รายงานการวิจัย

ผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อปริมาณโปรตีน และไวเทลโลจีนินในเลือดปลาตูหนา

Effect of Estradiol to Protein and Vitellogenin in Plasma of True eel *(Anguilla spp.)*

โดย

อุไรวรรณ วัฒนกุล วัฒนา วัฒนกุล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย งบผลประโยชน์ ประจำปี 2546
จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

รอ.
020

รายงานการวิจัย

ผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อปริมาณโปรตีน และไวเทลโลจีนินในเลือดปลาตูหนา

Effect of Estradiol to Protein and Vitellogenin in Plasma of True eel *(Anguilla spp.)*

โดย

อุไรวรรณ วัฒนกุล วัฒนา วัฒนกุล

เลขทะเบียน 30.020
เลขหมู่
เล่มที่ 1
วันที่ 4 ก.ค. 2550

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย งบผลประโยชน์ ประจำปี 2546
จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

ห้องสมุด
มทร.ศรีวิชัย วข.ตรัง

ผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อปริมาณโปรตีน และไวเทลโลจีนินในเลือดปลาตูหนา

Effect of Estradiol to Protein and Vitellogenin in Plasma of True eel *(Anguilla spp.)*

อุไรวรรณ วัฒนกุล[1] วัฒนา วัฒนกุล[1]
Uraiwan Wattanakul[1] Wattana Wattanakul[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อปริมาณโปรตีน และไวเทลโลจีนินในเลือดปลาตูหนา โดยการฉีดกระตุ้นปลาตูหนาด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จำนวน 2 ครั้ง และตรวจหาไวเทลโลจีนินด้วยการวัดระดับฟอสเฟตในเลือด พร้อมทั้งตรวจสอบแบบแผนโปรตีนด้วยการทำอิเล็คโตรโฟรีซิส พบว่าฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล ไม่สามารถกระตุ้นให้ปลาตูหนาสร้างไวเทลโลจีนินได้ เมื่อตรวจวัดระดับโปรตีนก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พบว่า ระดับโปรตีนในปลาตูหนาไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนในปลาตูหนาทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น ด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล พบว่า แบบแผนโปรตีนทั้งก่อนและหลังไม่แตกต่างกัน

---

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

[1] Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala Institute of Technology.

ABSTRACT

Study on effect of estradiol to protein and vitellogenin in plasma of true eel *(Anguilla spp.)*. It was induced by exogenous 17 β-estradiol injection amount 0.5 mg./ 1 Kg. body weight for 2 times. Determination of vitellogenin by measured phosphate level in plasma. Protein patterns was done by electrophoresis. The result showed that 17 β-estradiol could not induced vitellogenin in plasma of True eel. The level of protein before and after induced by hormone was not changing. Protein patterns before and after induced by 17 β-estradiol hormone was not difference.

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(3)
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	6
ผลและวิจารณ์	9
สรุปและข้อเสนอแนะ	15
กิตติกรรมประกาศ	16
บรรณานุกรม	17
ภาคผนวก	20

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงค่าของฟอตเฟต (µg./ml) และปริมาณโปรตีน (µg./ml) ในเลือดปลาดุหนา	11

สารบาญภาพ

รูปที่ หน้า

1. แสดงแบบแผนโปรตีนจากเลือดปลาตูหนาก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล 13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

บทนำ

ปลาตูหนา

ปลาตูหนา (True eel) นับเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง และเป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญที่ทำรายได้ให้กับชาวประมงในจังหวัดแถบภาคใต้ฝั่งอันดามัน เนื่องจากปลาตูหนาเป็นที่นิยมบริโภคของชาวต่างชาติ เช่น ชาวญี่ปุ่น ฮ่องกง และเกาหลี รวมถึงมีการซื้อขายกันในราคาแพง แต่ปัจจุบันนี้ผลผลิตปลาตูหนาในประเทศไทยได้มาจากการจับจากธรรมชาติเท่านั้น และเมื่อเวลาผ่านไปสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้เปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก ทำให้ปลาตูหนามีปริมาณลดลงและหาได้ยากขึ้น แต่ความต้องการบริโภคกลับมีเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการเก็บข้อมูลพื้นฐานของปลาตูหนาในด้านการวงจรสืบพันธุ์ การวางไข่ และการเจริญพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อจะได้สามารถเพาะพันธุ์ปลาตูหนาให้ทันความความต้องการของตลาด และใช้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงและการกระจายพันธุ์ของปลาตูหนาที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม

ปลาตูหนาที่พบแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามลักษณะทางกายภาพ คือกลุ่ม Long dorsal fin และ กลุ่ม Short dorsal fin แต่กลุ่ม Long dorsal fin พบน้อยมาก และยังไม่ทราบชนิด แต่คาดว่าเป็นชนิด *A. mamarata* ส่วนกลุ่ม Short dorsal fin พบ 3 ชนิด คือ *A. australis*, *A. bicolor* และ *A. obscura* (ไพบูลย์, 2530) สำหรับปลาตูหนาชนิด *A. bicolor* แบ่งย่อยได้ 2 ชนิด คือ ปลาตูหนาหูดำ และปลาตูหนาหูขาว ซึ่งราคาของปลาตูหนาหูดำจะแพงกว่า

