

ชื่อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบจับเพื่อตรวจหาไวเทลโลจีนินและตัวรับของปลากระบอกดำ
ผู้เขียน	นายอนรรฆ พลชาติ
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2546

## บทคัดย่อ

ในรังไข่ของปลาที่ออกลูกเป็นไข่อาศัยตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไซต์เพื่อนำไวเทลโลจีนินซึ่งเป็นพอสฟอไลโฟกลีโคโปรตีนในพลาสมาเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงเวลาการสืบพันธุ์และมีความสำคัญต่อการเจริญพันธุ์ของโอโอไซต์ ในงานวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ (greenback grey mullet, *Lisa subviridis*) เพศเมียโดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง แล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR พบว่าไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 480 และ 250 กิโลดัลตัน ในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ จากการเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์โดยการฉีดกระต่ายด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ครั้งละ 20 ไมโครกรัมเข้าในผิวหนังและได้ผิวหนังจำนวน 3 ครั้ง พบว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้เกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Dot blot ได้ทำการพัฒนาวิธี ELISA เพื่อตรวจวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากระบอกดำ ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณไวเทลโลจีนินของตัวอย่างในช่วง 0-100 นาโนกรัม (0-600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้

จากการสกัดตัวรับไวเทลโลจีนินจากเมมเบรนของโอโอไซต์ด้วย n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside และตรวจหาด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดัลตัน ในสารสกัดเมมเบรนที่ผ่านการบ่มกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ แต่ไม่พบโปรตีนแถบนี้ในสารสกัดเมมเบรนที่ไม่ผ่านการบ่มด้วย

ไวเทลโลจีนิบรีสุทธี ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าแถบโปรตีนนี้เป็นตัวรับไวเทลโลจีนิบนเมมเบรนไอโอไซท์เหมือนกับของกบและปลากระดูกแข็งบางชนิด

จากการคอนจูเกตไวเทลโลจีนิบรีสุทธีกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยการออกซิไดส์ด้วย periodate แล้วนำไปแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR พบว่าไวเทลโลจีนิบรีสุทธีคอนจูเกต (vitellogenin-peroxidase conjugate, VPC) มีน้ำหนักโมเลกุล 700 กิโลดัลตัน เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน และมีความเป็นอิมมูนเหมือนกับไวเทลโลจีนิบรีสุทธี เมื่อนำ VPC ไปใช้ในการพัฒนาวีธีวิเคราะห์แบบจับกับ VPC (enzyme-linked vitellogenin binding assay, ELVBA) เพื่อใช้ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนิบนเมมเบรนของไอโอไซท์ปลากระดูกดำ พบว่าการจับที่เหมาะสมระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนิบรีสุทธีเกิดเมื่อมีการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์วิเคราะห์ที่ pH 6 ที่มี 7.5 mM  $Ca^{2+}$  และ 7.5 mM  $Mg^{2+}$  การจับอย่างจำเพาะระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนิบรีสุทธีกับ VPC ขึ้นอยู่กับปริมาณเมมเบรนของไอโอไซท์และเป็นแบบอิมมิตัว จากการศึกษากการจับแบบอิมมิตัวและวิเคราะห์ด้วย Scatchard's plot แสดงให้เห็นว่าตัวรับไวเทลโลจีนิบรีสุทธีมีตำแหน่งจับเพียงชนิดเดียว ปริมาณ VPC ที่มากที่สุดในการจับแต่ละเซลล์ไอโอไซท์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.47 มิลลิเมตร มีค่าเป็น 4.7 พิโคกรัมต่อเซลล์ไอโอไซท์ และค่าความจำเพาะของการจับ ( $K_D$ ) ของตัวรับเหล่านี้มีค่าเป็น 68.5 pM (48 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

Thesis Title	Developing of Binding Assay for Detection of Vitellogenin and Its Receptor of Greenback Grey Mullet ( <i>Lisa subviridis</i> )
Author	Mr. Anak Pollachat
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2003

### Abstract

In the ovary of oviparous fish, the receptor-mediated uptake of vitellogenin, a plasma phospholipoglycoprotein, occurs only in the reproductive period and is important for oocyte maturation. In this study, vitellogenin was purified from plasma of female greenback grey mullet (*Lisa subviridis*) by ultracentrifugation and followed by chromatography on Superdex 200 HR column. The purified vitellogenin showed 2 protein bands in nondenaturing PAGE with  $M_r$  of 480 and 250 kDa (kilodalton). Antibody was raised against the purified vitellogenin in an albino rabbit by intradermal and subcutaneous injections of each 20  $\mu$ g of the protein for 3 times. The antibody showed cross reaction with the purified vitellogenin in Dot blotting analysis. An enzyme-linked immunosorbent assay was developed for measuring vitellogenin level in plasma of this species. Assay conditions provided a detectable vitellogenin in a range of 0-100 ng (0-600 ng/ml).

Vitellogenin receptor on oocyte membrane was extracted by N-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside and subsequently determined by means of Western blotting and specificity of the antibody. One protein band with  $M_r$  of 55 kDa

was detected in the membrane extract which had been preincubated in the presence of the purified vitellogenin, but it was not detected in the absence of the purified protein. This result indicates that this protein band is vitellogenin receptor on oocyte membrane similar to those of the frog and some teleosts.

Conjugation of the purified vitellogenin to peroxidase was performed by periodate-oxidation and then chromatography on Superdex 200 HR column. The vitellogenin-peroxidase conjugate (VPC) had a molecular weight of 700 kDa as determined by gel filtration. It was shown to be immunologically similar to the unbound vitellogenin. VPC was used in enzyme-linked vitellogenin binding assay (ELVBA) development for quantification of vitellogenin receptors on oocyte membrane of greenback grey mullet. By using ELVBA, the optimal binding between VPC and vitellogenin receptors occurred after they had been incubated at room temperature for 4 hours in the assay buffer, pH 6 containing 7.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 7.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . The specific binding was dependent on the amount of oocyte membrane and was saturable. Saturation studies and Scatchard's analyses revealed only a single class of binding site. The maximal amount of VPC bound to each oocyte in diameter of 0.47 mm found to be 4.7 pg/cell whereas the affinity ( $K_d$ ) of these receptors was 68.5 pM (48 ng/ml).