รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)

Development of monoclonal antibody specific to plasma vitellogenin in Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)

อาจารย์ ดร. พอจิต นันทนาวัฒน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร
นายศุภกิจ ศรีสวัสดิ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802047
สัญญาเลขที่ 71/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)

Development of monoclonal antibody specific to plasma vitellogenin in Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)

อาจารย์ ดร. พอจิต นันทนาวัฒน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร
นายศุภกิจ ศรีสวัสดิ์
คณะวิทยาศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559 มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการต่อเนื่อง 2 ปี (พ.ศ.2558 – 2559) ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 71/2559

บทสรุปผู้บริหาร

(Excecutive Summary)

ข้าพเจ้า อาจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา ในโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) (Development of monoclonal antibody specific to plasma vitellogenin in Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)) รหัสโครงการ 2559A10802047/ สัญญาเลขที่ 71/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 708,400 บาท (เจ็ดแสนแปดพันสี่ร้อยบาทถ้วน) ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี 10 เดือน (ระหว่างวันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ. 2559 – 6 สิงหาคม พ.ศ.2560)

บทคัดย่อ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว (MAb-sea bass VTG) ถูกผลิตขึ้นโดยนำเซลล์ม้ามของหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลา มาหลอมกับเซลล์ไมอิโลมา ได้เซลล์ลูกผสมที่จำนวน 11 โคลน ที่มีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะพงขาว (169, 132, 112 และ 86 กิโลดาลตัน) โดยเทคนิคเวสเทิร์น บลอท และแสดงผลของปฏิกิริยาสีน้ำตาลอ่อน กับไวเทลโลเจนินในเนื้อเยื่อตับ ม้าม และลำไส้ ของปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol โดยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี โดยไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นในพลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน นอกจากนี้ MAb-sea bass VTG 23 และ 41 สามารถทำปฏิกิริยาข้ามได้กับไวเทลโลเจนินในเลือดปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (210 และ 140 กิโลดาลตัน) ปลาเก๋าปะการัง (*Epinephelus corallicola*) (152, 133, 81, 72 และ 63 กิโลดาลตัน) ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol โดยเทคนิคดอท บลอท เวสเทิร์น บลอท และอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลลินในฮีโมลิมป์ของปูม้า (*Portunus pelagicus*) ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol

ผลผลิต

1. การตีพิมพ์ และการนำเสนอผลงาน

สุรัสวดี แพทย์รังษี, วิชชุดา ประสาทแก้ว, และ พอจิต นันทนาวัฒน์. (2560) ผลของโนนิลฟีนอลต่อการชักนำไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อน. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา.ปีที่ 22 (ฉบับพิเศษ) การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9".* 195-202.

หนึ่งฤทัย เอกจิตต์, วิชชุดา ประสาทแก้ว และ พอจิต นันทนาวัฒน์. (2560). การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวกับไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่น ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9*, ชลบุรี ; มหาวิทยาลัยบูรพา. (โปสเตอร์)

พิชยาภรณ์ โชติฐิติธนหิรัญ, วิชชุดา ประสาทแก้ว, พอจิต นันทนาวัฒน์. (2560). การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวกับไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่นด้วยเทคนิค western blot. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9*, ชลบุรี ; มหาวิทยาลัยบูรพา. (โปสเตอร์)

พอจิต นันทนาวัฒน์, นันทิกา คงเจริญพร, วิชชุดา ประสาทแก้ว และ ศุภกิจ ศรีสวัสดิ์. (2559). การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว. ใน *รายงานสืบเนื่อง การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8* (หน้า 518-523). พะเยา ; มหาวิทยาลัยพะเยา.

วิชชุดา ประสาทแก้ว, ชุติมา ถนอมสิทธิ์, และ พอจิต นันทนาวัฒน์**.** (2559). การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว. ใน*รายงานสืบเนื่อง การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8* (หน้า 491-496). พะเยา ; มหาวิทยาลัยพะเยา.

สุรัสวดี แพทย์รังษี, ณัฐธยาน์ โทธกานันท์, และพอจิต นันทนาวัฒน์. (2559). ผลของแคดเมียมในการชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อน. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8*, พะเยา ; มหาวิทยาลัยพะเยา. (โปสเตอร์)

และผลงานที่อยู่ในระหว่างการเสนอพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ จำนวน 1 ผลงาน

2. การจดอนุสิทธิบัตร

ได้ยื่นคำขอรับการจดอนุสิทธิบัตร จำนวน 2 เรื่อง ได้แก่

1. คำขอรับอนุสิทธิบัตร เรื่อง โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากระพงขาว เมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2559 เลขที่คำขอ 1603000313

2. คำขอรับอนุสิทธิบัตร เรื่อง วิธีตรวจสอบการปนเปื้อนสารคล้ายเอสโตรเจนในแหล่งน้ำด้วยการวัดระดับไวเทลโลเจนิน เมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2559 เลขที่คำขอ 1603000314

3. การถ่ายทอดเทคโนโลยี

1. การถ่ายทอดเทคโนโลยีและผลการวิจัยให้แก่นักเรียน นิสิต/นักศึกษา นักวิจัย และประชาชนทั่วไปในงานนิทรรศการสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติภาคตะวันออก ที่จัดขึ้นเมื่อวันที่ 16-18 สิงหาคม พ.ศ. 2559 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยให้ความรู้เกี่ยวกับการใช้ไวเทลโลเจนินเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ วิธีการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน และวิธีการตรวจไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคทางแอนติบอดี ในรูปแบบโปสเตอร์

2. บูรณาการงานวิจัยกับการเรียนการสอน รายวิชา 307335 การผลิตแอนติบอดี 307336 ปฏิบัติการการผลิตแอนติบอดี และ 307376 เทคนิคทางแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบสิ่งแวดล้อม ให้แก่นิสิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ในการทำปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ และการทำงานในอนาคต

3. นำผลงานที่ได้จากโครงการวิจัยเข้าร่วมประชุมทางวิชาการและเสนอผลงานวิจัย โดยมีการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 7 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก จำนวน 6 ผลงาน ครั้งที่ 8 ณ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา จำนวน 3 ผลงาน และในการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี จำนวน 3 ผลงาน

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยและการประยุกต์ผลการวิจัย

ควรพัฒนารูปแบบการนำแอนติบอดีไปใช้ในลักษณะที่สะดวก ต่อการออกภาคสนามหรือการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการพื้นฐานต่าง ๆ อาจเป็นในรูปของ Strip test หรือ ชุดตรวจเชิงปริมาณสำเร็จรูป โดยเทคนิค ELISA ซึ่งต้องมีกระบวนการพัฒนาให้มีความแม่นยำสูงใน plat form ต่าง ๆ กัน เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบไวเทลโลเจนินทั้งในด้านของการตรวจสอบเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (EDCs) และการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาแม่พันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่อไป

บทคัดย่อ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว (MAb-sea bass VTG) ถูกผลิตขึ้นโดยนำเซลล์ม้ามของหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลา มาหลอมกับเซลล์ไมอิโลมา ได้เซลล์ลูกผสมที่จำนวน 11 โคลน ที่มีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะพงขาว (169, 132, 112 และ 86 กิโลดาลตัน) โดยเทคนิคเวสเทิร์น บลอท และแสดงผลของปฏิกิริยาสีน้ำตาลอ่อน กับไวเทลโลเจนินในเนื้อเยื่อตับ ม้าม และลำไส้ ของปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol โดยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี โดยไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นในพลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน นอกจากนี้ MAb-sea bass VTG 23 และ 41 สามารถทำปฏิกิริยาข้ามได้กับไวเทลโลเจนินในเลือดปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (210 และ 140 กิโลดาลตัน) ปลาเก๋าปะการัง (*Epinephelus corallicola*) (152, 133, 81, 72 และ 63 กิโลดาลตัน) ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol โดยเทคนิคดอท บลอท เวสเทิร์น บลอท และอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลลินในฮีโมลิมป์ของปูม้า (*Portunus pelagicus*) ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol

Abstracts

Monoclonal antibody specific to Asian sea bass vitellogenin (MAb sea bass VTG) was produced by fusion of myeloma cell and spleen cell of BALB/c mouse immunized with vitellogenin (VTG). 11 clones of hybridoma can produced MAbs and specificity to plasma VTG were checked by western blot (169, 132, 112 and 86 kDa) and dot blot. The immunohistochemistry showed brownish reaction with VTG in 17β-estradiol treatment fish's liver, spleen and intestine with no reaction with the control groups. Moreover, MAb-sea bass VTG 23 and 41 showed cross-reactivity with VTG in tilapia (*Oreochromis niloticus*) (210 and 140 kDa) and coral grouper (*Epinephelus corallicola*) (152, 133, 81, 72 and 63 kDa) which were treated with 17β-estradiol by western blot, dot blot and immunohistochemistry as well. All clones were not showed cross-reactivity with vitellin in hemolymph of blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) treated with 17β-estradiol

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ค
บทสรุปผู้บริหาร..... ง
บทคัดย่อภาษาไทย..... ช
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ซ
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญรูป..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง..... 8
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 12
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง..... 38
รายงานสรุปการเงิน..... 42
เอกสารอ้างอิง..... 43
ประวัตินักวิจัย..... 47

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4-1 ผลการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน 13

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

4-1 การทดสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม) ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวแต่ละโคลนเปรียบเทียบกับโพลิโคลนอลแอนติบอดี 14

4-2 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับโปรตีนทั่วไปที่พบในพลาสมา 15

4-3 การทดสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ปริมาณโปรตีน 0.0039 ถึง 2 ไมโครกรัมตามผังการหยดแอนติเจน (ก) ด้วยเทคนิค Dot blot โดยใช้ MAb-sea bass VTG แต่ละโคลน (ข) 16

4-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับการเจือจางแอนติบอดี โดยใช้ระดับความเข้มข้นของแอนติเจนเคลือบเพลท 1,000-4,000 นาโนกรัมต่อหลุม โดยใช้แอนติบอดี 4 โคลน..... 18

4-5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณไวเทลโลเจนินจากการทดสอบด้วยเทคนิค ELISA แบบ Competitive 19

4-6 การตรวจสอบเนื้อเยื่อปลากะพงขาวโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร (Control)..... 21

4-7 การตรวจสอบเนื้อเยื่อปลากะพงขาวโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน 22

4-8 การตรวจสอบเนื้อเยื่อปลากะพงขาวโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลากะพงขาวที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol..... 23

4-9 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลากะพงขาวที่ได้รับสาร โนนิลฟีนอล..... 24

4-10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลานิล (ช่องที่ 1-12; ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม) เปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีและด้วยเทคนิค Western blot..... 25

4-11 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลาเก๋าปะการัง (ช่องที่ 1-12, ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม) ด้วยเทคนิค Western blot..... 26

4-12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลานิลและปลาเก๋า ปะการัง ด้วยเทคนิค Dot blot..... 27
4-13 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลานิลและปลาเก๋า ปะการัง ด้วยเทคนิค ELISA แบบ competitive โดยใช้ MAb-sea bass VTG 41 (1:500)..... 28
4-14 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลานิลและปลาเก๋า ปะการัง ด้วยเทคนิค ELISA แบบ competitive โดยใช้ MAb-sea bass VTG 23 (1:20)..... 29
4-15 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลานิลกลุ่มควบคุม (Control)..... 30
4-16 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลานิลกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (Vehicle control)..... 31
4-17 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohisto-chemistry ในปลานิลที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol..... 32
4-18 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohisto-chemistry ในปลาเก๋าปะการังกลุ่มควบคุม (Control) 33
4-19 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohisto-chemistry ในปลาเก๋าปะการังกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (Vehicle control))..... 34
4-20 20 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ใน ปลาเก๋าปะการังที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol 35
4-21 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปูม้าด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก) และเทคนิค Western blot โดยใช้ MAb-sea bass VTG 23 (ข) 36
4-22 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปูม้าด้วยเทคนิค Dot blot โดยใช้ MAb-sea bass VTG..... 37

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันมนุษย์ได้มีการใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ ในชีวิตประจำวันเป็นจำนวนมาก ซึ่งสารเหล่านี้ได้ถูกปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดมลพิษเป็นปัญหาต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมอย่างมาก สารเคมีหลายชนิดที่ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น สารเติมแต่งในกระบวนการผลิตพลาสติก (plasticiizer) สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ซึ่งเป็นสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogenic endocrine disruptor) (Arukwe และ Meucci, 2005) ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์สิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดความผิดปกติของการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ เช่น การสร้างโปรตีนไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้แล้ว ยังอาจส่งผลกระทบให้ลูกปลามีอัตรารอดน้อยลง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรและสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศนั้นได้ (Scholz และ Mayer, 2008)

ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์ด้วยการวางไข่ สร้างขึ้นโดยการควบคุมของฮอร์โมน 17β-estradiol มีการสังเคราะห์ขึ้นบริเวณตับของปลาเพศเมียที่โตเต็มวัยและหลั่งสู่กระแสเลือดเพื่อพัฒนาโอโอไซต์ (Oocyte) (Hock และคณะ, 2001) การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินถูกควบคุมโดยระบบฮอร์โมน ซึ่งในสภาวะปกติปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อน จะไม่มีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน อย่างไรก็ดีปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อนสามารถสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินได้ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลไกของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ จัดเป็นสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Xenoestrogen) ที่สามารถกระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนินได้ เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ขึ้นจากภายในร่างกาย (Marin และ Matozzo, 2004) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของระดับไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้สามารถเกิดขึ้นโดยสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน ทั้งการสัมผัสสารที่มีความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานาน หรือสัมผัสสารความเข้มข้นสูงในเวลาสั้น ๆ สามารถชักนำการสร้างไวเทลโลเจนินได้เช่นกัน (Hock และคณะ, 2001)

ดังนั้นการใช้ไวเทลโลเจนินเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการรับสัมผัสสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจนในสัตว์น้ำ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ประเมินการปนเปื้อนของมลพิษในแหล่งน้ำที่ส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำและระบบนิเวศ โดยทั่วไปการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินมีหลายวิธีเช่น วิธี alkaline-labile phosphate หรือการใช้เทคนิคทางพันธุกรรม ตรวจวัดยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน และการใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน โดยไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่เหมาะกับการนำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิคทางแอนติบอดี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน มีความแม่นยำสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์ และค่าใช้จ่ายน้อย ซึ่งการใช้พอลิโคนอลแอนติบอดีที่จำเพาะ

สำหรับสัตว์น้ำหลายชนิดได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจสอบการสร้างไวเทลโลเจนิน แต่พอลิโคลนอลแอนติบอดียังมีข้อจำกัดในด้านของปริมาณการผลิต

ซึ่งจากการทำวิจัยร่วมกับนักวิจัยจากกรมประมงก่อนหน้านี้ได้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะรังจุดฟ้า (ชุติมา ถนอมสิทธิ์ และคณะ, 2552) พบว่ามีข้อจำกัดเรื่องปริมาณพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยเนื่องจากหากสัตว์ทดลอง (หนูเมาส์) ที่ใช้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีตายไป จำเป็นต้องเริ่มหาแอนติเจนและฉีดกระตุ้นหนูขาวตัวใหม่เพื่อผลิตแอนติบอดีอีกครั้ง สร้างความสูญเสียสัตว์ทดลองอย่างต่อเนื่อง แต่หากนำหนูเมาส์ที่ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินได้นั้น มาผ่าตัดนำม้ามออกมาหลอมกับเซลล์ไมอิโลมาที่ผ่านการกลายพันธุ์ ตามเทคนิคของ Köhler และ Milstein (1976) และคัดเลือกเซลล์ลูกผสม ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีวิธีการเพิ่มปริมาณแอนติบอดีโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ในห้องปฏิบัติการจะทำให้ผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณมากและได้ไม่จำกัด และยังนำเซลล์โคลนนั้น เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) ได้อย่างยั่งยืน และส่วนใหญ่แอนติบอดีที่จำหน่ายทางการค้าเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลาในต่างประเทศ ดังนั้นหากสามารถพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว ซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย ก็จะสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคทางแอนติบอดีในการตรวจสอบการรับสัมผัสสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ ซึ่งการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามยังเป็นการยืนยันได้ว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ยังไปจำเพาะกับไวเทลโลเจนินในปลาทะเล ปลาน้ำจืด หรือสัตว์น้ำชนิดอื่นได้อีก จึงสามารถที่ใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาหรือสัตว์น้ำชนิดอื่นที่เสี่ยงต่อการรับสัมผัสสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน และการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนประชากรสัตว์น้ำในระบบนิเวศ ซึ่งอาจทำให้เกิดการสูญพันธุ์ของประชากรชนิดนั้นในธรรมชาติได้ อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของแม่พันธุ์ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)

2) เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาวที่ผลิตได้

3) ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาข้ามต่อสัตว์น้ำเศรษฐกิจกลุ่มอื่น ๆ โดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดีตรวจสอบไวเทลโลเจนินในพลาสมาที่เกิดขึ้นหลังจากสัตว์น้ำได้รับสัมผัสจากสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจนเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในสัตว์น้ำ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินที่ได้จากการกระตุ้นให้ปลากะพงขาวสร้างขึ้นหลังได้รับสาร 17 β-estradiol จากนั้นตรวจสอบลักษณะและคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ ทดสอบและเปรียบเทียบความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว ปลา และสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีได้แก่ Western blot, Dot blot, ELISA และ Immunohistochemistry

