidus* พบว่าการเจริญของรังไข่ระยะที่ 1 และ 2 ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนนินได้ แต่เริ่มวัดได้ในระยะที่ 3–6 (0.02$\pm$0.07 ถึง 0.14$\pm$0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งปริมาณไวเทลโลเจนนินที่ตรวจวัดได้มีปริมาณต่ำกว่าค่าไวเทลโลเจนินที่ตรวจวัดได้ในครัสตาเชียนชนิดอื่นๆ ที่มีการรายงานผลมาก่อนหน้านี้ โดยผู้ทำการศึกษาอธิบายว่าปูชนิดนี้ไวเทลโลเจนินถูกสร้างภายในรังไข่ ไวเทลโลเจนินที่ตรวจวัดได้ในเลือดในปริมาณต่ำและมีปริมาณเพิ่มสูงสุดหลังการวางไข่เป็นผลมาจากไวเทลลินในรังไข่ถูกปล่อยออกมาในเลือด และจากการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสตรี ซึ่งใช้แอนติบอดีต่อไวเทลลินเพื่อระบุแหล่งที่สร้างและสะสมไวเทลลิน และ/หรือไวเทลโลเจนิน ทำให้ทราบว่ารังไข่ที่มีการเจริญอยู่ในระยะที่ 1 และ 2 ไม่มีไวเทลลินสะสมอยู่แต่จะพบว่ามีไวเทลลินสะสมอยู่ในรังไข่ที่เจริญอยู่ในระยะที่ 3–6 และไม่พบปฏิกริยาทางอิมมูโนในส่วนของเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน ซึ่งแสดงว่าภายในเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อนไม่มีการสร้างและสะสมไวเทลโลเจนิน

Chang และ Shih (1995) ศึกษาปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดระหว่างการเจริญของรังไข่ของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* โดยเทคนิค ELISA ซึ่งได้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ออกเป็น 5 ระยะ พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินเริ่มวัดได้ตั้งแต่ระยะที่ 1 (1.82 mg/ml) และเพิ่มขึ้นในระยะที่ 2 (2.12 mg/ml) หลังจากนั้นมีระดับคงที่อยู่ในระดับนี้จนถึงระยะที่ 4 (ระยะที่ 3 มีค่าเท่ากับ 2.05 mg/ml; ระยะที่ 4 มีค่าเท่ากับ 2.48 mg/ml) และมีระดับลดลงในระยะก่อนกุ้งวางไข่หรือกำลังวางไข่(ระยะที่ 5 มีค่าเท่ากับ 1.42 mg/ml)

Lee และ Chang (1997) ได้ใช้เทคนิค ELISA ตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนิน และโปรตีนในเลือดในรังไข่ และในตับ-ตับอ่อน ของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ พบว่าไวเทลโลเจนินในเลือดมีปริมาณต่ำในขณะที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1 (0.05±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และระยะที่ 2 (1.19±0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นระดับไวเทลโลเจนินจะเพิ่มสูงสุดในระยะที่ 3 (2.89±0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และยังคงมีปริมาณสูงในระยะที่ 4 (2.67±0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และระยะที่ 5 (2.51±0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากนั้นพบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินลดลงจนเกือบจะตรวจวัดไม่ได้เมื่อใกล้ถึงเวลาที่กุ้งจะวางไข่

Longyant (1999) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน เพื่อนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยวิธี competitive ELISA และหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับระยะการเจริญของรังไข่ของกุ้งกุลาดำ พบว่าระดับไวเทลโลเจนินในกุ้งแต่ละตัวหลังจากชักนำให้รังไข่เจริญโดยการตัดตาแสดงความสัมพันธ์ที่คล้ายกัน โดยในวันที่ 2 หลังจากตัดตา (รังไข่เริ่มเจริญระยะที่ 2 มีค่าเท่ากับ 1.427 ± 1.701 mg/ml) ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดเริ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (ระยะที่3 มีค่าเท่ากับ 2.910 ± 3.601 mg/ml) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดในช่วง 2-5 วัน (รังไข่เจริญเต็มที่) จากนั้นระดับไวเทลโลเจนินจะลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 1 วันก่อนการวางไข่ (ระยะที่ 4 มีค่าเท่ากับ 1.384 ± 1.105 mg/ml)

Jasmani และคณะ (2000) ได้พัฒนาวิธี enzyme immunoassay (EIA) เพื่อใช้ตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้ง kuruma *Penaeus japonicus* สามารถตรวจวัดไวเทลโลเจนินได้ในช่วง 1.56-100 ng/well ค่าความเชื่อมั่นภายในถาดเดียวกันเท่ากับ 6% และระหว่างถาดเท่ากับ 10.5% ได้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่โดยใช้ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์ไข่ไว้ 3 ระยะ คือ previtellogenesis (เป็นระยะเซลล์ไข่อยู่ในระยะเริ่มต้นของการแบ่งเซลล์พบว่าเซลล์ไข่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในระยะนี้มีไซโตพลาสซึมน้อย พบโครโมโซมที่มาเข้าคู่กันจัดเรียงตัวคล้ายช่อดอกไม้ และพบนิวคลีโอลัสอยู่ชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์) ในระยะนี้พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินมีระดับต่ำมาก (0.14 mg/ml) และเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ endogenous vitellogenesis (เป็นระยะที่ย้อมติดสี periodic acid schiff) มีค่า 2.93 mg/ml และมีปริมาณสูงสุดในช่วงต้นของระยะ exogenous vitellogenesis (เป็นระยะที่พบ yolk granule) มีค่า 5.07 mg/ml และค่อย ๆ ลดลงในช่วงปลายของระยะนี้ (3.79 mg/ml)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2-1 การศึกษาเกี่ยวกับแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน

Species	Methods	Sites of vitellogenesis	References
Procambarus sp. (crayfish)	*In vitro* radiolabelled (^{3}H-leucine)	OV	Lui และ O' Connor, 1976
Pachygrapsus crassipes (lined shore crab)	*In vitro* radiolabelled (^{3}H-leucine)	OV	Lui และ O' Connor, 1977
Uca pugilator (fiddler crab)	*In vitro* radiolabelled (4,5-^{3}H leucine)	OV	Eastman-Reks และ Fingerman ,1985
Penaeus japonicus (kuruma prawn)	*In vitro* radiolabelled (^{14}C-amino acid)	OV	Yano และ Chinzei, 1987
Carcinus maenas (green crab) and *Libinia emarginata* (short-clawed spider crab)	Immunocytochemistry	OV, HP	Paulus และ Laufer, 1987
Parapenaeus longirostris	Immunocytochemistry	SAT	Tom และคณะ, 1987a
Orchestia gammarella (amphipod), *Porcellio dilatatus* (isopods), *Idotea balthica, Palaemon serratus*	Immunocytochemistry,autoradiography, ^{14}C-leucine-labelled, immunofluorescence	Fat body	Charniaux-Cotton และ Payen, 1988
Penaeus vannamei	*In vitro* Radiolabelled (^{14}C leucine)	OV	Rankin และคณะ, 1989

OV = Ovary HP= Hepatopancreas SAT = Subepidermal adipose tissue

ตารางที่ 2-1 การศึกษาเกี่ยวกับแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน (ต่อ)

Species	Methods	Sites of vitellogenesis	References
Penaeus semisulcatus	*In vitro* Radiolabelled (^{14}C leucine)	OV	Browdy และคณะ, 1990
Penaeus semisulcatus	*In vitro* Radiolabelled (^{14}C leucine)	HP	Fainzilber และคณะ, 1992
Macrobrachium nipponense	Immunocytochemistr y	HP, SAT	Han และคณะ, 1994
Callinectes sapidus	*In vitro* radiolabelled (^{35}S methionine)	OV	Lee และ Watson, 1995
Callinectes sapidus	Immunohistochemistry	OV	Lee และ Walker, 1995
Scylla serrata	*In vitro* radiolabelled (^{14}C phenylalanine)	OV, HP, SAT	Rani และ Subramoniam, 1997
Macrobrachium rosenbergii	*In vitro* radiolabelled (^{14}C –glycine), Immunocytochemistry	HP	Lee and Chang, 1999
Macrobrachium rosenbergii	Immunohistochemistry *In situ* hybridization (mRNA)	OV, HP	Chen และคณะ, 1999
Oniscus asellus (Isopod)	*In vitro* radiolabelled (^{3}H-leucine)	OV, fat body	Vafopoulou และ Steel, 1995
Penaeus japonicus	*In situ* hybridization (mRNA)	OV, HP	Tsutsui และคณะ, 2000

OV = Ovary HP= Hepatopancreas SAT = Subepidermal adipose tissue

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2-2 การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน

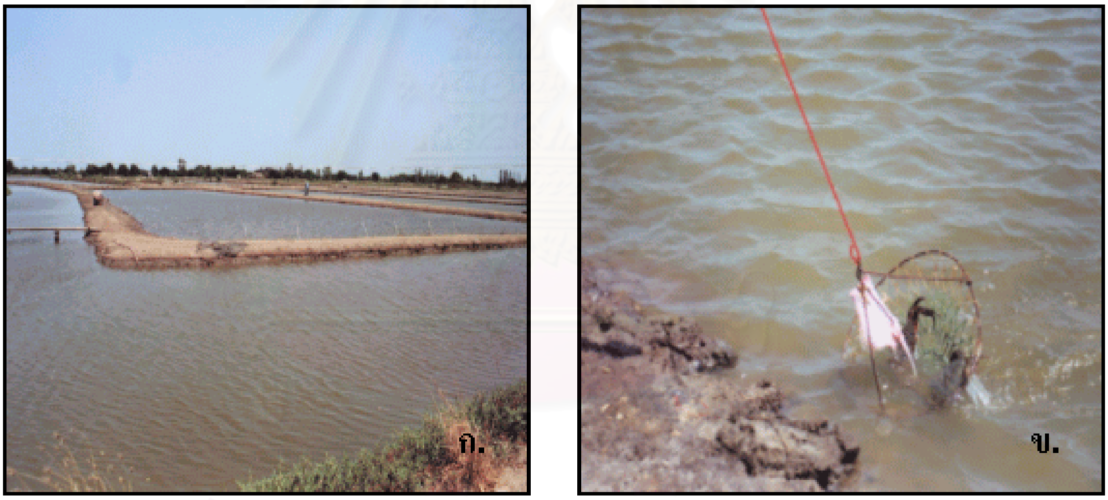
Species	Methods	References
Metapenaeus affinis	Competitive ELISA	ศิวาพร ลงยันต์, 2537
Homarus americanus	Immunoelectrophoresis, Competitive ELISA	Byard และ Aiken, 1984
Macrobrachium rosenbergii	Competitive ELISA	Derelle และคณะ, 1986
Callinectes sapidus	Ultracentrifugation PAGE, SDS-PAGE, Lowry's method	Lee และ Puppione, 1988
Macrobrachium nipponense	Rocket Immunoelectrophoresis	Okumura และคณะ, 1992
Penaeus semisulcatus	Rocket Immunoelectrophoresis	Shafir และคณะ, 1992
Penaeus monodon	Single radial immunodiffusion	Quinitio และคณะ, 1994
Callinectes sapidus	Competitive ELISA	Lee และ Watson, 1994-1996
Macrobrachium rosenbergii	Competitive ELISA	Chang และ Shih, 1995
Macrobrachium rosenbergii	Competitive ELISA	Lee และ Chang, 1997
Penaeus monodon	Competitive ELISA	Longyant, 1999
Penaeus japonicus	Competitive ELISA	Jasmani และคณะ, 2000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

3.1 สัตว์ทดลอง

3.1.1 ปูทะเล *Scylla serrata* ตัวเต็มวัย (ขนาดความกว้างกระดอง 90-140 เซนติเมตร) ซื้อจากตลาดเทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ เพื่อนำรังไข่ที่เจริญเต็มที่มาสกัดไวเทลลินและซื้อจากฟาร์มเลี้ยง ตำบลบางแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม เพื่อใช้ในการทดลองตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนินระหว่างที่รังไข่เจริญ โดยนำปูทะเลมาเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ในอ่างพลาสติกกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 เซนติเมตร โดยให้เนื้อหอยแมงภู่ และปลาทูสดเป็นอาหาร วันละ 2 ครั้ง เปลี่ยนน้ำทุกๆ 2 วัน ภาพที่ 3-1 แสดงสภาพโดยทั่วไปของฟาร์มเลี้ยงปูทะเล ในจังหวัดสมุทรสงคราม และวิธีการจับปูโดยใช้จั่น



ภาพที่ 3-1 แสดงฟาร์มเลี้ยงปูทะเล ตำบลบางแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม (ก.) และการจับปูทะเลโดยใช้จั่น (ข.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 หนูขาว (Swiss mouse) ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลอง ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล

3.2 ขั้นตอนดำเนินการศึกษา

ประกอบด้วย

1. การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล
2. การปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวเทลลินที่ถูกทำให้เสียสภาพให้กับหนูขาว
3. การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมโดยวิธี double immunodiffusion
4. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนินที่เสียสภาพ
5. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนินโดยวิธี indirect ELISA (indirect enzyme linked immunosorbent assay) และ dot-blotting
6. การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blotting และตรวจสอบ class และ subclass โดยใช้ชุด Mouse MonoAB ID kit (HRP) (ZYMED)
7. การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินด้วยวิธี competitive ELISA
8. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินกับการเจริญของรังไข่ (ดังแผนภาพที่ 3-2)

3.3 วิธีดำเนินการศึกษาโดยละเอียด

1. **การเตรียมสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเล** (ดัดแปลงจาก Longyant et al., 1999)

ผ่าตัดเอารังไข่จากปูทะเลที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 5 (รังไข่มีสีเหลืองส้มหรือส้มแดง) และเก็บรวบรวมไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส บดรังไข่ในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ที่มี ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราส่วน 1 กรัมต่อ 2 มิลลิลิตร บดด้วย homogenizer (Janke & Kunkel) จนละเอียด จากนั้นนำมาปั่นที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนไขมันและตะกอนทิ้ง แยกส่วนสารละลายสีเหลืองส้มส่วนหนึ่งไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (Bradford, 1976) โดยเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ปรับความเข้มข้นของสารละลายเป็น 10 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20

แผนภาพที่ 3-2 แสดงสรุปขั้นตอนดำเนินการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องศาเซลเซียส นำสารสกัดไวเทลลินบางส่วนไปทำให้เสียสภาพโดยต้มกับ treatment buffer (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1: 1 เป็นเวลา 1 นาที และก่อนที่จะนำไปปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว ต้องกำจัด SDS และ mercaptoethanol ใน treatment buffer โดยนำมาทำ dialysis ใน phosphate buffered saline(PBS) ที่ 4 องศาเซลเซียส 4 ครั้ง เป็นเวลา 2 วัน

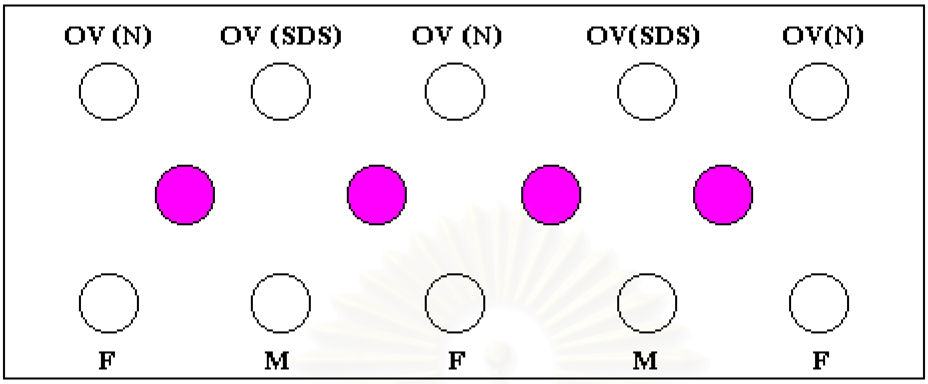
2. **การปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวเทลลินที่ถูกทำให้เสียสภาพให้กับหนูขาว** (ดัดแปลงจาก Goding, 1983)

นำสารสกัดไวเทลลินที่เสียสภาพผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูขาวปริมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อตัว หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีก 2 ครั้ง ทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยการฉีดครั้งที่ 2 จะผสมไวเทลลินที่เสียสภาพกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดครั้งที่ 3 และ 4 โดยไม่ต้องผสม adjuvant หนึ่งสัปดาห์หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เก็บเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณเบ้าตาหนูขาว (retroorbital plexus) จากนั้นนำเลือดไปปั่นที่ 5,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนที่เป็นซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส นำซีรัมของหนูแต่ละตัวไปตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพโดยวิธี double immunodiffusion

3. **การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพของแอนติซีรัมโดยวิธี double immunodiffusion**
(ดัดแปลงจาก Longyant et al., 1999)

เทวุ้น 1.2 % ที่ละลายใน PBS ลงบนแผ่นสไลด์ปริมาตร 4.5-5 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นจนวุ้นแข็งตัว และเจาะวุ้นเป็นหลุมตามแบบในแผนภาพที่ 3-3 หยอดแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบลงในหลุมแถวกลางปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ หยอดแอนติเจนชนิดต่างๆ คือ สารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ในสภาพปกติ และเสียสภาพ เลือดปูทะเลเพศเมียที่มีการเจริญของรังไข่อยู่ในระยะที่ 5 เลือดปูทะเลเพศผู้ ปริมาณหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในกล่องชื้นที่มีฝาปิด เป็นเวลานาน 48-72 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะของแนวตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาของแอนติซีรัมกับแอนติเจน ล้างโปรตีนส่วนที่ไม่เกิดแนวตะกอนออก โดยแช่ในสารละลาย PBS หลายๆ ครั้ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง นำไปย้อมด้วย 0.1% Coomassie brillant blue ที่ละลายใน 50% methanol และ 10% acetic acid เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง และล้างด้วย destain I (50% methanol, 10% acetic acid) (ภาคผนวก ข) จากนั้นล้างต่อด้วย destain II (5% methanol, 7% acetic acid) (ภาคผนวก ข) จนกระทั่งวุ้นใส นำไปทำให้แห้งโดยชุด gel air drying (BIO-RAD) หนูขาวตัวที่

ให้ผลของปฏิกิริยาของแอนติซีรัมกับแอนติเจนที่ดีที่สุดจะถูกนำมาใช้ในขั้นตอนของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป



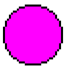
แผนภาพที่ 3-3 แสดงรูปแบบการหยอดแอนติซีรัมจากหนูแต่ละตัว และแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ลงในหลุมบนวุ้นสำหรับการทำ double immunodiffusion

O(N) = Native ovarian extract

O(SDS) = Denatured ovarian extract

F = Female haemolymph

M = Male haemolymph

 = Mouse anti-vitellin antisera

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนินที่เสียสภาพ** (แผนภาพที่ 3-4)

