การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนไวเทลโลเจนิน และโซนา เรดิเอตาในปลากะบอกดำ, *Liza subviridis*

นางสาวผจงสุข สุธารัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO VITELLOGENIN AND ZONA RADIATA PROTEINS IN GREENBACK MULLET, *Liza subviridis*

Miss Pajongsuk Sutarut

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492241

Thesis Title	PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO VITELLOGENIN AND ZONA RADIATA PROTEINS IN GREENBACK MULLET, *Liza subviridis*
By	Miss Pajongsuk Sutarut
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Narongsak Puanglarp, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Siwaporn Longyant, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Assistant Professor Charoen Nitithamyong, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

Narongsak Puanglarp ..... Thesis Co-advisor

(Narongsak Puanglarp, Ph.D.)

Siwaporn Longyant ..... Thesis Co-advisor

(Siwaporn Longyant, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Supat Chareonpornwattana, Ph.D.)

ผจงสุข สุธารัตน์ : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนไวเทลโลเจนินและโซนา เรดิเอตาในปลากะบอกดำ, *Liza subviridis* (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO VITELLOGENIN AND ZONA RADIATA PROTEINS IN GREENBACK MULLET, *Liza subviridis*) อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ฉรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, ดร. ศิวาพร ลงยันต์ 102 หน้า

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน (VTG) และโปรตีนโซนา เรดิเอตา (ZRP) ของปลากะบอกดำ (*Liza subviridis*) ผลิตขึ้นจากแอนติเจนที่เป็นโปรตีนสกัดจากไข่และเปลือกไข่ของปลากระบอกดำ ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบ็อดีที่สามารถจับกับ VTG และ ZRP ได้ทั้งแบบดั้งเดิมและเสียสภาพได้รับการคัดเลือกโดยวิธี dot-blotting และศึกษาลักษณะความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot และ Immunohistochemical staining ผลที่ได้พบว่า มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11 ชนิด ที่จำเพาะต่อ VTG และสามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่มตามความสามารถในการจับกับแอนติเจน โมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่สามารถจับกับแอนติเจนได้ทั้งแบบดั้งเดิมและแบบเสียสภาพ ยกเว้นเพียง 1 กลุ่ม (VTG-313, 530) ที่จำเพาะต่อแอนติเจนแบบดั้งเดิมเท่านั้น ผลของ immunohistochemistry ที่เนื้อเยื่อไข่พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 กลุ่มสามารถจับกับทุกระยะของเซลล์ไข่ได้ ส่วนการจำแนก Isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทำด้วยวิธี Sandwich ELISA พบว่าส่วนใหญ่เป็นชนิด IgG_1 มีเพียง 1 ตัวที่เป็นชนิด IgG_2 สำหรับการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ZRP นั้น มีแอนติบอดี 11 ชนิดที่จำเพาะต่อ ZRP ทั้งแบบดั้งเดิมและแบบเสียสภาพในซีรัมของปลาเพศเมียสมบูรณ์พันธุ์ และสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดมี isotype เป็นชนิด IgG_1 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VTG และ ZRP นั้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาระดับ VTG และ ZRP ในเลือดจากการเหนี่ยวนำลูกปลากะบอกวัยอ่อนด้วย estradiol (E2) ด้วยวิธี Indirect immunoperoxidase competitive ELISA พบว่า สามารถตรวจพบระดับที่เพิ่มขึ้นของ VTG และ ZRP ในกลุ่มตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นด้วย E2 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการตรวจวัดระดับ VTG และ ZRP ในปลากะบอกด้วยแอนติบอดีสามารถใช้ ในการตรวจวัดผลของสาร xenoestrogen ในแหล่งน้ำได้

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา...2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672338723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: XENOESTROGEN/VITELLOGENIN/ ZONA RADIATA PROTEIN/ IMMUNOHISTOCHEMISTRY/ MONOCLONAL ANTIBODY

PAJONGSUK SUTATUT: PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO VITELLOGENIN AND ZONA RADIATA PROTEINS IN GREENBACK, *Liza subviridis*. THESIS ADVISOR : PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ph.D., THESIS COADVISOR : NARONGSAK PUANGLARP, Ph.D., SIWAPORN LONGYANT, Ph.D.,102 pp

Monoclonal antibodies (MAbs) specific to vitellogenin (VTG) and zona radiata protein (ZRP) of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) were generated using proteins extracted from unfertilized eggs as immunogens. Hybridomas producing antibodies that bound to VTG and ZRP in both native and denatured forms were selected by dot-blotting and were characterized for their specificities by Western blot analysis and Immunohistochemical staining. Eleven MAbs specific to VTG can be grouped into 6 categories according to their binding capabilities to antigens. Most of MAbs bound to both native and denatured antigens while one group of them (VTG-313, 530) bound to only native antigens and 2 groups of monoclonal antibodies were able to cross react to vitellogenic cells by immunohistochemical staining. Isotype and subisotype of antibodies were identified by Sandwich ELISA. All MAbs belong to the IgG_1 isotype except one that belongs to the IgG_2 isotype. For the production of monoclonal antibodies specific to ZRP, 11 antibodies were specific to both native and denatured forms of ZRP in blood serum of mature female mullets. ZRP can be grouped into 4 categories according to their binding capabilities to different stages of antigens and all monoclonal antibodies belong to the IgG_1 isotype. Indirect immunoperoxidase competitive ELISA using VTG and ZRP monoclonal antibodies specific to VTG and ZRP levels in juvenile mullets injected with various estradiol (E2) were determined. The result indicated that the levels of VTG and ZRP were significantly increased in responding to the increase level of E2. This indicates that detection of VTG and ZRP in Greenback Mullet using antibodies is an effective method for determining xenoestrogenic effect in water.

Field of Study...Biotechnology.... Student's Signature..Pajongsuk Sutatut.....

Academic Year...2006..... Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.Narongsak Puanglarp

Co-advisor's Signature..Siwaporn Longyant.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to my major advisor : Professor Dr. Piamsak Menasveta, co-advisors : Dr. Narongsak Puanglarp and Dr. Siwaporn Longyant for their kind guidance and providing me an opportunity to develop not only the scientific merits but also social merits which are very valuable experience for my future career.

I would like to express my great thanks to Professor Dr. Paisarn Sithigorngul for his esteemed advice, guidance, supervision and giving me opportunities to do research of this study.

I am deeply thankful to Dr. Sirawut Klinbunga for their valuable advice and supports on some parts of my thesis work.

I would like to thank Center of Excellent for Marine Biotechnology (CEMB) Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University; Prasarnmit, National Center for Genetic Engineering Biotechnology and Program of Biotechnology, Chulalongkorn University for providing the facilities and all instruments for my research.

Special thanks goes to and Mr. Sombat Rukpratarnporn and all members of monoclonal antibody group, SWU and all members of Center of Excellent for Marine Biotechnology for actually helping me during moment of worrisome, depression, uncountable helps and cheerfulness.

Finally, I wish to express my infinite gratitude to my family especially my parents for their unlimited love, kindness, supports, understanding and attentions all the time.

CONTENTS

Page

Abstract in Thai..... iv

Abstract in English..... v

Acknowledgements..... vi

List of Tables..... ix

List of Figures..... x

List of Abbreviations..... xiii

CHAPTER

I Introduction..... 1

II Literature review..... 4

Xenoestrogen..... 4

Sources of xenoestrogen..... 4

Toxicity of xenoestrogens to marine organism..... 6

Monitoring of xenoestrogen problem..... 6

Vitellogenin and Zona radiate protein 8

Vitellogenesis and zonagenesis 11

Determination of VTG and ZRP..... 14

Monoclonal antibodies..... 14

Liza subviridis (Valenciennes, 1836)..... 19

III Materials and methods..... 21

CHAPTER Page

IV Results..... 39

V Discussion..... 65

VI Conclusion..... 72

References 74

Appendices

Appendix A : Original data from competitive ELISA..... 83

Appendix B : Buffer and reagent preparation..... 87

Appendix C : Reagent preparation for hybridoma production.... 88

Appendix D : Buffer and solution for SDS-PAGE and Western blot analysis..... 90

Appendix E : Reagent for determination of isotype and subisotype of monoclonal antibodies using antibody captured on anti-Ig antibodies..... 96

Appendix F : Buffer and solution for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)..... 97

Appendix G : Reagent and solution for immunohistochemistry.. 98

Biography..... 102

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Molecular mass of vitellogenin subunits reported in teleost fish.....	20
3.1	MAb mixtures for determination of MAb epitope of VTG.....	36
3.2	MAb mixtures for determination of MAb epitope of ZRP.....	37
4.1	ELISA OD values of various MAbs to determine epitope of MAbs..... ...	47
4.2	Characterization of monoclonal antibodies specific to vitellin and vitellogenin tested by western blot analysis and subtype.....	48
4.3	Characterization of MAbs specific to vitellin and VTG tested by dot blot and immunohistochemistry.....	49
4.4	ELISA OD values of various MAbs to determine epitope of MAbs..... ...	53
4.5	Characterization of monoclonal antibodies specific to ZRP tested by western blot analysis and subtype.....	54
4.6	Characterization of monoclonal antibodies specific to ZRP tested by dot blot and immunohistochemistry.....	55
4.7	Vitellogenin concentrations of Greenback mullet (*Liza subviridis*) juvenile fish serum.....	61
4.8	Zona radiate protein concentrations of Greenback mullet (*Liza subviridis*) juvenile fish serum.....	64
1A	VTG and ZRP concentrations of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) juvenile fish serum, which were injected by various estradiol (E2) Concentration.....	83
1E	Preparation of separating gel and stacking gel.....	92

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Immunohistochemical staining of cod (*Gadus morhua*) ovarian follicle cell and oocyte.....	10
2.2	Schematic representation of the hypothalamus-pituitary-gonadal-liver (HPGL) axis during oogenic protein synthesis in female teleosts.....	12
2.3	The principle of the production of an antibody-producing hybridoma.....	15
2.4	Nucleotide synthesis : *De novo* and Salvage pathway.....	17
2.5	*Liza subviridis* (Valenciennes, 1836).....	19
3.1	Diagram of hybridoma production.....	29
3.2	Diagram of dot blotting for screening method and characterization of monoclonal antibodies.....	30
3.3	Diagram of Western blot analysis for screening method and characterization of monoclonal antibodies.....	31
3.4	Diagram of immunohistochemistry for characterization of monoclonal antibodies.....	32
3.5	Diagram of sandwich ELISA.....	35
3.6	Diagram of competitive ELISA.....	38
4.1	SDS-PAGE of vitellin extract from the egg yolk of Greenback Mullet (*Liza subviridis*).....	39
4.2	SDS-PAGE of ZRP extract from the egg yolk of Greenback Mullet	40

Figure		Page
4.3	SDS-PAGE and immunoblot analysis of vitellin extract and female serum	41
4.4	SDS–PAGE and immunoblot analysis of ZRP extract	42
4.5	Immunohistochemical staining of Greenback Mullet(*Liza subviridis*) oocyte.....	43
4.6	Screening results of 10 monoclonal antibodies by dot-blot analysis.....	45
4.7	SDS-PAGE and immunoblot analysis of vitellin extract and female serum	46
4.8	Screening results of 11 monoclonal antibodies by dot-blot analysis	51
4.9	SDS-PAGE and Western blot of female serum.....	52
4.10	SDS-PAGE and Western blot analysis of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) juvenile fish serum, which were injected by various estradiol (E2) concentration.....	56
4.11	SDS-PAGE and Western blot analysis of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) juvenile fish serum, which were injected by various estradiol (E2) concentration.....	57
4.12	Validation of specificity and sensitivity of competitive ELISA for determination of vitellogenin using combination of four monoclonal antibodies specific to each vitellogenin subunits.....	59
4.13	Comparison of VTG levels of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) juvenile fish serum, which were injected by various estradiol (E2) Concentration.....	60

Figure Page

4.14 Validation of specificity and sensitivity of competitive ELISA for determination of zona radiate protein using combination of four monoclonal antibodies specific to each ZRP subunits..... 62

4.15 Comparison of zona radiate protein levels of Greenback Mullet (*Liz a subviridis*) juvenile fish serum, which were injected by various estradiol (E2) concentration..... 63

LIST OF ABBREVIATIONS

DAB	=	Diaminobenzidine
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
DAB	=	Diaminobenzidine
DMSO	=	Dimethylsulfoxide
FCS	=	Fetal calf serum
GAM-HRP	=	Goat anti mouse-horseradish peroxidase conjugated
GAR-HRP	=	Goat anti rabbit-horseradish peroxidase conjugated
h	=	Hour
Ig	=	Immunoglobulin
IHC	=	Immunohistochemistry
kDa	=	Kilo dalton
MAb	=	Monoclonal antibody
mg	=	Milligram
min	=	Minute
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
µl	=	Microlitre
µm	=	Micrometre
nm	=	Nanometre
OD	=	Optical density
OPD	=	o-phenylenediamine dihydrochloride
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAb	=	Polyclonal antibody
PBS	=	Phosphate buffer saline
RAM-IgG	=	Rabbit anti mouse-IgG

SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
RIA	=	Radioimmunoassay
VTG	=	Vitellogenin
WB	=	Western blot
ZRP	=	Zona radiate protein