การแบ่งหัวข้อในการทดลอง

1. การตรวจสอบลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาวกับไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับการชักนำให้เกิดด้วย 17β-estradiol
2. การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับการชักนำให้เกิด VTG ด้วยสารเคมีชนิดอื่น ด้วยเทคนิค western blot
3. การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว กับไวเทลโลเจนินในปลาชนิดต่าง ๆ ที่ได้รับการชักนำให้เกิด VTG ด้วย 17β-estradiol

1.4 การใช้สัตว์ทดลอง

<u>หนูเมาส์</u>

หนูเมาส์ที่นำมาใช้จะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเลี้ยงในกรงพลาสติกทนความร้อนขนาด 26x42x18 เซนติเมตร ในชุดกรงเลี้ยงสัตว์ทดลองแบบปลอดเชื้อ ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด และมีการเปลี่ยนวัสดุรองนอนและการดูแลจัดการตามมาตรฐานของจรรยาบรรณการเลี้ยงสัตว์ทดลอง ในการฉีดกระตุ้นให้หนูขาวสร้างแอนติบอดีจะฉีดไวเทลโลเจนินเข้าทางช่องท้องของหนูขาว และมีการเจาะเลือดที่บริเวณปลายหาง การเก็บม้ามของหนูทำโดยสลบหนูขาวด้วยไอโซฟลูราน (isoflurane) และส่วนที่เหลือของหนูจะส่งให้เจ้าหน้าที่ห้องทดลองส่งทำลายตามมาตรฐานจรรยาบรรณการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

<u>สัตว์น้ำ</u>

สัตว์ทะเล ได้แก่ ปลากะพงขาว ปลากะรัง และปูม้า โดยปลากะพงขาวที่นำมาใช้ในการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย 200-500 กรัม ได้มาจากฟาร์มทะเลทอง ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี นำมาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด 5 ตัน ที่ความเค็มเช่นเดียวกับความเค็มในแหล่งเลี้ยง ส่วนปลากะรัง น้ำหนัก 50-200 กรัม ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาและสถานที่ทำการทดลองโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาประมง

ชายฝั่งตราด อ.เมือง จ.ตราด และปูม้า ขนาด 65-120 กรัม ได้จากการประมงอวนลอยปูม้า บริเวณหาดวอนนภา อ.เมือง จ.ชลบุรี นำมาเลี้ยงในตู้กระจก ขนาด 18 X 32 X 16 นิ้ว ที่ความเค็ม 30

สัตว์น้ำจืดได้แก่ ปลานิล ขนาด 50-200 กรัม ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาและสถานที่ทำการทดลองโดย สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

โดยนำสัตว์น้ำมาเลี้ยงในห้องทดลองเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งสัตว์น้ำแต่ละชนิดจะได้รับอาหารวันละ 1 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาฉีดฮอร์โมน 17β-estradiol 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 3 วัน หลังจากการฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 3 วัน นำสัตว์น้ำมาสลบ และเก็บเลือดปลาหรือฮีโมลิมพ์ของปู และจัดการกับส่วนที่เหลือของสัตว์น้ำโดยการนำใส่ถุงพลาสติกและส่งไปกำจัดพร้อมขยะติดเชื้อ

1.5 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตราด อ.เมือง จ.ตราด

ฟาร์มทะเลทอง ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี

บ่อเลี้ยงปลา คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวเทลโลเจนินได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการรับสัมผัสสาร xenoestrogen อย่างแพร่หลาย โดยโปรตีนไวเทลโลเจนิน จะมีรูปแบบจำเพาะในปลาแต่ละชนิด และจำเป็นต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะสำหรับปลาแต่ละชนิดในการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกัน (Hansen และคณะ, 1998) จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้มีการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะไวเทลโลเจนินในปลาชนิดต่าง ๆ และการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปตรวจสอบการรับสัมผัสสาร xenoestrogen ในปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือการทดสอบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาทดลองชนิดต่าง ๆ (Codi King และคณะ, 2008; Eidem และคณะ, 2006; Nishi และคณะ, 2002)

Hock และคณะ (2001) ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะไวเทลโลเจนินในปลาเรนโบว์เทราท์ การศึกษาพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีค่า detection limit เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ปลา Roach (*Rutilus rutilus*) ปลา Flounder (*Platichthys flesus*) และ Dab (*Limanda limanda*) จากนั้นจึงได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไปตรวจสอบปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ได้รับน้ำเสียจากแหล่งที่ปล่อยน้ำทิ้ง ความเข้มข้น 10%, 20%, 30% และ 40% เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ด้วยวิธี Enzyme immunoassay เปรียบเทียบกับในปลาที่ไม่ได้รับสารพบว่าปลาเพศผู้ที่ได้รับน้ำเสียมีการสร้างไวเทลโลเจนิน โดยการเพิ่มขึ้นของไวเทลโลเจนินสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของน้ำเสีย

Nishi และคณะ (2002) ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c ด้วยไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของปลา Japanese medaka ที่ได้รับสาร 17β-estradiol พบว่าไวเทลโลเจนินในปลา Japanese medaka มีขนาด 200 กิโลดาลตัล จากนั้นจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบด้วยเทคนิค Sandwich ELISA เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไวเทลโลเจนิน พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ตั้งแต่ความเข้มข้นไวเทลโลเจนินเท่ากับ 1-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบ dilution test พบว่ากราฟความเข้มข้นไวเทลโลเจนินเป็นเส้นตรง และการหา %recovery ของไวเทลโลเจนินโดยการเติมไวเทลโลเจนินที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้นต่าง ๆ ในไวเทลโลเจนินจากพลาสมาที่ปลา Japanese medaka สร้างขึ้น มีค่าเท่ากับ 92-111% การศึกษาไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและตับพบว่าหลังจากที่ปลาได้รับสาร 17β-estradiol (10 นาโนกรัมต่อลิตร) สามารถพบไวเทลโลเจนินในตับและพลาสมาได้ตั้งแต่วันแรกและสูงสุดในวันที่ 3- 5 โดยมีแนวโน้มของปริมาณเช่นเดียวกัน แต่ในพลาสมาจะพบปริมาณมากกว่าในตับ

Van den Belt และคณะ (2003) ทดสอบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลา zebrafish และปลาเรนโบว์เทร้าท์ ที่ได้รับสารกระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนินผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยง คือ 4-nonylphenol (20, 100 และ 500 นาโนกรัมต่อลิตร) สาร Bisphenol (40, 200 และ 1000 นาโนกรัมต่อลิตร) สาร

dibutylphthalate (40, 200 และ 1000 นาโนกรัมต่อลิตร) และ 17β-estradiol (20 และ 100 นาโนกรัมต่อลิตร) การตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบมีการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาที่ได้รับสารทุกชนิดที่ทุกความเข้มข้น ยกเว้นสาร dibutylphthalate ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อลิตร ไม่พบการสร้างไวเทลโลเจนิน ซึ่งพบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลา zebrafish น้อยกว่าปลาเรนโบว์เทร้าท์ ที่ได้รับสาร 4-nonylphenol ประมาณ 5 เท่า ส่วนในสาร อื่น ๆ ไม่แตกต่างกัน การทดสอบด้วยเทคนิค Western blot พบว่าไวเทลโลเจนินในปลาทั้งสองมีโปรตีน 2 แถบ ขนาดประมาณ 193, 134 กิโลดาลตัล และ 177, 138 กิโลดาลตัล ตามลำดับ

Watt และคณะ (2003) ศึกษาการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้ 3 ชนิดคือ ปลา Atlantic salmon ปลา Greenback flounder และปลาเรนโบว์เทร้าท์ ที่ได้รับสาร 17β-estradiol ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ในปลา Atlantic salmon และปลา Greenback flounder มี 3 แถบโปรตีน คือ 159, 117, 86 กิโลดาลตัล และ 155, 104, 79 กิโลดาลตัล ตามลำดับ ส่วนในปลาเรนโบว์เทร้าท์พบโปรตีนขนาด 154 กิโลดาลตัล เท่านั้น จากนั้นจึงนำแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลมากที่สุดในปลาแต่ละชนิด มาฉีดกระตุ้นในแกะเพื่อให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน ซึ่งแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนทุกขนาด ส่วนการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าแอนติบอดีที่ได้ไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาปลาเพศผู้ที่ไม่ได้รับสาร 17β-estradiol แสดงว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะมากและสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับปลาแซลมอนได้อีก 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่าการแยกขนาดไวเทลโลเจนินบน SDS-PAGE แล้วตัดแถบโปรตีนขนาดที่คาดว่าจะเป็นไวเทลโลเจนินจากแผ่นเจลมาเป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับไวเทลโลเจนินได้

Arukewe และ Meucci (2005) ศึกษาการสร้างไวเทลโลเจนินและโปรตีน zona radiata (Zr-protein) ในพลาสมาของปลาเพศผู้ และปลาวัยอ่อนที่มีการสืบพันธุ์ด้วยการวางไข่ เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดการรับสัมผัสสารเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยให้ปลา Atlantic salmon ได้รับสาร nonylphenol ผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงความเข้มข้น 5, 15 และ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นนำพลาสมาและmucus มาตรวจสอบการสร้างไวเทลโลเจนินและ Zr-protein ด้วยเทคนิค western blot และ ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลา Arctic charr และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Zr-protein จากปลา Atlantic salmon พบว่าระดับไวเทลโลเจนินและ Zr-protein ในพลาสมาและ mucus มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ nonylphenol และระยะเวลาที่ได้รับสาร โดยไวเทลโลเจนินในปลา Atlantic salmon พบว่ามีขนาด 180 กิโลดาลตัล

An และคณะ (2007) ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลา Crucian carp (*Carassius carassius*) พบว่าไวเทลโลเจนินในปลา Crucian carp มีขนาด 149.4 กิโลดาลตัล ค่า antibody titer เท่ากับ 10^5-10^6 และค่าคงที่ affinity เท่ากับ $7x10^8$ ลิตรต่อโมลาร์ ซึ่งแสดงว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความไวและความจำเพาะสูง การทดสอบด้วยเทคนิค Sandwich ELISA พบว่ามี

ค่า detection limit เท่ากับ 0.98 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบได้ในปลากลุ่ม Cyprinids เช่น ปลา minnow, zebrafish และ ปลา carp จากนั้นจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาที่ได้รับน้ำทิ้งจากการบำบัดของโรงบำบัดน้ำเสีย Gaobeidian พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินในปลา crucian carp วัยอ่อนสูงขึ้น โดยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับ และความเข้มข้นของไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้ที่อยู่ในแหล่งน้ำได้รับน้ำทิ้งเท่ากับ 888.62 ±827.73 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในบริเวณควบคุมไม่สามารถตรวจวัดปริมาณของไวเทลโลเจนินได้

Codi King และคณะ (2008) ได้ศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลา Barramundi และปลา Black bream เพศผู้ที่ได้รับ 17β-estradiol เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2.5-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA และ Western blot ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาทั้งสองชนิดที่ได้รับ 17β-estradiol สูงกว่าในปลาชุดควบคุม ซึ่งในปลา Black bream ปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้และเพศเมียไม่แตกต่างกัน ส่วนการตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot พบว่าไวเทลโลเจนินในปลาทั้งสองมีขนาดประมาณ 100-200 กิโลดาลตัล ซึ่งการทดลองชี้ให้เห็นว่าการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้ทั้งสองชนิดสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดในการรับสัมผัสสารประกอบเอสโตรเจนได้

Lou และคณะ (2011) ได้พัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้วัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลา Chinese rare minnow ที่ได้รับผลกระทบจากสาร endocrine disrupting chemicals ในสิ่งแวดล้อม โดยนำไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลาที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol (E_2) มาทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกระต่ายและหนูขาวสายพันธุ์ BALB/c เทคนิค competitive ELISA ที่พัฒนาได้จากแอนติบอดีทั้งสองชนิดสามารถนำมาวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมา มีค่าที่วัดได้อยู่ต่ำกว่า 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้มีความไวสูงและสามารถนำมาใช้วัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลา rare minnow ได้

Garnayak และคณะ (2013) ได้ศึกษาไวเทลโลเจนินใน Asian catfish (*Clarias batrachus*) เพศผู้ที่ได้รับการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ขึ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol (2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว) ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย EDTA-$MgCl_2$ และคอลัมน์โครมาโตกราฟี Sephacryl-S300-HR นำโปรตีนไปผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี และนำมาตรวจสอบปริมาณไวเทลโลเจนินในตัวอย่างพลาสมาปลาด้วยเทคนิค competitive ELISA ได้ค่าเหมาะสมในการตรวจสอบได้ เป็น 7.8-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลาในช่วงระยะของการสร้างไข่ในช่วงปีในปลา Asian catfish เพศเมีย ได้อยู่ในค่าเฉลี่ย 2,187.51 ± 228.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วง 1 เดือนก่อนการวางไข่ในเดือนพฤษภาคม

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี จำนวน 11 โคลน ที่ได้จากพอจิต นันทนาวัฒน์ นันทิกา คงเจริญพร และศุภกิจ ศรีสวัสดิ์ (2558) มาตรวจสอบความจำเพาะกับไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวที่ได้รับการชักนำด้วย 17β-estradiol หรือสารเคมีชนิดอื่น ๆ รวมทั้งทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่น ๆ ที่ได้รับการชักนำด้วย 17β-estradiol ตามวิธีการทดลอง ดังนี้

3.1 การตรวจสอบลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาวกับไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับการชักนำให้เกิดด้วย 17β-estradiol

3.1.1 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยพิจารณาจากค่า detection limit ของแอนติบอดี เตรียมไวเทลโลเจนินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.1 – 1,000 µg/ml นำมาทดสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีด้วยวิธี Dot blot และ ELISA เพื่อดูระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ในแต่ละเทคนิค

ก. เทคนิค Dot Blot

นำไวเทลโลเจนินมาเจือจางแบบ serial dilution แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสทิ้งไว้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย 10% formalin ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง นำไปแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาบ่มใน culture media ของแต่ละโคลน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที บ่มต่อใน GAM-HRP เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS จากนั้นนำมาใส่ในสารละลายสับสเตรท ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ตรวจผลบวกที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจจับได้

ข. เทคนิค ELISA

เติมไวเทลโลเจนิน 100 µl ลงแต่ละหลุมใน Microtiter plate บ่มที่อุณหภูมิ 4 เซลเซียสข้ามคืน ล้างเพลท ด้วย 0.5% blotto เติมในสารละลาย 5% blotto หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาบ่มใน culture media ของแต่ละโคลน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้งๆละ 5 นาที บ่มต่อใน GAM-HRP เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรท ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.0 หลุมละ 100 µl เป็นเวลา 15 นาที เติมกรดไฮโดรคลอริก หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ

เอนไซม์ จากนั้นนำเพลทมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ตรวจผลบวกที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจจับได้

3.1.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot

ทำการแยกไวเทลโลเจนินใน 7.5 % SDS-PAGE จากนั้นนำเจลที่แยกโปรตีนแล้วถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มในโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto บ่มใน GAM-HRP 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto และบ่มในสารละลาย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2, 0.05% $CoCl_2$ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง ตรวจดูแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีแต่ละตัว คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

3.1.3 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบนเนื้อเยื่อโดยวิธี Immunohistochemistry

นำตัวอย่างตับ เหงือก และลำไส้ของปลาที่ถูกชักนำให้สร้างไวเทลโลเจนิน แช่ใน 10% formalin ล้างน้ำ และดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยแช่ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน บิวทานอล และในไซลีน จากนั้นฝังในพาราฟิน ตัดเป็นชิ้น ๆ มีความหนา 5 ไมครอน ติดเนื้อเยื่อตับ เหงือก แลลำไส้ลงบนสไลด์ นำไปอบให้แห้ง

นำสไลด์เนื้อเยื่อมาละลายพาราฟินออก และนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (rehydrate) จากนั้นบ่มด้วย 10% fetal calf serum และบ่มด้วย MAb แต่ละโคลน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วย PBS จากนั้นบ่มด้วย GAM-HRP เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำการแช่สไลด์ในสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2, เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยนำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ย้อมสี H&E และทำสไลด์ถาวร

3.2 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวที่ได้รับการชักนำให้เกิด VTG ด้วย สารเคมีชนิดอื่นด้วยเทคนิค western blot

นำปลากะพงขาววัยอ่อนความยาวเฉลี่ย 10 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 11.5 กรัม มาเลี้ยงในห้องทดลองเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ในตู้กระจกขนาด 18 X 32 X 16 นิ้ว ปริมาณน้ำ 30-40 ลิตร แบ่งปลาออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มควบคุม 2) กลุ่มทดลองที่ได้รับโนนิลฟีนอล (25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) 3) กลุ่มทดลองที่ได้รับเบนโซเอไพรีน (0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) และ 4) กลุ่มทดลองที่ได้รับแคดเมียมคลอไรด์ (0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) เก็บตัวอย่างเลือดปลา ก่อนเริ่มทำการทดลอง และหลังจากได้รับการฉีดกระตุ้นในวันที่ 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 ของการทดลอง เพื่อนำมาตรวจสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิค western blot

