บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้สามารถทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่โดยการเซนตริฟิวจ์ความเร็วสูง แล้วแยกต่อโดยคอลัมน์ Superdex 200 HR ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีนแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 480,000 ดัลตัน ขณะที่แบบแผนโปรตีนของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสสภาพรีดิวซ์ประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวนมาก ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ย้อมติดสีคูมาซีบลู ซูดานแบล็คบี เมธิลกรีนและชุดย้อมไกลโคโปรตีนได้ บ่งชี้ว่าไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์เป็นฟอสโฟลิโพไกลโคโปรตีน ทั้งไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์และไวเทลโลจีนินในพลาสมาเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรังได้

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ได้จากการฉีดไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ครั้งละ 20 ไมโครกรัม จำนวน 3 ครั้ง เข้าในผิวหนังและใต้ผิวหนังของกระต่าย แอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนใน Ouchterlony double immunodiffustion กับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ พลาสมา สารสกัดตับและสารสกัดรังไข่ของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่ รวมทั้งพลาสมาของปลากระบอกเพศเมียชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในวงศ์ Mugilidae เดียวกัน แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาและสารสกัดเนื้อเยื่ออื่น ๆ ของปลากระบอกเพศเมียไม่มีไข่ รวมทั้งพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ จากการทำ Western blot พบว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยากับพลาสมาและสารสกัดรังไข่ของปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์ นอกจากนี้ ได้พัฒนาวิธี ELISA ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาได้ในช่วง 0-100 นาโนกรัม (0-600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

ในการตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินจากสารสกัดเมมเบรนของโอโอไซท์ที่สกัดด้วย n–octyl-β-D-glucoside โดยวิธี Western blot และความจำเพาะของแอนติบอดี พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดัลตัน ในสารสกัดเมมเบรนที่ผ่านการบ่มกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ แต่ไม่พบในสารสกัดเมมเบรนที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์และในส่วนโปรตีนโยล์ค จากผลงานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าแถบโปรตีนนี้เป็นตัวรับไวเทลโลจีนินที่อยู่บนเมมเบรนของโอโอไซท์ เหมือนกับของกบและปลากระดูกแข็งบางชนิด

จากการคอนจูเกตไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แล้วนำไปแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR พบว่าไวเทลโลจีนินเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (vitellogenin-peroxidase conjugate, VPC) มีน้ำหนักโมเลกุล 700,000 ดัลตัน เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน และมีความเป็นอิมมูนเหมือนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ เมื่อนำ VPC ไปใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบจับกับ VPC (enzyme-linked vitellogenin binding assay, ELVBA) เพื่อใช้ในการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินบนเมมเบรนของโอโอไซท์ปลากระบอกดำ พบว่าการจับที่เหมาะสมระหว่าง VPC กับตัวรับไวเทลโลจีนินเกิดเมื่อมี

การบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์วิเคราะห์ที่ pH 6 ที่มี 7.5 mM Ca^{2+} และ 7.5 mM Mg^{2+} การจับอย่างจำเพาะระหว่างตัวรับไวเทลโลจีนินกับ VPC ขึ้นอยู่กับปริมาณเมมเบรนของโอโอไซท์ และเป็นแบบอิ่มตัว จากการศึกษาการจับแบบอิ่มตัวและวิเคราะห์ด้วย Scatchard plot แสดงให้เห็นว่าตัวรับไวเทลโลจีนินมีตำแหน่งจับเพียงชนิดเดียว ปริมาณ VPC ที่มากที่สุดในการจับแต่ละเซลล์โอโอไซท์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.47 มิลลิเมตร มีค่าเป็น 4.7 พิโคกรัมต่อเซลล์โอโอไซท์ และค่าความจำเพาะของการจับ (K_d) ของตัวรับเหล่านี้มีค่าเป็น 68.5 pM (48 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

Abstract

Purification of vitellogenin from plasma of ovulated greenback mullet was achieved by ultracentrifugation and followed by chromatography on Superdex 200 HR column. The purified vitellogenin showed one protein band in nondenaturing PAGE with M_r of 480,000 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. Moreover, 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).

Determination of vitellogenin receptor on oocyte membrane extracted by n-octyl-β-D-glucoside 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 frog and some teleosts.

Conjugation of the purified vitellogenin to peroxidase was performed and chromatographed on Superdex 200 HR column. The vitellogenin-peroxidase conjugate (VPC) had M_r of 700,000 Daltons 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 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 Ca^{2+} and 7.5 mM Mg^{2+}. The specific binding was dependent on the amount of oocyte membrane and was saturable. Saturation studies and Scatchard plot 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).