

การพัฒนาการผลิตโพลีโคลนอนแอนติบอดีต่อ CADMIUM-BINDING PROTEIN

จากปลากะพงขาว (*LATES CALCARIFER*, BLOCH)

และการนำไปประยุกต์ใช้

สุกานดา ทับเมฆา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

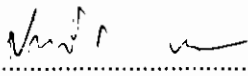
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มิถุนายน 2554

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

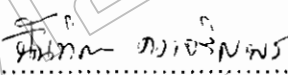
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของ สุกานดา ทับเมฆา ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

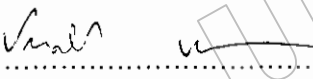
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์


  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท)


  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ดร. แววดา ทองระอา)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

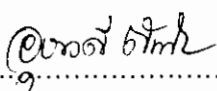
  
.....ประธาน  
(ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

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

  
.....กรรมการ  
(ดร. แววดา ทองระอา)

  
.....กรรมการ  
(ดร. อุมพร ทาไชสง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

  
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษาวดี ดันดิวนารักษ์)

วันที่.....เดือน..... พ.ศ. 2554

มหาวิทยาลัยบูรพา  
Burapha University

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม  
พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี  
ประจำปีการศึกษา 2549

## ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความรู้จาก ผศ. ดร. ปภาศิริ บาร์เนท อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทาง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. แหวดดา ทองระอา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาทะเลทั้งหมด จากงานวิจัย เรื่อง การประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของโลหะหนักในอาหารทะเลในพื้นที่อุตสาหกรรมชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

ขอขอบพระคุณ Dr. Malin Celandier อาจารย์ประจำมหาวิทยาลัย Gothenburg ประเทศสวีเดน ดร. พอลจิต นันทนาวัฒน์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร ดร. สุวรรณภา ภาณุตระกูล และนางสาวชุตติมา อนุอมสัทธิต์ ที่กรุณาให้ความรู้ แนวคิด อธิบายและให้แนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พืชวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกท่านที่เอาใจใส่ ให้กำลังใจ และสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูคุณเวทิตาแก่ บุษปการี บุรพจารย์ ผู้มีพระคุณทุกท่านและสัตว์ทศโลงทั้งหลายที่สละชีวิตเพื่อการวิจัยครั้งนี้ ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาครบถ้วนทุกวันนี้

สุกานดา ทับเมฆา

49910713: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ: ตัวชี้วัดชีวภาพ/ โพลีโคลนอลแอนติบอดี/ Cadmium-binding protein

สุกานดา ทับเมฆา: การพัฒนาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ CADMIUM-BINDING PROTEIN จากปลาชะพงขาว (*LATES CALCARIFER*, BLOCH) และการนำไปประยุกต์ใช้ (DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTIBODY TO CADMIUM-BINDING PROTEIN FROM SEA BASS (*LATES CALCARIFER*, BLOCH) AND ITS APPLICATION) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ปภาศิริ บาร์เนท, Ph.D., แววดา ทองระอา, D.Tech.Sc. 118 หน้า. ปี พ.ศ. 2554.

ปลาชะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch) ที่ฉีดกระตุ้นด้วย  $CdNO_3 \cdot 4H_2O$  ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และแยก Cd-Binding Protein ที่สกัดจากตับ โดยใช้วิธี Immobilized metal ion affinity chromatography โดยการผ่าน HiTrap FF crude column เพื่อให้ได้โปรตีนหลักถือว่าเป็นแอนติเจนที่บริสุทธิ์เป็น Cd-Binding Protein จากการศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟลิซิส พบว่ามีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 10 kDa แล้วนำไปผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ต่อ Cd-Binding Protein ในหนูทดลอง พบว่าหลังการฉีดกระตุ้นหนูทดลองเพื่อให้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีคือ Cd-Binding Protein ทำการตรวจสอบความจำเพาะต่อแอนติเจนจากปลาชะพงขาว โดยใช้เทคนิค Western blot ก็พบมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 10 kDa เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดี พบว่าการเจือจางแอนติบอดีเหมาะสมคือค่าเจือจางที่ 1:2,500 ในการนำมาใช้สำรวจการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในปลาทะเลที่จับจากชายฝั่งทะเลบริเวณเขตพื้นที่อุตสาหกรรม การแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในปลาทะเล ด้วยวิธี Western Blot พบว่าบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง พบการแสดงออกของ Cd-Binding Protein สูงกว่าบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี โดยพบ 48.6% (n=148) และ 29.1% (n=158) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบช่วงฤดูกาล พบว่าการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม 2551) สูงกว่า ฤดูฝน (สิงหาคม-กันยายน 2550) คือ 51.3% (n=158) และ 25.0% (n=148) ตามลำดับ ผลการศึกษารังนี้สามารถนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีคือ Cd-binding protein จากปลาชะพงขาวมาใช้สำรวจการสัมผัสสารเหนี่ยวนำการสร้าง Cd-binding protein ในปลาทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลเขตพื้นที่อุตสาหกรรมที่มีผลกระทบต่อมลภาวะทางทะเล และทำให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อนของโลหะหนักบริเวณแนวชายฝั่งทะเล