3.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลาชนิดต่าง ๆ ที่ได้รับการชักนำให้เกิด VTG ด้วย 17β-estradiol

ทำการชักนำให้ปลาน้ำจืด ปลาทะเล ชนิดอื่น ได้แก่ ปลานิลและปลาเก๋าปะการัง สร้างโปรตีนไวเทลโลเจนิน โดยการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol จากนั้นนำพลาสมาหรือเนื้อเยื่อของปลามาทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ผลิตได้โดยวิธี dot-blot, western blot และ immunohistochemistry

3.3.1 การทดสอบกับไวเทลโลเจนินในปลานิล

นำปลานิล (*Oreochromis niloticus*) น้ำหนัก 20-25 กรัม ปรับสภาพการเลี้ยงปลานิลในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแบ่งปลานิลออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดสารกระตุ้นใดๆ 2) กลุ่มควบคุมที่ฉีดตัวทำละลายฮอร์โมน และ 3) กลุ่มทดลองที่ฉีดฮอร์โมน 17β-estradiol ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยทำการฉีดกระตุ้นปลาในแต่ละกลุ่ม ทุก ๆ 6 วัน จำนวน 3 ครั้ง เป็นระยะเวลา 18 วัน (ฉีดกระตุ้นวันที่ 0, 6 และ 12 หลังการเก็บตัวอย่างเลือดปลา) การเก็บตัวอย่างเลือดปลาจะทำการเก็บทุกๆ 3 วัน ก่อนการฉีดกระตุ้น โดยเริ่มเก็บตัวอย่างเลือดตั้งแต่ก่อนฉีดครั้งแรก (วันที่ 0) จนถึงครั้งสุดท้าย และหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 3 และ 6 วัน เก็บเลือดปลา ปั่นแยกพลาสมา และเก็บตับ เหงือก และลำไส้ของปลามาแช่ใน 10% formaldehyde ใน PBS เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อนำไปเตรียมเนื้อเยื่อให้มีความหนา 8 ไมครอน สำหรับนำไปตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนต่อไป ด้วยเทคนิค western blot, dot blot, ELISA และ immunohistochemistry

3.3.2 การทดสอบกับไวเทลโลเจนินในปลาเก๋าปะการัง

นำปลาเก๋าปะการัง (*Epinephelus corallicola*) น้ำหนักเฉลี่ย 80-100 กรัม จำนวน 10 ตัว ปรับสภาพการเลี้ยงปลาเก๋าปะการังในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแบ่งปลาออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุมฉีดตัวทำละลายฮอร์โมน 3 ตัว และกลุ่มทดลองฉีดฮอร์โมน 17β-estradiol 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จำนวน 7 ตัว เก็บเลือดปลากลุ่มควบคุมก่อนทำการฉีดฮอร์โมน จากนั้นทำการฉีดกระตุ้นปลานิลด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol หรือตัวทำละลายฮอร์โมน ทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 3 วัน เก็บเลือดปลา ปั่นแยกพลาสมา และเก็บตับ เหงือก และลำไส้ของปลามาแช่ใน 10% formaldehyde ใน PBS เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อนำไปเตรียมเนื้อเยื่อให้มีความหนา 8 ไมครอนสำหรับนำไปตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนต่อไป ด้วยเทคนิค western blot, dot blot, ELISA และ immunohistochemistry

3.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในสัตว์ทะเลชนิดอื่น ที่ได้รับการชักนำให้เกิด VTG ด้วย 17β-estradiol

นำปูม้า (*Portunus pelagicus*) น้ำหนัก 65-120 กรัม ปรับสภาพการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแบ่งปูม้าออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดสารกระตุ้นใดๆ 2) กลุ่มควบคุมที่ฉีดตัวทำละลายฮอร์โมน และ 3) กลุ่มทดลองที่ฉีดฮอร์โมน 17β-estradiol ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยทำการฉีดกระตุ้นปูม้าแต่ละกลุ่ม ทุก ๆ 3 วัน จำนวน 4 ครั้ง และหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 3 วัน เก็บฮีโมลิมพ์ ปั่นแยกพลาสมา นำไปตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค western blot

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการตรวจสอบลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน (MAb- sea bass VTG) ที่ผลิตได้จาก พอจิต นันทนาวัฒน์ และคณะ (2559) จำนวน 11 โคลน มาตรวจสอบลักษณะสมบัติของแอนติบอดีแต่ละโคลน ได้ผลการทดลอง ดังนี้

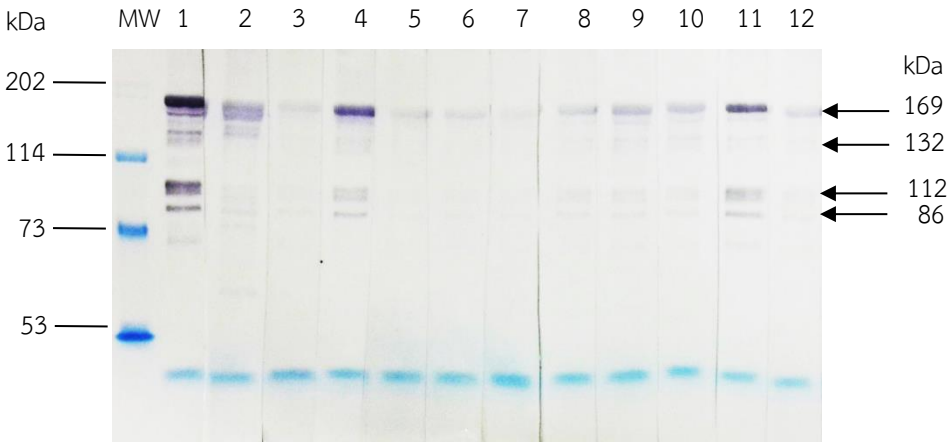
4.1.1 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 11 โคลนด้วยเทคนิค Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 11 โคลนมีความจำเพาะกับไวเทลโลเจนินโดยไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นในเลือดปลา อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนมีความไวในการทำปฏิกิริยากับไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (4 ไมโครกรัม) ที่อัตราการเจือจางต่างกัน ดังตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-1 จากผลการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Western blot จึงทำการเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่มีความไวสูง จำนวน 4 โคลน คือ MAb-sea bass VTG 18, MAb-sea bass VTG 37, MAb-sea bass VTG 41, และ MAb-sea bass VTG 23 มาใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีแบบอื่น ๆ ต่อไป

ตารางที่ 4-1 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน

ที่	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว (MAb-sea bass VTG)	กำหนดชื่อโคลนเป็น*	ได้จากการหลอมเซลล์ครั้งที่	Isotyping	อัตราการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับ Western blot
1	18-7G, 18-6G	MAb-sea bass VTG 18	1	IgG1	1:10,000
2	37-1F	MAb-sea bass VTG 37	1	IgG1	1:5,000
3	41-7G, 41-10G	MAb-sea bass VTG 41	1	IgG2b	1:10,000
4	1-7C	MAb-sea bass VTG 1	2	IgM	1:10
5	42-7D, 42-12C	MAb-sea bass VTG 42	2	IgG2b	1:10
6	46-11G	MAb-sea bass VTG 46	2	IgG2b	1:10
7	F3-18-2D, F3-18-2F, F3-18-2G	MAb-sea bass VTG F3-18	3	IgG1	1:100
8	F3-19-5B, F3-19-5D, F3-19-4C	MAb-sea bass VTG 19	3	IgG2a	1:100
9	F3-20-7C, F3-20-8C, F3-20-9C	MAb-sea bass VTG 20	3	IgG1	1:100
10	F3-23-3C, F3-23-2D, F3-23-1A	MAb-sea bass VTG 23	3	IgG1	1:100-1:1,000
11	F3-35-7B, F3-35-7C	MAb-sea bass VTG 35	3	IgG1	1:100

* เนื่องจากเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนเดียวกัน จึงกำหนดชื่อเรียกแทนโคลนต่าง ๆ เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้ประโยชน์



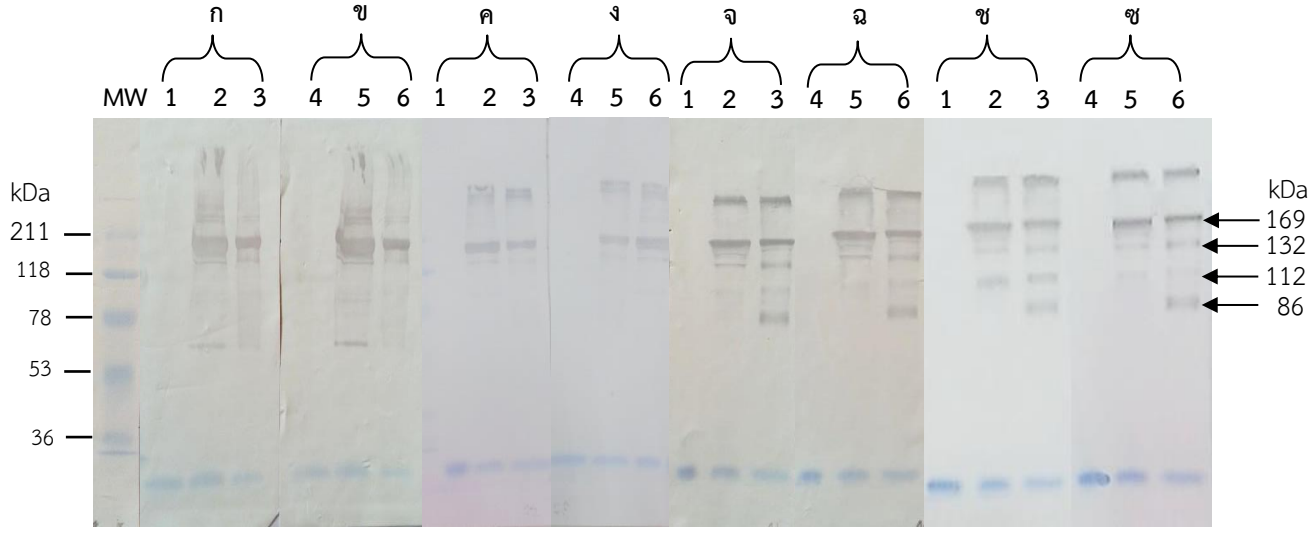
ภาพที่ 4-1 การทดสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม) ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวแต่ละโคลนเปรียบเทียบกับโพลิโคลนอลแอนติบอดี ดังนี้

ช่องที่ 1 PAb-sea bass VTG (1:10,000)
ช่องที่ 2 MAb-sea bass VTG 18 (1:10,000)
ช่องที่ 3 MAb-sea bass VTG 37 (1:5,000)
ช่องที่ 4 MAb-sea bass VTG 41 (1:10,000)
ช่องที่ 5 MAb-sea bass VTG 1 (1:10)
ช่องที่ 6 MAb-sea bass VTG 42 (1:10)
ช่องที่ 7 MAb-sea bass VTG 46 (1:10)
ช่องที่ 8 MAb-sea bass VTG F3-18 (1:100)
ช่องที่ 9 MAb-sea bass VTG 19 (1:100)
ช่องที่ 10 MAb-sea bass VTG 20 (1:100)
ช่องที่ 11 MAb-sea bass VTG 23 (1:1,000)
ช่องที่ 12 MAb-sea bass VTG 35 (1:100)

4.1.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Western blot

การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อยืนยันว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับไวเทลโลเจนิน โดยไม่จับกับโปรตีนที่พบทั่วไปในพลาสมาของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เพื่อดูดซับโปรตีนทั่วไปในพลาสมาก่อน จากนั้นจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นมาใช้ตรวจสอบกับพลาสมาปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พลาสมาปลาหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol และไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค Western blot พบว่าทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสมพลาสมาปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับโปรตีนทั่วไปที่พบในพลาสมา ไม่ปรากฏแถบโปรตีนสีน้ำตาลดำเมื่อทดสอบกับพลาสมาปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ส่วนในพลาสมาปลากะพงขาวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol และไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวที่

ผ่านการทำบริสุทธิ์ ปรากฏแถบโปรตีนหลักสีน้ำตาลเทา 4 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 169, 132, 112 และ 86 กิโลดาลตัน โดยแถบโปรตีนขนาด 169 กิโลดาลตัน สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนมากที่สุด จึงอาจกล่าวได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 169 กิโลดาลตัน มากที่สุดดังแสดงในภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับโปรตีนทั่วไปที่พบในพลาสมา ได้แก่ MAb-sea bass VTG 18 (ก), MAb-sea bass VTG 37 (ค), MAb-sea bass VTG 41 (จ) และ MAb-sea bass VTG 23 (ช) และทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี MAb-sea bass VTG 18 (ข), MAb-sea bass VTG 37 (ง) MAb-sea bass VTG 41 (ฉ) และ MAb-sea bass VTG 23 (ซ) โดยที่

ช่องที่ 1 และ 4 พลาสมาปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมน (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 2 และ 5 พลาสมาปลากะพงขาวหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 3 และ 6 ไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

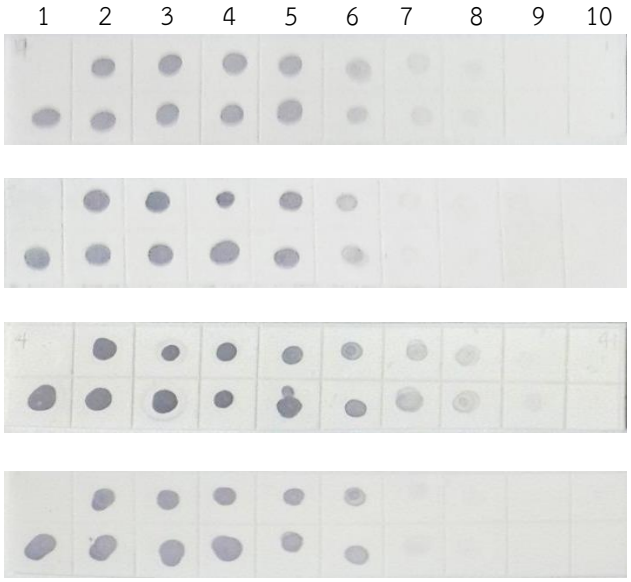
4.1.3 ผลการทดสอบความจำเพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Dot blot

การทดสอบระดับการเจือจางไวเทลโลเจนินที่เหมาะสมโดยเทคนิค Dot blot สำหรับการตรวจสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนคือ MAb-sea bass VTG 18 (1:10,000) MAb-sea bass VTG 41 (1:10,000) MAb-sea bass VTG 37 (1:5,000) และ MAb-sea bass VTG 23 (1:1,000) โดยทำการเจือจางไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เข้มข้นตั้งแต่ 0.0039 ไมโครกรัม ถึง 2 ไมโครกรัม พบว่า MAb-sea bass VTG 41 มีความไวในการทดสอบด้วยเทคนิค Dot blot มากที่สุด เนื่องจากสามารถจับกับไวเทลโลเจนินได้ที่ระดับการเจือจางไวเทลโลเจนินตั้งแต่ 2- 0.0312 ไมโครกรัม ในขณะที่ MAb-sea bass VTG 18, 37 และ 23 สามารถจับกับไวเทลโลเจนินได้ที่ระดับการเจือจางไวเทลโลเจนินตั้งแต่ 2- 0.125 ไมโครกรัม (ภาพที่ 4-3) ซึ่งสามารถเลือกใช้ระดับการเจือจางโปรตีนในช่วงดังกล่าวสำหรับทดสอบด้วย Dot blot โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ตามความเหมาะสมต่อไป

(ก)

	ไวเทลโลเจนินความเข้มข้นต่างๆ (1µl/ช่อง) (ไมโครกรัม)										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
	Negative control	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039
	Positive control	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039

(ข)