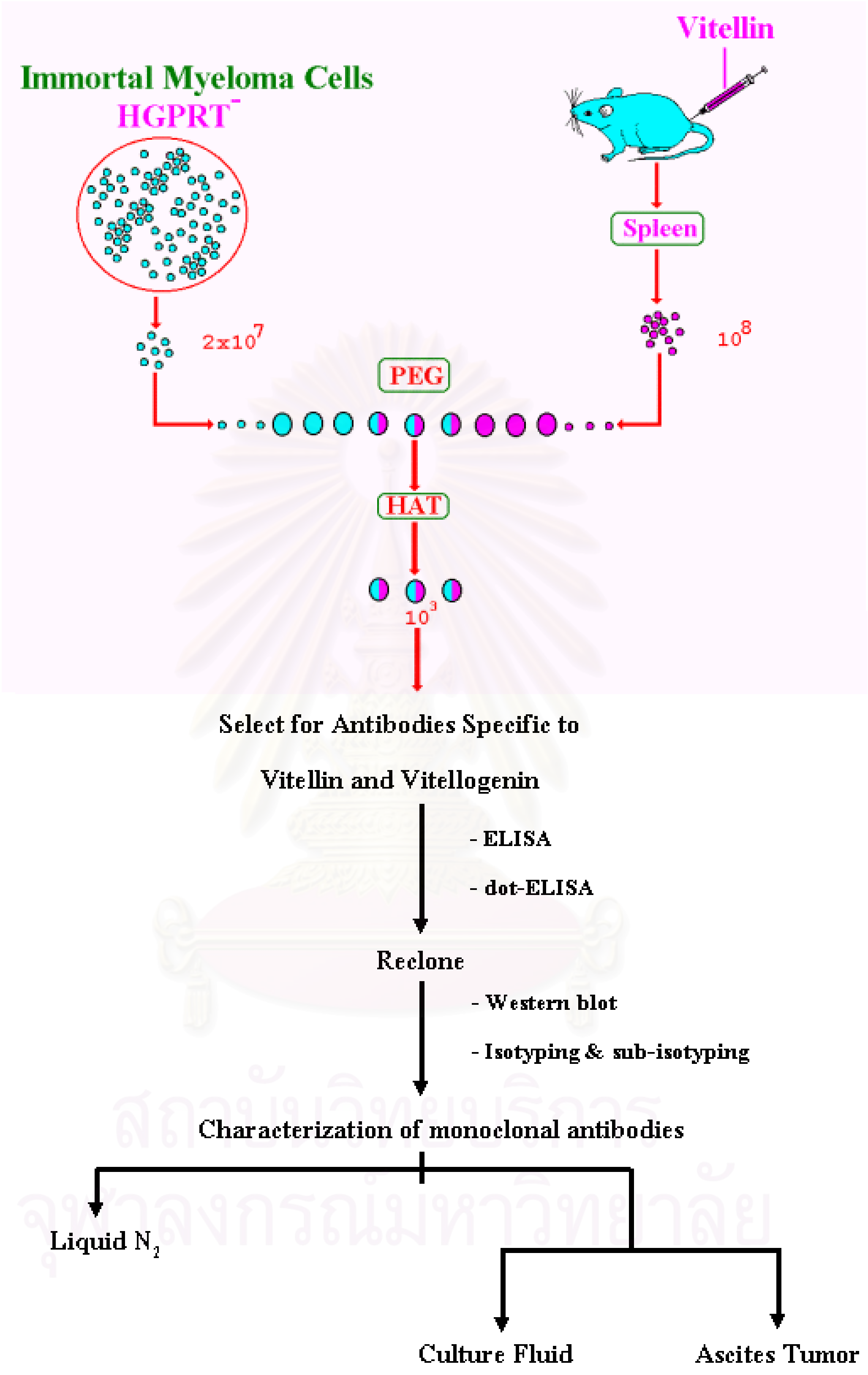
วิธีการทำ cell fusion ในการศึกษาครั้งนี้ได้ปรับปรุงพัฒนามาจากวิธีของ Köhler และ Milstein (1976) ซึ่งได้อธิบายไว้โดย Mosmann และคณะ (1979) ทำโดยฉีดสารสกัดไวเทลลินเข้าช่องท้องหนูขาวตัวที่ให้ผลของปฏิกิริยาของแอนติซีรัมกับแอนติเจนที่ดีที่สุด ก่อนทำ fusion 3 วัน ส่วน myeloma cell (P3X)[1] ต้องเลี้ยงให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ $2X10^7$ เซลล์ จากนั้นนำ spleen cell ของหนูขาวมาเชื่อมรวมกับ myeloma cell โดยใช้ polyethyleneglycol (PEG) 40% หลังจาก fusion นำเซลล์กระจายเลี้ยงใน selective medium (HAT medium ประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 20% fetal calf serum ใน RPMI medium ซึ่งมี 1% mouse red blood cell เป็น feeder layer) ใน 96 well culture plate ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 21 plate บ่มไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจดูการเจริญของ hybridoma cell ใน 96 well culture plate ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป โดยหลังจากการคัดเลือก hybridoma โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนินจะถูก reclone อย่างน้อย 2 ครั้ง ด้วยเทคนิค limiting dilution (Eshhar, 1985) เพื่อให้แน่ใจว่าเป็น monoclone ของ hybridoma

4.1 การเก็บเซลล์แช่แข็ง (cell freezing) (ดัดแปลงจาก Campbell, 1984)

หลังจากเก็บ hybridoma conditioned media และตรวจสอบความจำเพาะของแต่ละ hybridoma clone โดยวิธี indirect ELISA และ dot-blotting แล้ว เก็บเซลล์ที่อยู่ในช่วงที่มีการเจริญดีของโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนิน โดยนำไปปั่นที่ 1,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูด media ทิ้ง เติม 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่เจือจางใน RPMI ที่แช่ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส แบ่งใส่หลอดเก็บเซลล์ (cryotube) หลอดละ 1 ล้านเซลล์ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เก็บที่ –70 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวต่อไป

[1] ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 3-4 แสดงการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและ ไวเทลโลเจนินที่เสียสภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การละลายเซลล์ (cell thawing) เพื่อนำมาเลี้ยงใหม่ (ดัดแปลงจาก Campbell, 1984)

นำหลอดที่เก็บเซลล์ออกจากถังไนโตรเจนเหลว และนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทันที จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเซลล์ละลาย ใช้ pasteur pipette ดูดเซลล์ในอาหารเลี้ยงจากหลอดเก็บเซลล์ไปใส่ใน RPMI medium ที่ไม่มี serum ปริมาตร 10 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปปั่นที่ 1,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง กระจายเซลล์จากส่วนที่เป็นตะกอนใน RPMI medium ที่มี 10% fetal calf serum และย้ายลงจานเลี้ยงเชื้อขนาด 25 มิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นต้องทำการแยกเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นทุก ๆ 2-3 วัน

4.3 การผลิต ascites fluid จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนิน(ดัดแปลงจาก Campbell, 1984)

เลี้ยง hybridoma โคลนที่ต้องการผลิต ascites fluid ให้เซลล์มีจำนวนมากอยู่ในช่วงที่มีการเจริญดี ดูดใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ ปั่นที่ 1,000 g เป็นเวลา 5 นาที เท RPMI ทิ้ง เติม PBS ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เซลล์กระจายตัว นำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาวที่ได้รับการฉีด pristane ก่อนฉีดเซลล์ hybridoma (ประมาณ 1 ล้านเซลล์ต่อตัว) ประมาณ 1-2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นการช่วยให้ hybridoma เจริญได้ดีในร่างกายหนู เมื่อมีการเจริญของ hybridoma cell ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เก็บ ascites fluid ในช่องท้องออกโดยเจาะช่องท้อง และนำไปปั่นแยกเก็บส่วนที่เป็น ascites fluid ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

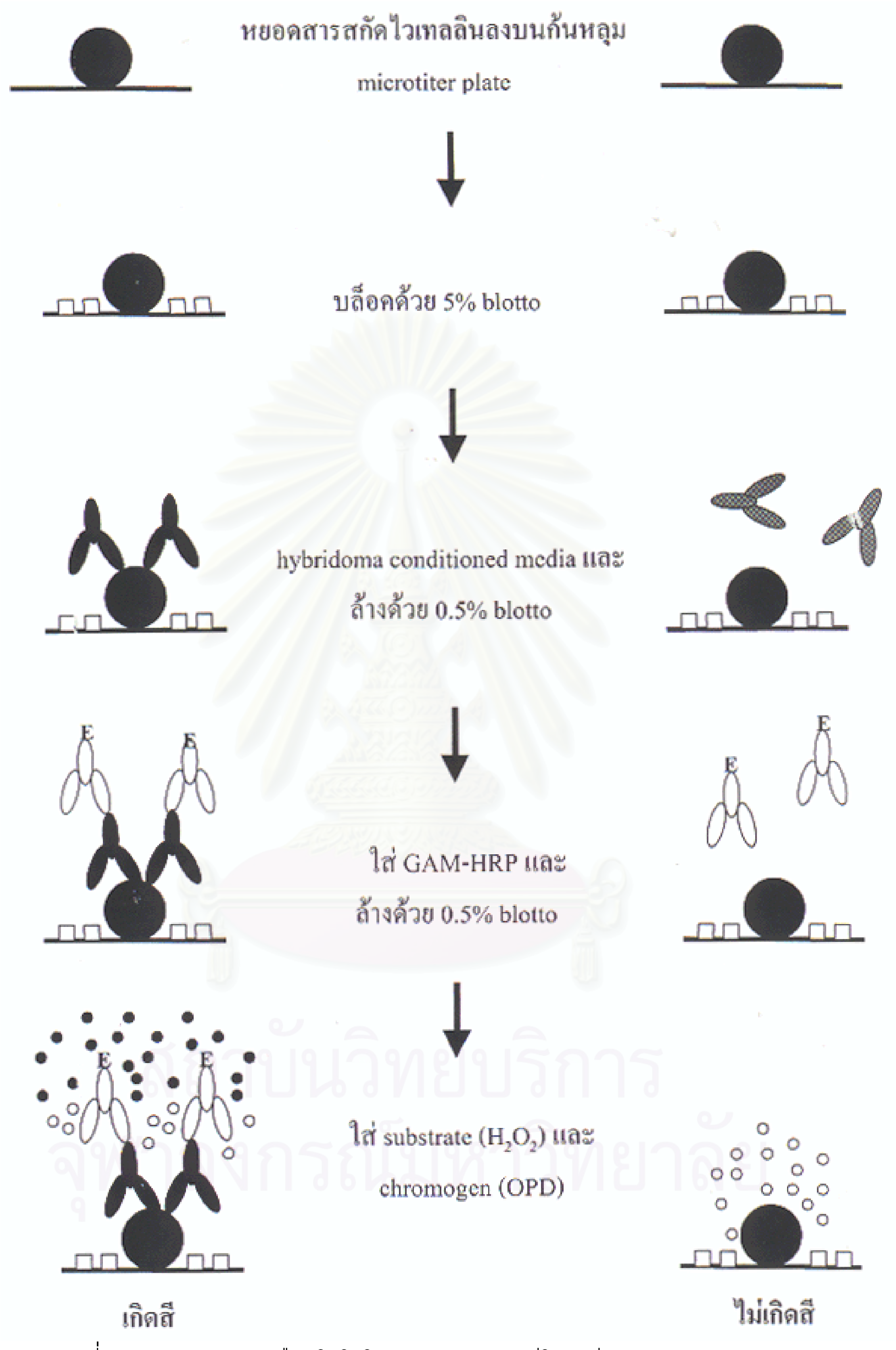
5. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่เสียสภาพ

5.1 การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA (แผนภาพที่ 3-5)

ใส่สารสกัดไวเทลลินที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง ในกล่องชื้นที่มีฝาปิด จากนั้นล้างไวเทลลินส่วนเกินซึ่งไม่สามารถจับในก้นหลุมได้อีกออกด้วย 0.5% blotto (0.5% นมผงพร่องมันเนย, 0.01% merthiolate, Triton X-100 และ PBS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ใช้ 5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเคลือบบริเวณภายในหลุมที่ยังไม่มีโปรตีนไวเทลลินจับอยู่ นาน 30 นาที นำ hybridoma conditioned media ในแต่ละหลุมจากข้อ 4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง ล้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีใน hybridoma conditeion media ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุมจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ

15 นาที ใส่ second antibody ได้แก่ goat anti-mouse IgG ซึ่ง conjugate ด้วย horseradish peroxidase (GAM-HRP) ที่เจือจางอัตราส่วน 1:1,500 ใน 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้าง second antibody ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วยสารละลาย PBS เติม substrate ของเอ็นไซม์ peroxidase ซึ่งได้แก่ 0.006% H_2O_2 และสารที่ทำให้เกิดสี (color developer) ซึ่งได้แก่ O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader หลุมที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงกว่าหลุมควบคุม แสดงว่า hybridoma นั้นสร้างแอนติบอดี ซึ่งจะนำไปทำการคัดเลือกต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



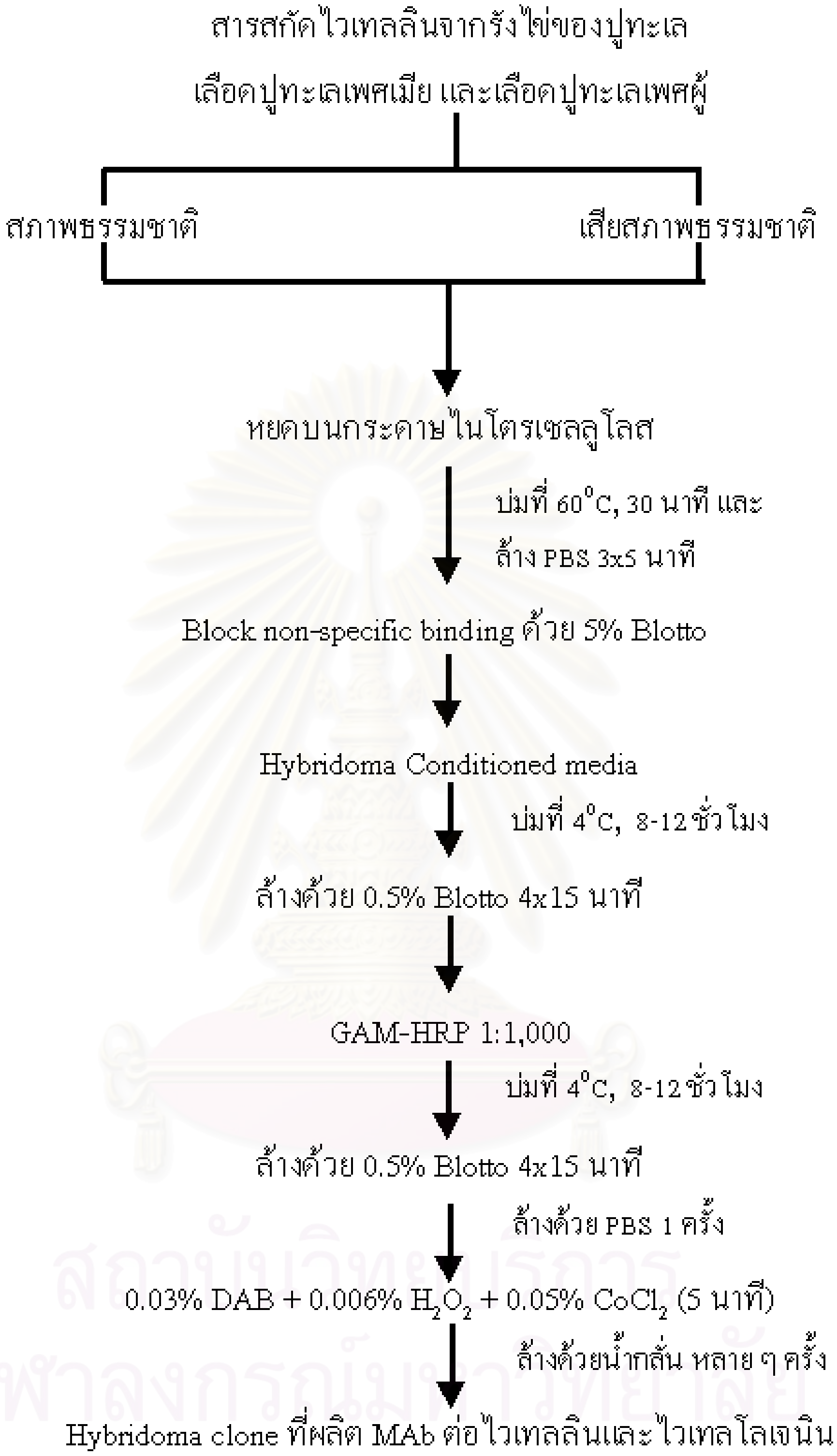
แผนภาพที่ 3-5 แสดงการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA (Indirect Immunoperoxidase)

5.2 การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot-blotting (Hawkes et al., 1982 cited in Cambell et al., 1984: 58) (แผนภาพที่ 3-7)

หยดสารสกัดไวเทลลิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างเลือดปูทะเลเพศเมียที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 5 และเลือดปูทะเลเพศผู้ที่เจือจาง 1:10 ที่อยู่ในสภาพปรกติ และเสียสภาพ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ตามแบบในแผนภาพที่ 3-6 นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้าง SDS ที่อยู่ในแอนติเจนที่เสียสภาพด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที บล็อคบริเวณอื่นบนกระดาษที่ไม่มีแอนติเจนด้วย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน hybridoma conditioned media ที่ต้องการทดสอบซึ่งเจือจางใน 5% blotto ที่อัตราส่วน 1:20 บ่มไว้ 8-12 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที แล้วนำไปบ่มใน GAM-HRP ที่ดูดซับด้วยเลือดปูทะเลเพศผู้ 40 % (เพื่อป้องกัน background ที่เกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะของสารละลาย GAM-HRP กับโปรตีนอื่น ๆ ในเลือด) เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย 0.5% blotto 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วย PBS แล้วนำไปทำปฏิกิริยาโดยเติม substrate ของเอ็นไซม์ peroxidase ซึ่งได้แก่ 0.006% H_2O_2 และสารที่ทำให้เกิดสี (color developer) ในกรณีนี้ได้แก่ 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ใน PBS ที่มีโคบอลต์คลอไรด์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ตรวจดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

Ovarian extract (Native)	Female haemolymph (Native)	Male haemolymph (Native)	Vitellin subunit 1 (107 kD)
Ovarian extract (Denatured)	Female haemolymph (Denatured)	Male haemolymph (Denatured)	Vitellin subunit 2 (78 kD)

แผนภาพที่ 3-6 แสดงรูปแบบการหยดแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส



แผนภาพที่ 3-7 แสดงการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot-blotting

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนิน

แยกโปรตีนไวเทลลินในสารสกัดจากรังไข่และโปรตีนไวเทลโลเจนินในเลือดโดยใช้ Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) หรือ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งการแยกโปรตีนโดย PAGE ประกอบด้วย separating gel 5% และ stacking gel 4% (ภาคผนวก ข) หรือ แยกโดย SDS-PAGE ซึ่งประกอบด้วย separating gel 7.5% และ stacking gel 4% (ภาคผนวก ข) เมื่อทำการแยกโปรตีนบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าเรียบร้อยแล้ว เจลส่วนหนึ่งนำไปย้อมเพื่อดูองค์ประกอบของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินโดยย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue ย้อมส่วนไขมันด้วย Sudan black B และย้อมคาร์โบไฮเดรตด้วย periodic acid Schiff (PAS) อีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blotting

6.1 วิธีการย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 มีขั้นตอนดังนี้

นำแผ่นเจลแช่ใน 0.1% Coomassie brilliant blue ที่ละลายใน 50% methanol และ 10% acetic acid เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง ล้างสีส่วนที่ติดบริเวณอื่นที่ไม่ใช่แถบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นออกด้วย destain I (50% methanol, 10% acetic acid) (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง และล้างต่อด้วย destain II (5% methanol, 7% acetic acid) (ภาคผนวก ข) จนกระทั่งแผ่นเจลใส นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel air drying

6.2 วิธีการย้อมไขมันด้วย Sudan black B (ดัดแปลงจากวิธีของ Humason, 1979) มีขั้นตอนดังนี้

นำแผ่นเจลแช่ใน 10% ฟอร์มาลิน ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อ fix แถบโปรตีนบนเจลให้อยู่ในตำแหน่งเดิม ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แช่แผ่นเจลใน ethyleneglycol 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เพื่อให้สี Sudan black B แทรกซึมเข้าในเนื้อเจลได้ดีเนื่องจากทำละลาย Sudan black B ด้วย ethyleneglycol จากนั้นแช่แผ่นเจลใน Sudan black B นาน 4-6 ชั่วโมง ล้างด้วย destain solution (20% acetone, 15% acetic acid) (ภาคผนวก ข) จนแผ่นเจลใส ล้างน้ำกลั่นก่อนนำไปทำให้แห้ง

6.3 วิธีการย้อมคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิค Periodic Acid Schiff (PAS) (ดัดแปลงจากวิธีของ Humason, 1979) มีขั้นตอนดังนี้

นำแผ่นเจลแช่ใน 10% ฟอร์มาลิน ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ใส่ periodic acid แช่ไว้เป็นเวลา 30-40 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที จากนั้นใส่ Schiff reagent (ภาคผนวก ข) ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไบซัลไฟด์จนแผ่นเจลใส ล้างน้ำกลั่นก่อนนำไปทำให้แห้ง

6.4 Western blot (แผนภาพที่ 3-8)

ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยเครื่อง Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยแช่ใน hybridoma conditioned media ของ แต่ละโคลน ที่เจือจางใน 5% blotto ในอัตราส่วน 1:500 บ่มไว้ข้ามคืน ล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วนำไปบ่มต่อใน GAM-HRP ที่เจือจาง 1:1,500 ใน 5% blotto ขั้นตอนต่อไป ทำเช่นเดียวกับในข้อ 3.2.5 ข สำหรับแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้จาก PAGE ต้องต้มใน 0.1% SDS เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที จากนั้นทำตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น

6.5 การตรวจสอบ class และ subclass ของ monoclonal antibody (แผนภาพที่ 3-9)