49910713: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: BIOMARKER/ POLYCLONAL ANTIBODY/ CADMIUM-BINDING PROTEIN

SUKANDA TUBMECA: DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTIBODY TO CADMIUM-BINDING PROTEIN FROM SEA BASS (*LATES CALCARIFER*, BLOCH) AND ITS APPLICATION. ADVISORY COMMITTEE: PRAPARSIRI BARNETTE, Ph.D., WAEWTAA THONGRA-AR, D.Tech.Sc. 118 P. 2011.

Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch) was first injected with  $\text{CdNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (4 miligram per 1 kilogram weight) and Cadmium-binding protein was extracted from its liver. Immobilized metal ion affinity chromatography (HiTrap FF crude column) was used to capture a pure Cd-Binding Protein with a molecular weight of 10 kDa after it was analysed with electrophoresis. Then, the Cd-Binding Protein as an antigen was immunized to mice to obtain Polyclonal Antibody (PAb). Polyclonal Antibody specific to Cd-Binding Protein was retested to the antigen using Western blot and molecular mass appeared at 10 kDa. The dilution of PAb resulted in the ratio 1: 2,500. The PAb specific to Cd-Binding Protein was used to analyze Cd-Binding Protein, the protein levels in Western blots was taken from the liver samples of selected feral marine fish along coastal Chonburi Province (Laemchabang) and Rayong Province (Map Ta Phut). The results showed that the level of Cd-Binding Protein detected in fish sampled from Map Ta Phut was high (48.6%, n =148), compared to fish sampled from Laemchabang (29.1%, n=158). Seasonal comparison shows Cd-binding protein results to be higher in the dry season (March 2008) as compared to the rainy season (August – September 2007): 51.3% (n=158) and 25.0% (n=148) respectively. This study shows that PolyclonalAntibody specific to Cd-Binding Protein from *Lates calcarifer* can be used to assess marine pollution from marine fishes. Furthermore, the data suggest that the coastal area of two industrial districts are exposed to heavy metal.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย.....	2
สมมติฐานของการทำวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตของการทำวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
โลหะหนักและแหล่งของโลหะหนัก ที่ปล่อยลงสู่ทะเล.....	5
สถานการณ์คุณภาพน้ำชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก.....	11
ตัวชี้วัดทางชีวภาพ.....	12
Metal - Binding Protein.....	13
การประยุกต์ใช้ Metal-Binding Protein เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อม.....	14
การเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ Metal - Binding Protein .....	15
การตรวจสอบ Metal - Binding Protein ในสิ่งมีชีวิต.....	16
การผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบ Metal - Binding Protein ในสิ่งมีชีวิต.....	20
การเตรียมแอนติเจนเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี.....	26
โครมาโตกราฟี.....	26
การแยกและทำชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	29

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
แนวโน้มการประยุกต์ใช้ MT เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในประเทศไทย.....	37
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	39
<b>3 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	
วัสดุและอุปกรณ์.....	43
สารเคมี.....	43
การสกัดโปรตีน Cd-binding protein และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized metal ion affinity chromatography.....	44
การผลิตและทดสอบคุณสมบัติของ โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd-Binding Protein.....	49
การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี สํารวจการแสดงออกของ Cd- Binding Protein ในปลาทะเลแนวชายฝั่งจังหวัดชลบุรีและระยอง.....	50
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	51
<b>4 ผลการทดลอง</b>	
การสกัด โปรตีน Cd- Binding Protein และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized metal ion affinity chromatography.....	53
การผลิตและทดสอบคุณสมบัติของ โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd- Binding Protein.....	44
การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี สํารวจการแสดงออกของ Cd- Binding Protein ในปลาทะเลแนวชายฝั่งจังหวัดชลบุรีและระยอง.....	53
<b>5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง</b>	
อภิปรายผล.....	65
สรุปผลการทดลอง.....	71
ข้อเสนอแนะ.....	71
บรรณานุกรม.....	73
ภาคผนวก ก.....	79
ภาคผนวก ข.....	105
ภาคผนวก ค.....	108



## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	
ภาคผนวก ง.....	111
ภาคผนวก จ.....	115
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	118

มหาวิทยาลัยบูรพา  
Burapha University

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 หมู่ต่าง ๆ ในโปรตีนพาหะที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับเพปไทด์หรือแฮปแทน.....	26
2-2 การตรวจสอบปริมาณ Metal-Binding Protein สำหรับใช้เป็นตัวชี้วัดถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ.....	40
4-1 สรุปจำนวนชนิดของปลาทะเลที่นำมาสำรวจการแสดงออกของ Cd-Binding Protein บริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี และนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง.....	59
4-2 ผลการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ของปลาทะเลเปรียบเทียบกับบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี และนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง ในปีพ.ศ. 2550-2551 ด้วยวิธี Western Blot.....	62
4-3 ผลการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ของปลาทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี และนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง จากการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝน ปี 2550 และฤดูแล้ง ปี 2551 ด้วยวิธี Western Blot.....	64

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะโครงสร้างของ Metallothioncin.....	14
2-2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	23
2-3 ตัวอย่าง Epitope ปรากฏในไวรัส.....	26
2-4 โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography) และ โครมาโตกราฟี แบบแผ่นระนาบ.....	27
2-5 Retention Mechanism ในการแยกสาร โดยวิธี Chromatography แบบต่าง ๆ .....	28
2-6 การแยกโปรตีนด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์.....	29
2-7 Gel Filtration Chromatography.....	31
2-8 Anion-Exchange Chromatography.....	32
2-9 Affinity Chromatography.....	34
2-10 HiTrap FF Crude Column ที่มีนิเกิลเคลือบอยู่บนเรซิน.....	35
4-1 ปริมาณโปรตีนรวมของปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมไม่ฉีดและฉีดบัฟเฟอร์ (50 mM Sodium Phosphate Buffer, pH 7.4) และปลากะพงขาวกลุ่มฉีด $dNO_3 \cdot 4H_2O$	53
4-2 โปรตีนสกัดจากตับปลากะพงขาว และศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบโดยใช้เทคนิค Gel Electrophoresis .....	53
4-3 ปริมาณโปรตีนรวมที่ผ่าน Hitrap Column สามารถแยกเก็บได้ในแต่ละแฟรกชัน.....	55
4-4 รูปแบบของ Cd-Binding Protein ที่ผ่าน Hitrap column สามารถแยกเก็บได้ ในแต่ละแฟรกชัน.....	55
4-5 เปรียบเทียบความแตกต่างของ Cd-Binding Protein ที่ผ่านและไม่ได้ผ่าน HiTrap Column.....	56
4-6 ทดสอบประสิทธิภาพของ PAb: Cd-Binding Protein จากปลากะพงขาวทดลองฉีด $CdNO_3$	57

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-7 ทดสอบการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในปลาทะเลที่เก็บจากบริเวณนิคมอุตสาหกรรม ด้วย PAb: Cd- Binding Protein.....	60
4-8 การแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในปลาทะเลจากชายฝั่งทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง.....	61
4-9 การแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในปลาทะเลจากชายฝั่งทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยองเปรียบเทียบตัวอย่างในช่วงฤดูฝน ปี 2550 และฤดูแล้ง ปี 2551	63