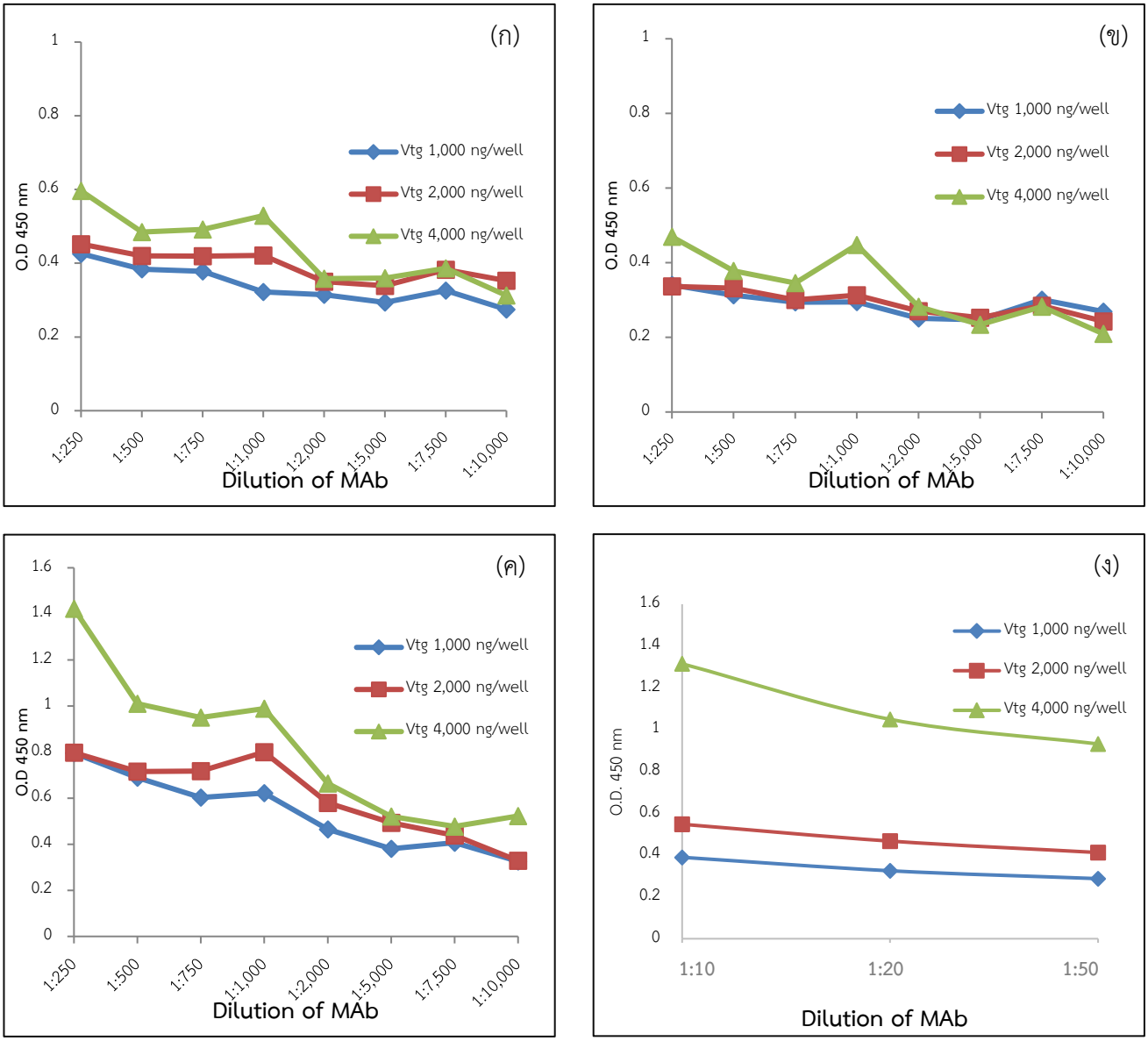


ภาพที่ 4-3 การทดสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ปริมาณโปรตีน 0.0039 ถึง 2 ไมโครกรัม ตามผังการหยดแอนติเจน (ก) ด้วยเทคนิค Dotblot โดยใช้ MAb-sea bass VTG แต่ละโคลน (ข)

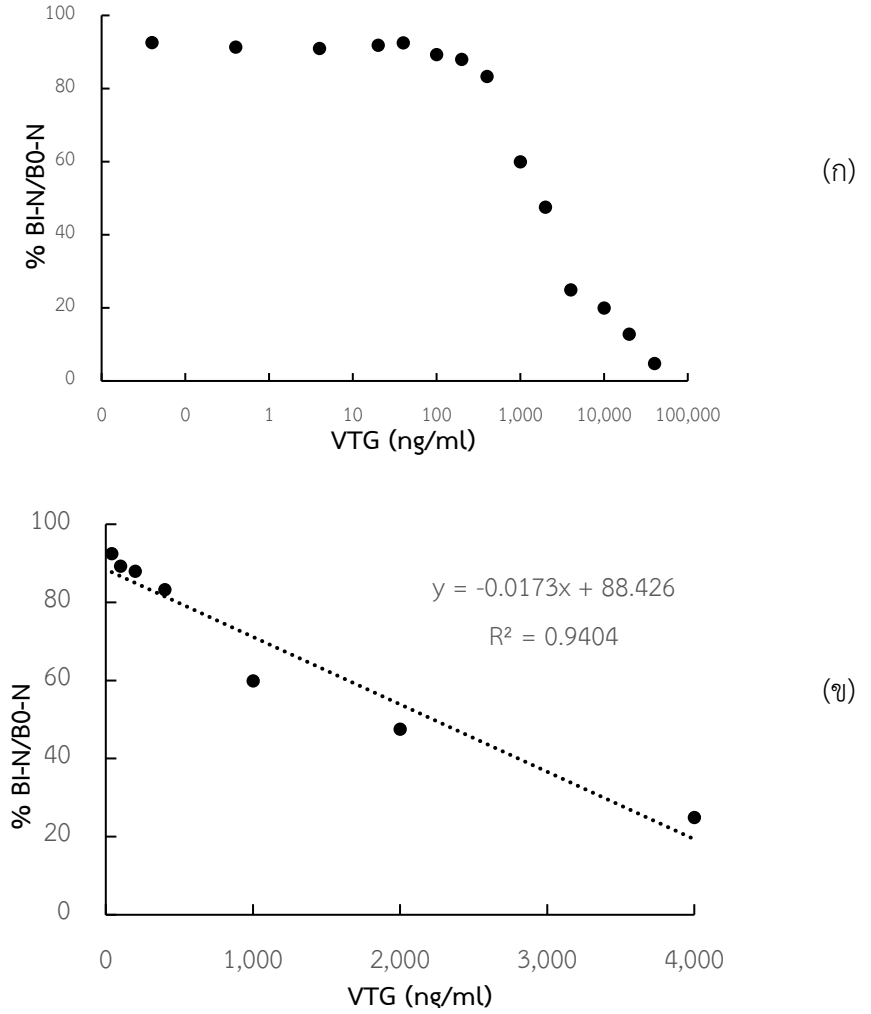
4.1.4 การทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค ELISA

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาเทคนิค ELISA แบบที่เคลือบเพลทด้วยแอนติเจน สำหรับการตรวจสอบไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว พบว่า MAb-sea bass VTG 41 มีความไวในการตรวจสอบสูงที่สุด เมื่อใช้ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2,000-4,000 นาโนกรัมต่อหลุม เคลือบเพลท โดยใช้ MAb-sea bass VTG 41 เจือจาง 1:500 และ GAM-HRP เจือจาง 1:10,000 ซึ่งผลจากสภาวะที่ใช้ในการทดสอบดังกล่าวทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเข้าใกล้ 1 มาก ซึ่งเป็นช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมมากที่สุดดังภาพที่ 4-4 (ค)

เมื่อนำ MAb-sea bass VTG 41 มาพัฒนาการตรวจสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิค ELISA แบบ competitive พบว่าสามารถตรวจสอบปริมาณไวเทลโลเจนินได้ในช่วงความเข้มข้น 40-4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานไวเทลโลเจนินแบบเส้นตรง ดังแสดงในภาพที่ 4-5 (ก) และ (ข) โดยมีค่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์ระหว่างเพลท (inter-assay) เท่ากับ 11.46% (n=6) และค่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์ในเพลทเดียวกัน (intra-assay) เท่ากับ 4.51% (n=6)



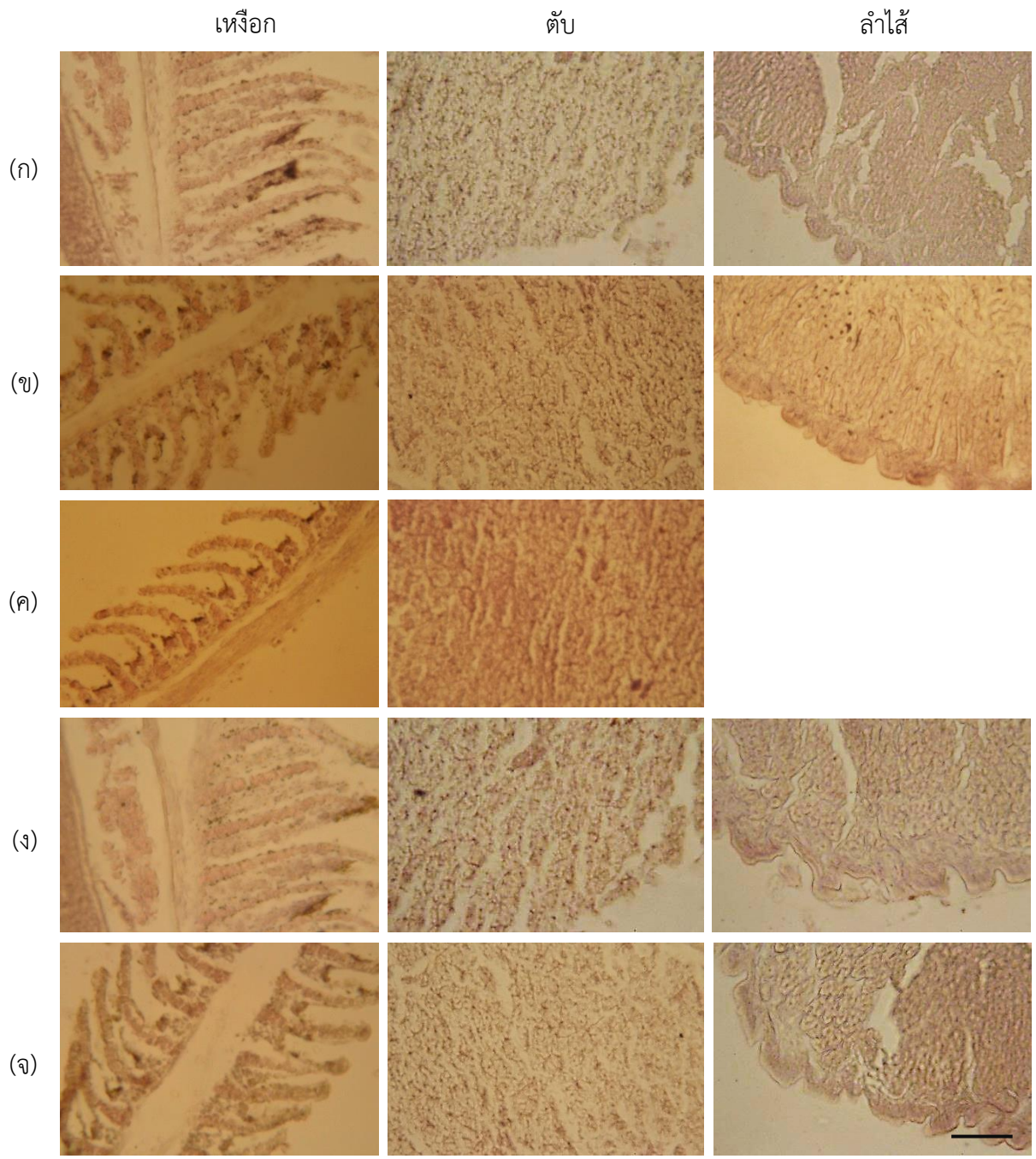
ภาพที่ 4-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับการเจือจางแอนติบอดี โดยใช้ระดับความเข้มข้นของแอนติเจนเคลือบเพลท 1,000-4,000 นาโนกรัมต่อหลุม โดยใช้แอนติบอดี 4 โคลน คือ MAb-sea bass VTG 18 (ก) MAb-sea bass VTG 37 (ข) MAb-sea bass VTG 41 (ค) และ MAb-sea bass VTG 23 (ง)



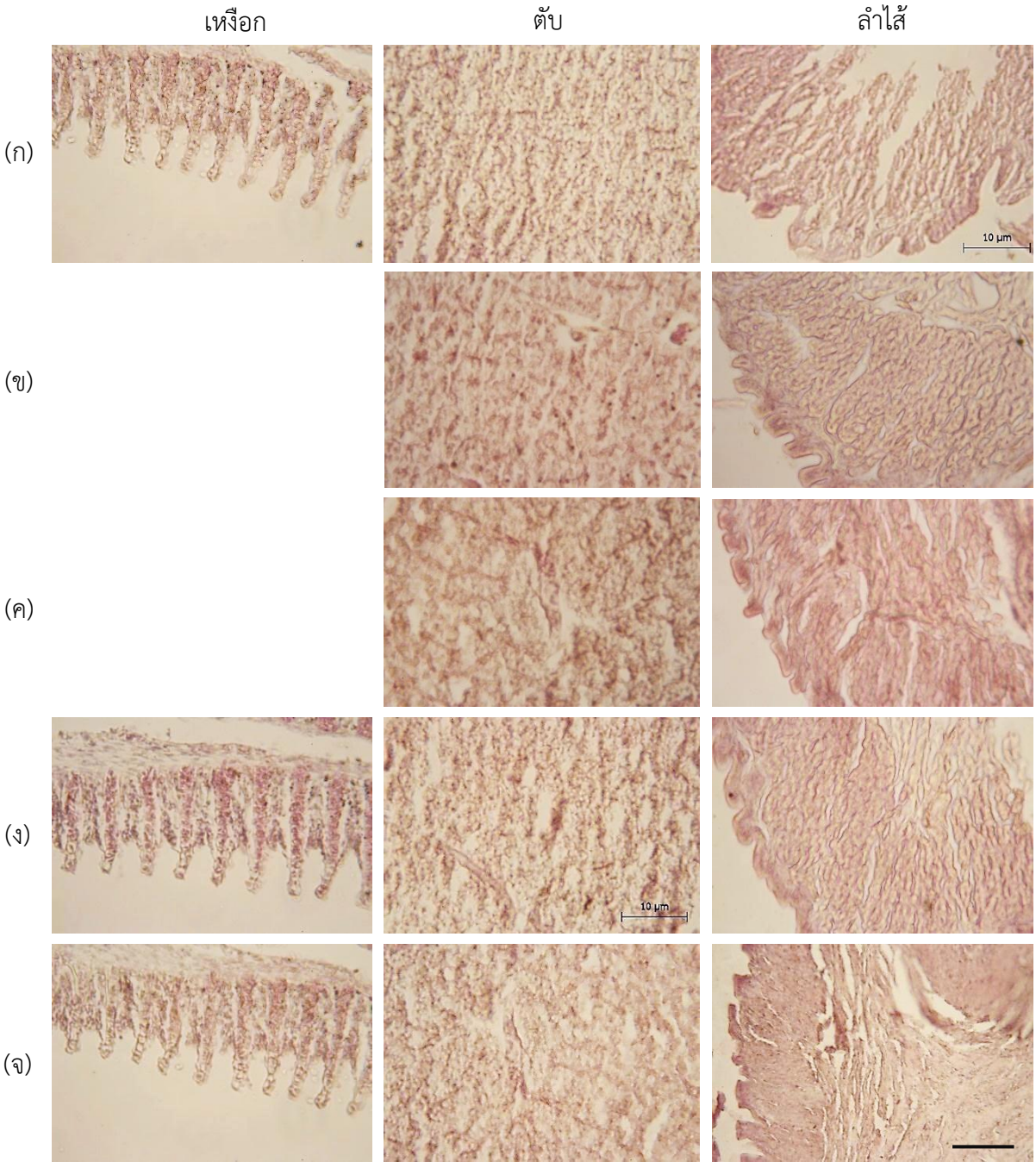
ภาพที่ 4-5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณไวเทลโลเจนินจากการทดสอบด้วยเทคนิค ELISA แบบ Competitive โดยใช้ระดับความเข้มข้นของแอนติเจนเคลือบเพลท 2,000 นาโนกรัมต่อหลุม ระดับการเจือจางของ MAb-sea bass VTG 41 เท่ากับ 1:500 และ GAM-HRP 1:10,000 แบบ logarithmic scale (ก) และกราฟมาตรฐานแบบ linear scale (ข)

