

ชื่อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์สมบัติของไวเทลโลจินีและการตรวจหาตัวรับ
ไวเทลโลจินีจากปลากะบอกดำ
ผู้เขียน นายพีรพงษ์ พึ่งแย้ม
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

ไวเทลโลจินีถูกสังเคราะห์ในตับภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนเอสตราไดออล ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง แล้วถูกส่งผ่านกระแสเลือดไปยังรังไข่ เมื่อรับเข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ด้วยตัวรับที่จำเพาะบนเมมเบรนของโอโอไซท์ไวเทลโลจินีจะเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนโยลค์ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานในการพัฒนาการเจริญของเอ็มบริโอ

สามารถทำให้ไวเทลโลจินีบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะบอกดำเพศเมียมีไข่โดยการเซนตริฟิวจ์ความเร็วสูง แล้วแยกต่อโดยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30, โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอริซิสแบบเตรียม หรือโดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงครั้งที่ 2 ไวเทลโลจินีบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีน 2 แถบ ในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 480,000 และ 240,000 ดัลตัน ขณะที่แบบแผนโปรตีนของไวเทลโลจินีบริสุทธิ์ในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอสสภาพรีดิวซ์ประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวนมาก ไวเทลโลจินีบริสุทธิ์ย่อยมอดิสตีคิวมาซีบลู ซูดานแบล็คบี เมธิลกรีน และซูดย้อมไกลโคโปรตีนได้ จากผลการทดลองบ่งชี้ว่าไวเทลโลจินีบริสุทธิ์เป็นฟอสโฟลิโฟไกลโคโปรตีน ทั้งไวเทลโลจินีบริสุทธิ์และไวเทลโลจินีในพลาสมาเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจินีบริสุทธิ์ของปลากะรังได้

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจินีบริสุทธิ์ได้จากการฉีดกระต่ายเข้าในผิวหนังและใต้ผิวหนังด้วยไวเทลโลจินีบริสุทธิ์ครั้งละ 20 ไมโครกรัม จำนวน 3 ครั้ง แอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนใน Ouchterlony double immunodiffusion กับไวเทลโลจินี

บริสุทธิ พลาสมา สารสกัดตับและสารสกัดรังไข่ของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่ รวมทั้งพลาสมาของปลากระบอกเพศเมียชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในวงศ์ Mugilidae เดียวกัน แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาและสารสกัดเนื้อเยื่ออื่น ๆ ของปลากระบอกเพศเมียไม่มีไข่ รวมทั้งพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ จากการทำให้ Western blot พบว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยากับพลาสมาและสารสกัดรังไข่ของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์

ในการตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินจากสารสกัดเมมเบรนของโอโอไซต์ที่สกัดด้วย Triton X-100 โดยวิธี Western blot และความจำเพาะของแอนติบอดีพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดัลตัน ในสารสกัดเมมเบรนที่ผ่านการบ่มกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ แต่ไม่พบในสารสกัดเมมเบรนที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิและในส่วนโปรตีนโกลด์ จากการค้นพบนี้บ่งชี้ว่าแถบโปรตีนนี้เป็นตัวรับไวเทลโลจีนินที่อยู่บนเมมเบรนของโอโอไซต์ เช่นเดียวกับที่พบในยุง กบ ไก่ และปลากะตุก แข็งชนิดต่าง ๆ

Thesis Title Characterization of Vitellogenin and Determination
 of Vitellogenin Receptor from Greenback Mullet
 (*Lisa subviridis*)

Author Mr. Peerapong Puengyam

Major Program Biochemistry

Academic Year 2001

Abstract .

Vitellogenin is synthesized in liver of vertebrates under influence of estradiol hormone and transported via blood to ovaries. After being taken up by specific receptors on oocyte membrane, it is then proteolytically cleaved to form yolk protein which is an energy source for embryonic development.

Purification of vitellogenin from plasma of ovulated greenback mullet was achieved by ultracentrifugation and followed by either chromatography on Superdex 200 HR 10/30 column, preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) or by the second ultracentrifugation. The purified vitellogenin showed 2 protein bands in nondenaturing PAGE with M_r of 480,000 and 240,000 Daltons. When analysed by SDS-PAGE under reducing condition, it was found to exist multiple vitellogenin subunits. The purified vitellogenin was positively stained with Coomassie blue, sudan black B, methyl green and glycoprotein staining kit. These results demonstrate that it is a phospholipoglycoprotein. In addition, both the purified and plasma vitellogenins could cross react with antibody of the purified grouper vitellogenin.

Antibody to the purified vitellogenin was successfully produced in an albino rabbit by intradermal and subcutaneous injections of each 20 μg of the purified vitellogenin for 3 times. In Ouchterlony double immunodiffusion test, precipitation of the antibody was found with the purified vitellogenin, plasma, liver extract and ovarian extract of ovulated greenback mullet. It also cross reacted with plasma of ovulated females of other Mugilidae species. The antibody did not show any cross reactivity with either plasma or any tissue extract of unovulated female greenback mullet and plasma of mature female grouper. By means of Western blotting, the antibody also reacted with plasma and ovarian extract of ovulated greenback mullet but did not react with plasma of mature female grouper.

Determination of vitellogenin receptor on oocyte membrane extracted by Triton X-100 was performed by Western blotting and specificity of the antibody. One protein band with M_r of 55,000 Daltons was detected in membrane extract which had been preincubated in the presence of the purified vitellogenin. In the absence of the purified vitellogenin or in yolk protein fraction, the protein band was not detected. This finding indicates that this protein band is the vitellogenin receptor on oocyte membrane similar to those of mosquito, frog, chicken and other teleosts.