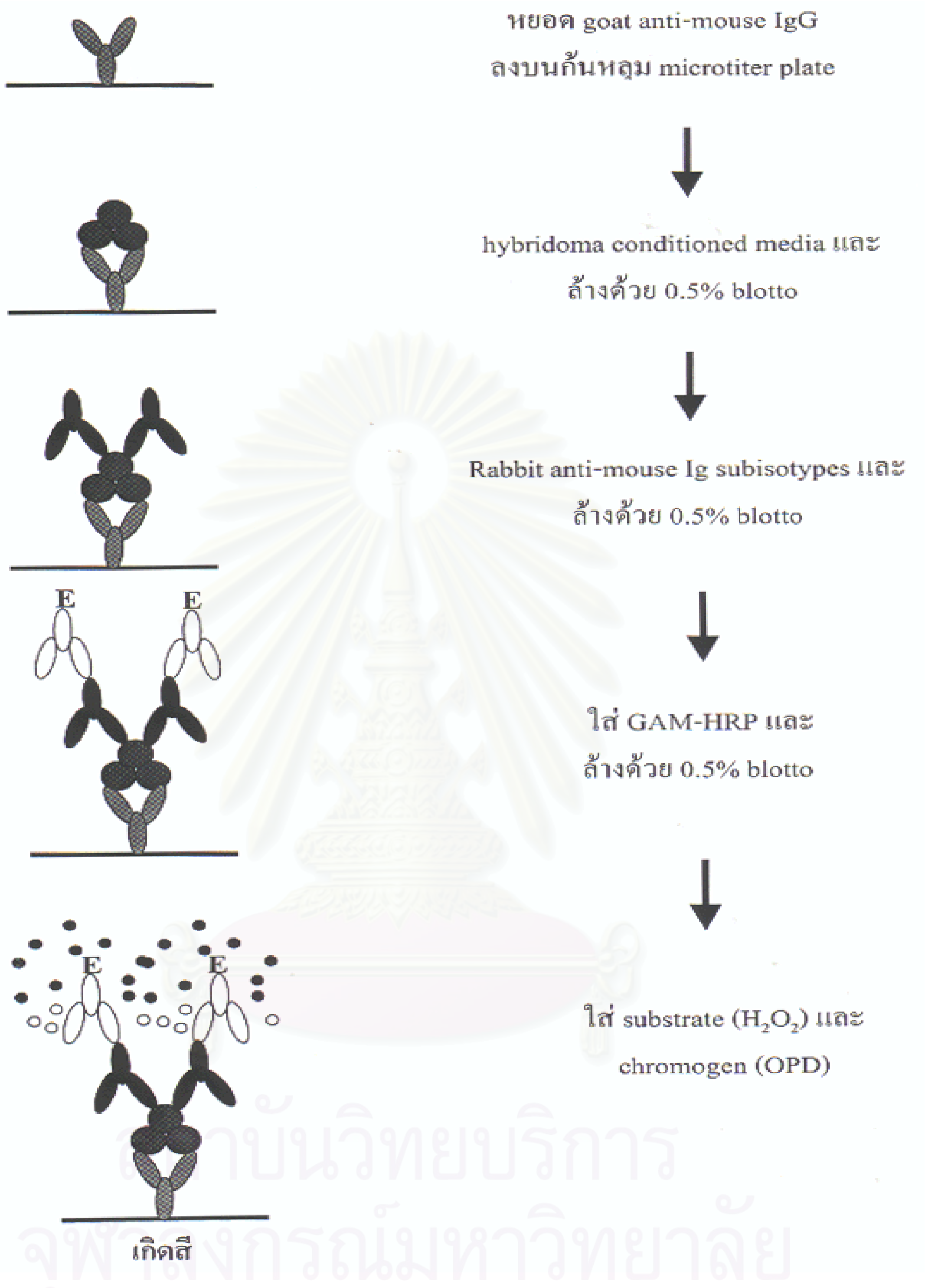
ตรวจสอบโดยใช้ชุด Mouse MonoAB ID kit (HRP) (ZYMED) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลาย goat anti-mouse IgG ที่ละลายใน plate coating solution อัตราส่วน 1:100 (ภาคผนวก ข) จากนั้นหยอดลงในหลุมของ 96 well culture plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลุมละ 150 ไมโครลิตร ใส่ hybridoma conditioned media ของ hybridoma ที่จะตรวจสอบลงในคอลัมน์ 1-11 หลุมละ 50 ไมโครลิตร หลุม 12A ใส่ mouse serum เจือจางอัตราส่วน 1:500 ใน PBS-surfactant (positive control) หลุม 12B-12E ใส่ subclass specific rabbit anti-mouse (negative control) หลุม 12F-12H ใส่ PBS-surfactant 100 ไมโครลิตร (Blank) (แผนภาพที่ 3-10) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ใส่ typing sera (ภาคผนวก ข) แต่ละชนิดลงในหลุม ๆ ละ 2 หยด (100 ไมโครลิตร) (แผนภาพที่ 3-10) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate ที่เจือจางอัตราส่วน 1:4,000 ใน 5% blotto ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5%

blotto 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วยสารละลาย PBS เติม substrate ของเอ็นไซม์ peroxidase ซึ่งได้แก่ 0.006% H_2O_2 และสารที่ทำให้เกิดสี (color developer) ซึ่งได้แก่ O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

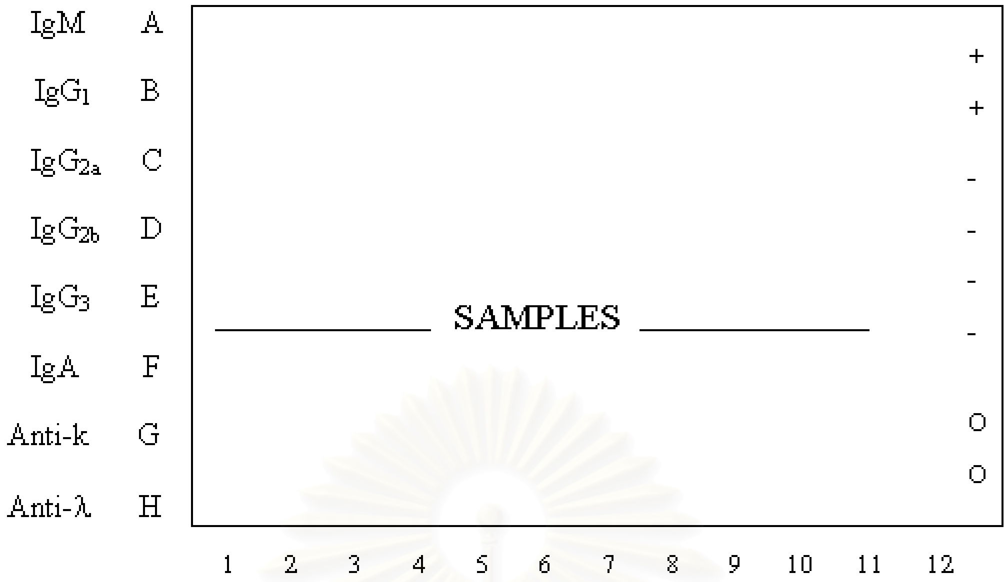
แผนภาพที่ 3-8 แสดงการตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western Blot

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 3-9 แสดงการตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
โดยวิธี sandwich ELISA



แผนภาพที่ 3-10 แสดงการหา class และ subclass ของ hybridoma conditioned media ด้วยวิธี ELISA + = positive control, - = negative control, O = blank

6.6 การตกตะกอนไวเทลลินจากสารสกัดรังไข่ และไวเทลโลเจนินจากเลือดโดยใช้แอนติ-ซีรัมต่อไวเทลลิน

ปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวเทลลินให้กับหนูขาวจำนวน 4 ตัว โดยทำตามขั้นตอนในข้อ 2 (หน้า 29) หลังจากตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแล้ว นำแอนติซีรัมที่ได้จากหนูทั้ง 4 ตัวรวมกัน ตกตะกอนไวเทลโลเจนินจากเลือดโดยผสมเลือดปูเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 5 กับแอนติซีรัมที่อัตราส่วน 8:1 ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปปั่นที่ 5000 g 15 นาที ล้างตะกอนด้วย PBS 3 ครั้ง และละลายตะกอนเก็บไว้ใน PBS การตกตะกอนไวเทลลินจากสารสกัด รังไข่ ทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้สารสกัดจากรังไข่ผสมกับแอนติซีรัมที่อัตราส่วน 4:1 จากนั้นนำโปรตีนไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่ตกตะกอนมาได้ไปแยกเพื่อตรวจสอบขนาดโดยใช้ SDS-PAGE และ Western blot (ข้อ 6.4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลิน และไวเทลโลเจนินด้วยวิธี competitive ELISA

7.1 การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนิน

หลังจากนำปูทะเลมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพร่างกาย 3 วัน ตัดตาทั้ง 2 ข้างเพื่อชักนำให้รังไข่เจริญ ใช้ syringe ที่เคลือบด้วย EDTA 0.5 มิลลิโมลาร์ เก็บตัวอย่างเลือดปูจากโคนขาว่ายน้ำ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งแต่ก่อนตัดตา 1 วัน และทุกๆ 2 วัน หลังจากตัดตา จนกระทั่งปูวางไข่ เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA ต่อไป

7.2 การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดด้วยวิธี competitive ELISA (แผนภาพที่ 3-11)

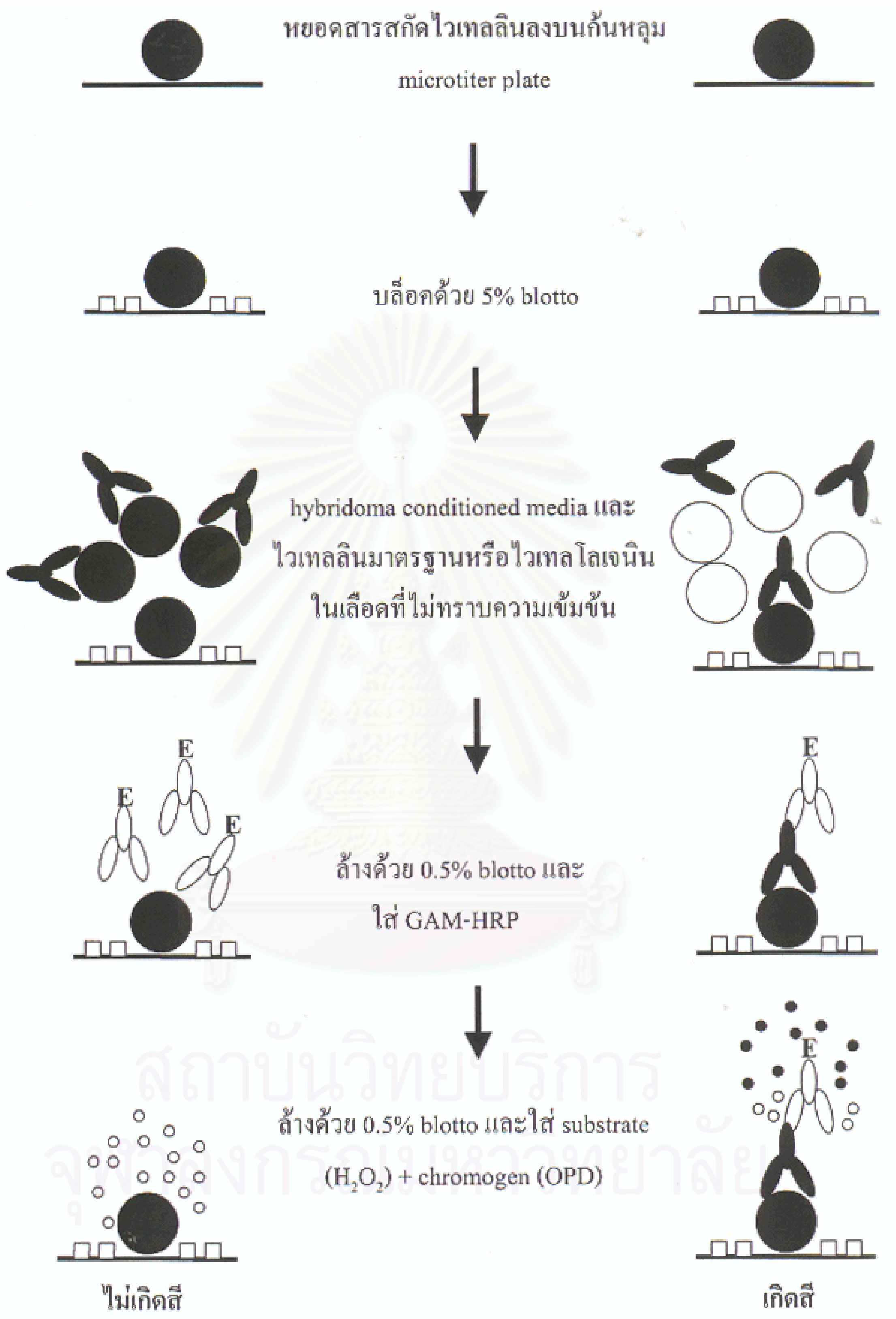
การตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในครั้งนี้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน โคลนที่ 71 ซึ่งผลิตโดย นุชนาถ เกษมวงศ์ (2542) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ใส่สารสกัด ไวเทลลินที่เจือจางใน PBS ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ maxisorp microtiter plate (NUNC) บ่มไว้ที่ 12-24 ชั่วโมง ในกล่องชื้นที่มีฝาปิด จากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และใช้ 5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เคลือบบริเวณภายในหลุมที่ยังไม่มีโปรตีนไวเทลลินจับอยู่ นาน 30 นาที หยอดสารสกัดไวเทลลินที่เจือจางด้วย 5% blotto ที่ความเข้มข้นดังนี้ 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 ไมโครกรัม ตัวอย่างเลือดปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะที่ 5 และตัวอย่างเลือดเพศผู้ ซึ่งเจือจางที่ค่า dilution เดียวกับสารสกัดไวเทลลินมาตรฐาน ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน microtiter plate จากนั้นเติม ascites fluid โคลนที่ 71 ที่เจือจาง 1:10,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง ล้างantigen-antibody complex ที่ไม่ได้เกาะที่ก้นหลุมออกด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ใส่ second antibody ซึ่งได้แก่ goat anti-mouse IgG ที่ conjugate ด้วย horseradish peroxidase (GAM-HRP) ที่เจือจางอัตราส่วน 1:1,500 ใน 5% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้าง second antibody ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และล้างครั้งสุดท้ายด้วยสารละลาย PBS เติม substrate ของเอ็นไซม์ peroxidase ซึ่งได้แก่ 0.006% H_2O_2 และสารที่ทำให้เกิดสี (color developer) ซึ่งได้แก่ O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้ม-ข้น 0.1โมลาร์พีเอช 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาทีหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100

ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

เขียนกราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดไวเทลลินมาตรฐาน เลือดปูทะเลเพศเมีย และเลือดปูทะเลเพศผู้

คำนวณหาค่าไวเทลโลเจนินในเลือดโดยเปรียบเทียบกับกราฟที่ได้จากไวเทลลินมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 3-11 แสดงการตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนินในเลือดปูทะเลโดยวิธี competitive ELISA

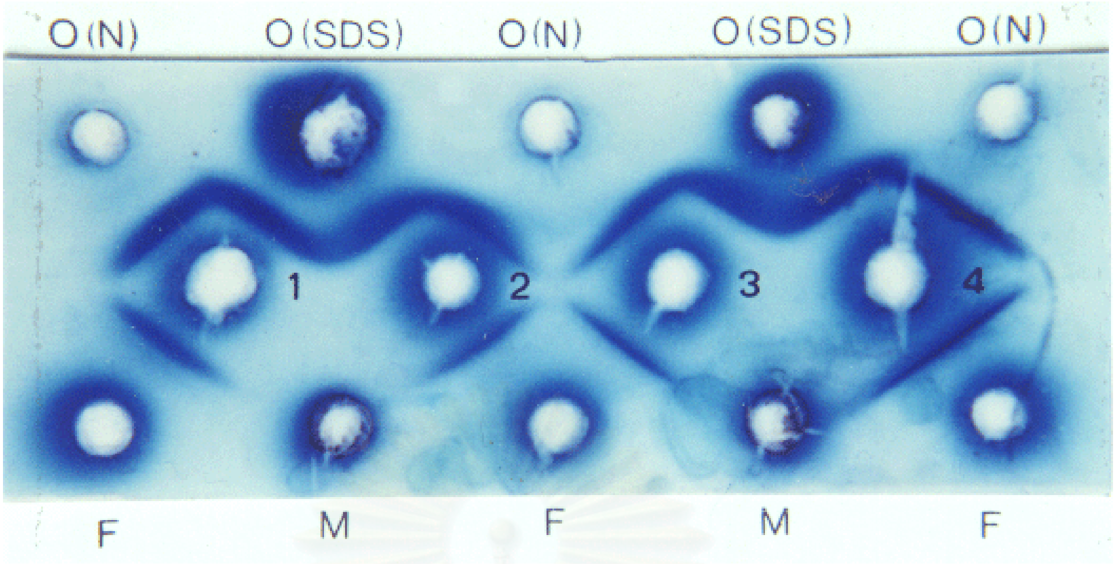
บทที่ 4

ผลการศึกษา และอภิปรายผลการศึกษา

4.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่เสียสภาพ

หลังจากการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดจากรังไข่ที่ถูกทำให้เสียสภาพของปูทะเลให้กับหนูขาว 4 ตัว และได้ตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี double immunodiffusion พบว่า แอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัวสามารถทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากรังไข่และเลือดปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญเต็มที่ (ระยะที่ 5) ในสภาพธรรมชาติ และเสียสภาพธรรมชาติได้ โดยแนวตะกอนเชื่อมต่อกันสมบูรณ์แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีสามารถจับกับไวเทลลินสภาพธรรมชาติและไวเทลลินที่ถูกทำให้เสียสภาพได้ดีเช่นเดียวกัน แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเลือดปูเพศผู้ แต่จะสังเกตเห็นว่าแถบปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติกับแอนติซีรัมจากหนูตัวที่ 2 และ 3 ไม่ถึงกับเชื่อมต่อกันจึงทำให้ยังไม่แน่ใจว่าแอนติบอดีจะสามารถจับกับไวเทลลินสภาพธรรมชาติและไวเทลลินที่ถูกทำให้เสียสภาพได้ดีเท่ากัน เนื่องจาก SDS ในสารสกัดไวเทลลินที่เสียสภาพอาจจะแพร่มามีผลทำให้ไวเทลลินที่อยู่ในสภาพธรรมชาติบางส่วนเสียสภาพ จึงทำให้เกิดแนวตะกอนเชื่อมถึงกันได้ อย่างไรก็ตามพบว่าหนูตัวที่ 4 ให้แนวตะกอนเข้มและคมชัดที่สุด (ภาพที่ 4-1) ดังนั้นจึงเลือกหนูตัวที่ 4 ไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

จากการทำ fusion ระหว่างเซลล์ P3X myeloma กับเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 4 และคัดเลือก hybridoma clone ในขั้นแรกโดยวิธี ELISA สามารถคัดเลือก hybridoma clone ที่ผลิตแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากรังไข่ได้ดีจำนวน 121 โคลน จากนั้นนำมาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี dot-blot เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ต่อสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ไวเทลโลเจนินจากเลือดปูเพศเมียที่มีรังไข่เจริญเต็มที่ และเลือดปูเพศผู้ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ และถูกทำให้เสียสภาพ รวมทั้งต่อหน่วยย่อยของไวเทลลิน 2 หน่วยย่อย พบว่าสามารถคัดเลือก hybridoma clone ได้จำนวน 14 โคลน ซึ่งผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารสกัดไวเทลลินจากรังไข่ และไวเทลโลเจนินจากเลือดตัวเมียที่มีรังไข่เจริญเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ และถูกทำให้เสียสภาพ และสามารถแบ่งความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ



ภาพที่ 4-1 การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแอนติซีรัมของหนูขาว 4 ตัวที่ถูกปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดรังไข่ที่เสียสภาพธรรมชาติ ต่อแอนติเจนต่างๆ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