4.1.5 การทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมมิสตรี

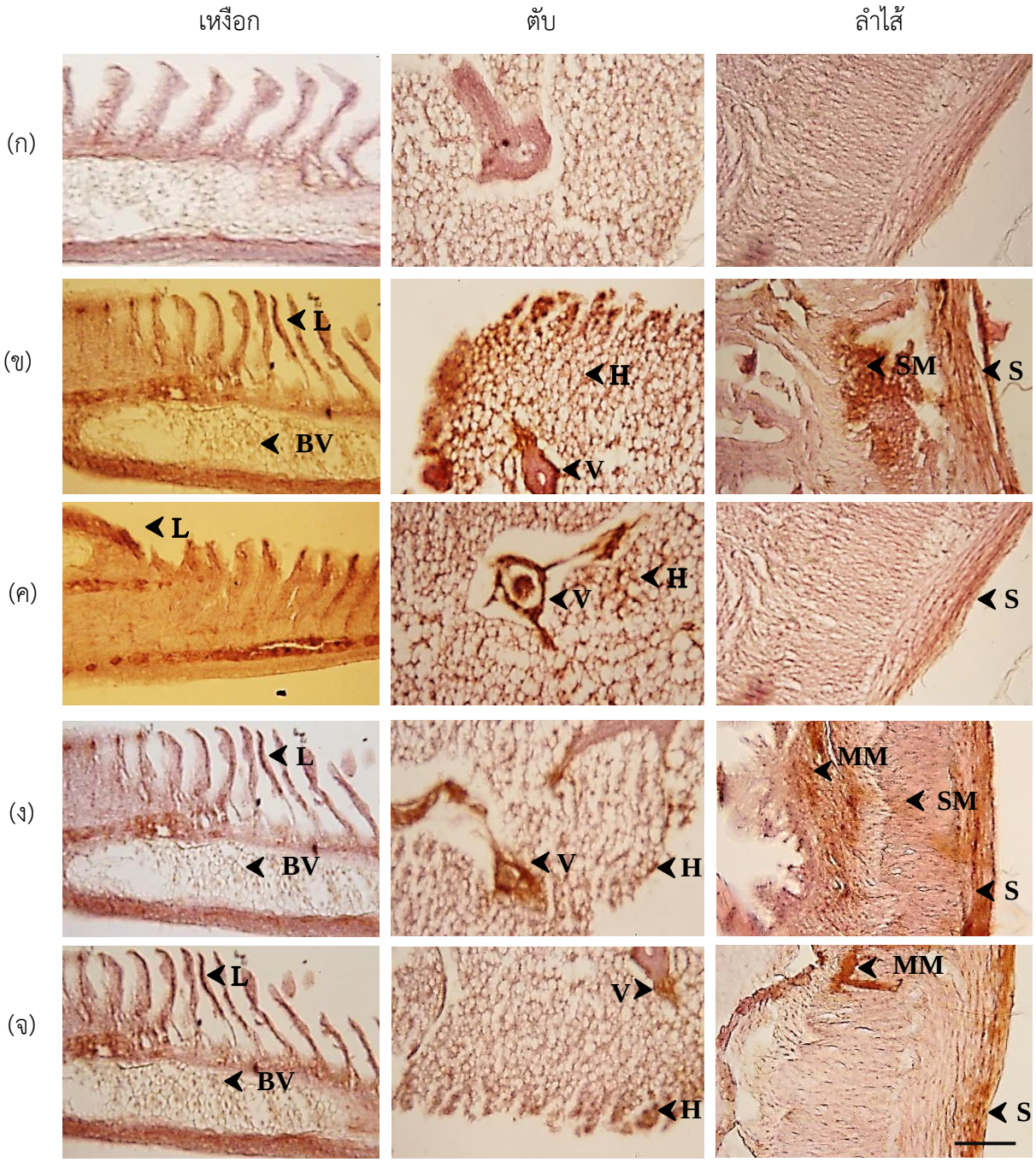
การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในเนื้อเยื่อของปลากะพงขาว ได้แก่ เนื้อเยื่อเหงือก ตับ และลำไส้ พบว่าเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 18 (1:50), 37 (1:50), 41 (1:5) และ 23 (1:50) ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร และกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน ไม่พบการแสดงผลของปฏิกิริยาสีน้ำตาล มีเพียงกลุ่มทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol ปริมาณ 2 mg/kg BW ที่แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินพบปฏิกิริยาสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อ คือ เนื้อเยื่อตับเกิดสีน้ำตาลเข้มที่เซลล์ตับ (hepatocytes) และไซนูซอยด์ (sinusoid) ลำไส้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเข้มบริเวณชั้นซีโรซา (serosa) ชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) และชั้นมัสคิวลาริส มิวโคซา (muscularis mucosa) และเหงือกเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเข้มบริเวณลาเมลลา (gill lamella) และเส้นเลือดภายในเหงือก (blood vessels) ดังแสดงในภาพที่ 4-6 ถึง 4-8



ภาพที่ 4-6 การตรวจสอบเนื้อเยื่อปลากะพงขาวโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร (Control) ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 18 (ข), 37 (ค) , 41 (ง) และ 23 (จ)



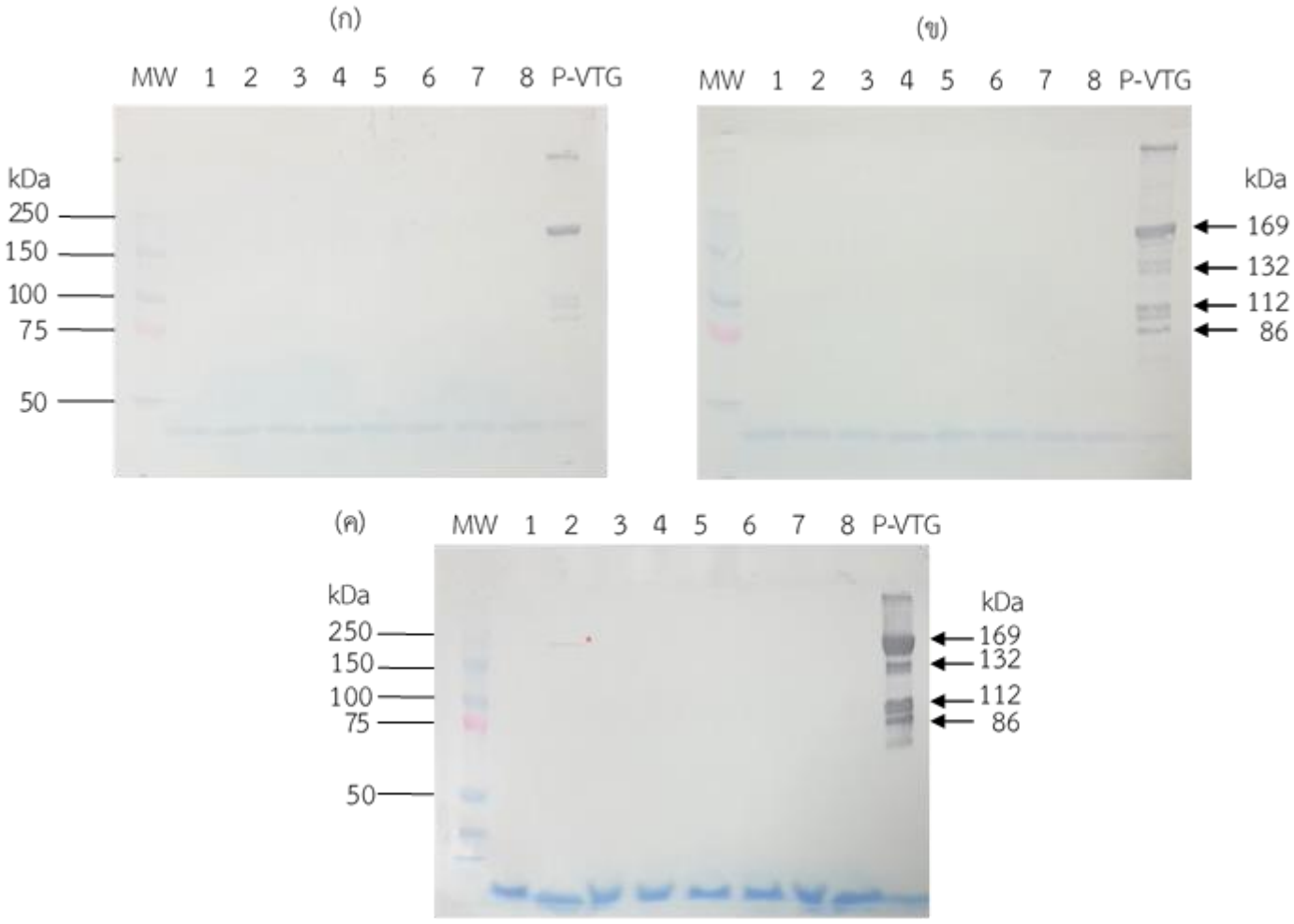
ภาพที่ 4-7 การตรวจสอบเนื้อเยื่อปลากะพงขาวโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (Vehicle control) ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 18 (ข), 37 (ค) , 41 (ง) และ F3-23 (จ)



ภาพที่ 4-8 การตรวจสอบเนื้อเยื่อปลากะพงขาวโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลากะพงขาวที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 18 (ข), 37 (ค) , 41 (ง) และ F3-23 (จ) โดย Scale bar มีขนาดเท่ากับ 10 ไมโครเมตร L=gill lamella, BV=blood vessels, H = hepatocytes, V = blood vein, SI= sinusoid, S = serosa, SM = submucosa, MM = muscularis mucosa

4.2 ผลการตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวที่ได้รับการชักนำให้เกิด VTG ด้วย สารเคมีชนิดอื่น

การทดสอบไวเทลโลเจนินของปลากะพงขาวที่ได้รับการฉีดสารเคมีในกลุ่มสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ ได้แก่ สารโนนิลฟีนอล (25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) เบนโซเอไพรีน (0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) และแคดเมียมคลอไรด์ (0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ผลการตรวจสอบพบว่ามีเพียง MAb-sea bass VTG 23 ที่สามารถตรวจพบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อนหลังได้รับแคดเมียมคลอไรด์ เป็นเวลา 3 วัน ดังแสดงในภาพที่ 4-9



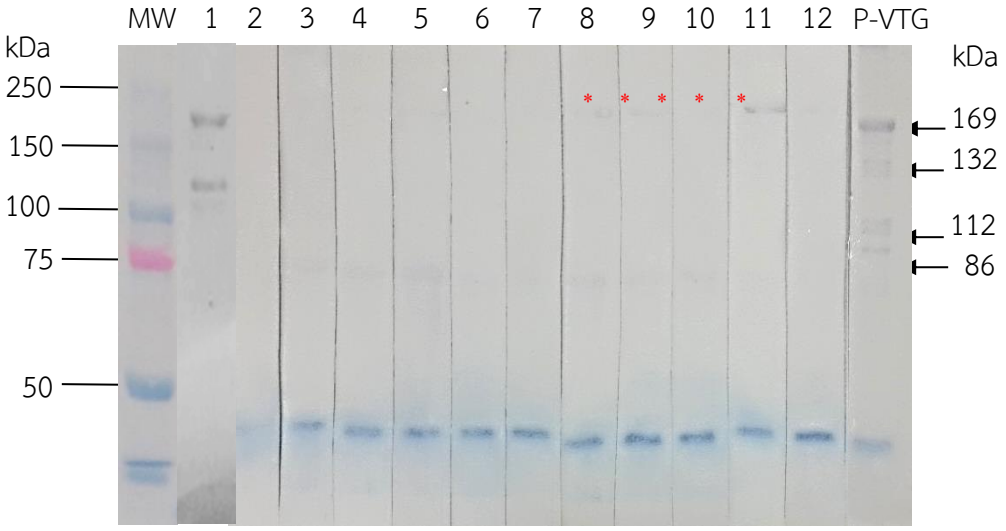
ภาพที่ 4-9 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลากะพงขาวที่ได้รับสารโนนิลฟีนอล (ก) เบนโซเอไพรีน (ข) และแคดเมียมคลอไรด์ (ค) ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ MAb-sea bass VTG 23 (ช่องที่ 1-12, ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม) ด้วยเทคนิค Western blot โดยที่ ช่องที่ 1 คือพลาสมาปลากะพงขาวก่อนได้รับสาร ช่องที่ 2-8 คือพลาสมาปลากะพงขาวหลังได้รับสารเป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18, และ 21 วัน ตามลำดับ

4.3 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb-sea bass VTG ในปลาชนิดต่าง ๆ ที่ได้รับการชักนำให้เกิด VTG ด้วย 17β-estradiol และสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจนอื่น ๆ

4.3.1 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Western blot

ก) การทดสอบกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลานิล

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 11 โคลนกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลานิลที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol (2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ด้วยเทคนิค Western blot พบว่ามีเพียงโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมเซลล์ครั้งที่ 3 จำนวน 5 โคลน (MAb-sea bass VTG 18, 19, 20, 23 และ 35) ที่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินจากปลานิลได้ อย่างไรก็ตามพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี MAb-sea bass VTG 23 สังเกตพบการเกิดแถบปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่สุดที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:100 โดยพบแถบโปรตีนขนาด 210 และ 140 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4-10) จึงเลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี MAb-sea bass VTG 23 ใช้สำหรับทดสอบปฏิกิริยาข้ามในปลานิลด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

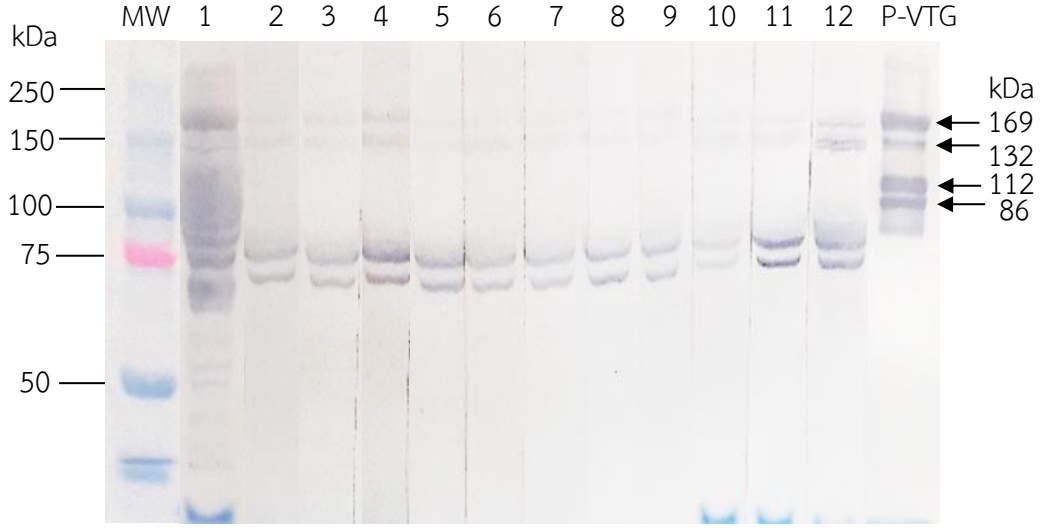


ภาพที่ 4-10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลานิล (ช่องที่ 1-12; ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม) เปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีและด้วยเทคนิค Western blot โดยที่

ช่องที่ 1 PAb-sea bass VTG (1:10,000) ช่องที่ 2 MAb-sea bass VTG 18 (1:10,000)
ช่องที่ 3 MAb-sea bass VTG 37 (1:5,000) ช่องที่ 4 MAb-sea bass VTG 41 (1:10,000)
ช่องที่ 5 MAb-sea bass VTG 1 (1:10) ช่องที่ 6 MAb-sea bass VTG 42 (1:10)
ช่องที่ 7 MAb-sea bass VTG 46 (1:10) ช่องที่ 8 MAb-sea bass VTG F3-18 (1:100)
ช่องที่ 9 MAb-sea bass VTG 19 (1:100) ช่องที่10 MAb-sea bass VTG 20 (1:100)
ช่องที่ 11 MAb-sea bass VTG F23 (1:100) ช่องที่ 12 MAb-sea bass VTG 35 (1:100)

ข) การทดสอบกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลาเก๋าปะการัง

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 11 โคลนกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลาเก๋าปะการังที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol (2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ด้วยเทคนิค Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทุกโคลนสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลาเก๋าปะการังได้ ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี MAb-sea bass VTG 23 ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:1,000 และ MAb-sea bass VTG 41 (1:10,000) พบการเกิดแถบปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่สุด โดยพบแถบโปรตีนขนาด 152, 133, 81, 72 และ 63 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4-11) จึงเลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี MAb-sea bass VTG 41 และ 23 สำหรับทดสอบปฏิกิริยาข้ามในปลาเก๋าปะการังด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

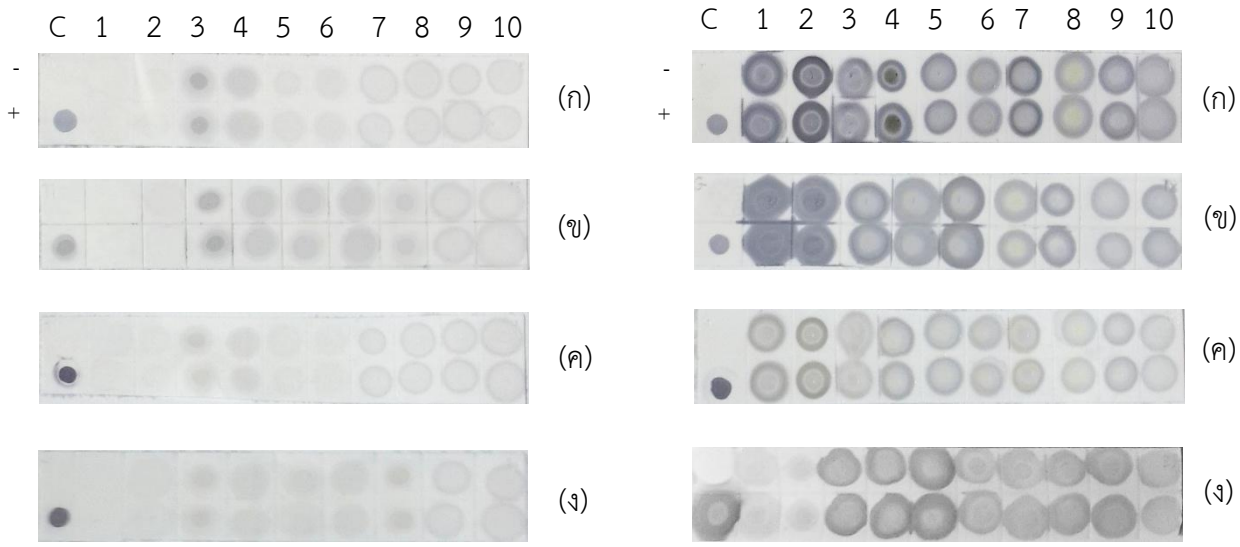


ภาพที่ 4-11 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลาเก๋าปะการัง (ช่องที่ 1-12, ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม) ด้วยเทคนิค Western blot โดยที่

