

การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินในปลากระพงแดง,  
*Lutjanus argentimaculatus*

นางสาวพอลิต วิโนทพรรษ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-786-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

L 1719944X

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VITELLOGENIN  
IN RED SNAPPER, *Lutjanus argentimaculatus***



**Miss Phochit Winotaphan**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science**

**Programme of Biotechnology  
Graduate School**

**Chulalongkorn University**

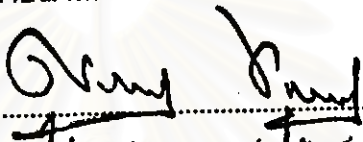
**Academic Year 1996**

**ISBN 974-635-786-7**

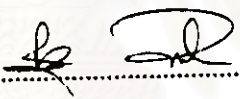
หัวข้อวิทยานิพนธ์      การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินในปลากระพงแดง,  
*Lutjanus argentimaculatus*  
โดย                              นางสาวพอลจิต วิโนทพรรณ์  
หลักสูตร                        เทคโนโลยีทางชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษา            ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรชิติวรกุล  
   รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วีรวัฒน์กะมุพะ

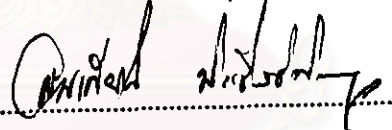
---

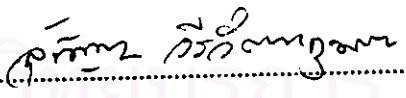
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

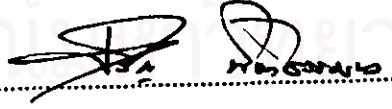
  
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุภวัฒน์ ชุตินวงศ์)

คณะกรรมการวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุมธ ดันตระเชียร)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรชิติวรกุล)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วีรวัฒน์กะมุพะ)

  
..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมขง)

พอลิต วิโนทพรรษ์ : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินในปลา  
กะพงแดง, *Lutjanus argentimaculatus* (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  
VITELLOGENIN IN RED SNAPPER, *Lutjanus argentimaculatus*)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรชิตวิรุณกุล,

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. สุกัญญา วีรวัฒน์ระกุ่มพะ, 64 หน้า. ISBN 974-635-786-7

การแยกไวเทลโลเจนินจากปลาตะเพียนและไข่ของปลาตะเพียนที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตรา-  
ไดออล (500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ด้วยคอลัมน์ไฮโครอกซิลอะพาไทต์ และคอลัมน์  
เซฟาคริล เอส-300 ได้ผลิตไวเทลโลเจนินในขั้นสุดท้าย 96.92% และ 63.07% ตามลำดับ เมื่อนำมาแยก  
ด้วยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส พบว่าได้โปรตีน 5 แถบเหมือนกัน มีน้ำหนัก  
โมเลกุล 140, 108, 95, 90 และ 77 kDa ส่วนการแยกไวเทลโลเจนินโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็ก  
โตรโฟริซิส แบบไม่แปลงสภาพ พบโปรตีน 4 แถบที่สามารถย้อมติดสี coomassie brilliant blue R-250,  
ซูดานแบล็ค บี, periodic acid-Schiff's reagent และ เมธิลกรีนได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติการเป็นไกลโคโปรตีน  
ไกลโคโปรตีนของไวเทลโลเจนิน พบฟอสฟอรัสของไวเทลโลเจนินในรูปอัลคาไลน์-เลบายล์ฟอสฟอรัสจาก  
ปลาตะเพียนและไข่ 0.13% และ 0.11% ของมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และไวเทลโลเจนินที่ได้สามารถกระตุ้น  
กระดูกขาวให้สร้างแอนติบอดีได้ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาคกตะกอนกับไวเทลโลเจนินจากปลาตะเพียนและไข่,  
คกตะกอนกับปลาของปลาตะเพียนเทศเมี่ยงที่สมบุรณ์เทศ และคกตะกอนกับปลาตะเพียนและไข่ของปลา  
กะพงแดงเทศเมี่ยงที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออลได้ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับปลาของปลาตะเพียน-  
แดงเทศผู้ และสามารถนำไวเทลโลเจนินไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยวิธี ELISA สำหรับประยุกต์ใช้ในการ  
ตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาตะเพียนได้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....  
สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....  
ปีการศึกษา..... 2539.....

ลายมือชื่อนิติกร..... พอลิต วิโนทพรรษ์.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## C726980 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD:

VITELLOGENIN / LIPOPHOSPHOGLYCOPROTEIN / RED SNAPPER

PHOCHIT WINOTAPHAN : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VITELLOGENIN

IN RED SNAPPER, *Lutjanus argentimaculatus*

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SOMKIAT PIYATIRATTIVORAKUL, Ph.D.

THESIS COADVISOR : ASSO. PROF. SUKANYA WERAWATGUMPA, Ph.D.

64 pp. ISBN 974-635-786-7

Vitellogenin was purified from plasma and egg of red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* treated with  $17\beta$ -estradiol (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw) by the chromatography method on a hydroxylapatite column and subsequently a Sephacryl S-300 column with a yield of 96.92% and 63.07%, respectively. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of vitellogenin obtained from either plasma or egg showed 5 bands at 140, 108, 95, 90 and 77 kDa. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis showed 4 bands which stained positively with Coomassie Brilliant Blue R-250, Sudan Black B, periodic acid-Schiff's reagent and methyl green. The results suggested that the protein was a lipophosphoglycoprotein. The phosphorus content of purified plasma and egg vitellogenin rendered alkali-labile for the purpose of measurement has been found to be 0.13% and 0.11% respectively. An application of the immunodiffusion test, antibodies against vitellogenin showed precipitin lines with purified vitellogenin from both plasma and egg, egg extract, mature female plasma and plasma of red snapper treated with  $17\beta$ -estradiol, but not with the male plasma of red snapper. The standard curve of the purified vitellogenin could be established by the ELISA technique which could be used for vitellogenin determination as well.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ

ปีการศึกษา..... 2539

ลายมือชื่อนิสิต..... นอจิฉวี อ้นทาทนพ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.สมเกียรติ พิชัยทิรตติวรกุล

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อ.สุกัญญา เรวาทกัมปา

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีรายชื่อดังต่อไปนี้ ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรชิตวิรุฬ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัญญา วีรวัดนะกุมพะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือด้านเทคนิคต่าง ๆ รวมทั้งวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิทยานิพนธ์ ตลอดจนทุนอุดหนุนส่วนหนึ่งในการทำงานวิจัย และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในงานวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ตูเมธ ดันตระเชียร ประธานกรรมการ ผู้ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

อาจารย์ ดร. เจริญ นิตยธรรมขง กรรมการ ผู้ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงธาดา สืบหลินวงศ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ, คุณธีรศักดิ์ นรภักดิ์สุนทร ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเพื่อสถานที่และอุปกรณ์บางชนิด เพื่อใช้ในการวิจัย

นักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และเอื้อเพื่อสถานที่ในการเลี้ยงปลากระพงแดง

ขอขอบคุณ โครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ (UDC) ทบวงมหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านทุนการศึกษา และวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ รวมทั้งผู้ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ที่ไม่ได้เอ่ยนามในที่นี้

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ได้เป็นกำลังใจ และสนับสนุนในด้านการเงินแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป .....	ฅ
คำย่อ .....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีทดลอง .....	12
3. ผลการทดลอง .....	28
4. วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง .....	52
รายการอ้างอิง .....	58
ประวัติผู้เขียน .....	64

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากปลาสดโดยวิธีโครมาโตกราฟี .....	31
2 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ โดยวิธีโครมาโตกราฟี.....	35



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 โครมาโตแกรมแสดงการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน)จากพลาสมาของปลากะพงแดง ก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ .....	29
2 โครมาโตแกรมแสดงการทำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมาให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 .....	30
3 โครมาโตแกรมแสดงการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ของปลากะพงแดง ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ .....	33
4 โครมาโตแกรมแสดงการทำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 .....	34
5 รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาของปลากะพงแดงแยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟริซิส .....	37
6 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำไวเทลโลเจนินใน พลาสมาให้บริสุทธิ์ แยกโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส....	38
7 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการแยกไวเทลโลเจนิน จากไข่ของปลากะพงแดง โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส...	39
8 รูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง ซึ่งเก็บไว้เป็นสารมาตรฐาน แยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส .....	41
9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility) กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน .....	42
10 รูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตร- โฟริซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน .....	44
11 รูปแบบของไลโปโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมไลโปโปรตีน .....	45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
12 รูปแบบของไกลโคโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมไกลโคโปรตีน .....	46
13 รูปแบบของฟอสโฟโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมฟอสโฟโปรตีน .....	47
14 กราฟมาตรฐานฟอสฟอรัส .....	49
15 ผลการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลโลเจนิน โดยวิธีอิมมูโนคิพีวัน .....	50
16 กราฟมาตรฐานของไวเทลโลเจนิน โดยวิธี ELISA .....	51



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำย่อ

BSA	=	Bovine Serum Albumin
CG	=	Chorionic Gonadotropin
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IgG	=	Immunoglobulin
kDa	=	kilodalton
OPD	=	O-phenylenediamine
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
PMSF	=	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RIA	=	Radioimmunoassay
TCA	=	trichloroacetic acid
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย