การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินในปลากะพงแดง, *Lutjanus argentimaculatus*

นางสาวพอจิต วิโนทพรรษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-786-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17199446X

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	การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินในปลากะพงแดง, *Lutjanus argentimaculatus*
โดย	นางสาวพอจิต วิไนทพรรษ์
หลักสูตร	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล
	รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

พอจิต วิโนทพรรษ์ : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินในปลากะพงแดง, *Lutjanus argentimaculatus* (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VITELLOGENIN IN RED SNAPPER, *Lutjanus argentimaculatus*)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล,
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ, 64 หน้า. ISBN 974-635-786-7

การแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล (500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ได้ผลผลิตไวเทลโลเจนินในขั้นสุดท้าย 96.92% และ 63.07% ตามลำดับ เมื่อนำมาแยกด้วยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าได้โปรตีน 5 แถบเหมือนกัน มีน้ำหนักโมเลกุล 140, 108, 95, 90 และ 77 kDa ส่วนการแยกไวเทลโลเจนินโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ พบโปรตีน 4 แถบที่สามารถย้อมติดสี coomassie brilliant blue R-250, ซูดานแบล็ค บี, periodic acid-Schiff's reagent และ เมธิลกรีนได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติการเป็นไลโปฟอสโฟ-ไกลโคโปรตีนของไวเทลโลเจนิน พบฟอสฟอรัสของไวเทลโลเจนินในรูปอัลคาไลน์-เลบายล์ฟอสฟอรัสจากพลาสมาและไข่ 0.13% และ 0.11% ของมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และไวเทลโลเจนินที่ได้สามารถกระตุ้นกระต่ายขาวให้สร้างแอนติบอดีได้ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่, ตกตะกอนกับพลาสมาของปลากะพงแดงเพศเมียที่สมบูรณ์เพศ และตกตะกอนกับพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงเพศเมียที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออลได้ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะพงแดงเพศผู้ และสามารถนำไวเทลโลเจนินไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยวิธี ELISA สำหรับประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา 2539

ลายมือชื่อนิสิต พอจิต วิโนทพรรษ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

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 PIYATIRATITIVORAKUL, 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 17β-estradiol (500 μg/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 17β-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..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

รองศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ให้คำแนะนำความช่วยเหลือด้านเทคนิคต่าง ๆ รวมทั้งวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิทยานิพนธ์ ตลอดจนทุนอุดหนุนส่วนหนึ่งในการทำงานวิจัย และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในงานวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ประธานกรรมการ ผู้ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

อาจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง กรรมการ ผู้ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงชาดา สืบหลินวงศ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ, คุณชีรศักดิ์ นรภักดิ์สุนทร ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคในการทำอิเลคโตรโฟรีซิส และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์บางชนิด เพื่อใช้ในการวิจัย

นักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการเลี้ยงปลากะพงแดง

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 ..... ฌ
คำย่อ ..... ฎ

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) จากพลาสมาโดยวิธีโครมาโตกราฟี 31

2 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ โดยวิธีโครมาโตกราฟี..... 35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 โครมาโตแกรมแสดงการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน)จากพลาสมาของปลากะพงแดง ก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิล-อะพาไทต์ 29

2 โครมาโตแกรมแสดงการทำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากพลาสมาให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 30

3 โครมาโตแกรมแสดงการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ของปลากะพงแดง ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ 33

4 โครมาโตแกรมแสดงการทำโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) จากไข่ให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 34

5 รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาของปลากะพงแดงแยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิส 37

6 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำไวเทลโลเจนินในพลาสมาให้บริสุทธิ์ แยกโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส.... 38

7 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการแยกไวเทลโลเจนินจากไข่ของปลากะพงแดง โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส... 39

8 รูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง ซึ่งเก็บไว้เป็นสารมาตรฐาน แยกโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส 41

9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility) กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน 42

10 รูปแบบของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตร-โฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน 44

11 รูปแบบของไลโปโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมไลโปโปรตีน 45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

12 รูปแบบของไกลโคโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมไกลโคโปรตีน 46
13 รูปแบบของฟอสโฟโปรตีนในโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) แยกโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยสีย้อมฟอสโฟโปรตีน 47
14 กราฟมาตรฐานฟอสฟอรัส 49
15 ผลการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลโลเจนิน โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น 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