ช่องที่ 1 PAb-sea bass VTG (1:10,000) ช่องที่ 2 MAb-sea bass VTG 18 (1:5,000)
ช่องที่ 3 MAb-sea bass VTG 37 (1:5,000) ช่องที่ 4 MAb-sea bass VTG 41 (1:10,000)
ช่องที่ 5 MAb-sea bass VTG 1 (1:10) ช่องที่ 6 MAb-sea bass VTG 42 (1:10)
ช่องที่ 7 MAb-sea bass VTG 46 (1:10) ช่องที่ 8 MAb-sea bass VTG F3-18 (1:100)
ช่องที่ 9 MAb-sea bass VTG 19 (1:100) ช่องที่ 10 MAb-sea bass VTG 20 (1:100)
ช่องที่ 11 MAb-sea bass VTG 23 (1:1,000) ช่องที่ 12 MAb-sea bass VTG 35 (1:100)

4.3.2 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Dotblot

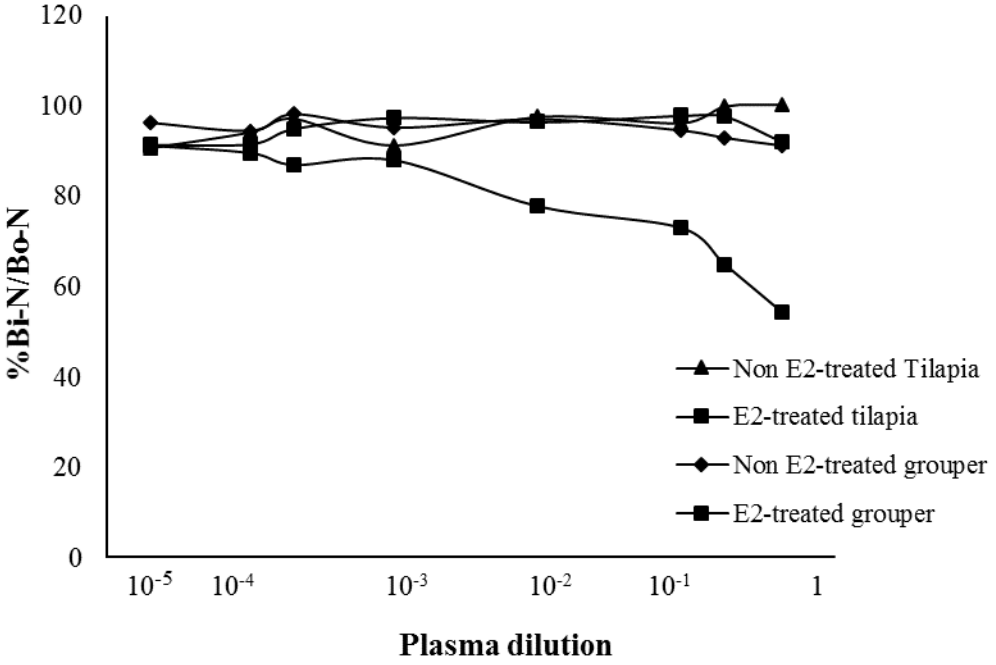
เมื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลานิลและปลาเก๋าปะการังด้วยเทคนิค Dot blot พบว่า MAb-sea bass VTG 18, 37, 41 และ 23 สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลานิลที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพลาสมาของปลานิลที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมน ส่วนในปลาเก๋าปะการังพบว่ามีเพียง MAb-sea bass VTG 23 ที่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลาเก๋าปะการังที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพลาสมาของปลาเก๋าปะการังที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมน ในขณะที่ MAb-sea bass VTG 18, 37 และ 41 ทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะกับพลาสมาของปลาเก๋าปะการังที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมนด้วย ดังแสดงในภาพที่ 4-12



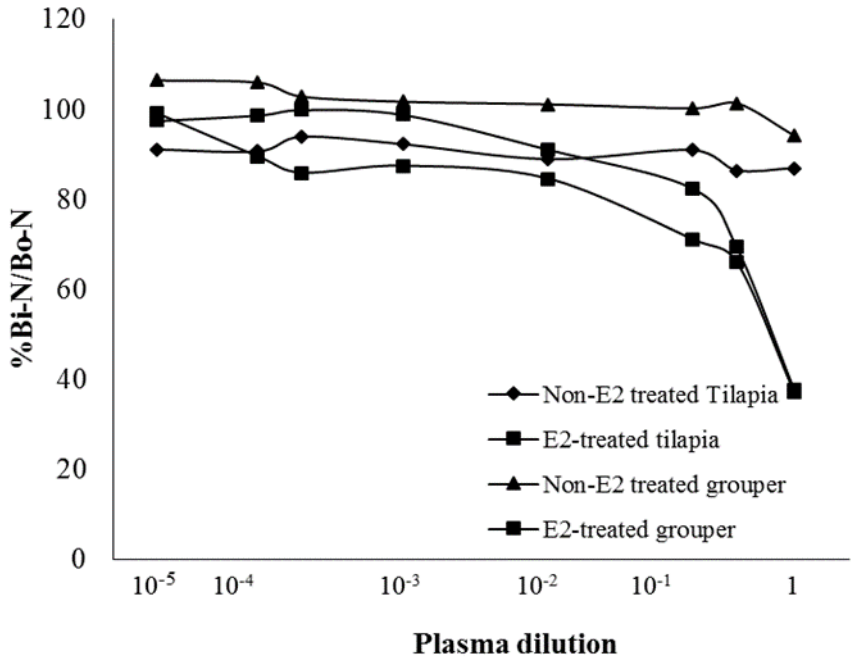
ภาพที่ 4-12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลานิลและปลาเก๋าปะการัง ด้วยเทคนิค Dot blot โดย ช่องที่ 1-2 พลาสมาปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol ตัวที่ 1 และ 2 ช่องที่ 3-10 พลาสมาปลาที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol ตัวที่ 1-8 โดยใช้ MAb-sea bass VTG 18 (ก), MAb-sea bass VTG 37 (ข), MAb-sea bass VTG 41 (ค), และ MAb-sea bass VTG 23 (ง)

4.3.3 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค ELISA

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลานิลและปลาเก๋าปะการังด้วยเทคนิค ELISA แบบ competitive พบว่า MAb-sea bass VTG 41 สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลานิลที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพลาสมาของปลานิลที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมน ปลาเก๋าปะการังทั้งที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol และไม่ได้รับฮอร์โมน ดังแสดงในภาพที่ 4-13 ส่วน MAb-sea bass VTG 23 สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลานิลและปลาเก๋าปะการังที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพลาสมาของปลานิลและปลาเก๋าปะการังที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมน ดังแสดงในภาพที่ 4-14



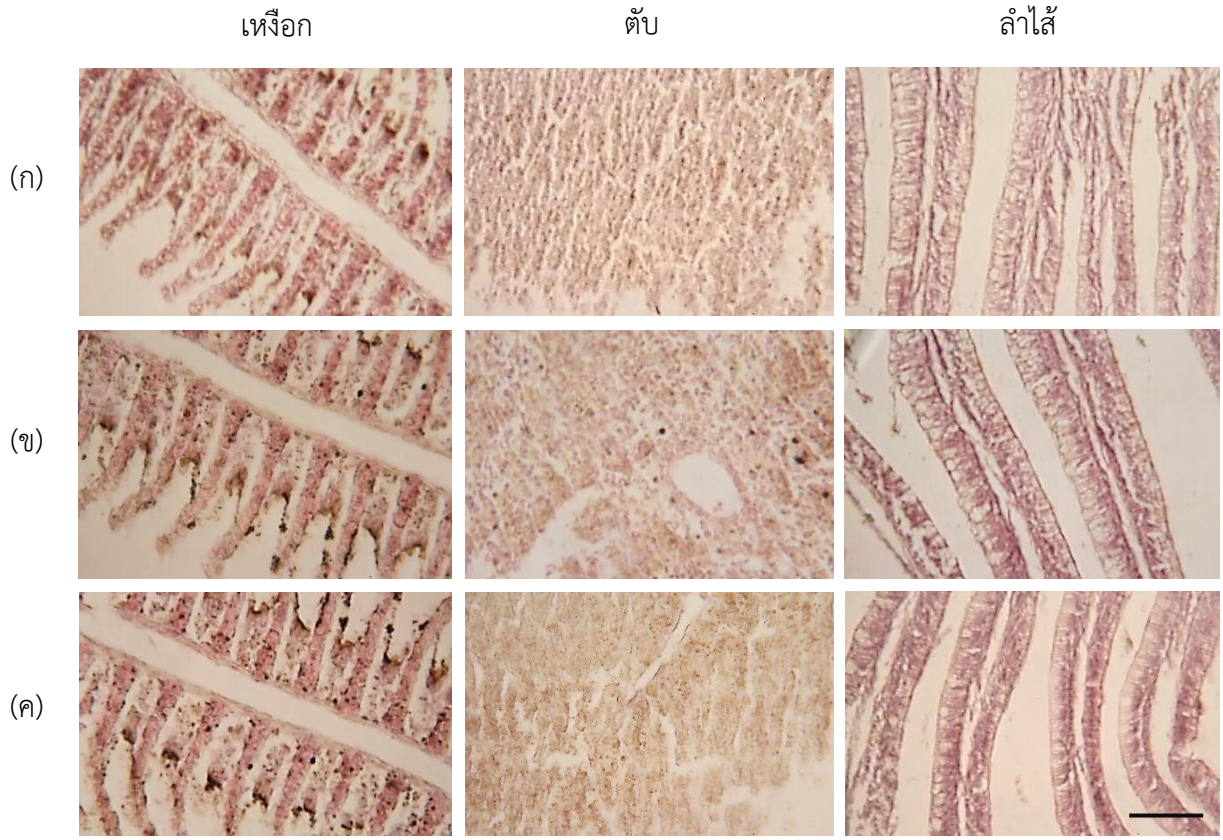
ภาพที่ 4-13 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลานิลและปลาเก๋าปะการัง ด้วยเทคนิค ELISA แบบ competitive โดยใช้ MAb-sea bass VTG 41 (1:500)



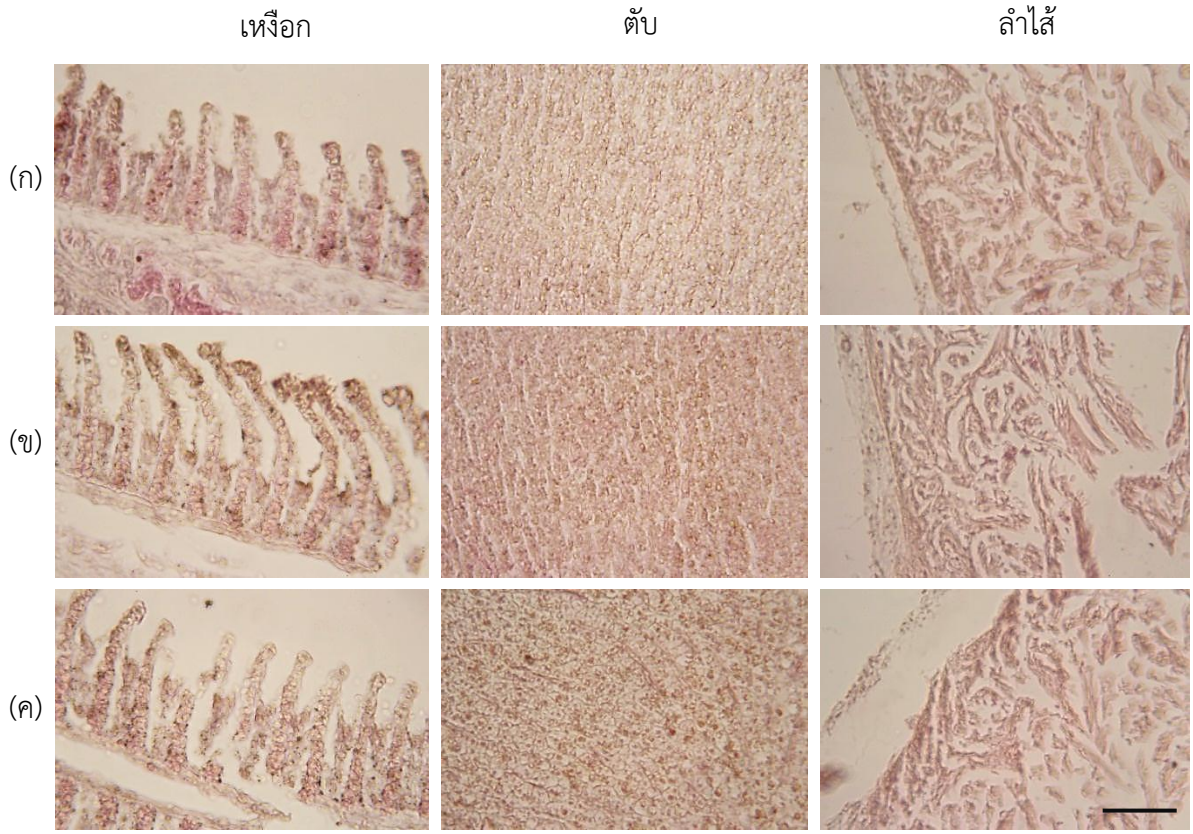
ภาพที่ 4-14 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพลาสมาปลานิลและปลาเก๋าปะการัง ด้วยเทคนิค ELISA แบบ competitive โดยใช้ MAb-sea bass VTG 23 (1:20)

4.3.4 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Immunohistochemistry

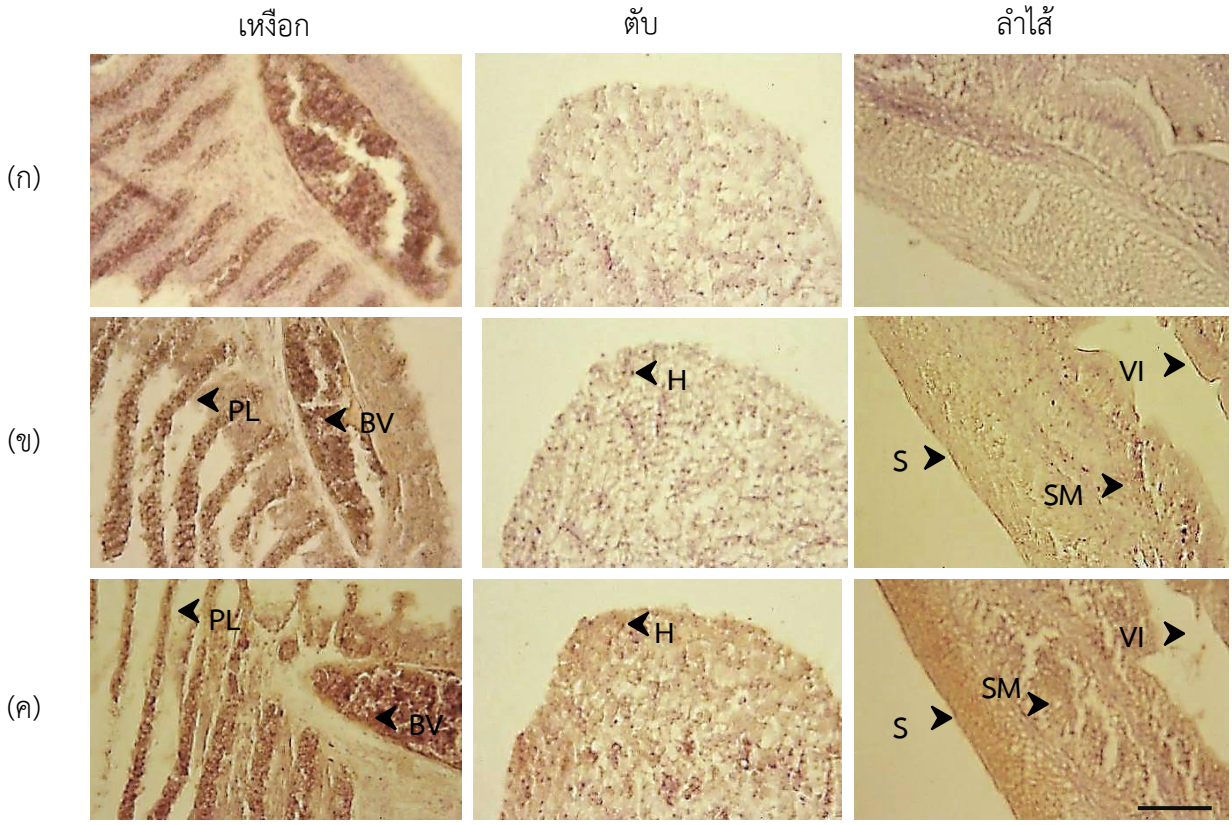
การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลานิลและปลาเก๋าปะการังด้วยเทคนิค Immunohistochemistry พบว่า MAb-sea bass VTG 41 และ 23 เจือจาง 1:20 และ GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลานิลและปลาเก๋าปะการังที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพลาสมาของปลานิลและปลาเก๋าปะการังที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมน โดยพบการเกิดไวเทลโลเจนินได้ในเนื้อทั้งเหงือก ตับ และ ลำไส้ โดยแสดงผลการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินที่พบปฏิกิริยาสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อ คือ เนื้อเยื่อตับเกิดสีน้ำตาลเข้มที่เซลล์ตับ (hepatocytes) และไซนูซอยด์ (sinusoid) ลำไส้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเข้มบริเวณชั้นซีโรซา (serosa) ชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) ชั้นมัสคิวลาริส มิวโคซา (muscularis mucosa) และวิลไล (Villi) และเหงือกเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเข้มบริเวณลาเมลลา (gill lamella) และเส้นเลือดภายในเหงือก (blood vessels) ดังแสดงในภาพที่ 4-15 – 4-20



ภาพที่ 4-15 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลานิลกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 41 (ข) และ 23 (ค)

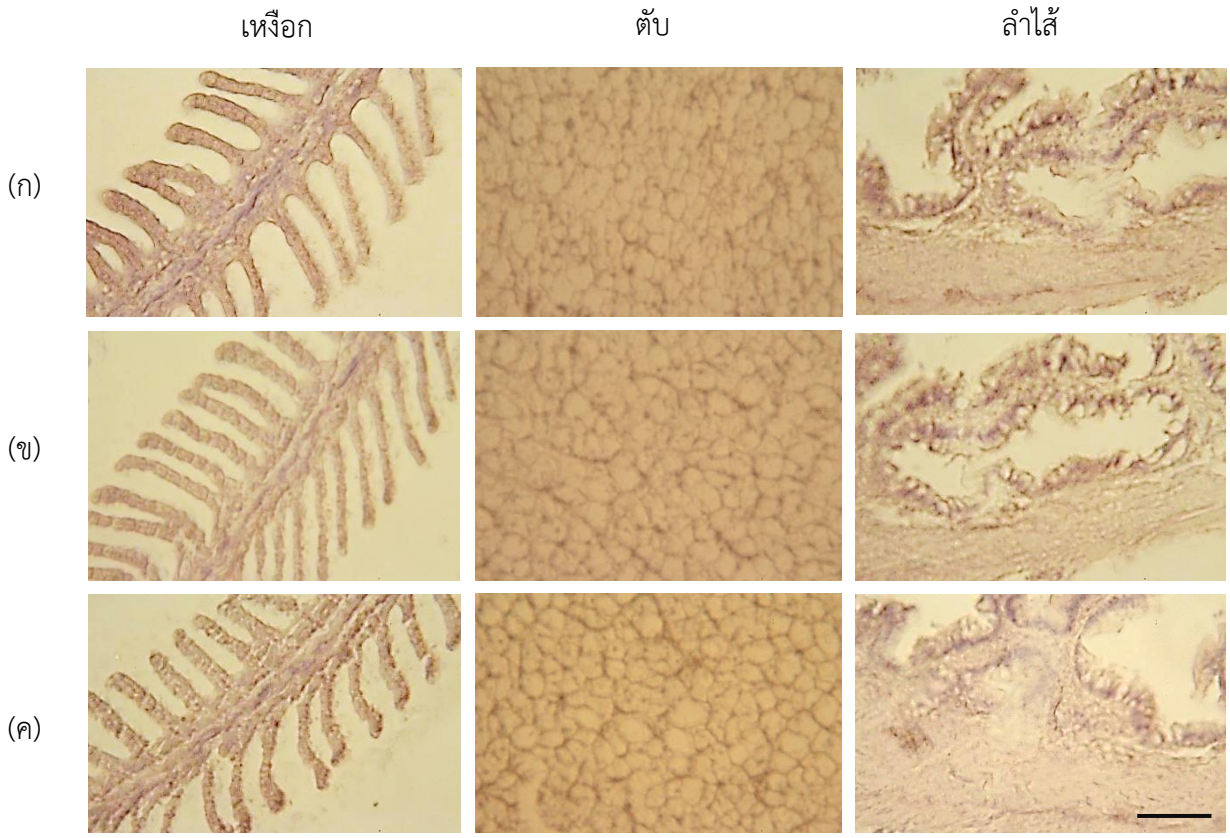


ภาพที่ 4-16 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลานิลกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (Vehicle control) ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 41 (ข) และ 23 (ค)

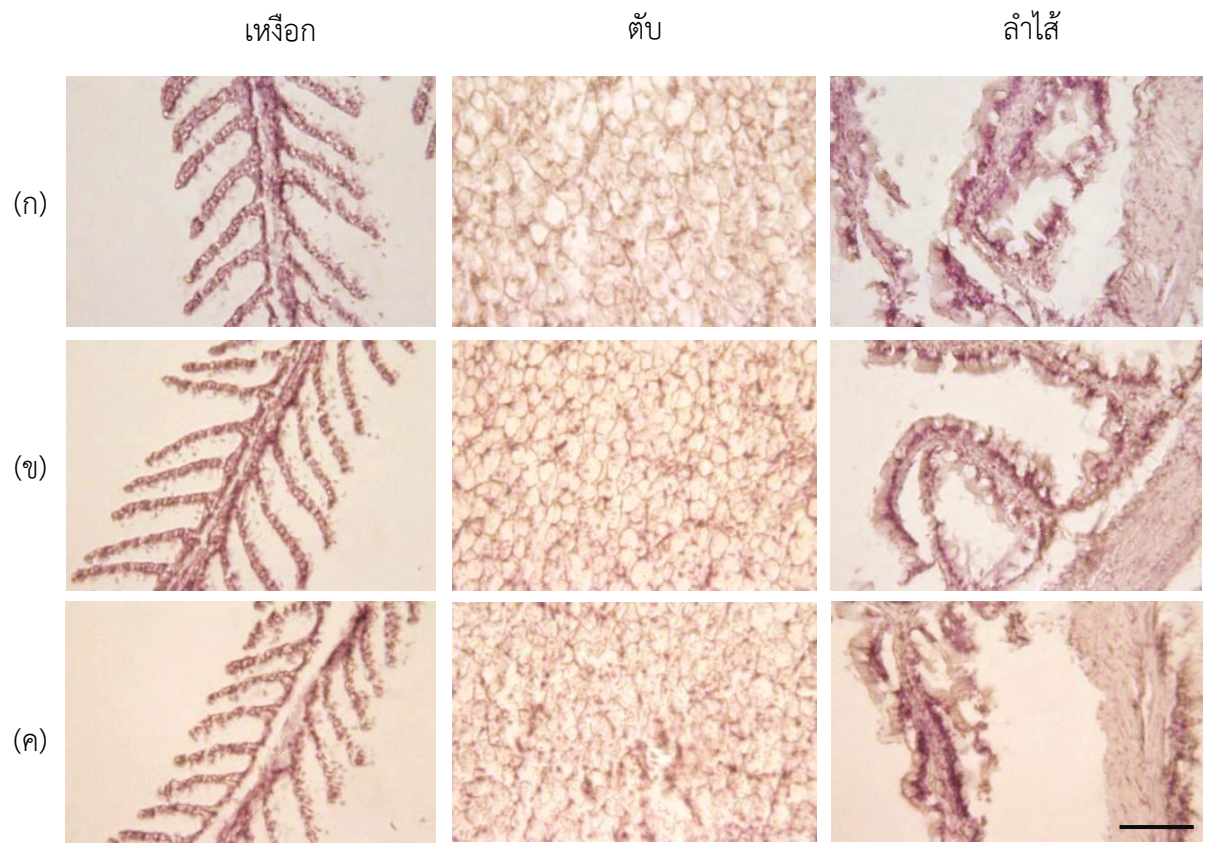


ภาพที่ 4-17 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลานิลที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 41 (ข) และ 23 (ค)

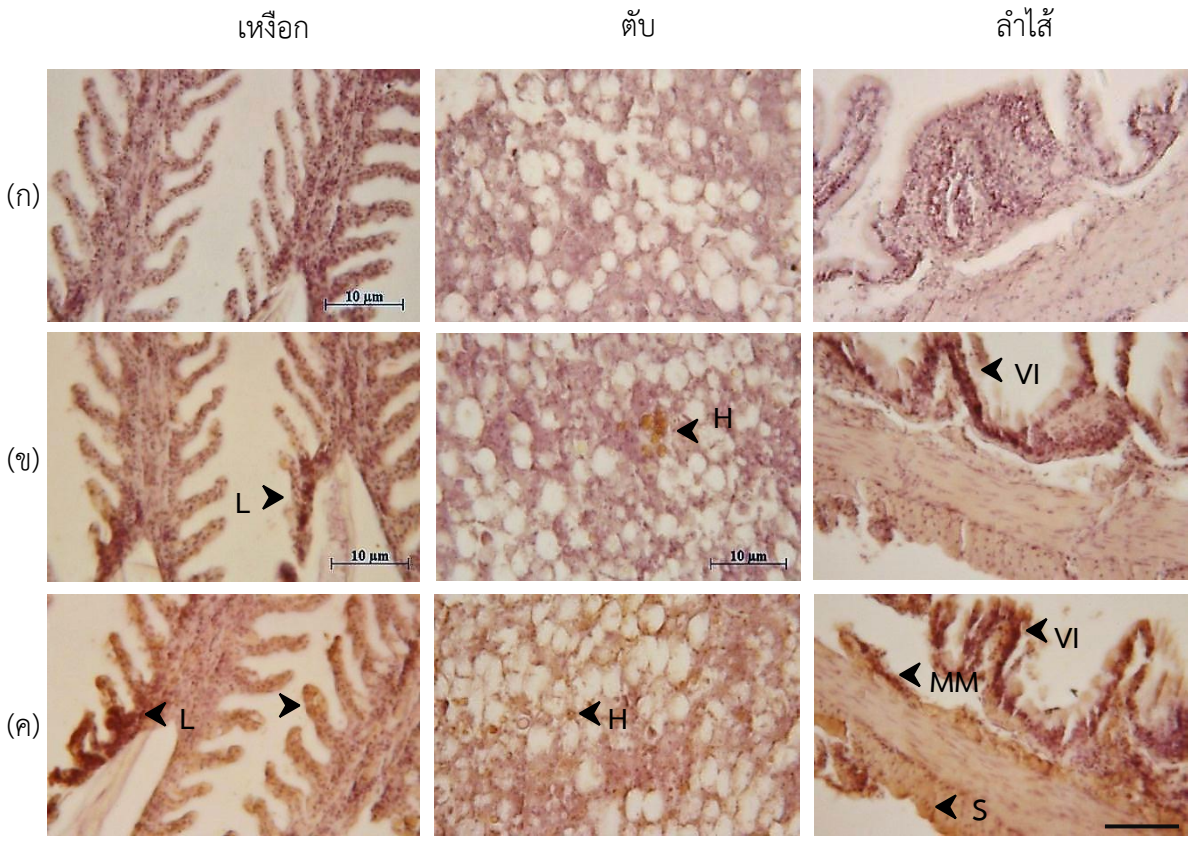
โดยที่ PL= primery lamella, BV=blood vessals, H = hepatocytes, V = blood vein, SI = sinusoid S = serosa, SM = submucosa, VI = villi of the intestine



ภาพที่ 4-18 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลาเก๋าปะการังกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 41 (ข) และ 23 (ค)



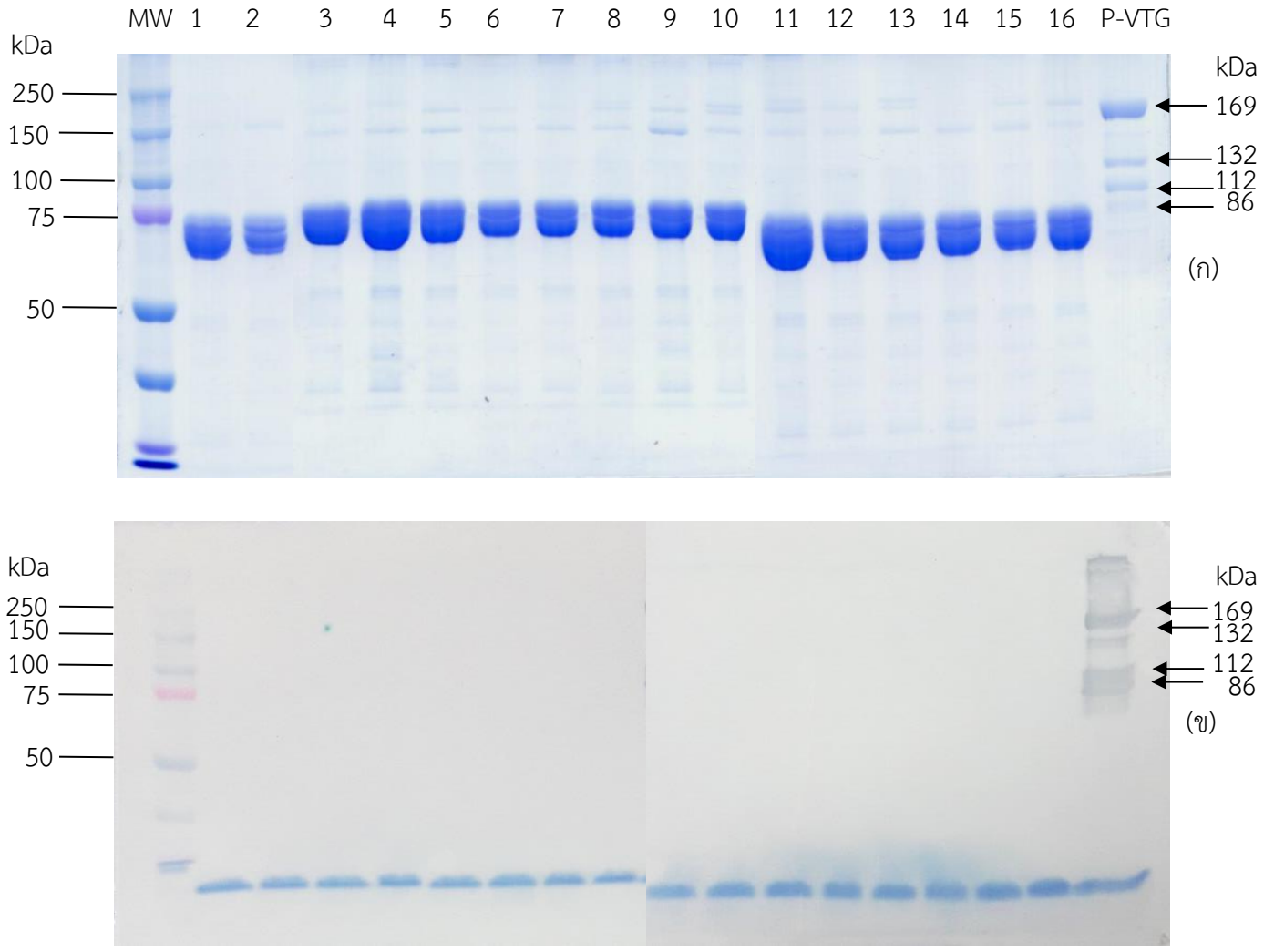
ภาพที่ 4-19 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ในปลาเก๋าปะการังกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (Vehicle control) ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 41 (ข) และ 23 (ค)



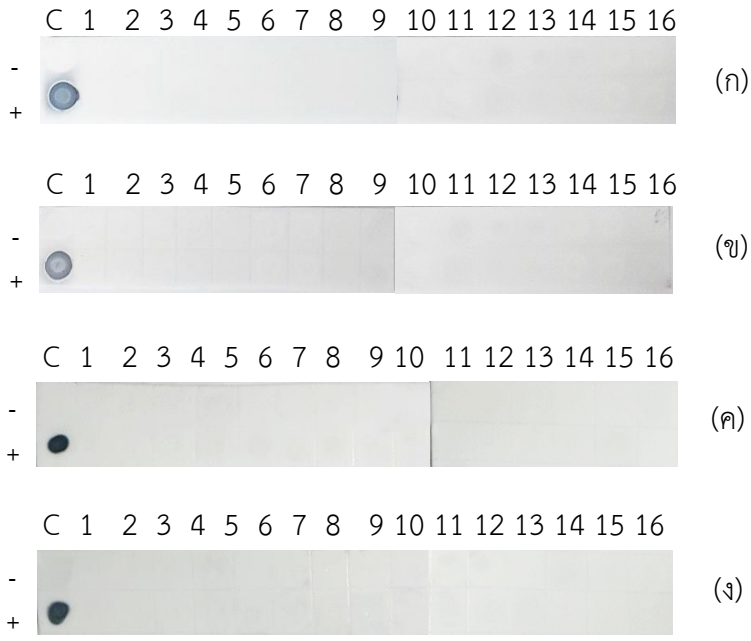
ภาพที่ 4-20 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Immunohistochemistry ใน ปลาเก๋าปะการังที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี (ก) และที่ย้อมด้วย MAb-sea bass VTG 41 (ข) และ 23 (ค) โดยที่ L= gill lamella, H = hepatocytes, S = serosa, MM = muscularis mucosa, VI = villi of intestine

4.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในสัตว์ทะเลชนิดอื่น ที่ได้รับการชักนำให้เกิด VTG ด้วย 17β-estradiol

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทะเลชนิดอื่น คือ ปูม้า (*Portunus pelagicus*) โดยเทคนิคทางแอนติบอดี Western blot และ dot blot ผลการศึกษาพบว่า MAb-sea bass VTG ทั้ง 11 โคลน และ PAb-sea bass VTG ไม่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปูม้าได้ ดังภาพที่ 4-21 และ 4-22



ภาพที่ 4-21 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปูม้าด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ก) และเทคนิค Western blot โดยใช้ MAb-sea bass VTG 23 (ข) โดยช่องที่ 1-2 คือพลาสมาปูม้าเพศผู้ที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol ช่องที่ 3-4 คือพลาสมาปูม้าเพศเมียที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol และช่องที่ 5-16 คือพลาสมาปูม้าที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol ตัวที่ 1-12



ภาพที่ 4-22 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปูม้าด้วยเทคนิค dot blot โดยใช้ MAb-sea bass VTG 18 (ก) MAb-sea bass VTG 37 (ข) MAb-sea bass VTG 41 (ค) และ MAb-sea bass VTG 23 (ง) โดยที่ช่อง C คือ negative และ positive control ช่องที่ 1-2 คือพลาสมาปูม้าเพศผู้ที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol ช่องที่ 3-4 คือพลาสมาปูม้าเพศเมียที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol และช่องที่ 5-16 คือพลาสมาปูม้าที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol ตัวที่ 1-12

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ตามข้อเสนอโครงการต่อเนื่อง 2 ปี ซึ่งในปีที่ 1 ได้มีการผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินเป็นหลัก ซึ่งมีสัมฤทธิผล 2 ประการ คือ ได้พอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูเมาส์มาใช้สำหรับตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว (พอจิต นันทนาวัฒน์ และคณะ, 2559) และได้มีการนำหนูเมาส์เหล่านั้นมาหลอมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อความยั่งยืนในด้านปริมาณการผลิตแอนติบอดีต่อไป ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสิ้น 11 โคลน ซึ่งในการทำงานโครงการต่อเนื่องทั้งในปีที่ 1 และปีที่ 2 ของโครงการตามแผนของการดำเนินโครงการ มีข้อสรุปดังนี้

1. ผลิตไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาวเพื่อเป็นแอนติเจน ทำโดยใช้ปลากะพงขาวมาฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol จากนั้นนำพลาสมาปลามาแยกไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และตรวจสอบลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินที่ได้โดยเทคนิคทางเคมีตามลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินซึ่งเป็นฟอสโฟไลโปไกลโคโปรตีน โดยการย้อมสีไวเทลโลเจนินที่ผลิตได้ด้วยสีย้อมโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และลิปิด ใน Native-PAGE (Garnayak และคณะ, 2013) และตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE ไวเทลโลเจนินที่มีขนาด 169, 132, 112 และ 86 กิโลดาลตัล ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของไวเทลโลเจนินที่พบในปลาชนิดอื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปไวเทลโลเจนินจะมีขนาดโมเลกุล 300-600 กิโลดาลตัล และเมื่ออยู่ในรูปโมเลกุลเดี่ยวจะมีขนาดประมาณ 150-200 กิโลดาลตัล (Scott และ Robinson, 2008) เช่น ขนาดของไวเทลโลเจนินในปลา shorthead redhorse และปลา copper redhorse เท่ากับ 150 กิโลดาลตัล (Maltais และ Roy, 2009) ปลา cod 165, 135 และ 116 กิโลดาลตัล (Scott และคณะ, 2006) หรือในปลา Stone flounder ซึ่งมีขนาด 165 และ 106 กิโลดาลตัล (Pan และคณะ, 2012) เป็นต้น

2. นำไวเทลโลเจนินที่ได้ไปฉีดกระตุ้นในหนูเมาส์จำนวน 3 ตัว เพื่อผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว (PAb-Seabass VTG) ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวโดยไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นในพลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ซึ่งสามารถนำไปใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีทั้ง western blot, dot blot, และ ELISA จึงสามารถนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูเมาส์ทั้ง 3 ตัวนี้มาใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินได้ดีในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 กับไวเทลโลเจนินในปลานิลและปลาเก๋าปะการังพบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลานิลและปลาเก๋าปะการัง และ

เนื้อเยื่อของปลานิลที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเดียวกันได้ ทำให้มูลค่าของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สูงขึ้น เนื่องจากสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินที่เกิดขึ้นในปลานิลและปลาเก๋าได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามพอลิโคลนอลแอนติบอดีมีข้อจำกัดในด้านของปริมาณที่สามารถผลิตได้ไม่มากนัก และเนื่องจากมีความจำเพาะต่ออิพิโทปที่หลากหลาย จึงได้มีการพัฒนาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อความยั่งยืนในการมีแอนติบอดีสำหรับใช้ตรวจสอบต่าง ๆ ได้ต่อไป

3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทำโดยนำเซลล์ม้ามจากหนูเมาส์ 3 ตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยไวเทลโลเจนินมาทำการหลอมเซลล์กับเซลล์ไมอิโลมา เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมที่สามารถเพาะเลี้ยงและถ่ายทอดลักษณะการสร้างแอนติบอดีได้ การทำหลายครั้ง เป็นการเพิ่มโอกาสในการทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปบนแอนติเจนที่หลากหลายมากขึ้น ในเบื้องต้นคัดเลือกไว้จำนวน 11 โคลน จากการหลอมเซลล์ 3 รอบ ซึ่งแต่ละโคลนมีลักษณะการตอบสนองต่อแอนติเจนแตกต่างกัน ซึ่งมีการพิสูจน์ต่อเนื่องในการวิจัยในปีที่ 2

จากงานวิจัยต่อเนื่องในปีที่ 2 นี้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นได้ มีความจำเพาะกับไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวโดยไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นในพลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ซึ่งสามารถนำไปใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีทั้ง western blot, dot blot, ELISA และ Immunohistochemistry โดยแอนติบอดีที่มีความไวเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตรวจสอบ ไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว ได้แก่ MAb-sea bass VTG 18 (1:10,000), MAb-sea bass VTG 37 (1:5,000), MAb-sea bass VTG 41 (1:10,000) และ MAb-sea bass VTG 23 (1:1,000) การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับปลานิลและปลากะพงขาว พบว่า MAb-sea bass VTG 23 (1:100) สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลานิลและมีความไวในการตรวจสอบสูงที่สุด ในปลาเก๋าปะการังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลาเก๋าปะการังได้ โดยแอนติบอดีที่มีความไวเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตรวจสอบ ได้แก่ MAb-sea bass VTG 23 (1:1,000) (วิชชุดา ประสาทแก้ว, ชุติมา ถนอมสิทธิ์, และ พอจิต นันทนาวัฒน์. (2559) นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี MAb-sea bass VTG 23 ยังสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวที่ได้รับแคดเมียมคลอไรด์ ขณะที่การทดสอบปฏิกิริยาข้ามในสัตว์ทะเลชนิดอื่น คือ ปูม้า พบว่าทั้งโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีแอนติบอดีไม่สามารถจับกับไวเทลลินในปูม้าได้ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นได้จากงานวิจัยนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินได้กว้างขวางยิ่งขึ้นในปลาทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม รวมทั้งในด้านการสำรวจทางสิ่งแวดล้อม และการทดลองในห้องปฏิบัติการต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยและการประยุกต์ผลการวิจัย

ควรพัฒนารูปแบบการนำแอนติบอดีไปใช้ในลักษณะที่สะดวก ต่อการออกภาคสนาม หรือการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการพื้นฐานต่าง ๆ อาจเป็นในรูปของ Strip test หรือ ชุดตรวจเชิงปริมาณสำเร็จรูป โดยเทคนิค ELISA ซึ่งต้องมีกระบวนการพัฒนาให้มีความแม่นยำสูงใน plat form ต่าง ๆ กัน เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบไวเทลโลเจนินทั้งในด้านของการตรวจสอบเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (EDCs) และการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาแม่พันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่อไป

5.3 ผลผลิต

5.3.1 การตีพิมพ์ และการนำเสนอผลงาน

สุรัสวดี แพทย์รังษี, วิชชุดา ประสาทแก้ว, และ พอจิต นันทนาวัฒน์. (2560) ผลของโนนิลฟีนอลต่อการชักนำไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อน. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา.ปีที่ 22 (ฉบับพิเศษ) การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9".* 195-202.

หนึ่งฤทัย เอกจิตต์, วิชชุดา ประสาทแก้ว และ พอจิต นันทนาวัฒน์. (2560). การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวกับไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่นด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่* 9, ชลบุรี ; มหาวิทยาลัยบูรพา. (โปสเตอร์)

พิชยาภรณ์ โชติฐิติธนหิรัญ, วิชชุดา ประสาทแก้ว, พอจิต นันทนาวัฒน์. (2560). การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวกับไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่นด้วยเทคนิค western blot. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่* 9, ชลบุรี ; มหาวิทยาลัยบูรพา. (โปสเตอร์)

พอจิต นันทนาวัฒน์, นันทิกา คงเจริญพร, วิชชุดา ประสาทแก้ว และ ศุภกิจ ศรีสวัสดิ์. (2559). การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว. ใน*รายงานสืบเนื่อง การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8* (หน้า 518-523). พะเยา ; มหาวิทยาลัยพะเยา.

วิชชุดา ประสาทแก้ว, ชุติมา ถนอมสิทธิ์, และ พอจิต นันทนาวัฒน์**.** (2559). การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว. ใน*รายงานสืบเนื่อง การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8* (หน้า 491-496). พะเยา ; มหาวิทยาลัยพะเยา.

สุรัสวดี แพทย์รังษี, ณัฐธยาน์ โทธกานันท์, และ**พอจิต นันทนาวัฒน์.** (2559). ผลของแคดเมียมในการชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อน. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8*, พะเยา ; มหาวิทยาลัยพะเยา. (โปสเตอร์)

ยังมีผลงานที่อยู่ในระหว่างการเสนอพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ จำนวน 1 ผลงาน

5.3.2 การจดอนุสิทธิบัตร

ได้ยื่นคำขอรับการจดอนุสิทธิบัตร จำนวน 2 เรื่อง ได้แก่

1. คำขอรับอนุสิทธิบัตร เรื่อง โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากระพงขาว เมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2559 เลขที่คำขอ 1603000313

2. คำขอรับอนุสิทธิบัตร เรื่อง วิธีตรวจสอบการปนเปื้อนสารคล้ายเอสโตรเจนในแหล่งน้ำด้วยการวัดระดับไวเทลโลเจนิน เมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2559 เลขที่คำขอ 1603000314

5.3.3. การถ่ายทอดเทคโนโลยี

1. การถ่ายทอดเทคโนโลยีและผลการวิจัยให้แก่นักเรียน นิสิต/นักศึกษา นักวิจัย และประชาชนทั่วไปในงานนิทรรศการสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติภาคตะวันออก ที่จัดขึ้นเมื่อวันที่ 16-18 สิงหาคม พ.ศ. 2559 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยให้ความรู้เกี่ยวกับการใช้ไวเทลโลเจนินเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ วิธีการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน และวิธีการตรวจไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคทางแอนติบอดี ในรูปแบบโปสเตอร์

2. บูรณาการงานวิจัยกับการเรียนการสอน รายวิชา 307335 การผลิตแอนติบอดี 307336 ปฏิบัติการการผลิตแอนติบอดี และ 307376 เทคนิคทางแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบสิ่งแวดล้อม ให้แก่นิสิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ในการทำปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ และการทำงานในอนาคต

3. นำผลงานที่ได้จากโครงการวิจัยเข้าร่วมประชุมทางวิชาการและเสนอผลงานวิจัย โดยมีการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 7 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก จำนวน 6 ผลงาน ครั้งที่ 8 ณ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา จำนวน 3 ผลงาน และในการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี จำนวน 3 ผลงาน

เอกสารอ้างอิง

ชุติมา ถนอมสิทธิ์, พอจิต นันทนาวัฒน์, เรณู ยาชิโร, ศิวาพร ลงยันต์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2552). การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า (*Plectopomus maculatus*). *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, *14*, 42-49.

พอจิต นันทนาวัฒน์, นันทิกา คงเจริญพร และ ศุภกิจ ศรีสวัสดิ์. (2559). การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch). รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สิ้นปีที่ 1. 45 หน้า อัดสำเนา

พอจิต นันทนาวัฒน์, นันทิกา คงเจริญพร, วิชชุดา ประสาทแก้ว และ ศุภกิจ ศรีสวัสดิ์. (2559). การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว. ใน*รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8* (หน้า 518-523). พะเยา ; มหาวิทยาลัยพะเยา.

วิชชุดา ประสาทแก้ว, ชุติมา ถนอมสิทธิ์, และพอจิต นันทนาวัฒน์. (2559). การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว. ใน*รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8* (หน้า 491-496). พะเยา ; มหาวิทยาลัยพะเยา.

An, L., Hu, J., Zhu, X., Deng, B., Zhang, Z., & Yang, M. (2007). Crucian carp (*Carassius carassius*) VTG monoclonal antibody: development and application. *Ecotoxicology and environmental safety*, *66*(2), 148–153.

Arukwe, A., & Meucci, V. (2005). Detection of vitellogenin and *zona radiate* protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquatic toxicology*, *73*, 1-10.

Codi King, S., Hassell, K., Nugegoda, D., & Kristiansen, S. I. (2008). The assessment of vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in two Australian perciformes. *Marine environmental research*, *66*(1), 116–118.

Codi King, S., Hassell, K., Nugegoda, D., & Kristiansen, S. I. (2008). The assessment of vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in two Australian perciformes. *Marine Environmental Research*, *66*(1), 116–118. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.040

Eidem, J. K., Kleivdal, H., Kroll, K., Denslow, N., van Aerle, R., Tyler, C., & Goksøyr, A. (2006). Development and validation of a direct homologous quantitative

sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *78*(2), 202–206. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.031

Gültekin, I., & Ince, N. H. (2007). Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management*, *85*(4), 816–832. doi:10.1016/j.jenvman.2007.07.020

Nishi, K., Chikae, M., Hatano, Y., Mizukami, H., Yamashita, M., Sakakibara, R., & Tamiya, E. (2002). Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *132*(2), 161–169. doi:10.1016/S1532-0456(02)00058-3

Porte, C., Janer, G., Lorusso, L. C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M. P., Fossi, M. C., & Canesi, L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, *143*(3), 303–315. doi:10.1016/j.cbpc.2006.03.004

Thanomsit, C., Nantanawat, P., Wassmur, B., Gräns, J., Celander, M. C., & Kanchanopas-Barnette, P. (2013). Characterization of metallothionein from Asian sea bass (*lates calcarifer*, Bloch) and application as a biomarker for heavy metal exposure in Thailand. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, *10*(4), 53–64. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/ record.url?eid=2-s2.0-84888875062&partnerID=tZOtx3y1

Van den Belt, K., Verheyen, R., & Witters, H. (2003). Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *56*(2), 271–281. doi:10.1016/S0147-6513(03)00004-6

Gültekin, I., & Ince, N. H. (2007). Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *Journal of environmental management*, *85*(4), 816–832.

Hansen, P.-D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., & Blasise, C.H. (1998). Vitellogenin-a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in analytical chemistry*, *17*, 448-451.

Hock, B., Marx, A., Sherry, J., & Hansen, P.D. (2001). A new monoclonal antibody against vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*). *Chemoshere*, *44*, 393-399.

Köhler, G., & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor cell fusion. *European Journal of Immunology*, *6*, 511-519

Luo, W., Zhou, Q., & Jiang, G. (2011). Development of enzyme-linked immunosorbent assays for plasma vitellogenin in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Chemosphere*, *84*(5), 681–668.

Maltais, D. & Roy R.L. (2009). Purification and partial characterization of vitellogenin from shorthead redhorse (*Moxostoma macrolepidotum*) and copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*) and detection in plasma and mucus with heterologous antibody. *Fish Physiology and Biochemistry*, *35*(2), 241-254.

Marin, M.G.M., & Matozzo, V. (2004). Vitellogenin induction as a biomarker of exposure estrogenic compounds in aquatic environmental. *Marine Pollution Bulletin*, *48*, 835-839.

Nishi, K., Chikae, M., Hatano, Y., Mizukami, H., Yamashita, M., Sakakibara, R., & Tamiya, E. (2002). Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, *132*, 161-169.

Pan, Z., Tain, H., Wang, W., Wang, J., & Ru, S. (2012). Identification, Purification, and Immunoassay of Stone Flounder (*Kareius bicolouratus*) Vitellogenin. *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *55*(2), 219-227. Retrieved October 27, 2011, from Springer database.

Scholz, S., & Mayer, I. (2008). Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and cellular Endocrinology*, *293*, 57-70.

Scott, A.P., & Robinson, C.D. (2008). Fish vitellogenin as a biological effect marker of oestrogenic endocrine disruption in the open sea. In A.P. Payne, J. Cotter, and T. Potter (Eds.), *Advances in Fisheries Science*. Iowa, Blackwell.

Scott, A.P., Katsiadaki, I., Witthames, P.R., Hylland, K., Davies, I.M., McIntosh, A.D., & Thain, J. (2006). Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea?. *Marine Environmental Research*, *61*, 149-170.

Van den Belt, K., Verheyen, R., & Witters, H. (2003). Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *56*(2), 271–281.

Watt, M., Pankhurst, N.W., Pryce, A., & Sun, B. (2003). Vitellogenin isolation, purification ans antigenic cross-reactivity in three teleost species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *134*, 467-476.