ปลาตูหนา มีชื่อเรียกเป็นภาษาอังกฤษว่า " True eel " มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Anguilla spp.* (Nelson, 1984) เป็นปลาในครอบครัว Anguillidae นักอนุกรมวิธานได้ศึกษาชนิดของปลาตูหนาในครอบครัว Anguillidae พบว่าในโลกนี้มีอยู่ 16 ชนิด ปลาตูหนาจัดเป็นปลา 2 น้ำ คืออยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ขณะที่กำลังเจริญเติบโตจะอยู่ในน้ำจืดตามแม่น้ำลำคลอง โดยเฉพาะบริเวณปากแม่น้ำที่จะออกสู่ทะเล เมื่อโตเต็มที่พร้อมจะเป็นพ่อแม่พันธุ์ ก็จะว่ายออกสู่ทะเลลึกเพื่อจับคู่ผสมพันธุ์ หลังจากออกไข่และฟักเป็นตัวอ่อนแล้วตัวเมียก็จะตาย ส่วนตัวผู้จะดำรงชีวิตต่อไปในทะเล ในประเทศไทยจะพบได้ตามภาคใต้ฝั่งตะวันตก และในภาคเหนือพบทางลุ่มน้ำสาละวิน (กรมประมง , 2530) ปลาตูหนามีรูปร่างคล้ายปลาไหล มีครีบหูกลมมน ครีบหลัง ครับก้นและครีบหางเชื่อมติดกัน ลำตัวกลมยาวส่วนหางแบน ข้างปลายหางกลมมน ส่วนหัวแบนจงอยปากค่อนข้างยาวมนบางครั้งกว้างลาดลง ฟันบนขากรรไกรและ vomer แบ่งออกเป็นชุด ๆ มุมปากอยู่ในระดับกึ่งกลางของตา ท่อรูจมูกอยู่ใกล้ส่วนหน้าของจงอยปาก และรูจมูกอีกคู่หนึ่งอยู่ที่ส่วนหน้าของตา ตามีลักษณะกลมมีม่านตาสีเหลือง ครีบหูประกอบด้วยก้านครีบ 14 - 18 อัน เส้นข้างตัวแยกจากกันเห็นชัด เกล็ดมีรูปร่างเป็นรูปกรวยขนาดเล็กฝังตัวอยู่ใต้ผิวหนัง สีบนลำตัวมีลักษณะแตก

ต่างกันไป สีด้านบนลำตัวมีตั้งแต่สีน้ำตาลแกมเทา น้ำตาลเข้ม หรือสีเหลืองอ่อน ไปจนถึงสีดำ ด้านท้องเป็นสีเหลืองอ่อน ครีบหลังสีเข้ม (ไพบูลย์, 2530) ปลาตูหนาจะมี 2 เพศ ในตัวเดียวกัน ขึ้นอยู่กับขนาดของตัวดังนี้ คือ

ความยาว 18 ซม. จะเริ่มสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ความยาว 20 ซม. เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจะเริ่มพัฒนามากขึ้นเป็นเพศเมียอย่างชัดเจน

ความยาว 25 - 40 ซม. เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเริ่มพัฒนาให้สมบูรณ์พร้อมที่จะผสมพันธุ์

ความยาว 40 ซม. มีการเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มากขึ้นจนเป็นเพศผู้ และในช่วงอพยพออกสู่ทะเล เรียกว่า silver eel เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พัฒนามากขึ้น ความยาวประมาณ 40 ซม. เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเจริญอย่างรวดเร็วกลับมาเป็นเพศเมียอีกครั้งหนึ่ง และเมื่ออพยพออกสู่ทะเลเรียกว่า silver eel อาหารของตัวอ่อนจะพัฒนาอย่างรวดเร็ว

ปลาตูหนาสามารถพบได้ในแหล่งต่าง ๆ ของโลก ดังนี้บริเวณแถบทวีปอเมริกา พบปลาตูหนาชนิด *A. rostrata* บริเวณแถบทวีปยุโรป พบปลาตูหนาชนิด *A. anguilla* บริเวณแถบแอฟริกาตะวันออกเฉียงใต้ พบปลาตูหนาชนิด *A. marmorata, A. nebulosa, A. mossambica* และ *A. bicolor* บริเวณเขตแปซิฟิกเหนือ พบปลาตูหนาชนิด *A. japonica* และ *A. marmorata* บริเวณเขตแปซิฟิกตะวันออกเฉียงใต้ พบปลาตูหนาชนิด *A.australis, A dieffenbachi* บริเวณเขตทรอปิคอล พบปลาตูหนาชนิด *A. celebensis, A. megagtoma, A. interioris, A. ancestralis, A. nebulosa, A. marmorata, A. reinhardti, A. borneensis, A. bicolor, A. obscura* และจากรายงานของเธียร (2505) พบว่ามีเพียง 6 ชนิดที่นิยมนำมาเลี้ยง โดยเฉพาะปลาไหลญี่ปุ่น (*A. japonica*) สมพิศ (2537) รายงานว่า ระบบย่อยอาหารของปลาไหลญี่ปุ่นมีท่อทางเดินอาหารติดต่อกับกระเพาะลม กระเพาะอาหารมีลักษณะแคบเป็นรูปกรวย มีติ่งรูปตัววายยื่นออกมา ไม่มี Phyloric appendages ซึ่งพบในปลากระดูกแข็งทั่วไป มีตับอ่อนสร้างเอนไซม์เพื่อควบคุมการพัฒนาการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ

- **ไวเทลโลจีนิน**

ไวเทลโลจีนิน (Vitellogenin) เป็นพลาสมาโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์โดยตับ (Mommsen and Walsh, 1988) และเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของโปรตีนโยล์ค (yolk protein) ซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของ เอมบริโอ (embryo) ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Korsgard and Peterson, 1979) การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน เกิดขึ้นในตับของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและถูก

เหนี่ยวนำโดยฮอร์โมนเอสโตรเจนในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และมีการศึกษาขบวนการสร้างไวเทลโลจีนินกันมาก ซึ่งกล่าวว่า ยีนที่สร้างไวเทลโลจีนินอยู่ในเซลล์ตับของสัตว์เพศผู้และเพศเมีย และถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน อาจมีเพียงหนึ่งยีน หรือหลายยีนที่เป็นโฮโมโลกัส ซึ่งมีรหัสที่จะสร้างโพลีเปปไทด์สายเดียว คือ ไวเทลโลจีนิน แล้วถูกย่อยดัดแปลงเป็นโพลีเปปไทด์หลายสาย ซึ่งพบในโยล์คเชิงซ้อน (Wallace and Jared, 1968) การแสดงออกของยีนเหล่านี้ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน มีผลทำให้มีการสังเคราะห์โยล์คเป็นจำนวนมาก ปริมาณไวเทลโลจีนินในเลือดของปลา จะเปลี่ยนแปลงตามระยะการพัฒนาการของไข่ Palico *et al* (1990) ได้ศึกษาปริมาณไวเทลโลจีนินในปลาดุกอัฟริกัน โดยวิธี Elisa พบปริมาณไวเทลโลจีนิน 30.21 มก./มล. พลาสมาในระยะก่อนการวางไข่ และลดลงอย่างรวดเร็ว เป็น 3.79 มก./มล.พลาสมา หลังจากวางไข่ ส่วน Copeland, *et al* (1986) ได้ศึกษาปริมาณไวเทลโลจีนินในปลาเรนโบว์ เทราท์ ตามวิธี radioimmunoassay พบว่าปริมาณไวเทลโลจีนินจะเปลี่ยนแปลงตามขนาดของไข่ กล่าวคือ เมื่อไข่เริ่มเจริญมากขึ้น มีขนาดใหญ่ขึ้น ระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาก็สูงขึ้นเช่นกัน

ไวเทลโลจีนิน (Vitellogenin) เป็นฟอสโฟลิโปไกลโคโปรตีน (phospholipoglycoprotein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรต ไขมันและฟอสเฟต เป็นองค์ประกอบ ไวเทลโลจีนินเป็นพลาสมาโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์โดยตับ (Mommsen and Walsh, 1988) และเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของโปรตีนโยล์ค (yolk protein) ซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของ เอมบริโอ (embryo) ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Korsgard and Peterson, 1979) การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินในตับถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอสตราไดออล (Hara and Hirai, 1978) ไวเทลโลจีนินจากตับถูกขนส่งผ่านกระแสเลือดไปยังรังไข่เพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์โอโอไซท์ (oocyte) เมื่อไวเทลโลจีนินจากกระแสเลือดถูกรับเข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ จะถูกย่อยเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนโยล์ค (Wallace and Selman, 1981; Liu *et al.*, 1996) จากการศึกษาของ Utarabhand และ Bunliptanon (1996) พบว่าระดับไวเทลโลจีนินในปลากะรัง จะพบเฉพาะในพลาสมาของปลากะรังเพศเมียเท่านั้น ไม่พบในปลาเพศผู้หรือปลารุ่นเยาว์ แต่สามารถกระตุ้นให้ปลารุ่นเยาว์สังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้โดยฮอร์โมนเอสตราไอออล นอกจากนี้ยังพบว่าระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นแปรผันสัมพันธุกับขนาดของโอโอไซท์ที่มีการเจริญมากขึ้นในระยะการสะสมโปรตีนโยล์คและเพิ่มสูงสุดก่อนปลาวางไข่ 1 เดือน เช่นเดียวกับปลาอื่น ๆ

ฮอร์โมนที่ควบคุมกระบวนการสร้างไวเทลโลจีนิน

ฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ คือ โกนาโดโทรปินเอสโตรเจน และโปรเจสติน โกนาโดโทรปินเป็นฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมใต้สมองมีบทบาทสำคัญต่อการสืบพันธุ์ของปลา ทั้งในขั้นตอนการสังเคราะห์และสะสมไวเทลโลจีนิน การเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ การตกไข่ และการวางไข่ Fostier *et al* (1983) พบว่าในปลาเทราท์มีระดับของ 17 เบตา-เอสตราไดออล สูงขึ้นเล็กน้อยในระหว่างที่มีการสะสมโยล์คในโอโอไซท์ นอกจากนี้ 17 เบตา-เอสตราไดออลมีบทบาทในการกระตุ้นให้ตับสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน

การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเกิดขึ้นในตับของสัตว์มีกระดูกสันหลังและถูกเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน (Wallace, 1978) เมื่อระดับฮอร์โมนกลุ่มเอสโตรเจน เช่น เอสตราไดออล ในเลือดสูง ฮอร์โมนเพศเมียตัวนี้จะทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างและสะสมโยล์ค และเมื่อการสะสมโยล์คสิ้นสุดลง ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดจะลดลงทันที

นอกเหนือจากฮอร์โมนเอสโตรเจนแล้ว พบว่ากลุ่มสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนหรือสารแปลกปลอมทางชีวภาพ กลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนที่เรียกว่า ซีโนเอสโตรเจน (xenoestrogen) และซีโนไบโอติก (xenobiotic) ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่ทำหน้าที่เหมือนเอสโตรเจนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง สามารถชักนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้

การวัดระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลา

การวัดระดับไวเทลโลจีนินสามารถทำได้หลายทางดังนี้

1. การวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินโดยทางอ้อม เป็นการวัดระดับแคลเซียมไอออน หรือปริมาณฟอสฟอรัสที่จับอยู่กับโปรตีนในพลาสมาปลาชนิดต่าง ๆ เป็นดัชนีบ่งบอกปริมาณของไวเทลโลจีนิน (Emmerson and Petersen, 1976; Craik, 1982) โดย nath และ Sundararaj (1981) ทำการหาปริมาณฟอสฟอรัสในไวเทลโลจีนินของปลาดุก
2. การวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินโดยตรง ได้พัฒนาวิธีการทางอิมมูนไปใช้ตรวจวัดระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลา เช่น วิธี immunoagglutination วิธีร็อกเกตอิมมูโนอิเล็คโตรฟอรีซิส วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีความแม่นยำสูง ให้ผลละเอียด แต่ต้องใช้สารเคมี และเครื่องมือที่มีราคาแพง

ดังนั้นการวิจัยเรื่อง ผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อปริมาณโปรตีนและไวเทลโลจีนินในเลือดปลาตูหนา จะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์มากในเรื่องระยะการเจริญพันธุ์และพัฒนาการของรังไข่ในปลาตูหนา อีกทั้งหากจะทำการเพาะพันธุ์ปลาตูหนาโดยกระตุ้นการสร้างไข่ได้ด้วยฮอร์โมนชนิดนี้แล้ว จะสามารถทำได้หรือไม่ นอกจากนั้นยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการตรวจสอบว่า

โปรตีนที่ปลาตูหนาสร้างขึ้นในเลือดแถบใดเป็นกลุ่มของโปรตีนไวเทลโลจีนิน โดยใช้วิธีอิเลคโตรโฟรีซิส หรือใช้เป็นแนวทางในการเพาะขยายพันธุ์ปลาตูหนาในโอกาสต่อไป

วิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์ในการวิจัย
    1.1 ปลาตูหนา
    1.2 ถังพลาสติก
    1.3 เครื่องเซนตริฟิวจ์
    1.4 เครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
    1.5 pH meter
    1.6 Vortex mixer
    1.7 เครื่อง stir plate & megnetic stirrer
    1.8 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
    1.9 เครื่องปั่นบดไฟฟ้า
    1.10 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรฟอรีซิส
    1.11 ไม้บรรทัด
    1.12 ไมโครปิเปต
    1.13 ปิเปต
    1.14 ฮอร์โมนเอสตราไดออล
    1.15 กล้องถ่ายรูป
    1.16 วัสดุอุปกรณ์เครื่องแก้ว
    1.17 กล่องพลาสติกไว้ย้อมสี
    1.18 ถุงมือแพทย์
    1.19 สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโตรฟอรีซีส

2. วิธีการดำเนินการ

การศึกษาผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อปริมาณโปรตีนและไวเทลโลจีนินในเลือดปลาตูหนาแบ่งวิธีการดำเนินการวิจัยออกเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างปลาตูหนา มาประมาณ 10 ตัว โดยแต่ละตัวให้มีขนาดความยาวไม่น้อยกว่า 18 ซม. นำมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวลำตัว บันทึกผลไว้ จากนั้นนำปลาตูหนาที่ได้มาเลี้ยงในท่อซีเมนต์ แยกเลี้ยงท่อละ 1 ตัว แล้วนำมาฉีดด้วยฮอร์โมน17 เบตา-เอสตราไดออล ซึ่งละลายอยู่ใน 95%เอทานอล (0.5 มก./กก.ปลา) บริเวณกล้ามเนื้อเหนือเส้นข้างตัวปลา ทุก 3 วัน จำนวน 2 ครั้ง เก็บเลือดก่อนและหลังการฉีดฮอร์โมนทุกครั้ง เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและไวเทลโลจีนินในพลาสมา โดยใช้เฮพารินเป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำเลือดมาเซนตริฟิวจ์เพื่อปั่นแยกเม็ดเลือดแดงทิ้ง เก็บพลาสมาที่ได้นำไปหาปริมาณโปรตีนและทำอิเลคโตรโฟรีซิส

2. การหาปริมาณโปรตีนโดยวธี เลาว์รี (Lowry method)

ทำการหาปริมาณโปรตีนในพลาสมาของปลาตูหนาตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลน์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมสารละลายฟอลิน-ฟีนอล (Folin-phenol reagent, Folin : น้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1) 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3. การทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส

โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส ที่ใช้ศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น ประกอบด้วยเจลส่วนบนและเจลส่วนล่างที่มีเปอร์เซ็นต์ของเนื้อเจลต่างกัน เตรียมแบบไม่แปลงสภาพ ตามวิธีของ Davis (1964)

4. การทำอิเลคโตรโฟรีซิส

นำสารตัวอย่าง ใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ใช้ 0.025 M Tris – 0.192 M glysine, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับการทำอิเลคโตรโฟรีซิส เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 30 mA ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอล บลู เคลื่อนที่ไปจนห่างขอบล่างของเจลประมาณ 0.5 ซม. ปิดกระแสไฟฟ้า นำไปย้อมหาโปรตีนด้วยสีคูมาซี บลู 0.02% (Coomassie brilliant blue R-

250) แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 50% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วยสารละลาย 5% เมธานอล -7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบสีน้ำเงินชัดเจน

5. การบันทึกผล

นำแผ่นเจลที่ปรากฏแถบต่าง ๆ มาทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนไวเทลโลจีนิน เพื่อหาความแตกต่างของแถบไวเทลโลจีนินในปลาตูหนาในแต่ละครั้ง ที่ทำการเหนี่ยวนำโดยการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล

6. การหาปริมาณฟอสเฟต

หาปริมาณฟอสเฟตของสารตัวอย่างซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Fisk and Subbarow (1925) นำสารตัวอ่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย molybdic TCA จำนวน 180 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g นาน 10 นาที นำเฉพาะส่วนใส 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย *p*-phenylenediamine (0.5% *p*-phenylenediamine dihydrochloride – 5% sodium disulphate) จำนวน 200 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร บันทึกผลที่ได้ของฟอสเฟตในเลือดปลาตูหนา ก่อนและหลังจากฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล

3. ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อปริมาณโปรตีนและไวเทลโลจีนินในเลือดปลาตูหนาเพื่อจะได้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นของระดับไวเทลโลจีนินในปลาตูหนา เมื่อเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล ทั้งนี้เพื่อจะได้ข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและการเพาะขยายพันธุ์ปลาตูหนาในโอกาสต่อไป

4. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

เก็บตัวอย่างปลาตูหนาที่พบทั้งใน จ.ตรัง และ จ.สตูล และทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง โดยเริ่มต้นตั้งแต่เดือนเมษายน 2546 – เดือนมีนาคม 2547

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาระดับของไวเทลโลจีนินในปลาตูหนาเมื่อเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล

จากการฉีดออร์โมนเอสตราไดออลให้แก่ปลาตูหนา แล้วทำการวัดปริมาณฟอสเฟต เพื่อดูปริมาณของไวเทลโลจีนินในเลือดปลาตูหนา ซึ่งระดับฟอสเฟตจะแปรผันตรงกับระดับไวเทลโลจีนิน หากพบว่ามีระดับฟอสเฟตสูง แสดงว่าในตัวอย่างจะต้องมีระดับไวเทลโลจีนินสูงเช่นกัน และวัดปริมาณโปรตีน ทั้งก่อนและหลังการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล พบว่า ปลาตูหนาก่อนการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล ทั้ง 9 ตัวมีค่าฟอสเฟต ดังนี้ 44.00 53.18 55.12 70.00 44.01 53.17 55.13 70.01 44.02 ตามลำดับ หลังจากฉีดฮอร์โมน พบว่าค่าฟอสเฟตมีค่าไม่แตกต่างจากก่อนการฉีดฮอร์โมน ดังนี้ 43.40 48.68 57.87 70.02 43.42 54.12 57.89 70.03 43.44 ตามลำดับ ส่วนค่าปริมาณโปรตีนก่อนการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล มีค่าดังนี้ 43.08 48.97 48.97 61.67 43.10 48.99 48.98 61.70 43.10 ตามลำดับ หลังจากฉีดฮอร์โมน พบว่าค่าปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างจากก่อนการฉีดฮอร์โมน ดังนี้ 35.12 48.58 62.17 63.38 35.14 50.01 62.19 63.39 35.15 ตามลำดับ เมื่อมาคำนวณอัตราส่วนระหว่างปริมาณฟอสเฟตต่อโปรตีน ของปลาตูหนาทั้ง 9 ตัว ก่อนการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล มีค่าดังนี้ 1.02 1.09 1.13 1.14 1.02 1.09 1.13 1.13 1.02 ตามลำดับ และหลังการฉีดฮอร์โมน มีค่าดังนี้ 1.24 1.00 0.93 1.10 1.24 1.08 0.93 1.10 1.24 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งค่าที่ได้จากการวิจัยพบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณฟอสเฟตในปลาตูหนาทั้ง 9 ตัวที่นำมาฉีดฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไวเทลโลจีนิน ซึ่งตามหลักการในปลาที่เป็นเพศเมียเมื่อนำมาเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจน เช่น เอสตราไดออล จะต้องได้ค่าของปริมาณโปรตีนและไวเทลโลจีนิน ที่สูงกว่า ระดับก่อนการเหนี่ยวนำ ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเกิดขึ้นในตับของสัตว์มีกระดูกสันหลังและถูกเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน (Wallace, 1978) เมื่อระดับฮอร์โมนกลุ่มเอสโตรเจน เช่น เอสตราไดออล ในเลือดสูง ฮอร์โมนเพศเมียตัวนี้จะทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างและสะสมโยล์ค แต่จากผลการทดลองที่ได้ไม่เป็นไปตามหลักการ ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดลองของ Utarabhand และ Bunliptanon (1996) พบว่า ระดับไวเทลโลจีนินในปลากะรัง จะพบเฉพาะในพลาสมาของปลากะรังเพศเมียเท่านั้น ไม่พบในปลาเพศผู้หรือปลารุ่นเยาว์ แต่สามารถกระตุ้นให้ปลารุ่นเยาว์สังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้โดยฮอร์โมนเอสตราไอออล และ Fostier *et al* (1983) พบว่าในปลาเทราท์มีระดับของ 17 เบตา-เอสตราไดออล สูงขึ้นเล็กน้อยในระหว่างที่มีการสะสมโยล์คในโอโอไซท์ นอกจากนี้ 17 เบตา-เอสตราไดออลมีบทบาทในการกระตุ้นให้ตับสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน

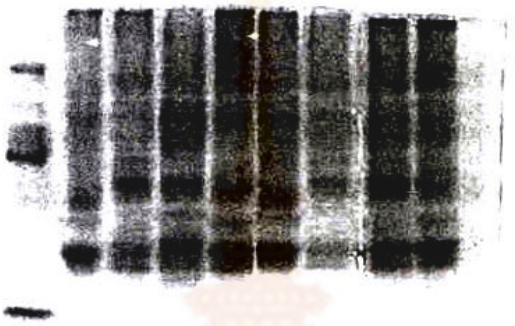
เมื่อหาปริมาณโปรตีนของปลาตูหนาก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออล พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณไวเทลโลจีนินที่ได้คือไม่มีความแตกต่างเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างโปรตีนตัวอื่น ๆ ในปลาตูหนา เมื่อนำค่าของฟอตเฟตเทียบกับโปรตีน เพื่อดูอัตราการเปลี่ยนแปลงของไวเทลโลจีนินให้ชัดเจนขึ้น ก็ไม่พบความแตกต่าง โดยแต่ละค่ามีความใกล้เคียงกัน ในช่วงระหว่าง 0.93 – 1.24 ซึ่งแตกต่างจากงานทดลองของ nath และ Sundararaj (1981) ที่ทำการกระตุ้นปลาดุกด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออลแล้วมีผลทำให้ระดับของไวเทลโลจีนินสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 1 แสดงค่าของฟอสเฟต (µg./ml) และปริมาณโปรตีน (µg./ml) ในเลือดปลาตูหนา

ตัวอย่าง (น้ำหนักตัว กก.)	Phosphate (µg./ml)	Protein (µg./ml)	Phosphate/ Protein (µg. mg protein $^{-1}$)
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 1 (0.62 กก.)	44.00	43.08	1.02
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 2 (0.55 กก.)	53.18	48.97	1.09
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 3 (0.53 กก.)	55.12	48.97	1.13
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 4 (0.80 กก.)	70.00	61.67	1.14
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 5 (0.61 กก.)	44.01	43.10	1.02
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 6 (0.54 กก.)	53.17	48.99	1.09
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 7 (0.53 กก.)	55.13	48.98	1.13
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 8 (0.81 กก.)	70.01	61.70	1.13
ปลาตูหนาก่อนฉีด ตัวที่ 9 (0.63 กก.)	44.02	43.10	1.02
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 1	43.40	35.12	1.24
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 2	48.68	48.58	1.00
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 3	57.87	62.17	0.93
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 4	70.02	63.38	1.10
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 5	43.42	35.14	1.24
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 6	54.12	50.01	1.08
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 7	57.89	62.19	0.93
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 8	70.03	63.39	1.10
ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 9	43.44	35.15	1.24

2. ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนในปลาตูหนาก่อนการฉีด และหลังการฉีดกระตุ้นด้วย ฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล

ผลจากการทำอิเล็คโตรโฟรีซิส เพื่อศึกษาแบบแผนโปรตีนในปลาตูหนา พบว่าปริมาณโปรตีนในปลาตูหนา 4 ตัว ก่อนการฉีดกระตุ้นด้วย ฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล (รูปที่ 1 แถวที่ 2 – 5) ไม่มีความแตกต่างกัน โดยปรากฏแถบโปรตีนที่มีความเข้มของสีย้อม ระดับ และ จำนวนของแถบเรียงอยู่ในแนวเดียวกันทั้ง 4 แถว ส่วนปริมาณโปรตีนของปลาตูหนาทั้ง 4 ตัว หลังการฉีดกระตุ้นด้วย ฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล (รูปที่ 1 แถวที่ 6 – 9) ไม่มีความแตกต่างกันเช่นเดียวกับก่อนการฉีดฮอร์โมน โดยปรากฏแถบโปรตีนที่มีความเข้มของสีย้อม ระดับ และ จำนวนของแถบโปรตีนเรียงอยู่ในแนวเดียวกันทั้ง 4 แถว และ พบว่าทั้งก่อนและหลังการฉีดฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล ไม่มีความแตกต่างของแถบโปรตีน โดยโปรตีนในแต่ละแถบยังคงมีปริมาณเท่าเดิม ซึ่งสังเกตได้จากความเข้มของสีที่ใช้ย้อมโปรตีน ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ เจนจิต (2538) ที่พบว่าการฉีดฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออลในปริมาณ 2.5 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ห่างกัน 3 ครั้ง ทำให้ปริมาณโปรตีนในพลาสมาของปลากะรังเพิ่มขึ้น เป็น 2.3 3.4 และ 4.0 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณพลาสมาโปรตีนก่อนการฉีดฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล แลผลของการฉีดฮอร์โมนฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออลต่อการเพิ่มระดับโปรตีนในพลาสมา พบในทำนองเดียวกันกับการศึกษาในปลานิล (Chan *et al.*, 1991) ปลาไหล (*Anguilla japonica*) (Komatsu *et al.*, 1996) เป็นต้น



แถวที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9

รูปที่ 1 แสดงแบบแผนโปรตีนจากเลือดปลาตูหนาก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 2 ปลาตูหนาก่อนฉีดฮอร์โมนตัวที่ 1
แถวที่ 3 ปลาตูหนาก่อนฉีดฮอร์โมนตัวที่ 2
แถวที่ 4 ปลาตูหนาก่อนฉีดฮอร์โมนตัวที่ 3
แถวที่ 5 ปลาตูหนาก่อนฉีดฮอร์โมนตัวที่ 4
แถวที่ 6 ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมนตัวที่ 1
แถวที่ 7 ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมนตัวที่ 2
แถวที่ 8 ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมนตัวที่ 3
แถวที่ 9 ปลาตูหนาหลังฉีดฮอร์โมนตัวที่ 4

จากผลการวิจัยที่ได้ แสดงให้เห็นว่า การใช้ฮอร์โมน 17–เบตา–เอสตราไดออล ซึ่งเป็นเพียงฮอร์โมนตัวหนึ่งในกลุ่มเอสโตรเจน ไม่ได้ผล ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาต่อไปถึงฮอร์โมนตัวอื่น ๆ ในกลุ่มเอสโตรเจนที่อาจมีความเหมาะสมและสามารถเหนี่ยวนำการสร้างไวเทลโลจีนินได้ อีกทั้งต้องคำนึงถึงปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ความเค็มของน้ำ น้ำหนักและความยาวของปลาตูหนา ปริมาณของฮอร์โมนที่ใช้ ระยะเวลาและความถี่ของการฉีดกระตุ้น ฯลฯ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการสร้างไข่ในปลาหลายชนิด แล้วแต่ว่าชนิดใดมีจะมีความเหมาะสมกับปัจจัยใดมากที่สุด ทั้งนี้เพราะปลาตูหนาเป็นปลา ที่อยู่ได้ทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยเมื่อถึงฤดูกาลสืบพันธุ์จะอพยพจากแหล่งน้ำจืดไปวางไข่ในน้ำกร่อยและจะเจริญเป็นตัวอ่อนเคลื่อนเข้าชายฝั่งสู่แหล่งน้ำจืดเป็นวงจรสืบไป อีกทั้งในเรื่องเพศยังไม่มีความชัดเจนในการศึกษา โดย ไพบูลย์ (2530) รายงานว่า ปลาตูหนาจะมีสองเพศในตัวเดียวกัน ขึ้นกับขนาดดังนี้ ความยาว 25 – 40 ซม. จะเป็นเพศเมียที่สมบูรณ์พร้อมสืบพันธุ์ หากความยาวมากกว่า 40 ซม. จะเป็นเพศผู้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปจำเป็นต้องผ่าดูอวัยวะสืบพันธุ์ด้วย เพื่อให้ผลการทดลองมีความชัดเจนยิ่งขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อฉีดกระตุ้นปลาตูหนาด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล เพื่อวัดระดับไวเทลโลจีนินจากปริมาณฟอสเฟต พบว่า ฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล ไม่สามารถกระตุ้นให้ปลาตูหนาสร้างไวเทลโลจีนินได้
2. เมื่อวัดระดับโปรตีนก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล พบว่าระดับโปรตีนในปลาตูหนาไม่มีการเปลี่ยนแปลง
3. เมื่อทำการศึกษาแบบแผนโปรตีนในปลาตูหนาทั้งก่อน และ หลังการกระตุ้น ด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล พบว่า แบบแผนโปรตีนทั้งก่อนและหลังไม่แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจน ตัวอื่น ๆ นอกเหนือจาก 17 เบตา-เอสตราไดออล ซึ่งอาจมีความเหมาะสมกับปลาตูหนามากกว่า ฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล
2. ตัวอย่างปลาตูหนาที่ทำการศึกษาควรจะต้องมีวิธีพิสูจน์ว่าเป็นเพศเมียจริง เนื่องจากการดูด้วยสายตาจากภายนอกไม่สามารถระบุเพศได้ ทั้งนี้เพราะปลาตูหนาจัดเป็นปลาสองเพศในตัวเดียวกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

บรรณานุกรม

กรมประมง. 2530. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 325 น.

ไพบูลย์ รุ่งพิบูลโสภิษฐ์. 2530. การศึกษาชนิดของปลาในสกุล *Anguilla* ที่พบในจังหวัดตรัง. ใน รายงานสัมมนาทางวิชาการประจำปี 2530. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 55 - 60 น.

