การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus maculatus*)

ชุติมา ถนอมสิทธิ์

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวาริชศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2550
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ชุติมา ถนอมสิทธิ์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.เรณู ยาชิโร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

.....กรรมการ
(ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์)

.....กรรมการ
(ดร.เรณู ยาชิโร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประทุม ม่วงมี)
วันที่ 15 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2550

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์ และ ดร.เรณู ยาชิโร กรรมการที่ปรึกษา และกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สัตว์ทดลองคือหนูขาวรวมถึงให้คำแนะนำในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี้

ขอขอบพระคุณ คุณนิพนธ์ เสนอินทร์ ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการเก็บตัวอย่างเลือดปลากะรังจุดฟ้า

ขอขอบพระคุณพ่อกับคุณแม่ที่ทำให้ผู้วิจัยมีวันนี้ มีวันที่สามารถก้าวเข้ามาศึกษาในรั้วมหาวิทยาลัยที่ทรงคุณค่า และเป็นมหาบัณฑิตที่สมบูรณ์

ขอขอบคุณพี่คิมหรือคุณทวีชัย สถาพรชัยสิทธิ์ พี่ชายที่แสนดีที่เป็นที่ปรึกษาและคอยให้กำลังใจตลอดการศึกษาวิจัย และขอบคุณคุณวิภาดา กิตยารักษ์ คุณเมธาวี เบญจบรรพต คุณสุกัญญา อบรมวรรณ คุณศุภกิจ ศรีสวัสดิ์ และคุณนิวัฒน์ วงษ์พยัคฆ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาวาริชศาสตร์และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือให้การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ชุติมา ถนอมสิทธ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

47911125: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วาริชศาสตร์)
คำสำคัญ: ปลากะรังจุดฟ้า/ โพลีโคลนอลแอนติบอดี/ ไวเทลโลเจนิน

ชุติมา ฉนอมสิทธิ์: การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus maculatus*) (PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTIBODIES SPECIFICS TO PLASMA VITELLOGENIN OF BLUE-SPOTTED GROUPER (*Plectropomus maculatus*)) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์: วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, Ph.D., พจิต นันทนาวัฒน์, Ph.D., เรณู ยาชิโร, Ph.D. 62 หน้า. ปี พ.ศ. 2550

ไวเทลโลเจนินเป็น Biomarker ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาถึงกลไกการทำงานของต่อมไร้ท่อ ไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนหลักในโยล์คที่ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตโดยรังไข่และถูกลำเลียงมาตามกระแสเลือดกระตุ้นให้เซลล์ตับผลิตและหลั่งไวเทลโลเจนินออกมา ในปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus maculatus*) กระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินเกิดขึ้นได้เมื่อมีการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลจำนวน 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ไวเทลโลเจนินสามารถแยกได้โดยใช้ Ion-Exchange Chromatography และ Gel-Filtration Chromatography โดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และคอลัมน์ เซฟาคริล เอส-300 หลังจากทำการศึกษาด้วยเอสดีเอสโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีสพบว่า ไวเทลโลเจนินที่แยกได้ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 102 และ 94 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เนื่องจากไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่แยกได้มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอในการนำไปใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว เพราะฉะนั้นจึงใช้โปรตีนในพีคที่ 3 ที่แยกได้จากคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์มาใช้ในการฉีดกระตุ้นแทน และเมื่อทำการศึกษาถึงความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยใช้เทคนิค Western Blot และ Immunodiffusion พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูขาวทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลและไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมีย ที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นและพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศผู้ เมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค Western Blot พบว่าแถบโปรตีนที่แยกได้จากไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 94, 75, 70, 68 และ 50 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาโดยใช้เทคนิค เอสดีเอสโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส ระดับความเข้มข้นของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค Dot Blot คือ 1: 10,000

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

47911125: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)
KEYWORDS: *Plectropomus maculates*/ POLYCLONAL ANTIBODY/ VITELLOGENIN
CHUTIMA THANOMSIT: PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTIBODIES SPECIFICS TO PLASMA VITELLOGENIN OF BLUE-SPOTTED GROUPER (*Plectropomus maculatus*). ADVISORY COMMITTEE: VERAPONG VUTHIPHANDCHAI, Ph.D., PHOCHIT NANTANAWAT, Ph.D., RENU YASHIRO, Ph.D. 62 P. 2007.

Vitellogenin (VTG) is a widely used biomarker in the studies on regulation of endrocrine gland.Vitellogenin is a yolk precusor protein, which is synthesized and secreted in the liver in response to circulating estrogen. In blue-spotted grouper (*Plectropomus maculatus*), vitellogenin synthesis was induced by injection of 2 mg/ Kg of 17 B-estradiol. Vitellogenin was isolated from plasma by ion-exchange chromatography and gel-filtration chromatography on hydroxylapatite column and sephacryl S-300 column, respectively. After performing SDS-PAGE, vitellogenin was identified at the molecular weight of 102 and 94 kDa. Due to in sufficientamount of purified vitellogenin, protein in the third peak which segregated from hydroxylapatite was used instead. The specificity of polyclonal antibody to vitellogenin was assessed by western blot and immunodiffusion analysis. The polyclonal antibody had crossreactivity with E_2-injected female and purified vitellogenin. However, the crossreactivity was not observed in the plasma of intact females and plasma from blue-spotted grouper males. When using western blot techniques, the vitellogenin was identified at molecular weight of 94, 75, 70, 68 and 50 kDa which were different from SDS-PAGE technique. By using dot blot techniques, the suitable antibody titer for polyclonal antibody was 1: 10,000

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

สมมติฐานของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

อนุกรมวิธานของปลากะรังจุดฟ้า..... 4

ชีววิทยาของปลากะรังจุดฟ้า..... 4

ความหมายของไวเทลโลเจนิน..... 4

การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน..... 5

ส่วนประกอบของไวเทลโลเจนิน..... 8

เทคนิคที่ใช้ในการแยกไวเทลโลเจนิน..... 8

การตรวจสอบไวเทลโลเจนิน..... 14

แอนติบอดีและการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน..... 19

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 24

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย..... 24

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 24

สัตว์ทดลอง..... 24

การเก็บเลือด..... 26

การฉีดกระตุ้นปลากะรังจุดฟ้า..... 26

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การฉีดกระตุ้นปลากะรังจุดฟ้า	26
	การเตรียมไวเทลโลเจนินและการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์	26
	การแยกโปรตีนวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส	27
	การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้า	30
4	ผลการวิจัย	34
	ผลการฉีดกระตุ้นปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้ฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออล	34
	ผลการเตรียมไวเทลโลเจนินและการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์	35
	การศึกษารูปแบบของโปรตีน และการหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้เทคนิคเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเลคโตรโฟรีซีส	39
	ผลการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้า	40
5	อภิปรายและสรุปผล	45
	อภิปรายผล	45
	การฉีดกระตุ้นปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้ฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออล	45
	การเตรียมไวเทลโลเจนินและการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์	46
	รูปแบบของโปรตีนและการหาน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้เทคนิคเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเลคโตรโฟรีซีส	48
	การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้า	48
	สรุปผลการวิจัย	51
	ข้อเสนอแนะ	52
บรรณานุกรม		53
ภาคผนวก		59
ประวัติย่อของผู้วิจัย		63

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 การศึกษาการแยกไวเทลโลเจนินในปลาชนิดต่าง ๆ..... 12

2-2 ความไวของการตรวจสอบวิธีทางภูมิคุ้มกัน..... 19

2-3 การเปรียบเทียบลักษณะโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 23

3-1 สารละลายที่ใช้ในการเตรียม Separating Gel 7.5% และ Stacking Gel 4% สำหรับการทำ SDS-PAGE..... 28

4-1 ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในพลาสมา ก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล..... 36

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 กระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน..... 6

2-2 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี..... 20

3-1 ปลากะรังจุดฟ้า..... 25

3-2 หนูขาวพันธุ์ Swiss Albino Mice IRC เพศเมีย..... 25

3-3 ชุดอิเลคโตรโฟรีซีส..... 29

3-4 การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค Immunodiffusion..... 31

3-5 การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ (Antibody Titer) โดยใช้เทคนิค Dot Blot..... 32

4-1 พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า ก่อนและหลังการถูกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า- เอสตราไดออล..... 34

4-2 โครมาโตแกรมแสดงการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า ก่อนและหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า- เอสตราไดออล นำมาผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, 0.4 โมลาร์ และ1.2 โมลาร์ ตามลำดับ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแฟรกชั่นละ 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร..... 37

4-3 โครมาโตแกรมแสดงการแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ของปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์เซฟาคริลเอส -300 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อนาทีจำนวน 120 แฟรกชั่น แฟรกชั่นละ 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร..... 38

4-4 รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาและโปรตีนที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี..... 39

4-5 การศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้า ด้วยเทคนิค Immunodiffusion..... 41

4-6 ผลการตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ (Antibody Titer) ที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ..... 42

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-7 การศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่แยกได้จากการผ่านคลอลัมน์โครมาโตรกราฟีโดยเทคนิค West Blot..... 43

4-8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative Mobility) กับโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส..... 62

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University