

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิต่ำ (Refrigerated Centrifuge) บริษัท BGH
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงแรงสูง (Ultracentrifuge) บริษัท Hitachi, Japan
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท Milton Roy, U. S. A.
4. เครื่อง Transblot Semi-Dry Transfer Cell บริษัท Bio-Rad, U.S.A.
5. เครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis) บริษัท Bio-Rad, U.S.A.

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) บริษัท Pharmacia
2. เซฟาคริล เอส-300 (Sephacry S-300) บริษัท Pharmacia
3. โปรตีนมาตรฐานสำหรับเอสดีเอส โพลีอะคริลามิడ్ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส: ประกอบด้วย Myosin (250 kDa), B-Galactosidase (150 kDa), Phosphorylase B (100 kDa), BSA (75 kDa), Ovalbumin (50 kDa), Carbonic Anhydrase (37 kDa) และ Triosephosphate Isomerase (25 kDa) บริษัท Bio-Rad U.S.A.
4. อะกาโรส (Agarose) บริษัท Bio-Rad U.S.A.
5. สารเคมีที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส และ Western Blot บริษัท Bio-Rad, U.S.A.
6. สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวมาแล้วเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์

สัตว์ทดลอง

1. ปลากระังจุดฟ้า (*Plectropomus maculatus*) ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 1.5-2.5 กิโลกรัม ซึ่งรวบรวมได้จากกระชังบริเวณเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง



ภาพที่ 3-1 ปลากะรังจุดฟ้า

2. หนูขาวสายพันธุ์ Swiss Albino Mice ICR เพศเมีย อายุประมาณ 6 สัปดาห์



ภาพที่ 3-2 หนูขาวพันธุ์ Swiss Albino Mice ICR เพศเมีย

การเก็บเลือด

1. การเก็บเลือดปลากะรังจุดฟ้า

การเก็บเลือดบริเวณซี่เหงือก โดยใช้เข็มรูปผีเสื้อ และใส่เฮพาริน (Heparin) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำเลือดไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกพลาสมาของปลาแต่ละตัวเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

2. การเก็บเลือดหนูขาว

ทำการสลบหนูขาวด้วยอีเธอร์ พอหนูเริ่มสลบจับหนุออกวางบนพื้นสะอาดที่เช็ดด้วย 70% แอลกอฮอล์ จับหนังคอหนูดึงให้ตึงจนตาลนออกเล็กน้อย สวม Sterile Pasture Pipette กับหลอดยาง สอดปลายปิเปตตรงกลางเบ้าตาลล่างเฉียงไปทางด้านหลังเล็กน้อยหมุนไปมาเล็กน้อย พร้อมทั้งดูดเบา ๆ จนเลือดไหลเข้าสู่ปิเปตปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ซึ่งจะเร่งให้เลือดแข็งตัวค้างในปิเปต ปลอยเลือดลงในหลอดเก็บเลือดและนำไปปั่นแยกซีรัม ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

การฉีดกระตุ้นปลากระรังจุดฟ้า

นำปลากระรังจุดฟ้ามากระตุ้นให้สร้างไวเทลโลเจนิน โดยการฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล จำนวน 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ที่บริเวณกล้ามเนื้อเหนือเส้นข้างลำตัว จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3 วัน โดยจะเก็บทั้งหมด 5 ครั้ง ซึ่งการเก็บครั้งที่ 1 จะเป็นการเก็บก่อนที่จะมีการฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล ส่วนการเก็บครั้งที่ 2, 3, 4 และ 5 จะเก็บหลังจากที่มีการกระตุ้นทุก ๆ 3 วัน

การเตรียมไวเทลโลเจนินและการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์

การแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์ จะใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยขั้นตอนแรกจะใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ส่วนขั้นตอนที่สองจะใช้คอลัมน์เซฟาคริลเอส-300

1. คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

นำไฮดรอกซิลอะพาไทต์ 2.5 กรัม แช่ในน้ำกลั่นตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเทส่วนใสและผละเย็ดทิ้ง ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง แล้วบรรจุลงในคอลัมน์พลาสติกขนาด 1.6×10 เซนติเมตร ให้ได้ความสูงของไฮดรอกซิลอะพาไทต์ 6 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ลงในคอลัมน์ด้วย อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้สารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรไฮดรอกซิลอะพาไทต์ เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ไฮดรอกซิล

อะพาไทด์จะโปรตีนออกจากคอลัมน์แบบขั้นตอน (Stepwise Elution) ด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, 0.4 โมลาร์ และ 1.2 โมลาร์ พีเอช 6.8 ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 60 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ แฟรงชันละ 1.5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 120 แฟรงชัน นำสารละลายในหลอดที่เก็บได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณโปรตีน เทียบกับ BSA (Bovine Serum Albumin) มาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมพิคแต่ละพิคที่ได้จากการชะด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, 0.4 โมลาร์ และ 1.2 โมลาร์ พีเอช 6.8 ไว้ด้วยกัน ทำให้เข้มข้น และนำพิคที่ชะด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ พีเอช 6.8 (ที่มีไวเทลโลเจนิน) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

2. คอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

บรรจุเซฟาคริล เอส-300 ในคอลัมน์ขนาด 1.5x30 เซนติเมตร ซึ่งมีน้ำกลั่นบรรจุอยู่เกือบเต็ม ค่อย ๆ เทเซฟาคริล เอส-300 ลงในคอลัมน์พร้อม ๆ กับปล่อยให้น้ำไหลออกจากคอลัมน์ บรรจุเซฟาคริล เอส-300 จนมีความสูงของเจล 30 เซนติเมตร ปล่อยไว้ให้เม็ดเจลเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงผ่านสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 ลงในคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้สารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจลเพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุล นำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์มาวัดพีเอช เพื่อให้แน่ใจว่าคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0

นำสารละลายที่เก็บรวบรวมได้จากการชะของสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ จากข้อ 1. มาเติมลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ชะด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์แฟรงชันละ 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 120 แฟรงชัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับ BSA มาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บรวบรวมพิคของสารละลายไว้ด้วยกันและทำให้เข้มข้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปทดสอบลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินต่อไป

การแยกโปรตีนด้วยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น

1. เตรียมสารละลาย Separating Gel 7.5% และ Stacking Gel 4% ดังตารางที่ 3-1
2. ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วบรรจุในช่องว่างของระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ให้ได้ความสูงของเจลประมาณ 5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนเจลแข็งตัว โดยสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างน้ำกับเจลชัดเจน จึงเทน้ำออกจากหน้าเจล

ตารางที่ 3-1 สารละลายที่ใช้ในการเตรียม Separating Gel 7.5% และ Stacking Gel 4%

	Separating Gel 7.5%		Stacking Gel 4%	
1. สารละลายอะคริลาไมด์ 30%	2.5	มิลลิลิตร	1.34	มิลลิลิตร
2. สารละลายทริส/ ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.8	2.5	มิลลิลิตร	-	
3. สารละลายทริส/ ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8	-			มิลลิลิตร
			2.5	
4. สารละลายเอสดีเอส 10%	0.1	มิลลิลิตร	0.1	มิลลิลิตร
5. น้ำกลั่น	4.85	มิลลิลิตร	6.1	มิลลิลิตร
6. TEMED	3.5	ไมโครลิตร	10	ไมโครลิตร
7. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%	50	ไมโครลิตร	0.1	มิลลิลิตร

3. นำ Comb มาเสียบระหว่างแผ่นกระจกเหนือบริเวณผิวหน้าเจล

4. เตรียมสารละลาย Stacking Gel 4% ลงบนหน้าเจลที่แข็งตัวจนเต็มแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว แล้วจึงดึง Comb ออก

การเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการแยกและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

1. นำโปรตีนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ของปลากะรังจุดฟ้าทั้งก่อนฉีดและหลังฉีดด้วยกระดุนด้วย 17 เบตา-เอสตราไดออลจำนวน 250 ไมโครลิตรมาต้มรวมกับสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่างจำนวน 250 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที

2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

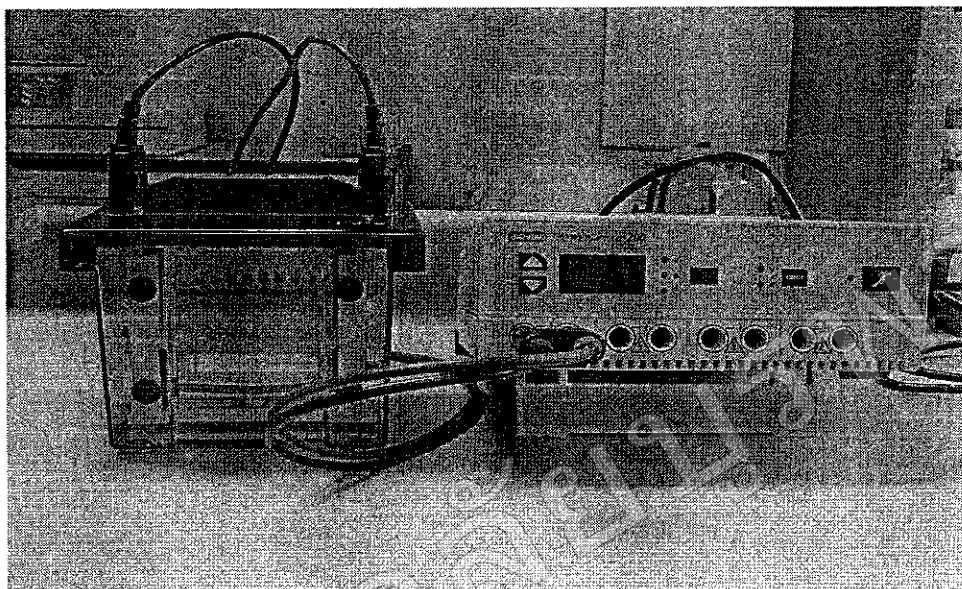
การแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้า

1. บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ที่มีสารละลายทริส/ไกลซีนบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ พีเอช 8.3

2. นำสารละลายโปรตีนและพลาสมาที่เตรียมได้มาใส่ลงในช่องเจล ช่องละ 5 ไมโครกรัมต่อช่อง

3. จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีค่าความต่างศักย์ 110 โวลต์ จนกระทั่งแถบสี (Tracking Dye) ในบัฟเฟอร์ตัวอย่าง เคลื่อนลงไปจนถึงส่วนของ Separating Gel จึงลดความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์

4. ปลดปล่อยให้แถบสีเคลื่อนที่ลงไปจนเกือบถึงปลายแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า



ภาพที่ 3-3 ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini-Protein II: BioRad)

การย้อมแถบสีโปรตีนในแผ่นโพลีอะคริลามัดเจล

1. นำแผ่นเจลมาย้อมสีโดยแช่น้ำยาย้อมสีโปรตีนเป็นเวลา 30 นาที
2. ล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining Solution)

จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนที่อยู่บนแผ่นเจลชัดเจนและพื้นเจลใส นำแผ่นเจลที่ได้ไปทำให้แห้ง

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน)

1. วัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ และระยะทางที่แถบสีตามรอย (Tracking Dye) เคลื่อนที่ ในแผ่นเจล แล้วคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative Mobility: R_m)

จากสูตร

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

2. คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย Myosin (250 kDa), B-Galactosidase (150 kDa), Phosphorylase B (100 kDa), BSA (75 kDa), Ovalbumin (50 kDa), Carbonic Anhydrase (37 kDa), และ Triosephosphate Isomerase (25 kDa)

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้า

1. นำโปรตีนฟิสิกที่ 3 ที่แยกได้โดยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ที่ถูกชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ พีเอช 6.8 มาทำ Dialysis เพื่อแยกเกลือออกจากโปรตีนโดยการแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส

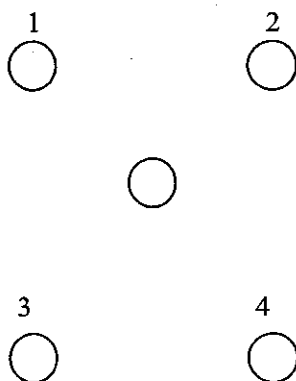
2. จากนั้นเตรียมโปรตีนให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปฉีดหนูขาว การกระตุ้นให้หนูขาวสร้างแอนติบอดี

โดยนำแอนติเจนที่เตรียมไว้มาผสมกับ Freund' s Adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของหนูขาวสายพันธุ์ Swiss Albino Mice ICR อายุประมาณ 6 สัปดาห์ ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 จะนำแอนติเจนมาผสมกับ Freund' s Adjuvant Complete ส่วนครั้งที่ 2, 3 และ 4 จะนำแอนติเจนมาผสมกับ Freund' s Adjuvant Incomplete ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นในแต่ละครั้งคือ 100 ไมโครกรัมต่อหนึ่งมิลลิลิตร หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 7 วัน ก็ทำการเก็บเลือดมาปั่นแยกเฉพาะซีรัมมาตรวจสอบคุณสมบัติต่อไป

การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค

Immunodiffusion

1. ต้มอะกาโรส (Agarose) 1.2% ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.2 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
 2. ปิเปตอะกาโรส 2 มิลลิลิตร ปล่อยลงบนกระจกสไลด์ขนาด 2.5x7.5 เซนติเมตร รอจนกระทั่งอะกาโรสแข็งตัว เจาะรูบนอะกาโรส
 3. นำไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมีย และพลาสมาของปลากะรังเพศผู้มาหยอดลงในหลุม หลุมละ 5 ไมโครลิตร
 4. นำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินมาหยอดลงในหลุมตรงกลาง 5 ไมโครลิตร
- ดังภาพที่ 3-4



หมายเหตุ หลุมตรงกลาง คือ โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ โปรตีนพีคที่ 3 ที่ได้จาก
พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า

- หลุมที่ 1 คือ พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย
17 เบต้า-เอสตราไดออล
- หลุมที่ 2 คือ พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย
17 เบต้า-เอสตราไดออล
- หลุมที่ 3 คือ ไวเทลโลเจนนินที่แยกได้โดยคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300
- หลุมที่ 4 คือ พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศผู้

ภาพที่ 3-4 การตรวจสอบความจำเพาะของ โพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค

Immunodiffusion

5. ตั้งทิ้งไว้ในกล่องที่มีความชื้นตั้งไว้นาน 12 ชั่วโมง เพื่อรอปฏิกิริยา สังเกตได้จาก
การเกิดแถบตะกอนสีขาวขุ่น
6. นำสไลด์ที่ได้มาหยอดน้ำกลั่นให้เต็มหลุม ใช้กระดาษฟางทาบหน้าเจลบนแผ่นกระจก
และของหนักทับไว้อย่างน้อย 10 นาที
7. นำสไลด์มาแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% เพื่อล้างเอาโปรตีนส่วนเกินออก
อย่างน้อย 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
8. นำกระจกสไลด์ที่แห้งแล้วมาข้อมด้วยสีย้อมโปรตีน (0.1% Coomassie Brilliant Blue
R-250) เป็นเวลา 30 นาที
9. นำมาแช่ในน้ำกลั่น 10 นาที ใช้กระดาษฟางทาบอีกครั้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ
65 องศาเซลเซียส จนวุ้นใส (ใช้เวลาประมาณ 10-30 นาที)
10. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงิน
บนแผ่นเจลใส

การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจหาแอนติบอดีไทเตอร์ (Antibody Titer) โดยใช้เทคนิค Dot Blot

1. เตรียมแอนติบอดีที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับคือ 1: 200, 1: 500, 1: 1,000, 1: 5,000, 1: 10,000 และ 1: 20,000
2. นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสและนำมาขีดเป็นเส้นตารางขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร และทำสัญลักษณ์ดังรูป

Dilution	(-)	1	2
Prot Cont	(+)	1	2

หมายเหตุ Dilution-Antibody Dilution คือ ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดี

Protein Cont-Antigen Content

(-) -- Negative Control คือ พลาสมาของปลาก่อนได้รับการกระตุ้นด้วย 17

เบต้า-เอสตราไดออล

(+) -- Positive Control คือ ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ

- 1 คือ พลาสมาของปลาก่อนได้รับการกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล
- 2 คือ พลาสมาของปลาหลังได้รับการกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล

ภาพที่ 3-5 การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจหาแอนติบอดีไทเตอร์ (Antibody Titer) โดยใช้เทคนิค Dot Blot

3. นำตัวอย่างของโปรตีนที่แยกได้มาหยดลงในไนโตรเซลลูโลสช่องละ 1 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้ง
4. นำเมมเบรนมาแช่ใน 5% Blotto เพื่อ Block Nonspecific Protein เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
5. นำเมมเบรนไปบ่มในแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ผลิตได้จากหนูขาวที่มีการดูดซับแอนติเจนที่เจือปนก่อนใช้โดยการผสมซีรัมของปลาดำผู้ร่วมกับแอนติบอดีที่ระดับความเจือจางที่ต่างกัน 6 ระดับคือ 1: 200, 1: 500, 1: 1,000, 1: 5,000, 1: 10,000 และ 1: 20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
6. ล้างด้วย 0.5% Blotto จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
7. นำไปบ่มใน Goat-Anti-Mouse IgG-HRP Antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1: 1,500 ใน 5% Blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

8. ล้างด้วย 0.5% Blotto จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

9. แช่ในสารละลายยับยั้งสเตรท (DAB จำนวน 0.003 กรัม, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ประมาณ 9-10 ไมโครลิตร, CoCl_2 0.5 มิลลิลิตร และ PBS จำนวน 10 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที สังเกตจุดสีดำที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีจับกับแอนติเจน ล้างเมมเบรนด้วยน้ำประปา สำหรับสารละลาย DAB และน้ำที่ปนเปื้อน DAB เดิม Chorox เล็กน้อยตั้งทิ้งไว้จนสารละลายใส ก่อนทิ้ง

การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีคลอนอลแอนติบอดีโดยใช้ Western Blot Analysis นำโปรตีนในเจลที่แยกได้จากการเตรียมไวเทลโลเจนินและการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์ ย้ายลงในกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้กระแสไฟฟ้า ดังนี้

1. นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสประกบกับเจลแห้ง
2. จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องทำย้ายโปรตีนแบบกึ่งแห้งผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 10 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

3. นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่ได้ไปแช่ใน 5% Blotto เป็นเวลา 30 นาที

4. นำมาแช่ในแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนพีคที่ 3 ที่มีการดูดซับแอนติบอดีที่เจือปนออก โดยการนำซีรัมของปลาตัวผู้มาผสมกับแอนติบอดี ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5. ล้างด้วย 0.5% Blotto ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง

6. แช่ใน Goat-Anti-Mouse IgG-HRP Antibody (GAM-HRP) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7. ล้างด้วย 0.5% Blotto ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง

8. แช่ในสารละลายยับยั้งสเตรท (DAB จำนวน 0.003 กรัม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ประมาณ 9-10 ไมโครลิตร, CoCl_2 0.5 มิลลิลิตร และ PBS จำนวน 10 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที สังเกตจุดสีดำที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีจับกับแอนติเจน ล้างเมมเบรนด้วยน้ำสำหรับสารละลาย DAB และน้ำที่ปนเปื้อน DAB เดิมสารฟอกขาวตั้งทิ้งไว้จนสารละลายใสก่อนทิ้ง