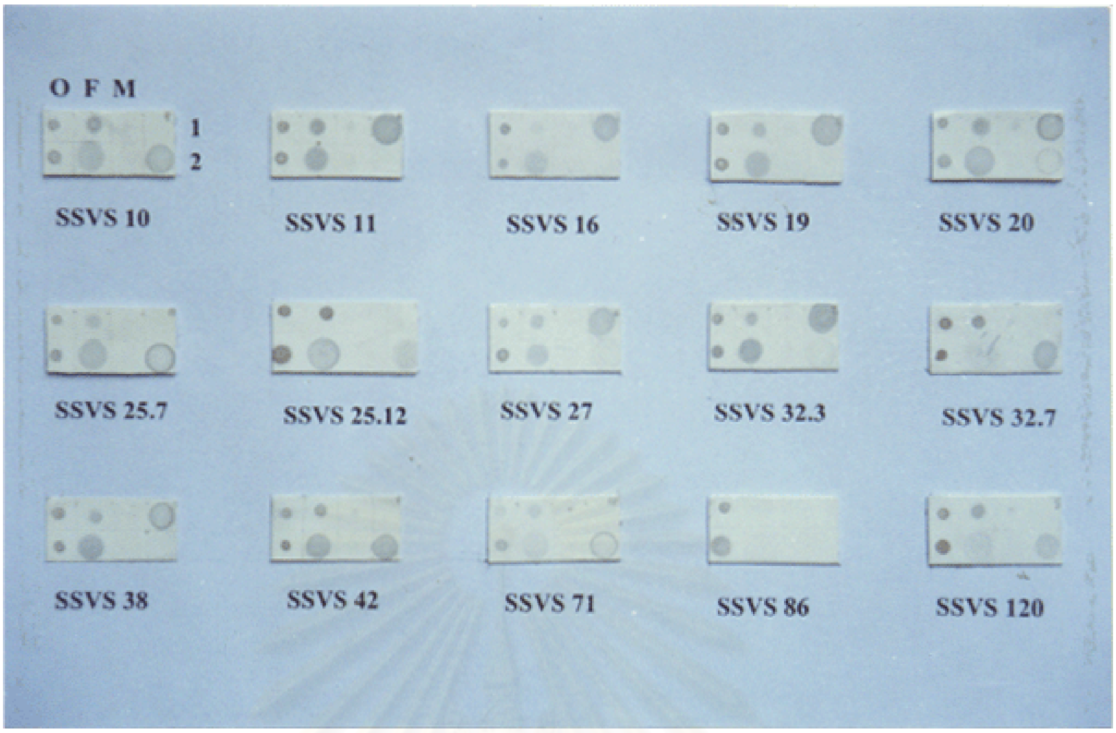
O(N)	=	Native ovarian extract	M	=	Male haemolymph
O(SDS)	=	Denatured ovarian extract	F	=	Female haemolymph
1-4	=	Anti-vitellin antiserum ของหนูตัวที่ 1-4			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 1 แอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยของไวเทลลินทั้ง 2 หน่วยย่อย มีจำนวน 3 โคลน ได้แก่โคลน SSVS-20, SSVS-27, SSVS-32.3 กลุ่มที่ 2 แอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 78 กิโลดาลตัน มีจำนวน 6 โคลน ได้แก่โคลน SSVS-10, SSVS-25, SSVS-32.7, SSVS-42, SSVS-71 และ SSVS-120 กลุ่มที่ 3 แอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยของไวเทลลินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 107 กิโลดาลตัน มีจำนวน 4 โคลน ได้แก่โคลน SSVS-11, SSVS-16, SSVS-19, SSVS-38 และกลุ่มที่ 4 ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่อยู่ในสารสกัดรังไข่ แต่ไม่จับกับโปรตีนในเลือดปูทะเลเพศผู้ มีจำนวน 1 โคลน ได้แก่โคลน SSVS-86 (ภาพที่ 4-2 และตารางที่ 4-1)

แสดงว่าไวเทลลินเป็นองค์ประกอบที่เป็น immunodominant ในสารสกัดจากรังไข่ เนื่องจาก hybridoma ส่วนใหญ่สร้างแอนติบอดีต่อไวเทลลิน แต่อย่างไรก็ตามมีองค์ประกอบอื่น ๆ ในรังไข่ด้วยทำให้ได้โคลนที่ SSVS-86

จากการศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blot โดยแยกโปรตีนจากสารสกัดรังไข่ และเลือดของปูทะเลเพศเมียด้วย PAGE พบว่าโมโนโคลนอล-แอนติบอดีทุกโคลนไม่สามารถจับกับแถบของโปรตีนได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลที่ได้จาก dot-blot ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับได้ทั้งโปรตีนในสภาพธรรมชาติและเสียสภาพ คาดว่าเนื่องจากในระหว่างกระบวนการของการหยดแอนติเจนที่อยู่ในสภาพธรรมชาติลงบนกระดาษไนโตร-เซลลูโลสและทำให้แห้งมีแอนติเจนบางส่วนเสียสภาพธรรมชาติทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับได้ ทั้งนี้เพราะหลังจากทำให้โปรตีนที่แยกมาโดย PAGE และย้ายลงบนกระดาษไนโตร-เซลลูโลสเสียสภาพธรรมชาติด้วยการต้มกระดาษไนโตรเซลลูโลสใน 1% SDS แล้ว พบว่าโมโน-โคลนอลแอนติบอดีทุกโคลน ยกเว้นโคลนที่ 86 (SSVS-86) สามารถจับกับแถบโปรตีนเดียวกันทั้งในสารสกัดจากรังไข่ และเลือดของปูทะเลเพศเมีย ซึ่งเป็นแถบของ lipoglycoprotein ทั้งนี้เนื่องจากแถบนี้ติดสี Coomassie blue, PAS และ Sudan black B (ภาพที่ 4-2 A, B, และ C)แต่ไม่จับกับโปรตีนของเลือดปูเพศผู้ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 86 (SSVS-86) จับกับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ในสารสกัดรังไข่และในเลือดปูทะเลเพศเมีย



ภาพที่ 4-2 การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (SSVS-….) โดยวิธี dot-blot

O = Native (บน) and denatured (ล่าง) ovarian extract

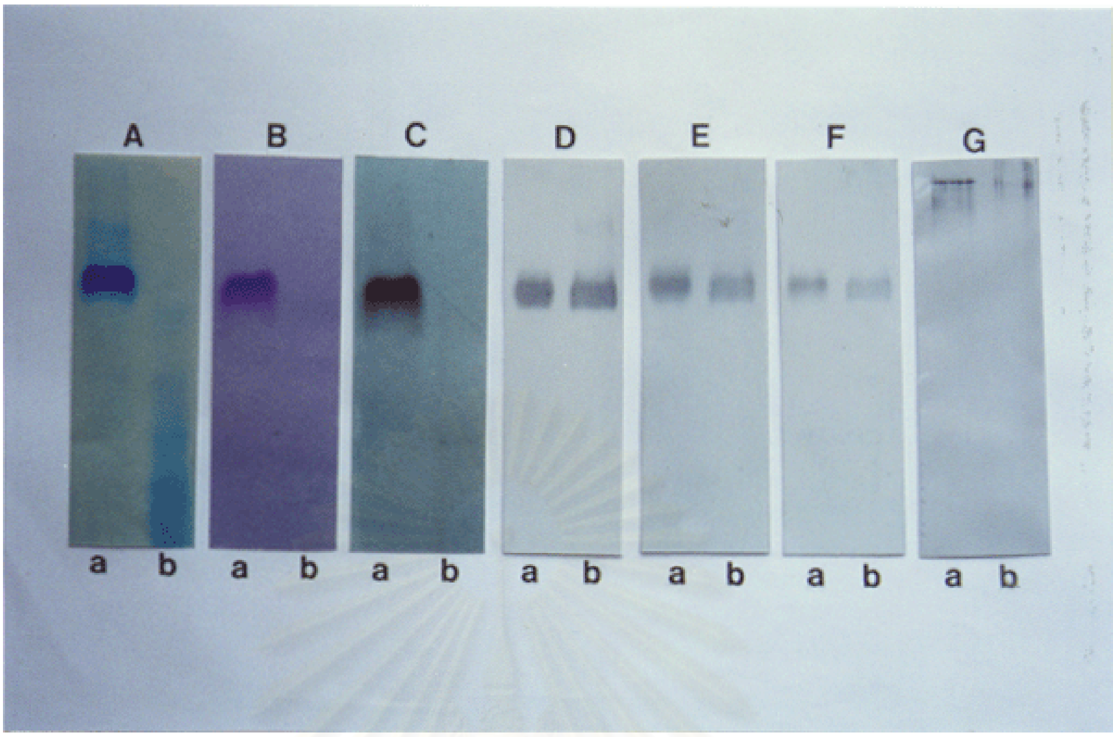
F = Native (บน) and denatured (ล่าง) female haemolymph

M = Native (บน) and denatured (ล่าง) male haemolymph

1 = Vitellin 107 kD subunit 2 = Vitellin 78 kD subunit

หมายเหตุ : โคลนที่ 25.7 กับ 25.12 เป็นโคลนเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-3 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดย PAGE ของสารสกัดรังไข่ (a; 20 μg/lane) และเลือดปูทะเลเพศเมีย (b; 50 μg/lane) ย้อมด้วย Coomassie blue (A), PAS (B), Sudan black B (C) และ Western blot ของสารสกัดรังไข่ (a; 0.8 μg/lane) และเลือดของปูทะเลเพศเมีย (b; 80 μg/lane) ซึ่งย้อมด้วย MAb โคลนต่าง ๆ ที่เป็นตัวแทนของทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ SSVS-20 (D), SSVS-25 (E),
SSVS-38 (F) และ SSVS-86 (G)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปรตีนไวเทลลินจากสารสกัดรังไข่ และไวเทลโลเจนินจากเลือดของปูทะเลเพศเมีย แยกโดย SDS-PAGE และนำเจลมาย้อมสี Coomassie brilliant blue พบว่าไวเทลลินจากรังไข่ของปูทะเลประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 107 กิโลดาลตัน และหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 78 กิโลดาลตัน ส่วนไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเลเพศเมียไม่สามารถตรวจพบโดยการย้อมสี Coomassie brilliant blue เนื่องจากมีปริมาณของไวเทลโลเจนินในเลือดต่ำมาก และไม่สามารถเพิ่มปริมาณโดยใช้ตัวอย่างเลือดมาก ๆ ได้ เพราะในเลือดมี haemocyanin อยู่ในปริมาณมากจึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีนชนิดอื่น ดังนั้นจึงใช้วิธี Western blot เพื่อศึกษาคุณลักษณะและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในเลือดต่อไปและจากผลของ Western blot พบว่าความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อหน่วยย่อยของไวเทลลิน สอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธี dot-blot คือมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีแบ่งเป็น 4 กลุ่มตามความจำเพาะ ดังนี้

(1)โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยของไวเทลลินทั้ง 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 107 และ 78 กิโลดาลตัน มีจำนวน 3 โคลน

(2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 78 กิโลดาลตัน มีจำนวน 6 โคลน

(3) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 107 กิโลดาลตัน มีจำนวน 4 โคลน

(4) โมโนโคลนอลผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่อยู่ในสารสกัดรังไข่ และในเลือดปูทะเลเพศเมีย แต่ไม่จับกับโปรตีนในเลือดปูทะเลเพศผู้ จำนวน 1 โคลนซึ่งได้เลือกตัวแทนกลุ่มละ 1 โคลนมาแสดงดังนี้กลุ่มที่ 1 - SSVS-20

กลุ่มที่ 2 - SSVS-25

กลุ่มที่ 3 - SSVS-38

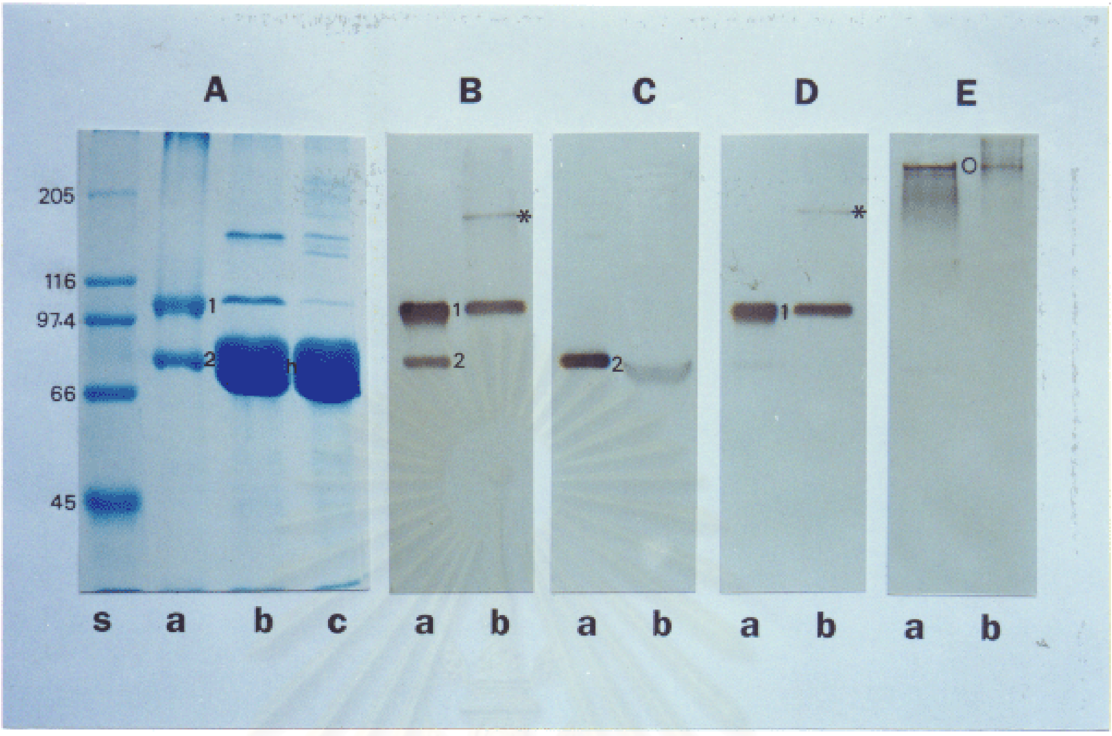
กลุ่มที่ 4 - SSVS-86

โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 20 (SSVS-20) สามารถจับกับหน่วยย่อยของไวเทลลินทั้ง 2 หน่วยย่อย (107 และ 78 กิโลดาลตัน) และสามารถจับกับโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่มีขนาดเท่ากับหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 107 กิโลดาลตันของไวเทลลินในรังไข่ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับแถบโปรตีนที่มีขนาด 78 กิโลดาลตัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี SSVS-20 นี้มีแรงจับ (binding affinity) ต่อหน่วยย่อยขนาด 78 น้อยกว่า SSVS-25 และอาจประกอบกับในเลือดของปูทะเลที่มีรังไข่เจริญเต็มที่ (ระยะที่ 5) มีปริมาณของหน่วยย่อยขนาด 78 กิโลดาลตันน้อย เพราะในระยะนี้ไวเทลโลเจนินในเลือดส่วนใหญ่ได้เข้าสะสมเป็นไวเทลลินใน รังไข่แล้ว

โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 25 (SSVS-25) สามารถจับกับหน่วยย่อยของไวเทลลินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 78 กิโลดาลตัน และสามารถจับกับโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่มีขนาดเท่ากัน แต่ปฏิกิริยาเกิดไม่ชัดเจน เนื่องจาก haemocyanin ในเลือดมีปริมาณมากและอยู่ตำแหน่งที่ตรงกับหน่วยย่อย 78 กิโลดาลตันพอดีทำให้หน่วยย่อยนี้ถูกย้ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสได้น้อย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 38 (SSVS-38) สามารถจับกับหน่วยย่อยของไวเทลลินที่มีขนาด 107 กิโลดาลตัน และสามารถจับกับโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่มีขนาดเท่ากัน

โมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนไม่จับกับแถบโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศผู้ นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 38 และ 20 ยังสามารถจับกับโปรตีนในเลือดปูทะเลเพศเมียที่มีน้ำหนักโมเลกุล 190 กิโลดาลตัน ซึ่งไม่พบในรังไข่โดยคาดว่าแถบของโปรตีนในเลือดนี้น่าจะเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของไวเทลลินในรังไข่ที่สร้างออกมาในเลือดก่อนมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและเข้าสะสมในรังไข่ แต่จะสังเกตได้ว่าแถบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแถบบาง ซึ่งแสดงว่ามีปริมาณโปรตีนน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากในระยะที่รังไข่มีการเจริญเต็มที่ มีการสะสมของไวเทลลินเพียงพอแล้ว หน่วยย่อยของสารตั้งต้น (น้ำหนักโมเลกุล 190 กิโลดาลตัน) จึงพบปริมาณน้อยในเลือด



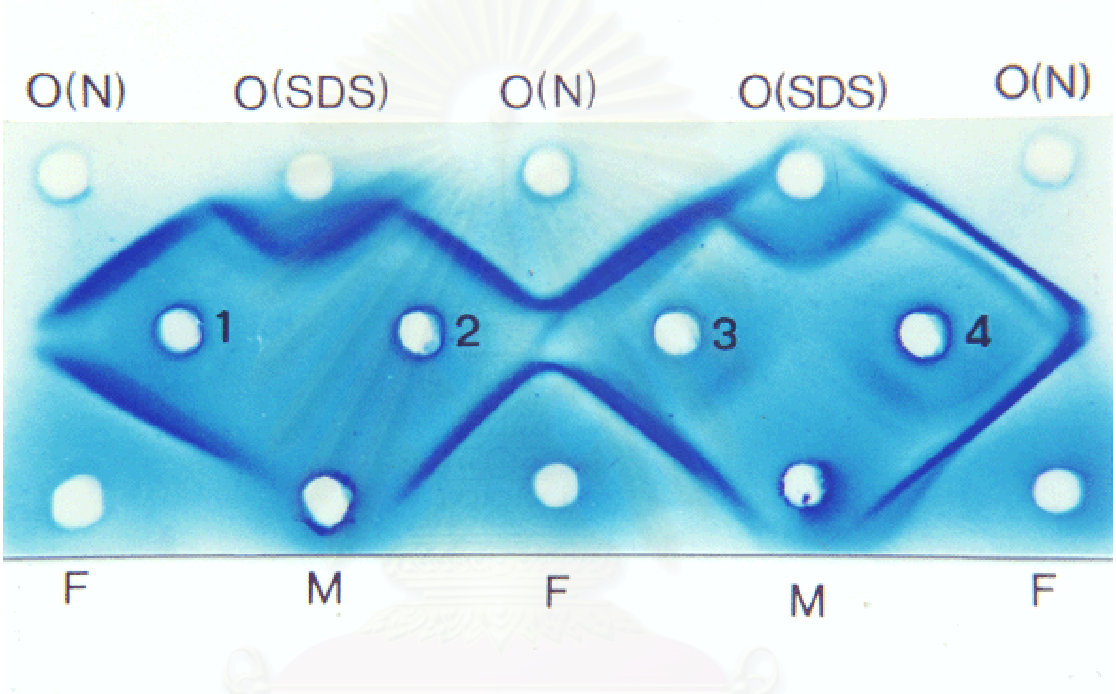
ภาพที่ 4-4 SDS-PAGE ของสารสกัดจากรังไข่ (a; 4 μg/lane) เลือดปูทะเลเพศเมียและเพศผู้(b&c; 80 μg/lane) ย้อมด้วย Coomassie blue (A) และผล Western blot ของสารสกัดจากรังไข่ (a; 0.6 μg/lane) เลือดของปูทะเลเพศเมียและเพศผู้ (b&c; 50 μg/lane) ซึ่งย้อมด้วย MAb; SSVS-20 (B), SSVS-25 (C),SSVS-38 (D) และ SSVS-86 (E)

s	=	Protein marker	h	=	Haemocyanin
1	=	Vitellin 107 kD subunit	2	=	Vitellin 78 kD subunit
*	=	Vitellin precursor (190 kD)	O	=	High molecular weight protein