เธียร บรรณโสภิษฐ์. 2505. การเลี้ยงปลาไหลในญี่ปุ่น. ว.การประมง. 15(2) : 139 - 146.

สันติ ปริยะวาที. 2530. การประมงปลาตูหนาในอ่าวพังงา. สำนักงานประมงจังหวัดพังงา. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เอกสารราชการฉบับที่ 1/2530. 12 น.

สมชาติ สุขวงศ์ และ โกวิทย์ เก้าเอี้ยน. 2538. การสำรวจแหล่งและทดลองเลี้ยงปลาตูหนา. น. 55 – 60. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2538. กรมประมง กระทรวงเกษตและสหกรณ์.

สมพิศ สิงคูณ. 2537. การเลี้ยงปลาไหลญี่ปุ่น. วารสารฟาร์มิ่ง. 2(6) : 17 - 32 น.

Copeland, P.A., Sumpter,J.P., Walker, T.K.,and Croft, M. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) at various stages of the reproductive cycle. Comp. Biochem.Physiol. 83(2) : 478-493.

Chan, S.L., Tan, C.H., Pang, M.K. and Lam, T.J. 1991. Vitellogenin purification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (*Oreochromis nilotica*). J. Exp. Zool. 257 : 96-109.

Craik, J.C.A. 1982. Levels of phosphoprotein in the eggs and ovaries of some fish species. Comp. Biochem. Physiol. 72: 507 –510.

David, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 : 404 - 427.

Emmersen, B.K. and Petrson, J.M. 1976. Natural occurrence and experimental induction by estradiol-17β of lopophosphoprotein (vitelogenin) in flounder (*Platichtye flesus* L.). Comp. Biochem. Physiol. 54: 443 –446.

Fisk, C.H. and Subbarow, Y. 1925. Measurement of inorganic phosphate. J. Biol. Chem. 66: 375 – 400.

Fostier, A., Jalabert, B. Billard, T., Breton, B. and Zohar, Y. 1983. The gonadal steroids. In Hoar, W.S. Et al. (eds.), Fish Physiology, pp. 277 – 372. New York: Acedemic Press Inc.

Hara, A. and Hirai, H. 1978. Comparative studies on immunological properties of female specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem.Physiol. 59B:339-343.

Komatsu, M., Matsumoto, W. and Hayashi, S. 1996. Protease activity appeared often trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel *Anguilla japonica*. Comp. Biochem. Physiol. 113 : 561-571.

Korsgard, B. and Peterson, I. 1979. Vitellogenin, lipid and carbohydrate metabolism during vitellogenesis and pragnancy in the blenny (*Zoarces viviparus*, L.) Comp. Biochem.Physiol. 36B: 245-251.

Liu, X., McCarron, R.C. and Nordin, J.H. 1996. A cysteine protease that processes insect vitellin. J.Biol.Chem. 271 : 33344-33351.

Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265 - 275.

Mommsen, T.P. and Walsh, P.J. 1988. Vitellogenin and oocyte assembly. *In*: Fish Physiology (Hoar, W.S. and Randall, D.J. ed), Vol. XI, part A, New York; Academic Press, pp. 348-406.

Nath, P. and Sundararaj, B.I. 1981. Isolation and identification of female-specific serum lipophosphoprotein (vitellogenin) in the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Gen. Comp. Endocrinol. 43: 184 –190.

Nelson, S. Joseph. 1984. Fish of The Word. Jhon Wileley and Sons, Inc., United States of America. 102 p.

Pacoli, C.Q., Grizzle, J.M. and Bradley, J.T. 1990. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 90: 353-367.

Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, J. Catalan and J. Britton-Davidian. 1988. Practical isozyme genetics. 215 pp.

Utarabhand, P. and Bunlipatanon, P. 1996. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinenephelus malabaricus*) : Isolation and properties. Comp. Biochem.Physiol. 115C:101-110.

Wallace, R.A. 1978. Oocyte growth in non-mammalian vertebrate. In Jones, R.E> (ed), The Vertebrate Ovary : Comparatkive Biology and Evolution, pp. 469 – 502. New York: Plenum.

Wallace, R.A. and Jared, D.W. 1968. Studies on amphibian yolk III. Serum phosphoprotein synthesis by vitellogenic females and estrogen-treated male of *Xenopus laevis*. Can. J. Biochem. Physiol. 46:953-959.

Wallace, R.A. and Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth teleosts. Am. Zool. 21: 325-343.

Whitmore, D.H. 1990. Electropheresis and Isolecteic Focusing Techniques in Fisheries Management. CRC. Press, Florida. 350 pp.

ภาคผนวก

1. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer ; PB)

0.1 M Phosphate, pH 7.5	100	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	2	มิลลิลิตร
14.3 M β-mercaptoethanol	70	ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณฟอสเฟต

2.1 สารละลาย Molybdic-TCA

ผสมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 15 มล. กับน้ำปลอดไอออน 25 มล. เติมแอมโมเนียมโมลิบเดท 2.5 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 50 มล. เติม 10% กรดไตรคลอโรอะซีติค จำนวน 50 มล. ผสมให้เข้ากัน

2.2 สารละลาย *p*-phenylenediamine

ละลาย *p*-phenylenediamine dihydrochloride 0.5 กรัม กับ sodium disulphate 5 กรัม ในน้ำปลอดไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย