

การพัฒนาเทคนิค RIA เพื่อวัดระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินซึ่งใช้เป็น
ตัวบ่งชี้วงจรการสืบพันธุ์ในปลากะรัง

Development of Radio Immuno Assay (RIA) for Measuring
Plasma Vitellogenin : an Indicator of Reproductive Cycle in Grouper

โดย

รศ.ดร.ประภาพร อูทาร์พันธุ์
นายไพบูลย์ บุญเลิศานนท์
นางสาวเจนจิตต์ คงกำเนิด

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์
ประจำปี 2537-2539

๑๕๐

Order Key.....	16660
BIB Key.....	128521

เลขหมู่.....	QL 638.548 P73
เลขทะเบียน.....	1997
.....	๑ / ๓๓ / ๒๕๔๑

Part I

Plasma Vitellogenin of Grouper (*Epinephelus malabaricus*) : Isolation and Properties



Plasma Vitellogenin of Grouper (*Epinephelus malabaricus*): Isolation and Properties

Prapaporn Utarabhand and Paiboon Bunlipatanon

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE, PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY, HAT YAI, SONOKLA 90112, THAILAND, AND SONGKLA COASTAL AQUACULTURE DEVELOPMENT CENTER, SONGKLA 90000, THAILAND

ABSTRACT. Radiolabelled vitellogenin produced by juvenile grouper following injection of ^3H -leucine, ^{32}P -orthophosphate and estradiol-stimulation was purified by anion-exchange and gel filtration chromatography and characterized by electrophoresis and chemical analysis. The radiolabelled product was found to exist in two heterogeneous molecular weight forms by electrophoresis under non-denaturing conditions on polyacrylamide gel with M_r of 260,000 and 525,000. It showed two protein monomers (M_r 113,000 and 140,000) on electrophoresis under denaturing condition on a sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel. The purified material contained 17.2% total lipid with 1.3% cholesterol and 2.1% triglycerides, 8–21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein total carbohydrate and 6.8 μg phosphate/mg protein; amino acid analysis showed a profile comparable to that found for vitellogenins isolated from the grouper, medaka, goldfish and rainbow trout. The study showed grouper vitellogenin to be a glycopospholipoprotein similar in composition to vitellogenins from other teleosts and demonstrated that vitellogenins can be induced in juveniles by injection with estradiol-17 β . *COMP BIOCHEM PHYSIOL* 115C;2:101–110, 1996.

KEY WORDS. Vitellogenin, grouper, *Epinephelus malabaricus*, fish yolk protein, estradiol, ovarian development, maturation

Part II

**Development of Radio immuno Assay (RIA) for Measuring
Plasma Vitellogenin of Grouper (*Epinephelus malabaricus*)**

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้สามารถพัฒนาเทคนิค RIA ที่มี ^3H -ไวเทลโลจินิกิน เป็น tracer ในการวัดระดับไวเทลโลจินิกินในพลาสมาของปลากระรัง แทนการใช้ ^{125}I -ไวเทลโลจินิกินเป็น tracer ดังที่มีรายงานในปลาชนิดอื่น ๆ โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RIA นี้ จะต้องใช้ ^3H -ไวเทลโลจินิกิน 180 μg ผสมกับแอนติบอดี 475 μg ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 6 ชั่วโมง และที่ 4°C อีก 72 ชั่วโมง แล้วแยกโปรตีนเชิงซ้อนออกจาก ^3H -ไวเทลโลจินิกินอิสระด้วย 8% polyethylene glycol กราฟมาตรฐานไวเทลโลจินิกินที่ให้ค่าอยู่ในช่วงเส้นตรงคือ 100-1,600 μg ปริมาณไวเทลโลจินิกินในพลาสมาตัวอย่างที่หาได้โดยวิธีนี้พบว่ามีค่าไม่แตกต่างจากการหาโดยวิธี rocket immunoelectrophoresis (ที่รายงานในส่วนที่ III)

เทคนิค RIA ที่พัฒนาได้มีข้อเสียคือในแต่ละการวิเคราะห์ ใช้เวลานานมาก และต้องใช้ ^3H -ไวเทลโลจินิกินปริมาณสูงมาก (180 μg) หรือมีความไวต่ำกว่าการใช้ ^{125}I -ไวเทลโลจินิกิน (ระดับ ng) เป็น tracer มาก

Part III

Plasma Vitellogenin in Relation to Ovarian Development and Induction by Estradiol in Grouper (*Epinephelus malabaricus*)

ABSTRACT

The antibody against vitellogenin purified from grouper plasma was raised in rabbits. The antibody cross-reacted well with the protein in the plasma, the liver and the ovary of female grouper. It also cross-reacted with plasma of estradiol treated juvenile grouper and of some marine females. No cross-reactivity was found when the plasma from male grouper or some freshwater females were used in the test.

Plasma vitellogenin concentration in female grouper is in relation to the development of the gonad expressed as a gonadosomatic index (GSI). Oocyte maturation in this species can be divided into 6 stages of the previtellogenic and the vitellogenic phases. Together with growth of oocytes, the ovarian development can be divided into 5 stages. In female grouper, no change in plasma vitellogenin level was detected from March to June. It increased from June to reach maximum 1 month before spawning in December. A linear reaction appeared between the concentration of vitellogenin in the plasma and GSI, with the exception of the last month before spawning which plasma vitellogenin dropped gradually while the gonads continued to grow. Grouper vitellogenin is female-specific plasma protein and its synthesis can be induced in juvenile fish by exogenous estradiol.