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

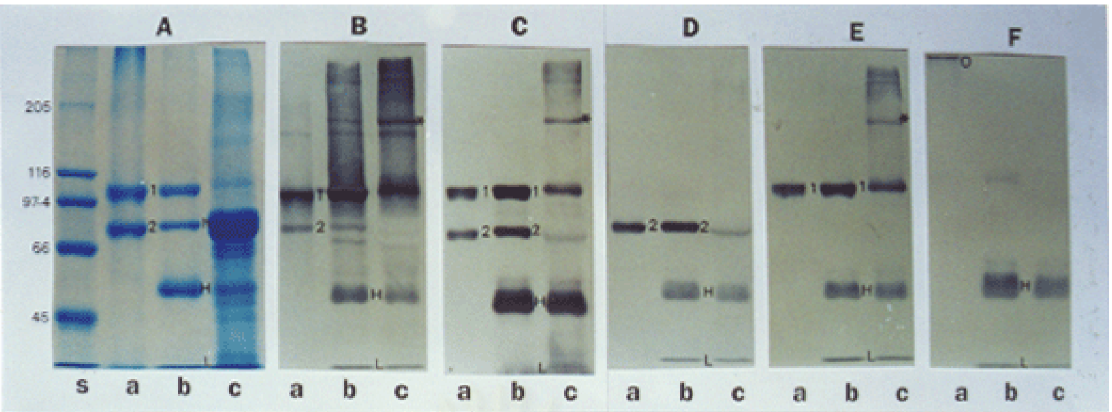
อย่างไรก็ตามขนาดของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่แน่นอนต้องทำการยืนยันโดยการตกตะกอนไวเทลลินในสารสกัดรังไข่ และตกตะกอนไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่รังไข่กำลังเจริญด้วยแอนติซีรัมต่อไวเทลลิน (polyclonal anti-vitellin) เพื่อให้ได้ไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่เข้มข้นมากขึ้นก่อนที่จะนำไปแยกโดย SDS-PAGE โดยเริ่มจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วยสารสกัดรังไข่ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ ซึ่งได้ตรวจสอบคุณภาพแอนติซีรัมโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น (ภาพที่ 4-5) จากรูปแบบของแถบตะกอนที่เกิดขึ้นแสดงว่าแอนติซีรัมจากหนูตัวที่ 3 และ 4 สามารถจับกับสารสกัดจากรังไข่ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติได้ดีกว่าในรูปเสียสภาพทั้งนี้เนื่องจากในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูครั้งนี้ใช้สารสกัดจากรังไข่ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ เพราะคาดว่าน่าจะใช้ตกตะกอนไวเทลลินและไวเทลโลเจนินซึ่งอยู่ในสภาพธรรมชาติได้ดี แอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัว สามารถทำปฏิกิริยากับเลือดปูทะเลเพศเมียโดยให้แนวตะกอนที่เข้มและคมชัดทั้ง 4 ตัว ดังนั้นจึงนำแอนติซีรัมของหนูทั้ง 4 ตัว มารวมกันเพื่อนำไปใช้ตกตะกอนไวเทลลินในสารสกัดจากรังไข่ และไวเทลโลเจนินในเลือด จากการที่แอนติซีรัมอยู่ในรูป polyclonal antibody ซึ่งประกอบด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนไวเทลลินและไวเทลโลเจนินและแอนติเจนอื่น ๆ ที่ปะปนอยู่ในสารสกัดที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูขาวทำให้เห็นว่าผล Western blot ที่ได้จากย้อมด้วยแอนติซีรัมมี background สูงกว่าผลที่ได้จากการย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีอย่างเห็นได้ชัด และจากผล Western blot ที่ย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดียืนยันว่าโปรตีนไวเทลลินในรังไข่มีขนาด 107 และ 78 กิโลดาลตัน ส่วนโปรตีนไวเทลโลเจนินในเลือดมีขนาด 190, 107 และ 78 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4-6) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับหน่วยย่อยของไวเทลลินของปูม้า *Callinectes sapidus* ซึ่งเป็นปูที่จัดอยู่ในวงศ์ (family) เดียวกัน (Lee และ Puppione, 1988) แต่กรณีจากการศึกษาของ Lee และ Watson (1994-1995) ใน *Callinectus sapidus* พบว่าหน่วยย่อยของไวเทลลินประกอบด้วยโปรตีนขนาด 188, 168, 109 และ 68 กิโลดาลตัน อาจเนื่องจากเป็นปูต่าง species หรืออาจเนื่องจากการใช้แอนติซีรัมซึ่งมีแอนติบอดีต่อโปรตีนอื่น ๆ ปะปนอยู่ ทำให้สามารถตรวจพบได้โดยใช้แอนติซีรัมเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4-6 B) แต่จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะไม่สามารถพบการจับของแอนติบอดีต่อโปรตีนเหล่านี้ จึงคาดว่าโปรตีนขนาด 188 และ 168 กิโลดาลตันน่าจะเกิดจากแอนติบอดีต่อโปรตีนอื่น ๆ มากกว่าที่จะเป็นองค์ประกอบของไวเทลลิน และจากการศึกษาในปูที่อยู่ต่างวงศ์พบว่าจำนวนหน่วยย่อยของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของปูมีจำนวนอยู่ระหว่าง 2-4 หน่วยย่อยซึ่งขนาดจะแตกต่างกันไปในแต่ละ species (ตารางที่ 4-2)

จากการตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่าเป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG_1 จำนวน 12 โคลน (SSVS-10, SSVS-11, SSVS-16, SSVS-20, SSVS-25, SSVS-27, SSVS-32.3, SSVS-32.7, SSVS-38, SSVS-42, SSVS-71, SSVS-120) ชนิด IgG_{2b} จำนวน1 โคลน (SSVS-86) และชนิด IgM จำนวน 1 โคลน (SSVS-19) (ตารางที่ 4-1) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ส่วนใหญ่เป็นชนิด IgG เพราะแอนติบอดีที่สร้างขึ้นหลังจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนตัวเดิมครั้งที่ 2 ส่วนใหญ่จะเป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG ซึ่งจะมี IgM อยู่เพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 4-5 การตรวจสอบความจำเพาะและคุณภาพแอนติซีรัมของหนูขาว 4 ตัวที่ถูกปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดรังไข่ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ ต่อแอนติเจนต่างๆ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น

O(N)	=	Native ovarian extract	M	=	Male haemolymph
O(SDS)	=	Denatured ovarian extract	F	=	Female haemolymph
1-4	=	Anti-vitellin antiserum ของหนูตัวที่ 1-4			



ภาพที่ 4-6 SDS-PAGE ของสารสกัดจากรังไข่ (a), สารสกัดรังไข่และเลือดตัวเมียที่ตกตะกอนด้วย mouse anti-vitellin antiserum (b&c) โดยนำมาย้อมด้วย Coomassie blue (A) และ Western blot โดยใช้ mouse anti-vitellin antiserum (B), SSVS-20 (C), SSVS-25 (D), SSVS-38 (E) และ SSVS-86 (F) ความเข้มข้นของโปรตีน a = 4, b = 5 และ c = 6 μg/lane สำหรับการย้อม Coomassie blue และ a = 4, b = 0.8 และ c = 3 μg/lane สำหรับ Western blot

S	=	Protein marker	1 & 2	=	Vitellin 107 & 78 kD subunits
h	=	Haemocyanin	H & L	=	Heavy and light chain
*	=	Vitellin precursor (190 kD)	O	=	High molecular weight protein

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4-1 คุณสมบัติและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน

<table>
<tr><th rowspan="3">Hybridoma Clones</th><th rowspan="3">Class & Sub-class</th><th colspan="6">Dot-ELISA Test / Western Blot</th></tr>
<tr><th colspan="2">Ovarian Extract</th><th colspan="2">Female haemolymph</th><th colspan="2">Vitellin subunits (kD)</th></tr>
<tr><th>Native</th><th>Denatured</th><th>Native</th><th>Denatured</th><th>107</th><th>78</th></tr>
<tr><td>SSVS-20, 27, 32.3</td><td>IgG_1</td><td>±</td><td>+</td><td>±</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td></tr>
<tr><td>SSVS-10, 25, 32.7,
42, 71, 120</td><td>IgG_1</td><td>±</td><td>+</td><td>±</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td></tr>
<tr><td>SSVS-11, 16, 38</td><td>IgG_1</td><td rowspan="2">±</td><td rowspan="2">+</td><td rowspan="2">±</td><td rowspan="2">+</td><td rowspan="2">+</td><td rowspan="2">-</td></tr>
<tr><td>SSVS-19</td><td>IgM</td></tr>
<tr><td>SSVS-86</td><td>IgG_{2b}</td><td>±</td><td>+</td><td>±</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td></tr>
</table>

+ = strongly bind ± = not strongly bind

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4-2 การศึกษาไวเทลลิน และไวเทลโลเจนินของปู 5 ชนิด

Species	Molecular weight (kD)				References
	Vn	Vn subunits	Vg	Vg subunits	
Uca pugilator	ND	123.5, 100.6	ND	ND	Eastman-Reks and Fingerman, 1985
Pachygrapsus crassipes	ND	118, 105, 83	ND	ND	Lui and O' Connor, 1987
Callinectes sapidus	ND	107, 78	ND	190, 107, 78	Lee and Puppione, 1988
	ND	188,168, 109, 86	ND	ND	Lee and Watson, 1994-1995
Potamon potamios	510	115, 105, 85	511	115, 105, 85	Pateraki and Stratakis, 1997
Scylla serrata	ND	107, 78	ND	190, 107, 78	This study

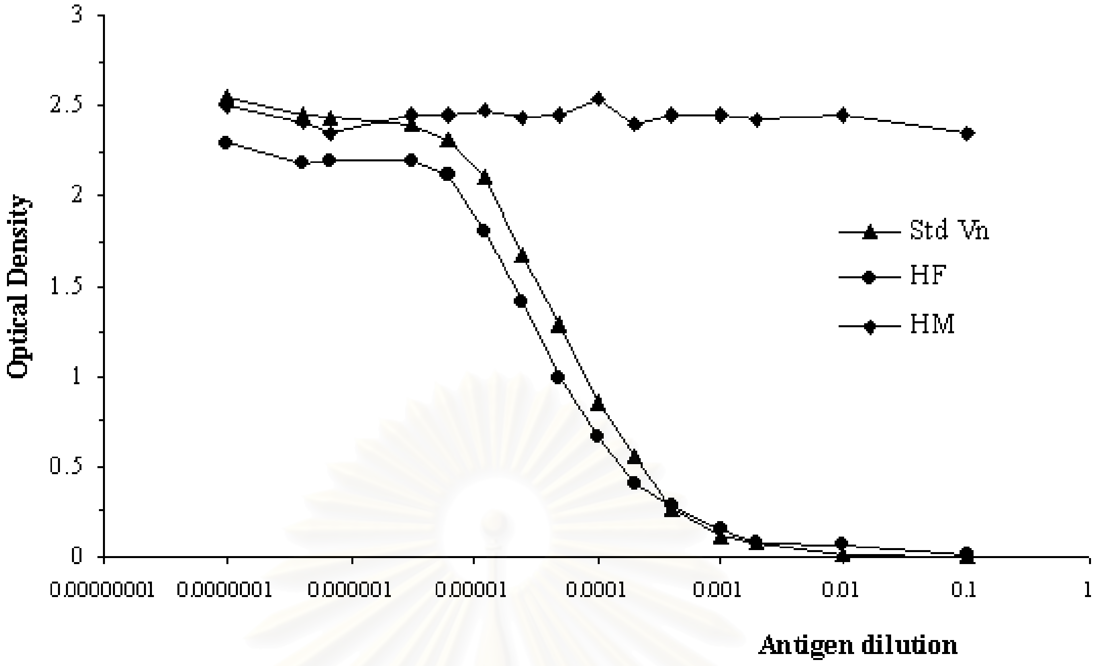
ND = Not determined, Vn = Vitellin, Vg = Vitellogenin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน

4.2.1 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี competitive ELISA

จากการใช้วิธี competitive ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่ถูกทำให้เสียสภาพของหน่วยย่อยต่าง ๆ ทั้ง 2 หน่วย พบว่าแอนติบอดีทุกโคลนไม่สามารถให้ปฏิกิริยาถึงจุด maximum binding ได้เมื่อเทียบกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับไวเทลลินที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้สารสกัดไวเทลลินจากรังไข่และเลือดจากปูทะเลเพศเมียไม่สามารถแทนที่การจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนในหลุมได้อย่างสมบูรณ์ ถึงแม้จะใช้สารสกัดไวเทลลินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นสูง (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทั้งนี้เนื่องมาจากโมโนโคล-นอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากการใช้ไวเทลลินที่เสียสภาพธรรมชาติเป็นแอนติเจนในครั้งนี้ ไม่ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับไวเทลลินหรือไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเลที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีอาจจะจับไวเทลลินในสภาพธรรมชาติได้บ้าง แต่ไม่ดีนัก และไม่เลือกที่จะทำให้ไวเทลโลเจนินในเลือดเสียสภาพก่อนที่จะนำมาตรวจวัดโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่อยู่ในรูปเสียสภาพ เนื่องจากโปรตีนไวเทลลินมาตรฐานที่นำมาทำให้เสียสภาพธรรมชาติโดยต้มกับ SDS แล้วนำไปหาปริมาณโปรตีนไม่ได้ เพราะ SDS ไปรบกวนปฏิกิริยาของ reagent กับโปรตีนทำให้ไม่สามารถสร้างกราฟมาตรฐานของไวเทลลินที่เสียสภาพได้ หรือถ้าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานได้การทำให้โปรตีนไวเทลโลเจนินในเลือดเสียสภาพโดยต้มกับ SDS ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่อยู่ในรูปเสียสภาพ ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจะถูกรบกวนโดย SDS อีกเช่นกัน หรือถ้าทำให้เสียสภาพโดยใช้ความร้อนอาจทำให้ตัวอย่างเลือดที่มีไวเทลโลเจนินมากเกิดการเกาะตัวเป็นก้อนไม่สามารถวัดปริมาณไวเทลโลเจนินได้ นอกจากนี้ตัวอย่างเลือดที่ทำในการทดลองนี้มีจำนวนมากจึงไม่สะดวกที่ต้องต้มทุกตัวอย่าง และทุก ๆ dilution ของตัวอย่างก่อนตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA ดังนั้นในการศึกษาในช่วงต่อมาจึงได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (SSV-71) ที่ผลิตโดย
นุชนาถ เกษมวงศ์ (2542) ซึ่งพบว่าสารสกัดไวเทลลินมาตรฐานและไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเลสามารถแทนที่การจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนนี้กับแอนติเจนในหลุมได้อย่างสมบูรณ์เมื่อมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และให้เส้นกราฟที่ขนานกัน ส่วนเลือดของปูทะเลเพศผู้ไม่มีผลในการแทนที่การจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งช่วงความเข้มข้นของระดับไวเทลโลเจนินในเลือดที่ตรวจวัดได้แม่นยำอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-7)



ภาพที่ 4-7 Competitive ELISA ของไวเทลลินมาตรฐานและตัวอย่างเลือดปูทะเล *S. serrata* เพศเมียและเพศผู้ที่ระดับเจือจางต่างๆ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (SSV-71) ที่เจือจาง 1:10,000 ความเข้มข้นของไวเทลลินมาตรฐานเริ่มต้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Std Vn = standard vitellin, HF = female haemolymph, HM = male haemolymph

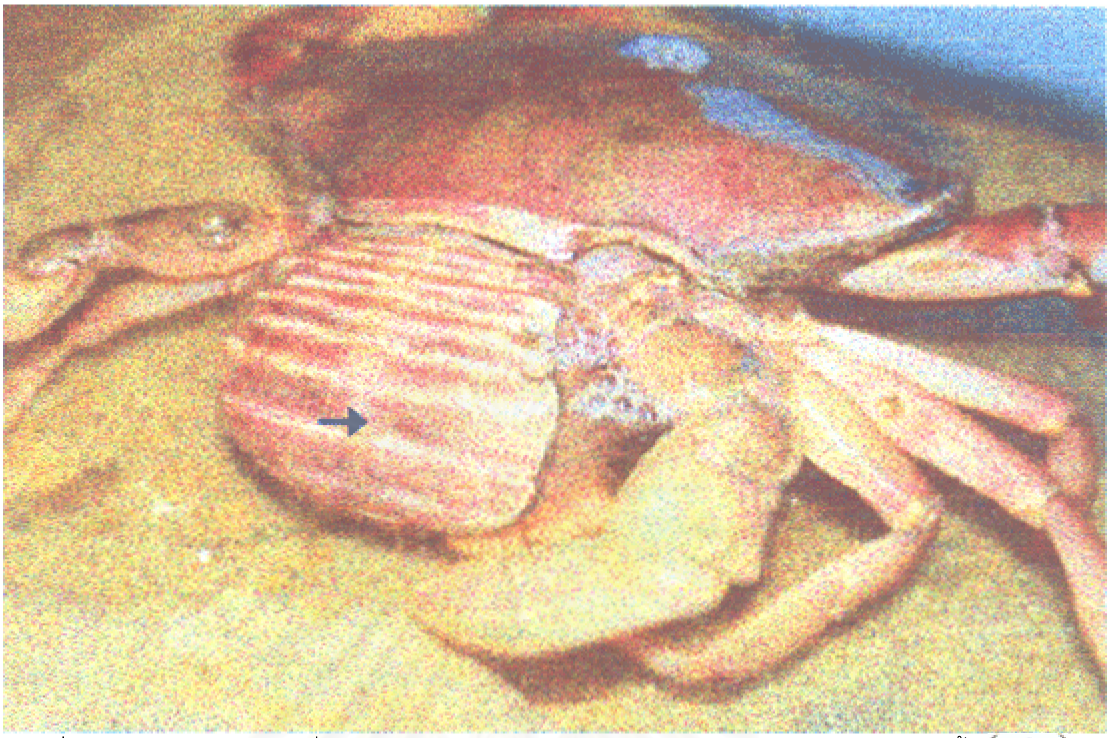
4.2.2 การประเมินความแม่นยำของวิธี competitive ELISA ในการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือด

จากการสุ่มตัวอย่างเลือดของปูทะเลเพศเมียมาตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 71 (นุชนาถ เกษมวงศ์, 2542) ซึ่งทำใน microtiter plate เดียวกัน และ microtiter plate ที่ต่างกัน ในเวลาต่างๆ กัน พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินที่ตรวจวัดได้ในแต่ละครั้งมีค่าใกล้เคียงกัน มีค่าความแปรปรวนอยู่ในช่วง 2-5% และแม้จะทำต่าง microtiter plate ที่ต่างเวลากันมีค่าเฉลี่ยความแปรปรวน 3.7% (ภาคผนวก ค ตารางที่ 1) ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับค่าที่นุชนาถ เกษมวงศ์ (2542) ได้ทำไว้คือ ค่าความแปรปรวนภายในและภายนอก microtiter plate เท่ากับ 3.8-7.5% และ 5% ตามลำดับ ดังนั้นจึงเชื่อว่าวิธี competitive ELISA ที่ใช้ตรวจหาปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ จากการศึกษาของนุชนาถ เกษมวงศ์ (2542) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าของไวเทลโลเจนินในเลือดกับค่าดัชนีรังไข่ ข้อมูลมีลักษณะกระจายและมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-1) แสดงว่าการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่โดยศึกษาจากปูหลาย ๆ ตัวเป็นไปได้ยากทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสมบูรณ์ของปูแต่ละตัวทำให้ปูสร้างไวเทลโลเจนินปล่อยออกสู่กระแสเลือดได้ในปริมาณต่างกัน และอัตราการสะสมไวเทลลินโดยเซลล์ไข่ในแต่ละระยะอาจจะไม่เท่ากัน ทำให้ค่าดัชนีของรังไข่ไม่สามารถบ่งบอกระยะการเจริญของรังไข่ที่แน่นอนได้ นอกจากนี้การเจริญของรังไข่เป็นการเจริญที่ต่อเนื่องไม่สามารถแบ่งระยะการเจริญของรังไข่ได้อย่างเที่ยงตรงซึ่งมีการศึกษาในแบบเดียวกันนี้ในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (Lee and Chang, 1997) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-2) โดยได้ผลคล้ายกับผลการทดลองของนุชนาถ ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของปูตัวเดียวกันตลอดตั้งแต่รังไข่ยังไม่เจริญจนกระทั่งถึงระยะที่ปูวางไข่ น่าจะสามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างระยะการเจริญของรังไข่กับระดับไวเทลโลเจนินได้ดีกว่า

รายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกุ้ง และปูชนิดต่าง ๆ มีฮอร์โมนยับยั้งการสร้างและสะสมไข่แดงของรังไข่อยู่ในส่วนของก้านตา เมื่อมีการทำลายก้านตาจะมีผลทำให้เกิดการเจริญของรังไข่อย่างรวดเร็ว (Anikumar และ Adiyodi, 1980) ดังเช่นมีการทดลองตัดตากุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Chen และ Chen, 1994) และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (Wilder et al., 1994) พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง (vitellogenesis) ได้ภายหลังจากตัดตาในช่วง 3-7 วัน ดังนั้นจึงได้มีการทดลองตัดตาปูทะเลที่รังไข่ยังไม่เจริญเพื่อกระตุ้นให้รังไข่มีการเจริญโดยการกำจัดแหล่งที่ผลิตฮอร์โมนยับยั้งการเจริญของรังไข่ (gonad inhibiting hormone หรือ GIH) พบว่าวิธีนี้สามารถชักนำให้รังไข่ของปูทะเลเจริญ

จนกระทั่งวางไข่ได้ ภาพที่ 4-8 และ ภาพที่ 4-9 แสดงการวางไข่ของปูทะเล *S. serrata* และไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมถูกปล่อยออกมาติดอยู่ที่ pleopod ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-8 ปูทะเล *S. serrata* ที่ถูกกระตุ้นให้รังไข่เจริญโดยการตัดตากำลังวางไข่โดยการเปิดจับปิ้ง (→)

ภาพที่ 4-9 ไข่ที่ไม่ได้รับการผสม (→) ที่ถูกปล่อยออกมา บางส่วนยังติดอยู่ที่ pleopod

4.2.3 การหาความสัมพันธ์ของระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ในปูทะเลที่ชักนำให้รังไข่เจริญโดยการตัดตา

จากการเก็บตัวอย่างเลือดปูทะเลเพศเมียทุก ๆ 2 วันหลังจากตัดตาเพื่อนำมาตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินโดยวิธี competitive ELISA พบว่าปูแต่ละตัวให้ความสัมพันธ์ในรูปแบบที่คล้ายกัน (ภาพที่ 4-10) โดยในระยะก่อนการเจริญของรังไข่ ปริมาณไวเทลโลเจนินเฉลี่ยยังอยู่ในระดับต่ำ (0.018 $\pm$ 0.019 mg/ml) (ตารางที่ 4-3) และหลังจากตัดตาได้ 2 วัน รังไข่เริ่มมีการเจริญอยู่ในระยะแรกปริมาณไวเทลโลเจนินเพิ่มขึ้นโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.315 $\pm$ 0.236 mg/ml (ตารางที่ 4-3) ซึ่งมีค่าทั้งสูงกว่าและต่ำกว่ารายงานการศึกษาในครัสตาเชียนอื่น ๆ ดังตารางที่ 4-4 และมีค่าใกล้เคียงกับกุ้งตะกาด *Metapenease affinis*, American lobster *Homarus americanus*, *Macrobrachium rosenbergii* (Derelle และคณะ, 1986) และ kuruma prawn *Penaeus japonicus* จากนั้นปริมาณไวเทลโลเจนินมีการเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ปูบางตัว (ตัวที่ 5 และ 6) (ภาพที่ 4-11) มีปริมาณไวเทลโลเจนินขึ้น ๆ ลง ๆ ในช่วงแรกของการเจริญของรังไข่ ในขณะที่ตัวอื่น ๆ มีแนวโน้มค่อย ๆ สูงขึ้นอย่างค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่าอัตราการเข้าสะสมเป็นไวเทลลินโดยเซลล์ไข่นั้นแตกต่างกัน คาดว่าน่าจะเกิดจากความเครียดของปูเมื่อนำมาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงถึงแม้จะพยายามเลียนแแบบสภาพในธรรมชาติมากที่สุดแล้วก็ตาม ซึ่งความเครียดที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้การกินอาหารลดลง และความสมบูรณ์ของร่างกายลดลงด้วย

ปริมาณไวเทลโลเจนินจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในปูแต่ละตัวใช้เวลาต่างกันอยู่ในช่วง 10-18 วันหลังจากตัดตา ค่าสูงสุดของปริมาณไวเทลโลเจนินของปูทั้ง 8 ตัว อยู่ระหว่าง 1.007-3.432 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยเมื่อเปรียบเทียบค่าสูงสุดของปริมาณไวเทลโลเจนินของปูทะเลกับรายงานการศึกษาในครัสตาเชียนอื่นในตารางที่ 4-4 พบว่ามีค่าต่ำกว่ารายงานการศึกษาใน American lobster *H. americanus*, *M. rosenbergii* (Derelle และคณะ, 1986), *M. nipponense* และ *P. monodon* (Quinitio และคณะ, 1994) มีค่าสูงกว่าในกุ้ง *P. semisulcatus* และมีค่าใกล้เคียงกับกุ้งตะกาด *M. affinis*, *Callinectes sapidus* (Lee และ Puppione, 1988), *M. rosenbergii* (Chang และ Shih, 1995; Lee และ Chang, 1997) และกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (Longyant, 1999)

ความแตกต่างของค่าสูงสุดของปริมาณไวเทลโลเจนินครัสตาเชียนแต่ละชนิดนี้อาจเนื่องมาจากความต้องการในการสะสมไวเทลลินในแต่ละชนิดไม่เท่ากัน และอัตราการนำเข้าของไวเทลโล-เจนินโดยเซลล์ไข่ต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในครั้งนี้ข้อมูลของปูทะเลแต่ละตัวชี้ให้เห็นว่าปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดจะเพิ่มขึ้นสูงสุด และลดลงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งไวเทล-โลเจนินมีค่าต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปูจึงวางไข่ ซึ่งเป็นเวลา 3-4 วันหลังจากระดับไวเทลโลเจนินเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุด โดยวันที่ปูวางไข่อยู่ในช่วง 13-21 วันหรือเฉลี่ยประมาณ 16 วันหลังจากตัดตา หลังจากปูทะเลวางไข่แล้วส่วนใหญ่ระดับไวเทลโลเจนินจะลดลงหรือเท่าเดิม และปูจะตายภายใน 0-3 วัน หลังจากการวางไข่ ทั้งนี้เนื่องจากสภาพร่างกายของปูทะเลจะอ่อนแอมากหลังจากวางไข่และร่างกายจะกลับมาสู่สภาพสมดุลดังเดิมได้ยากเนื่องจากถูกตัดก้านตา (eyestalk) ทั้ง 2 ข้าง ซึ่งภายในก้านตานอกจากจะมีฮอร์โมนยับยั้งการเจริญของรังไข่แล้วยังมีฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของระบบภายในร่างกายอีกหลายอย่าง เช่น ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของเม็ดสี ฮอร์โมนควบคุมเมตาบอลิซึมของน้ำ ฮอร์โมนควบคุมเมตาบอลิซึมของน้ำตาล ฮอร์โมนควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ เป็นต้น นอกจากนี้การเจริญของไข่และการวางไข่เป็นการใช้สารอาหารและพลังงานอย่างสูงมากซึ่งจะส่งผลกระทบให้ปูไม่สามารถมีการปรับตัวของระบบสรีระของร่างกาย (physiological adaptation) เพื่อกลับเข้าสู่สภาวะสมดุลตามปกติได้

มีการศึกษาที่พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดลดลงอย่างรวดเร็วก่อนการวางไข่ในครัสตาเชียนหลายชนิด ได้แก่ american lobster *Homarus americanus* (Byard และ Aiken, 1984); กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Quinitio และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-3); กุ้ง *Penaeus nipponense* (Okumura และคณะ, 1992); *M. rosenbergii* (Derelle และคณะ, 1986) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-4); *M. rosenbergii* (Chang และ Shih, 1995) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-5); *P. monodon* (Longyant, 1999) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-6) และมีการทดลองที่ยืนยันว่ากระบวนการสะสมไข่แดงของกุ้งก้ามกราม มีการสังเคราะห์มาจากภายนอกรังไข่เนื่องจากสามารถวัดไวเทลโลเจนินในเลือดเพศเมียได้ตั้งแต่รังไข่เริ่มมีการเจริญ (Lee และ Chang, 1997) และการวัดไวเทลโลเจนินในปู *Callinectes sapidus* โดยใช้เทคนิค ELISA ระดับไวเทลโลเจนินอยู่ในระดับที่ต่ำตลอดระยะการเจริญของรังไข่ แต่จะเพิ่มสูงขึ้นหลังจากวางไข่ (Lee และคณะ, 1996) ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ว่าไวเทลโลเจนินเป็นสารตั้งต้นของไวเทลลิน โดยสร้างมาจากภายนอกรังไข่และส่งมาตามกระแสเลือดเพื่อไปสะสมในรังไข่ และจากรายงานการศึกษาแหล่งสร้างไวเทลลินในปู *C. sapidus* โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรี (immunocytochemistry) พบว่าแหล่งการสร้างไวเทลลินในปู *C. sapidus* อยู่ที่รังไข่เท่านั้น (Lee และ Watson, 1995) จึง

เป็นไปได้ที่ไวเทลโลเจนินที่วัดได้ในเลือดเป็นส่วนที่เกิดจากการปล่อยออกจากรังไข่ ส่วนการศึกษาในปูทะเล *Scylla serrata* โดยเทคนิค radiolabelled amino acid (^{14}C phenylalanine) พบว่ามีแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินจากภายนอกรังไข่ ได้แก่ ตับ-ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนังก่อนนำเข้าสะสมโดยเซลล์ไข่ซึ่งอยู่ในรูปไวเทลลิน (Rani และ Subramonium, 1997) และจากการใช้วิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรีติดตามแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของ ปูทะเล *S. serrata* ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นก่อนที่จะทำการทดลองในครั้งนี้ พบว่านอกจาก
รังไข่แล้วตับ-ตับอ่อนยังเป็นแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินด้วย ดังนั้นทำให้สามารถวัดปริมาณไวเทล-โลเจนินในเลือดปูทะเลได้ และทำให้พบไวเทลโลเจนินหน่วยย่อยที่มีขนาด 190 กิโลดาลตันในเลือดซึ่งเป็น precursor ของไวเทลลินในรังไข่ด้วย

ถึงแม้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในครั้งนี้จะไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินได้ แต่ได้นำมาใช้ในการศึกษาขนาดของโปรตีนหน่วยย่อยของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินได้ดีเนื่องจากผลิตได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อทั้ง 2 หน่วยย่อยของไวเทลลิน และยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินโดยวิธีอิมมูโนไซโต-เคมิสทรีได้ดีกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ เพราะแอนติเจนในเนื้อเยื่อที่จะตรวจสอบนั้นอยู่ในรูปที่เสียสภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

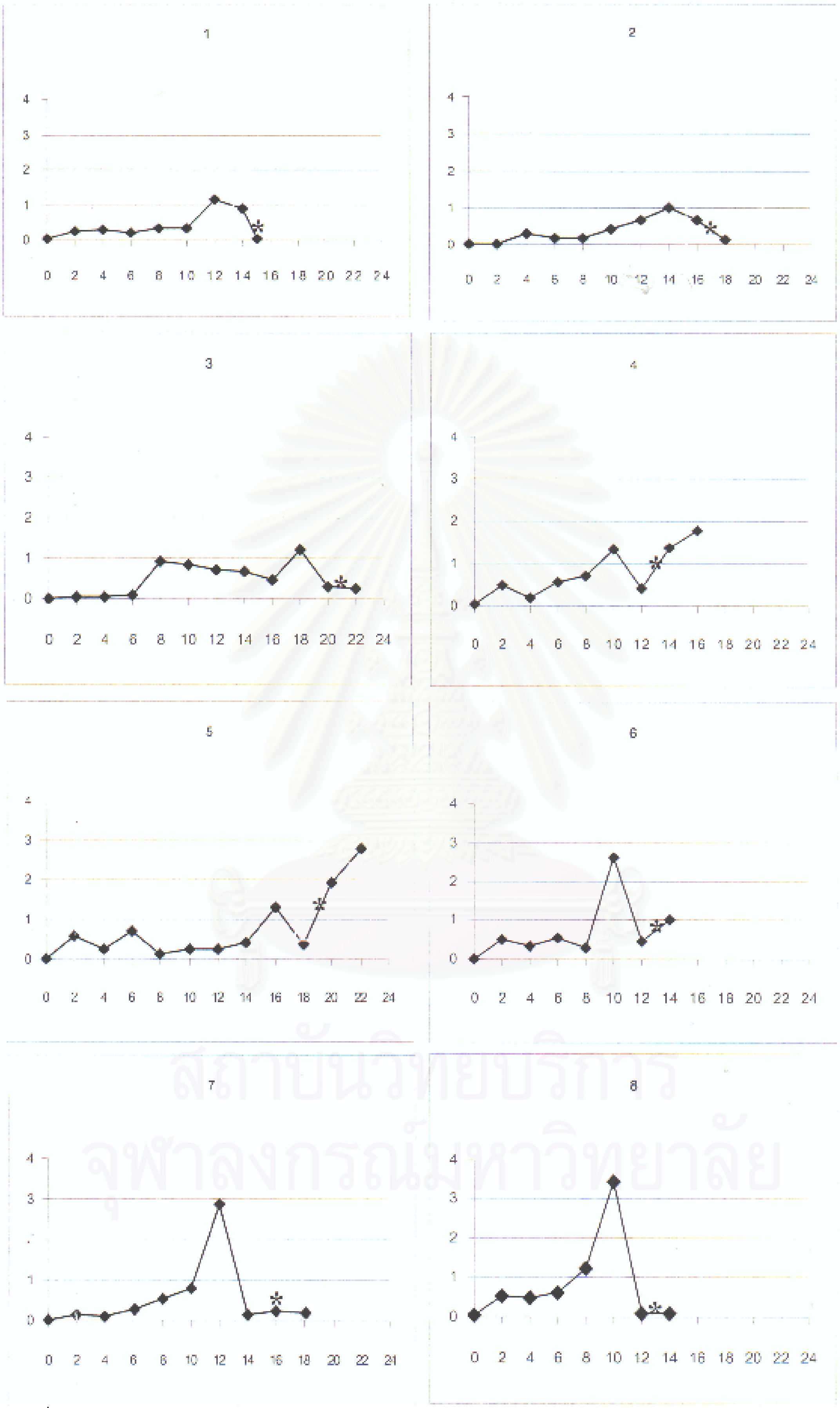
ตารางที่ 4-3 ปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดปูทะเล *S. serrata* หลังจากตัดตา

ตัวที่	CW (cm.)	BW1 (g.)	BW2 (g.)	ปริมาณไวเทลโลเจนิน (mg/ml) หลังจากตัดตาจนกระทั่งปูวางไข่ (วัน)																
				0	2	4	6	8	10	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	109	226	232	0.032	0.262	0.295	0.206	0.339	0.329	1.141		0.879	0.054*	=						
2	101	168	178	0	0.006	0.274	0.156	0.173	0.431	0.669		1.007		0.674	*	0.133		=		
3	108	224	228	0.016	0.044	0.047	0.064	0.899	0.843	0.705		0.667		0.447		1.189		0.31	*	0.250=
4	101.5	180	200	0.023	0.479	0.171	0.54	0.708	1.324	0.402	*	1.369		1.79		=				
5	110	220	237	0.001	0.585	0.236	0.717	0.105	0.259	0.26		0.409		1.285		0.358	*	1.932		2.791=
6	110	206	232	0.004	0.511	0.331	0.539	0.305	2.627	0.468	*	1.012		=						
7	110	208	237	0.008	0.119	0.085	0.243	0.494	0.758	2.857		0.14		0.221*		0.159	=			
8	107	204	226	0.057	0.521	0.465	0.592	1.239	3.432	0.084	*	0.099			=					
Mean	107.063	204.500	221.250	0.018	0.315	0.238	0.382	0.533	1.250	0.823		0.698		0.745		0.459		1.121		1.520
SD	3.746	20.805	21.104	0.019	0.236	0.135	0.242	0.390	1.169	0.882		0.452		0.667		0.496		1.146		1.797

CW = ความกว้างของกระดอง BW1 = น้ำหนักเริ่มต้นก่อนการตัดตา BW2 = น้ำหนักสุดท้ายก่อนการวางไข่

* = วันที่ปูทะเลวางไข่ = = วันที่ปูตาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-10 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดปูทะเล (แกน Y, มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับระยะการเจริญของรังไข่หลังจากตัดตา (แกน X, วัน) ของปูแต่ละตัว (n=8)

* = วันที่ปูทะเลวางไข่

ตารางที่ 4-4 การศึกษาปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน

Species	Methods	Min (mg/ml)	Max (mg/ml)	References
Callinectes sapidus	Ultracentrifugation PAGE, SDS-PAGE, Lowry's method	0	4.1	Lee และ Puppione, 1988
C. sapidus	Competitive ELISA	0	0.14	Lee และ Watson, 1994-1996
Metapenaeus affinis	Competitive ELISA	0.193	2.673	ศิวาพร ลงยันต์, 2537
Homarus americanus	Immunoelectrophoresis, Competitive ELISA	0.107	12	Byard และ Aiken, 1984
Macrobrachium rosenbergii	Competitive ELISA	0.1	15	Derelle และคณะ, 1986
M. rosenbergii	Competitive ELISA	1.86	2.48	Chang และ Shih, 1995
M. rosenbergii	Competitive ELISA	0.05	2.89	Lee และ Chang, 1997
M. nipponense	Rocket Immunoelectrophoresis	1	9	Okumura และคณะ, 1992
Penaeus semisulcatus	Rocket Immunoelectrophoresis	0.05	0.439	Shafir และคณะ, 1992
P. monodon	Single radial immunodiffusion	0	6.973	Quinitio และคณะ, 1994
P. monodon	Competitive ELISA	0	2.91	Longyant, 1999
P. japonicus	Competitive ELISA	0.14	5.07	Jasmani และคณะ, 2000

Min = Minimal vitellogenin level   Max = Maximal vitellogenin level

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

1. สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อไวเทลลินในรังไข่ และไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเล *Scylla serrata* โดยใช้สารสกัดจากรังไข่ที่ถูกทำให้เสียสภาพ เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว

1.1 Hybridoma clone ที่ผลิตได้แบ่งตามความจำเพาะได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทั้ง 2 หน่วยย่อย มีจำนวน 3 โคลน กลุ่มที่ 2 ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยที่มีขนาด 78 กิโลดาลตัน มีจำนวน 6 โคลน กลุ่มที่ 3 ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยของไวเทลลินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 107 กิโลดาลตัน มีจำนวน 4 โคลน และกลุ่มที่ 4 ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีขนาดใหญ่อยู่ในสารสกัดรังไข่ และในเลือดปูทะเลเพศเมีย แต่ไม่จับกับโปรตีนในเลือดปูทะเลเพศผู้ มีจำนวน 1 โคลน

1.2 Hybridoma ทุกโคลน สามารถจับกับไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่อยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติ

2. โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้สำหรับตรวจหาหน่วยย่อยของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินได้ ไวเทลลินจากรังไข่ปูทะเลที่มีการเจริญเต็มที่ (ระยะที่ 5) ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 107 และ 78 กิโลดาลตัน และไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเลเพศเมีย ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 190, 107 และ 78 กิโลดาลตัน

3. การตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเลที่ถูกชักนำให้รังไข่เจริญโดยการตัดตา ด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (นุชนาถ เกษมวงศ์, 2542) พบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือด ของปูทะเลแต่ละตัวมีรูปแบบที่คล้ายกัน คือมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดเพียงเล็กน้อยในระยะแรกของการเจริญของรังไข่ จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดและลดต่ำลงอย่างรวดเร็วก่อนการวางไข่

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้ศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล ติดตามการทำงานของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของรังไข่ และใช้ตรวจหาแหล่งสร้างไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของปูทะเลได้

2. ควรนำสารสกัดจากรังไข่ และเลือดของปูทะเลที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1-5 มาตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อหน่วยย่อยต่าง ๆ เพื่อที่จะสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของหน่วยย่อยไวเทลลินในรังไข่ และ precursor ของไวเทลลินได้ดียิ่งขึ้น

3. เนื่องจากปัญหาที่พบมากในการทดลองครั้งนี้คือ ปูที่เลี้ยงมีรังไข่ที่เจริญจนถึงระยะสุดท้ายแล้วแต่ไม่วางไข่และทำให้ตายในที่สุด ซึ่งอาจจะแก้ไขได้โดยการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมที่ปูต้องการในช่วงก่อน หลัง และระหว่างการวางไข่ เช่น ความเค็มของน้ำ กระแสน้ำเป็นต้น ถ้าทราบข้อมูลและนำมาปฏิบัติโอกาสที่ปูจะปล่อยไข่และไม่ตายหลังการวางไข่น่าจะมีมากขึ้น ดังนั้นถ้าสามารถเลี้ยงปูให้วางไขได้มากกว่านี้ จะทำให้ปัญหาความแตกต่างระหว่างปูแต่ละตัวลดลง เนื่องจากจะมีข้อมูลมากขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินกับการเจริญของรังไข่ ปัญหาความแตกต่างที่เกิดขึ้นดังกล่าวได้แก่ข้อมูลปริมาณไวเทลโลเจนินสูงสุดของปูทะเลแต่ละตัวไม่เท่ากัน วันที่ค่าไวเทลโลเจนินเพิ่มขึ้นสูงสุดของปูแต่ละตัวแตกต่างกัน นอกจากนี้ถ้าปูไม่ตายหลังจากวางไข่ครั้งแรกจะทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยน-แปลงของปริมาณไวเทลโลเจนินให้ได้มากกว่า 1 รอบของการเจริญของไข่ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ดีสำหรับใช้ยืนยันว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวเทลโลเจนิน ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของปริมาณไวเทลโลเจนิน และระยะเวลาของการเจริญของไข่ในปู species นี้ เป็นดังผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จริง

4. ข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระดับไวเทลโลเจนินในเลือดนี้จะเป็นดัชนีของการเจริญของรังไข่ได้เป็นอย่างดี สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปติดตามการเจริญของรังไข่ของปูทะเลโดยการตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนินในเลือด สำหรับการคัดเลือกปูเพื่อการค้า และการคัดเลือกแม่พันธุ์ปูเพื่อการเพาะเลี้ยงลูกปูวัยอ่อนต่อไป

5. หลังจากตัดตาปูแล้วควรชั่งน้ำหนัก และเก็บตัวอย่างรังไข่ ตับ-ตับอ่อน และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่สนใจศึกษาจากปูทุก ๆ 2 วัน เหมือนการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อนำมาศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินโดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรี (immunocytochemistry) และเพื่อนำข้อมูลดัชนีรังไข่ (gonadosomatic index, GSI) มาเปรียบเทียบกับค่าไวเทลโลเจนินในเลือด รวมทั้งศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อรังไข่ ซึ่งจะทำให้สามารถแบ่งระยะการเจริญของรังไข่ได้แน่นอนมากขึ้น โดยดูจากค่า GSI และลักษณะภายในเนื้อเยื่อรังไข่ที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากการสังเกตสี และขนาดของรังไข่ภายนอกอาจทำให้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ผิดพลาดได้ เมื่อสามารถแบ่งระยะที่แน่นอนได้แล้วจะสะดวกต่อการศึกษาชีววิทยาของปูทะเลในด้านอื่น ๆ ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชลธี ชีวะเศรษฐธรรม. 2539. การเลี้ยงปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal). คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 127 หน้า.

นุชนาถ เกษมวงศ์. 2542. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลลินเพื่อใช้ตรวจไวเทลโลเจนินในฮีโมลิมป์ของปูทะเล *Scylla serrata* (Forskal). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

บรรจง เทียนรัศมี บุญญรัตน์ ประทุมชาติ และคเชนทร์ เฉลิมรัตน์. แนวทางอนุรักษ์และใช้ทรัพยากรปูทะเล *Scylla serrata* (Forskal) แบบบูรณาการในทศวรรษหน้า รายงานการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กุมภาพันธ์ 2541.

วิมล สุขตั้งมั่น วีระวรรณ สิทธิกรกุล และไพศาล สิทธิกรกุล. 2539. ผลของสารสกัดจากก้านตาต่อระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii.* วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 12(1) : 38-47.

ศิวาพร ลงยันต์ และคณะ. 2537. ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ของกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis.* วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 10(2) : 27-39.

ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล นิรันดร์ บุญอิงเพริศพงศ์ และไพศาล สิทธิกรกุล. 2539. ผลของสารสกัดจากก้านตาต่อระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis.* วารสารวาริชศาสตร์. 3(1): 1-13.

สุรชาติ ฉวีภักดิ์ เจษฎา เจริญวัฒน์ และสินธุวัฒน์ สุทธิอาจ. 2538. การเพาะเลี้ยงปูทะเล. จันทบุรี: ศูนย์พัฒนาการเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี, 18 หน้า.

เสน่ห์ ผลประสิทธิ์. 2541. การเลี้ยงปูทะเล. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 33 หน้า.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ภาษาอังกฤษ</u>

Adiyodi, R.G. and K.G. 1983. <u>Reproductive biology of invertebrate volume I: Oogenesis, Oviposition, and Oosorption.</u> Chichester: John Wiley & Sons.

Anilkumar, G. and Adiyidi, K.G. 1980. Ovarian growthinduced by eyestalk ablation during the prebreeding season is not normal in crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). <u>Inter. J. Invert. Reprod.</u> 2:95-105.

Barnes, R.D. 1987. <u>Invertebrate Zoology</u> 5th edition. Orlando: Harcourt Brace Jovanovich college Publishers.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of *microgram quantities of protein utilizing the principle of* protein-dye binding. <u>Anal. Biochem.</u> 72: 248-254.

Browdy. C.L., Fainzilber, M., Tom, M., Loya, Y. and Lubzens, E. 1990. Vitellin synthesis in relation to oogenesis: *In vitro* incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacean, Decapoda, Peneeidae). <u>J. Exp. Zoo.</u> 225: (3/4): 609-615.

Byard, E.H. and Aiken, D.E. 1984. The relationship between molting, reproduction and a hemolymph female-specific protein in the lobster, *Homarus americanus*. <u>Comp. Biochem. Physiol.</u> 77A: 749-757.

Cambell, A.M., Burdon, R.H. and van Knippenberg, P.H. 1984. <u>Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology</u>, Volume 3: Monoclonal antibody technique. Amsterdum: Elsevier.

Carlson, B.M. 1988. <u>Patten 's foundations of embryology.</u> 5th edition. New York: McGraw-Hill.

Chang, C.F., Lee, F.Y., Huang, Y.S. and Hong, T.S. 1994. Purification and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of prawn, *Penaeus monodon*. <u>Invert. Repord. Dev</u>. 25: 185-192.

Chang, C.F. and Shih, T.W. 1995. Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergi*. Invert. Reprod. Dev. 27 (1): 11-20.

Charniaux-Cotton, H. and Payen, G. 1988. Endocrinology of selected invertebrate types volume II: Crustacean reproduction. New York.: Liss, 279-303.

Cheewasedtham, C. 1989. Fishery biology of mud crab *Scylla serrata* (Forskal) in Klong Ngao mangrove forest, Ranong provice. Master's thesis, Department of Marine Science, Graduate school, Chulalongkorn University. 100 pp.

Chen, C. and Chen, S. 1994. Vitellogenesis in the giant prawn *Penaeus monodon* Fabricius, 1789. Comp. Biochem. Physiol. 107b: 453-460.

Chen, Y.N., Taeng, D.Y., Ho, P.Y. and Kuo, C.M. 1999. Site of vitellogenin synthesis determined from a cDNA encoding a vitellogenin fragment in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Mol. Reprod. Dev. 54: 215-222.

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

Dehn, P.F., Aiken D.E and Waddy, S.L. 1983. Aspects of vitellogenesis in the lobster *Homarus americanus* Can. Tech. Rep. Fish. Aquat.Sci. 1161: 24 pp.

Eastman-Reks, S.B. and Fingerman, M. 1984. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol. 79a (4): 679-684.

Eastman-Reks, S.B. and Fingerman, M. 1985. *In Vitro* synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*, J. Exp. Zool. 233 : 111-116.

Eshhar, Z. 1985. Monoclonal antibody strategy and technique. In : Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine. T. A. Springer (ed.). New York : Plenum Press, 1-42.

Fainzilber, M., Tom, M., Shafir , S., Applebaum, S.W. and Lubzens, E. 1992. Is there extraovarian synthesis of vitellogonin in penacid shrimp?. Bio. Bull. 183: 233-241.

Fyppe, W. and O' Connor, J.D. 1974. Characterization and quantification of a crustacean lipovitellin. Comp. Biochem. Physiol. 47b: 851-867.

Goding, J.W. 1983. Monoclonal antibodies: principles and practice. London: Academic Press.

Han, C.H., Okumura, T., Suzuki, Y., Aida, K. and Hanyu, I. 1994. Immunocytochemical identification of the site of vitellogenin synthesis in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. Fish. Sci. 60 (2): 149-154.

Harrison F.W. and Humes, A.G. 1992. Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10 Decapod crustacea. New York: Wiley-Liss.

Horn, E.C. and Kerr, M.S. 1969. The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapaidus* I. Hemocyanins and certain other major protein constituents. Comp. Biochem. Physiol. 29: 493-508.

Humason, G.L. 1979. The animal tissue techniques. San Francisco: W.H. Freeman.

Jasmani, S., Kawazoe, I., Shih, T.W., Suzuki, Y. and Aida, K. 2000. Hemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Fish. Sci. 66: 535-539.

John, D.A., guatsch, J.W., Sportman, J.R. and Elder, J.H. 1984. Improve technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. Gene Anal. Tech. 1: 3-8.

Kalthoft, K. 1996. Analysis of biological development. 4th edition. New york: McGraw-Hill.

Keenan, C.P., Davie, P.J.F. and Mann, D.L. 1998. A revision of the genus *Scylla* De Haan,1833. (Crustacea : Decapoda : Brachyura : Potunidae). The Raffles Bull. Zool. 46 (1): 215-245.

Kerr, M.S. 1969. The hemolymph protein of the blue crab *callinectes sapidus* II a lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin. Dev. Biol. 20: 1-17.

Klinbunga, S.; Boonyapakdee, A. and Pratoomchat, B. 2000. Genetic diversity and species-diagnostic markers of mud crab (genus Scylla) in eastern Thailand determined by RAPD analysis. Mar. Biotechnol. 2: 180-187.

Köhler, G. and Milstein, C. 1976. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor cell fusion. Eur. J. Immunol. 6: 511-519.

Lee, C.Y., Umphrey, H.R., and Watson, R.D. 1996. Developmental changes in the level of vitellin-immunoreactive proteins in hemolymph and tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*: relation to vitellogenesis. J. Crust. 16 (1): 1-9.

Lee, C.Y. and Walker, A. 1995. Lipovitellin and lipid dropet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab *Callinectes sapidus*. J.Exp. Zool. 271: 401-412.

Lee, C.Y. and Watson, R.D. 1994. Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin and vitellogenin of the blue crab, *Callinectes sapidus*. J. Crust. 14 (4): 617-626.

Lee, C.Y. and Watson, R.D. 1995. *In vitro* study of vitellogenesis in the blue crab *Callinectes sapidus*: Site and Control of Vitellin Synthesis. J. Exp. Zool. 271: 364-372.

Lee, F.Y. and Chang, C.F. 1997. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 117A (4): 433-439.

Lee, F.Y. and Chang, C.F. 1999. Hepatopancreas is the likely organ of vitellogenin synthesis in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Exp. Zool. 284: 798-806.

Lee, R.F. and Puppione. 1988. Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. J. Exp. Zool. 248: 278-289.

Liong, P.C. 1993. The culture and fattening of mud crabs. INFOFISH int. (FAO, Kuala Lumpur) 1993 (3): 46-49.

Longyant, S. 1999. Production of specific monoclonal antibodies to vitellin and vitellogenin for assessing gonad inhibiting hormone levels in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. The dreegree of doctoral dissertation, department of marine science, chulalongkorn university.

Longyant, S., Sithigorngul, P., Thampalerd, N., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 1999. Monoclonal antibodies production specific to vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Invert. Reprod. Dev. 35 (1): 9-17.

Lui, C.W. and O' Connor, J.D. 1976. Biosynthesis of lipovitellin by the incoporation of labelled amino acids into the purified subunits. J. Exp. Zool. 195: 41-52.

Lui, C.W. and O' Connor, J.D. 1977. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary III: the incoporation of labelled amino acids into the purified lipovitellin of the crab *Pachygrapsus crassipes*. J. Exp. Zool. 199: 105-108.

Meusy, J.J., Martin, G., Soyes, D., Deijnen, J.E.V. and Gallo, J.M. 1987. Immunochemical and immunocytochemical studies of the crustacean vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH). Gen. Comp. Endocrinol. 67: 333-341.

Mosmann, T.R., Bauman, R. and Williamson, A.R. 1979. Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. Eur. J. Immunol. 9: 511-516.

Okumura, T., Han, C.H., Suzuki, Y., Aida, K. and Hanyu, I. 1992. Changes in haemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Zool. Sci. 9: 37-45.

Pateraki, L.E. and Stratakis E. 1997. Characterization of vitellogenin and vitellin from land crab *Potamon potamios*: Identification of a precursor polypeptide in the molecule. J. Exp. Zool. 279: 597-608.

Pateraki, L.E. and Stratakis E. 2000. Synthesis and organization of vitellogenin and vitellin molecules from the land crab *Potamon potamios*. Comp. Biochem. Physiol. 125B: 53-61.

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

Pechenik, J.A. 1991. Biology of the Invertebrates. 2nd edition. Bogota: Wm.C. Brown Publishers, 370-385.

Poore. G. and Taylor, J. 2000. Biology of crab [www.mov.vic.gov.au/crust/crabbiol.html]. Crustacean laboratory, Museum victoria, Melbourne, Australia.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Pripanapong, S. and Tongdee, N.A. 1998. Denish/SE-Asian Collaboration in tropical coastal ecosystems research and training project (Denmark, Thailand, Malaysia)[www.biology.aau.dk/cenTER/NLDec98.html].

Quackenbush, L.S. 1989. Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei*: *In Vitro* studies of the isolated hepatopancreas and ovary. Comp. Biochem. Physiol. 94B (2): 153-261.

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

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

Quinitio. E.T., Hara, A., Yamauchi, K. and Nakao, S. 1994. Change in the steriod hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. 109C (1): 21-26.

Quinn, N.J. and Kojis, B.L. 1987. Reproductive Biology of *Scylla* sp. (Crustacea:Portuidae) form the Labu Estuary in Papua New Guinea. Bull. Mar. Sci. 41(2): 234-241.

Rani, K. and Subramonium, T. 1997. Vitellogenesis in the Mud Crab (*Scylla serrata*) : an *in vivo* isotope study. J. Crust. Biol. 17 (4): 659-665.

Rankin, S.M.; Bradfield, J.Y. and Keeley, L.L. 1989. Ovarian protein synthesis in the South American white shrimp, *Penaeus vannamei*, during the reproductive cycle. Invert. Reprod. Dev. 15: 27-33.

Shafir, S., Tom, M., Ovadia, M. and Lubzens, E. 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., Le Caer, J.P., Noel, P.Y. and Rossier, J. 1991. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. Neuropeptides. 20: 25-32.

Takayanagi, H., Yamamoto, Y. and Takeda, N. 1986. An ovary-stimulating factor in the shrimp *Paratya compressa*. J. Exp. Zool. 240: 203-209.

Tom, M., Goren, M. and Ovadia, M. 1987a. Purification and characterization of vitellin from ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidea). Comp. Biochem. Physiol. 87b: 17-23.

Tom, M., Goren, M. and Ovadia, M. 1987b. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Invert. Reprod. Dev. 12a: 1-12.

Tsutsui, N.; Kawazoe, I.; Ohira, T.; Jasmani, S.; Yang, W.J.; Wilder, M.N. and Aida, K. 2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zool.Sci. 17: 651-660.

Vafopoulou, X. and Steel, C.G.H. 1995. Vitellogenesis in the terrestrial isopod, *Oniscus asellus* (L.): Characterization of vitellins and vitellogenins and changes in their synthesis throughout the intermoult cycle. Invert. Reprod. Dev. 28(2): 87-95.

Wallace, R., Walker, S. and Hauschka, P. 1967. Crustacean lipovitellin isolation and characterization of the major high density lipoprotein from the eggs of decapod. Biochem. 6: 1582-1590.

Wilder, MN., Okumura, T., Suzuki, Y., Fusetani, N. and Aida, K. 1994. Vitellogenin production induced by eyestalk ablation in juvenile giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* and trial methylfernesoate administration. Zool.Sci. 11 (1): 45-53.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Wolin, E.M.; Laufer, H. and Albertini, D.F. 1973. Uptake of the yolk protein, lipovitellin by developing crustacean oocytes. Dev. Biol. 35: 160-170.

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อุปกรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

- Centrifuge	: VARISPEED Centurion scientific, Ltd., England
- Color negative film	: Eastman kodax company, USA
- Conical centrifuge tube 15 ml.	: NUNC. Inc.
- Cover slips	: Menzel-Glaser, Germany
- CO_2 incubator	: Model 3327/3337 Dual chamber Forma Scientfic, Inc., USA
- ELISA reader	: EL 312e BIO-TEX Instrument, USA
- Freezer –20 °C	: Sharp FC-27 Thai City Electrics, Thailand
- Freezer –70 °C	: Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., USA
- Hemacytometer	: Hausser Scientific, USA
- Inverted microscope	: Olympus CK-2, Japan
- 14-L glass jar	: Commercial source, Thailand
- Laboratory oven	: Model 600, Memmert Gm + Co. RG, Schwabach
- Laminar flow hood	: Model BV-124, DWYER instrument, Inc., USA
- Light microscope	: Olympus BH-2, Japan
- Magnetic stirer	: M 21/1, Framo-Geratetechnik
- Microcentrifuge tube 0.5 ml	: TreffLab 20 μl, 200 μl, 1000 μl Treff AG, CH-9113 Degersheim, Switzerland
- Microscope slides	: Shanghai Machinery Import and Export Company, China
- Microtiter plate 96 wells	: F96 maxisorp, NUNC, Inc.
- Mixer	: Vortex-Gene 2 Scientific Industries, Thailand

- Micropipettes	: Pipetman P20, P200, P1000 Gilson, France
- Micropipette tips	: TreffLab 20 μl, 200 μl, 1000 μl Treff AG, CH-9113 Degersheim, Switzerland
- pH meter	: Model 330 Perphect logrmeter, Portugal
- Refrigerater	: Sharp SJ-438F Thai City Electrics, Thailand
- Rotary microtome	: A.O., USA
- Scintillation vials	: Wheaton, England
- Shaker bath	: Forma Scientific, Inc., USA
- Slide warmer	: K.V. Science Co., Lid., Thailand
- Surgical blades	: Feather, Japan
- Surgical scissors and forceps	: PT Germany Stainless, Germany
- Thermometer	: Brannan, England
- Vacuum healer	: National Appliance Company, USA
- Vernier caliper	: 0.05 mm graduation Mitutoyo, Japan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Acetic acid	: Merck, Germany
- Acetone	: Merck, Germany
- Acrylamide	: BIO-RAD, USA.
- Aminopterin	: Sigma, USA.
- Ammonium persulfate	: BIO-RAD, USA.
- Basic fuchsin	: SERVA, USA.
- Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	: BIO-RAD, USA.
- Bovine calf serum	: Starrate, Australia
- Coomassie brilliant blue G-250	: Sigma, USA.
- D-glucose	: Sigma, USA.
- Dimethylsulfoxide (DMSO)	: Sigma, USA.
- Disodium hydrogenphosphate	: Merck, Germany
- Ethanol	: Merck, Germany
- Ethanol Absolute	: Merck, Germany
- Ethylenediamine Tetraacetic acid (EDTA)	: Sigma, USA.
- Fetal calf serum	: Starrate, Australia
- Glycerol	: BDH chemical Ltd., England
- Glycine	: BIO-RAD, USA.
- HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-n'-2-ethanesulfonic acid)	: Sigma, USA.
- Hypoxanthine, Thymidine (HT) Supplement	: Gibco BRL, USA
- Hydrochloric acid	: Merck, Germany
- L-glutamine	: Sigma, USA.
- 2-Mercaptoethanol	: Sigma, USA.
- Methanol	: Merck, Germany
- Nitric acid	: Merck, Germany
- Periodic acid	: BDH chemical Ltd., England
- Phosphoric acid	: Merck, Germany
- Polyethylene glycol (PEG)	: Sigma, USA.
- Potassium chloride	: Merck, Germany
- Potassium dihydrogenphosphate	: Merck, Germany
- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	: Gibco BRL, USA
- SDS molecular weight markers	: Sigma, USA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Sodium bicarbonate	: Sigma, USA.
- Sodium chloride	: Merck, Germany
- Sodium citrate	: Merck, Germany
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)	: BIO-RAD, USA.
- Sodium metabisulfite	: Merck, Germany
- Sodium pyruvate	: Sigma, USA.
- Sudan black B	: Sigma, USA.
- Sulfuric acid	: Merck, Germany
- N, N, N', N' Tetramethyethylene diamine (TEMED)	: BIO-RAD, USA.
- Thimerosal	: Sigma, USA.
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane	: BIO-RAD, USA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M pH 7.2

วิธีการเตรียม :	Sodium chloride (NaCl)	8 g.
	Potassium chloride (KCl)	0.2 g.
	Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	0.2 g.
	Disodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	1.15 g.
	or $Na_2HPO_4 . 7H_2O$	2.15 g.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	1,000 ml.

- Bradford solution (Bradford, 1976)

วิธีการเตรียม :	Coomassie brilliant blue G-250	100 mg.
	Methanol	50 ml.
	85% Phosphoric acid	100 ml.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	1,000 ml.

- 1% Merthiolate

วิธีการเตรียม :	Thimerosal	1 g.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	100 ml.

- RPMI medium

วิธีการเตรียม :	RPMI 1640	10.4 g.
	D-glucose	3.6 g.
	L-glutamine	0.2923 g.
	Sodium pyruvate	1.1005 g.
	Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	2.0160 g.
	HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-n’-2-ethanesulfonic acid)	5.9525 g.
	H_2O (Milli Q water)	1,000 ml.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใส่ penicillin G, streptomycin and kanamycin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20,000 units, 200 mg and 200 mg / liter ตามลำดับ นำ medium กรองโดย millipore membrane (pore size 0.22 μm) และเก็บไว้ที่ 4 ^{o}C.

- RPMI medium with serum

วิธีการเตรียม :	RPMI medium	80 ml.
	Fetal calf serum (FCS) หรือ	
	Bovine calf serum (BCS)	20 ml.
	100 X HT supplement	1 ml.

- Hybridoma selective medium (HAT medium)

วิธีการเตรียม :	RPMI medium	80 ml.
	FCS	20 ml.
	HT supplement	1 ml.
	50 X Aminopterin	2 ml.
	1% Mouse red blood cell	

- Fusion solution (40% polyethylene glycol)

วิธีการเตรียม :	Polyethylene glycol (PEG)	4 g.

ละลาย polyethylene 4 g. ใน RPMI medium 6 ml. เก็บสารละลายไว้ที่ 34 ^{o}C ใน CO_2 incubator ก่อนนำมาใช้

- Freezing medium (12% DMSO)

วิธีการเตรียม :	Dimethylsulfoxide (DMSO)	12 ml.
	RPMI medium	88 ml.

เก็บสารละลายไว้ที่ 4 ^{o}C ก่อนนำมาใช้

- Monomer solution (30% T, 2.7% C_{Bis})

วิธีการเตรียม :	Acrylamide	58.4 g.
	Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	1.6 g.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	200 ml.

เก็บสารละลายไว้ในที่มืดที่ 4 °C

- 4X Running gel buffer (1.5 M tris-Cl pH 8.8)

วิธีการเตรียม :	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	36.3 g.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	200 ml.

ปรับ pH ด้วย HCl

- 4X Stacking gel buffer (0.5 M tris-Cl pH 6.8)

วิธีการเตรียม :	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3 g.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	50 ml.

ปรับ pH ด้วย HCl

- 10% SDS

วิธีการเตรียม :	SDS	50 g.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	500 ml.

- 10% Ammonium persulfate (freshly prepared)

วิธีการเตรียม :	Ammonium persulfate	0.1 g.
	H_2O (distilled water)	1 ml.

- Running gel overlay (0.375 M tris-Cl pH 8.8, 0.1% SDS)

วิธีการเตรียม :	1.5 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane	25 ml.
	10% SDS	1 ml.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	100 ml.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 2X Treatment buffer (0.125 M tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycol, 10% 2-mercaptoethanol)

วิธีการเตรียม :	0.5 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane	2.5 ml.
	10% SDS	4 ml.
	Glycerol	2 ml.
	2-Mercaptoethanol	1 ml.
	H_2O (distilled water)	0.5 ml.

(บัฟเฟอร์สำหรับ PAGE ไม่ใส่ SDS และ 2- mercaptoethanol)

- Separating gel and stacking gel for PAGE 5% gel (5% T, 2.7% C_{Bis})

วิธีการเตรียม :	Monomer solution	5 ml.
	1.5 M tris-Cl	7.5 ml.
	H_2O (distilled water)	17.05 ml.
	10% Ammonium persulfate	150 μl.
	TEMED	20 μl.

- Separating gel for SDS-PAGE 7.5% gel (7.5% T, 2.7% C_{Bis})

วิธีการเตรียม :	Monomer solution	7.5 ml.
	1.5 M tris-Cl pH 8.8	7.5 ml.
	10% SDS	0.3 ml.
	H_2O (distilled water)	14.55 ml.
	10% Ammonium persulfate	150 μl.
	TEMED	20 μl.

- Stacking gel for SDS-PAGE 4% gel (4%T, 2.7% C_{Bis})

วิธีการเตรียม :	Monomer solution	10 μl.
	0.5 M tris-Cl pH 6.8	5 ml.
	10% SDS	0.2 ml.
	H_2O (distilled water)	12.2 ml.
	10% Ammonium persulfate	100 μl.
	TEMED	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- PAGE-Upper tank buffer (37.6 mM tris, 40 mM HCl, pH 8.89)

วิธีการเตรียม :	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	4.56 g.
	Glycine	3 g.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	1,000 ml.

- PAGE-Lower tank buffer (63 mM tris, 50 mM HCl, pH 7.47)

วิธีการเตรียม :	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	22.7 g.
	1N Hydrochloric acid	150 ml.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	3,000 ml.

- SDS-PAGE Tank buffer (.0025 M tris pH 8.3, 0.192 M glycine, 0.1% SDS)

วิธีการเตรียม :	Tris	12 g.
	Glycine	57.6 g.
	10% SDS	40 ml.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	4,000 ml.

- Coomassie blue

วิธีการเตรียม :	1% Coomassie blue G-250	50 ml.
	Methanol	250 ml.
	Acetic acid	50 ml.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	500 ml.

Destaining solution for Coomassie blue

- Destain I

วิธีการเตรียม :	Methanol	500 ml.
	Acetic acid	100 ml.
	H_2O (distilled water)	1,000 ml.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Destain II

วิธีการเตรียม :	Methanol	50 ml.
	Acetic acid	70 ml.
	H_2O (distilled water)	1,000 ml.

- Periodic Schiff reagent

วิธีการเตรียม :	Periodic acid (HIO_4)	0.6 g.
	14 M Nitric acid	0.3 ml.
	H_2O (distilled water)	100 ml.

- Schiff reagent

วิธีการเตรียม :	Basic fuchsin	0.5-1.0 g.
	Sodium metabisulfite ($Na_2S_2O_5$)	1.9 g.
	1N Hydrochloric acid	15 ml.
	H_2O (distilled water)	85 ml.

เขย่าสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นเติม activated charcoal เขย่าเป็นเวลา 1 นาที จนกระทั่งสารละลายเป็นสีขาว

- Sodium metabisulfite solution

วิธีการเตรียม :	Sodium metabisulfite ($Na_2S_2O_5$)	0.5 g.
	H_2O (distilled water)	100 ml

- Staining solution for lipid (Sudan black B-SBB)

วิธีการเตรียม :	Sudan black B	0.7 g.
	Ethylene glycol	100 ml.

- Destaining solution for sudan black B (20% acetone, 15% acetic acid)

วิธีการเตรียม :	Acetone	20 ml.
	Acetic acid	15 ml.
	H_2O (distilled water)	65 ml

- SDS molecular weight markers ประกอบด้วย

วิธีการเตรียม :	Myosin, Rabbit muscle	205 kD
	β Galactosidase, *Escherichia coli*	116 kD
	Phosphorylase β , Rabbit muscle	97.4 kD
	Albumin, Bovine plasma	66 kD
	Albumin, Egg (Ovalbumin)	45 kD
	Carbonic anhydrase (Bovine erythrocytes)	29 kD

- Towbin transfer buffer pH 8.8 สำหรับทำ Western blot analysis (25 mM tris, 192 mM glycine, 20% methanol)

วิธีการเตรียม :	Tris	3.03 g.
	Glycine	14.4 g.
	Methanol	200 ml.
	H_2O (distilled water) adjusted to	1,000 ml

แช่สารละลายที่ 4 ^{O}C ก่อนนำมาใช้

- 5% Blotto solution (Johnson et al., 1984)

วิธีการเตรียม :	Skimmed milk	5 g.
	PBS 0.15 M pH 7.2	100 ml.
	1% Merthiolate	1 ml.
	Triton X-100 (Sigma)	0.1 ml.

- 0.1 M Citrate Buffer pH 4.5

วิธีการเตรียม :	Sodium citrate	29.41 g.
	1% Merthiolate	10 ml.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	1,000 ml.

ปรับ pH ให้ได้ 4.5 ด้วย 0.1 M HCl

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 1 N H_2SO_4

วิธีการเตรียม :	18 M H_2SO_4	27.6 ml.
	H_2O (distilled water) adjust volume to	1,000 ml.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการวัดปริมาณไวเทลโลเจนิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค-1 ค่าความแม่นยำของวิธี competitive ELISA

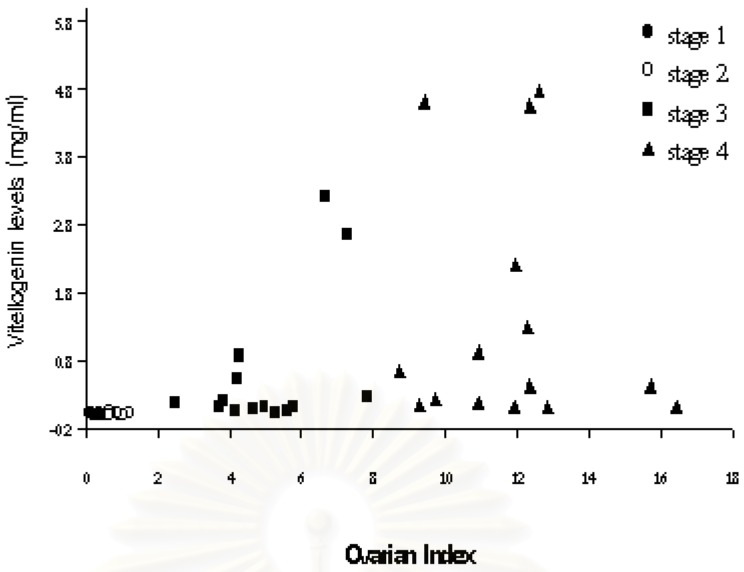
ตัวอย่างเลือดของปูทะเลเพศเมียตัวที่ 1

		Well No.				Mean	SD	%
		1	2	3	4			
Plate No.	1	1.564	1.541	1.476	1.527	1.527	0.037	2.440
	2	1.400	1.312	1.416	1.447	1.394	0.057	4.153
	3	1.499	1.537	1.506	1.554	1.524	0.026	1.701
	4	1.302	1.425	1.377	1.506	1.402	0.086	6.102
	5	1.443	1.433	1.383	1.416	1.419	0.026	1.855
	6	1.393	1.326	1.406	1.518	1.410	0.079	5.645
						1.446	0.052	3.649

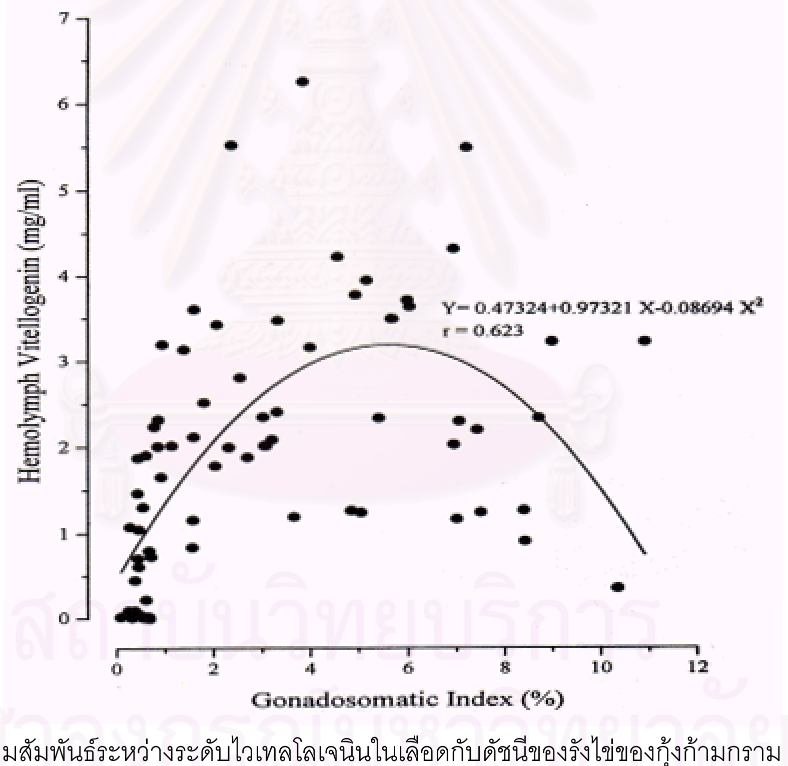
ตัวอย่างเลือดของปูทะเลเพศเมียตัวที่ 2

		Well No.				Mean	SD	%
		1	2	3	4			
Plate No.	1	7.177	6.865	7.630	7.527	7.299	0.348	4.777
	2	6.663	6.060	6.372	6.015	6.277	0.302	4.812
	3	6.739	6.929	7.171	7.563	7.100	0.355	5.006
	4	6.150	6.494	6.070	6.376	6.272	0.196	3.132
	5	6.368	6.313	6.629	6.360	6.417	0.143	2.229
	6	6.815	7.136	7.159	6.830	6.985	0.188	2.691
						6.725	0.256	3.774

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

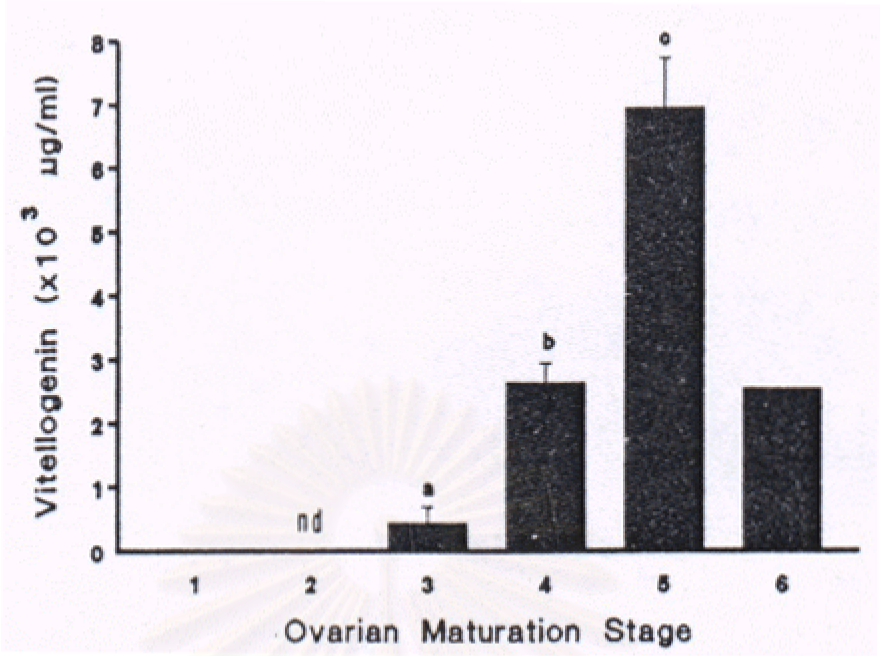


ภาพที่ ค-1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับดัชนีของรังไข่ของปูทะเล *Scylla serrata* เพศเมียแต่ละตัว (นุชนาถ เกษมวงศ์, 2542)



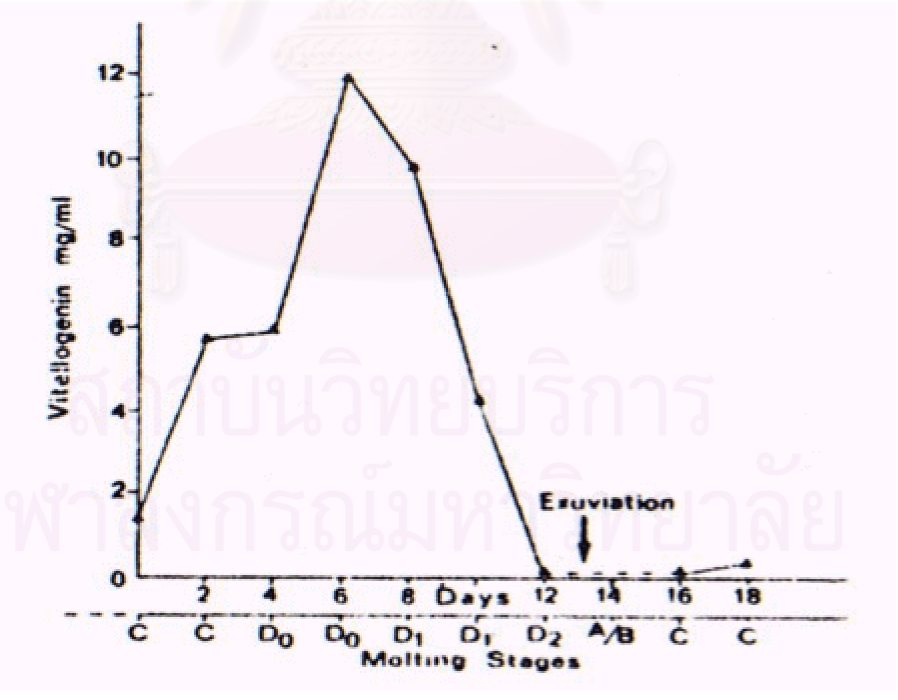
ภาพที่ ค-2 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับดัชนีของรังไข่ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เพศเมียแต่ละตัว

(Lee and Chang, 1997)

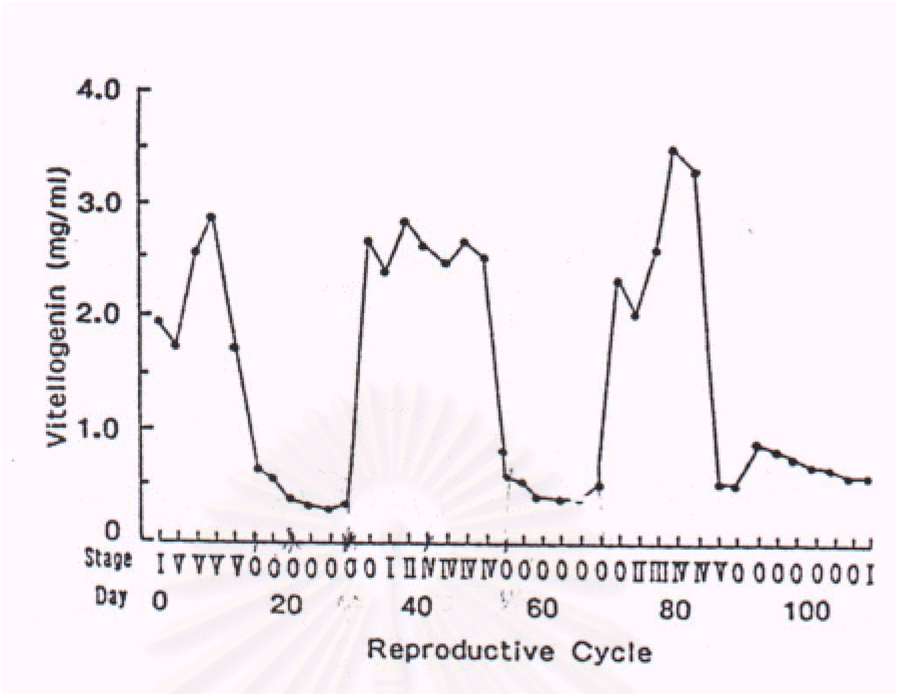


ภาพที่ ค-3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กับระยะการเจริญของรังไข่ (Quinitio และคณะ, 1994)

หมายเหตุ : stage 6 คือระยะหลังการวางไข่

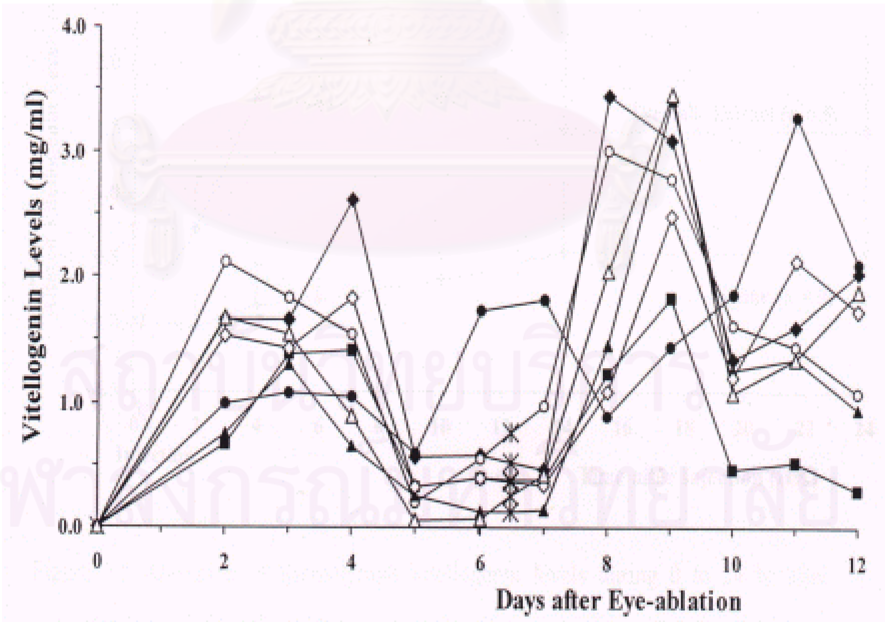


ภาพที่ ค-4 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กับระยะการลอกคราบ (Derelle และคณะ, 1986)



ภาพที่ ค-5 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กับระยะการเจริญของรังไข่ (Chang และ Shih, 1995)

0 = วันที่เห็นไข่ปรากฏอยู่ที่โคนขาว่ายน้ำ



ภาพที่ ค-6 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กับการเจริญของรังไข่ซึ่งบ่งชี้โดยจำนวนวันหลังจากตัดตา (Longyant, 1999)

* = วันที่กุ้งวางไข่; เส้นกราฟ 1 เส้นแทนข้อมูลของกุ้ง 1 ตัว (n=7)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวดวงใจ งามสม เกิดวันที่ 10 พฤศจิกายน พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2539 ในปี พ.ศ. 2540 ได้รับทุนโครงการพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลนจากทบวงมหาวิทยาลัย ในส่วนความต้องการของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และได้บรรจุเข้ารับราชการ ตำแหน่งอาจารย์ระดับ 3 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร จากนั้นเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2541

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย