บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โลหะหนักที่ปนเปื้อนตามแนวชายฝั่งทะเลเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ กระบวนการทางสรีรวิทยา และพันธุกรรม เป็นต้น และเกิดเป็นพิษได้โดยการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อ เริ่มตั้งแต่ปริมาณน้อยและเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงขีดที่ร่างกายจะแสดงผลออกมาทันที (เฉลิมพล กานุวงษ์, 2544) และอาจก่อให้เกิดอันตรายทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์ที่บริโภคสัตว์น้ำ

การตรวจวัดโลหะหนักบริเวณแนวชายฝั่งทะเลทำให้ทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของโลหะหนัก เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและจัดการการปนเปื้อนของโลหะหนักแนวชายฝั่งทะเลต่อไป จึงมีการศึกษาการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้งในน้ำ ดินตะกอน และเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ (Wu & Chen, 2005) รวมทั้งการนำตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) ได้แก่ Metal-binding protein ซึ่งจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเมื่อสัตว์น้ำได้รับและสัมผัสกับโลหะหนัก (Wu & Chen, 2005) โดยมีหน้าที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโลหะหนักที่เป็นพิษต่อร่างกาย เช่น แคดเมียม (Cd) ปรอท (Hg) และ สารหนู (As) เป็นต้น ทำให้ความเป็นพิษนั้นลดลง และยังมีหน้าที่ปรับสมดุลของโลหะที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น สังกะสี (Zn), ทองแดง (Cu) ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพราะโลหะที่มีความเข้มข้นสูงในร่างกายสามารถเป็นพิษได้ (Chaffai, Amiard, Pellerin, Joux, & Berthet, 2000) ด้วยเหตุนี้งานวิจัยทางสิ่งแวดล้อมจึงนำ Metal-binding protein มาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพเพื่อติดตามประเมินคุณภาพน้ำและสัตว์น้ำที่อยู่ในแหล่งเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของโลหะหนัก (Moraga et al., 2002)

เทคนิคการตรวจสอบ Metal-binding protein มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ Electroanalytical Techniques, UV-Visible spectrophotometry, Metal saturation assay (Dabrio et al., 2002) ซึ่งวิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง ราคาแพง ในการดำเนินการวิเคราะห์ ทั้งสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ยังมีความเป็นพิษต่อผู้ทำการวิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม การใช้เทคนิคทางแอนติบอดีมาเป็นตัวตรวจวัดจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความแม่นยำสูง โดยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น อีกทั้งราคาในการดำเนินการไม่สูงมาก สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการผลิตแอนติบอดีต่อ Metal-binding protein นั้น จำเป็นต้องเตรียมแอนติเจนให้มีความจำเพาะและความบริสุทธิ์สูง อยู่ในรูปของ Metal-binding protein เพื่อสามารถนำมาผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงกว่า หากแต่ขั้นตอนในการผลิตมีความยุ่งยากกว่าการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและราคาแพงกว่า (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) การเตรียมแอนติเจน Metal-binding protein เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเป็นต้องให้บริสุทธิ์มากที่สุด โดยใช้วิธีทางโครมาโทรกราฟี เช่น Gel Filtration, Ion Exchange และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นต้น แต่วิธีการเหล่านี้ใช้ทำให้สูญเสียโปรตีนจำนวนมาก และเวลานาน การศึกษาครั้งนี้ได้นำวิธี Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) ซึ่งเป็นการให้โปรตีนจับกับโลหะในคอลัมน์แล้วชะโปรตีนออกมา โดยอาศัยหลักการ Metalbiospecific Interaction เป็นวิธีที่ง่าย สามารถทำให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ในขั้นตอนเดียว ไม่ทำให้สูญเสียโปรตีนมาก และใช้เวลาน้อย (Honda, Araujo, Horta, Val, & Dema1, 2005) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการเตรียมแอนติเจน Metal-binding protein เพื่อการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี มาประยุกต์ ใช้ในงานวิจัยด้านสิ่งแวดล้อม

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการเตรียมแอนติเจน Cd-binding protein จากปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch) ให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี นำไปใช้สำรวจปลาทะเลกลุ่มหน้าดินที่จับโดยใช้อวนลากแผ่นตะเฆ่ ในแหล่งเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของโลหะหนัก บริเวณเขตนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและเขตนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เตรียมแอนติเจน Cd-binding proteinให้บริสุทธิ์ จากปลากะพงขาวรับสารแคดเมียมด้วยวิธี IMAC

2. ผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd-binding protein จากปลากะพงขาวรับสารแคดเมียม

3. สำรวจการแสดงออกของ Cd-binding protein ในปลาทะเลกลุ่มหน้าดินที่จับโดยใช้อวนลากแผ่นตะเฆ่ บริเวณเขตอุตสาหกรรม ได้แก่ นิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและเขตนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดจังหวัดระยอง โดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สมมติฐานของการวิจัย

1. โปรตีนสกัดจากตับปลากะพงขาวรับสารแคดเมียม เมื่อผ่าน IMAC น่าจะเป็น Cd-binding protein

2. โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd-binding protein จากปลากะพงขาวรับสารแคดเมียมที่ผลิตขึ้น น่าจะจำเพาะต่อ Metal-binding protein ที่แสดงออกในปลาทะเลที่ปนเปื้อนโลหะหนักบริเวณชายฝั่งทะเลเขตนิคมอุตสาหกรรมได้

3. แนวชายฝั่งทะเลบริเวณเขตนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและเขตนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง น่าจะเป็นแหล่งเสี่ยงต่อการปนเปื้อนโลหะหนักชักนำให้เกิด Metal-binding protein ในปลาทะเล

4. ในช่วงฤดูแล้งน่าจะพบการปนเปื้อนของโลหะหนักในปลาทะเลมากกว่าช่วงฤดูฝน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Cd-binding protein เพื่อใช้เป็นเครื่องมือสำหรับวัดผลกระทบในปลาทะเลจากการสัมผัสโลหะหนัก

2. การใช้เทคนิคทางแอนติบอดีมาตรวจวัดการแสดงออกของ Metal-binding protein ในปลาทะเล ทำให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อนของโลหะหนักบริเวณแนวชายฝั่งจังหวัดชลบุรีและระยอง

ขอบเขตของการวิจัย

1. ฉีดปลากะพงขาวด้วยโลหะหนัก ($CdNO_3.4H_2O$) เพื่อให้สร้าง Cd- binding protein

2. ทำการสกัด Cd-Binding Protein จากตับปลากะพงขาวและทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี IMAC ด้วย HiTrap FF Crude Column 5 mL (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A) ที่มี $NiSO_4$ อยู่บนเรซิน

3.ตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีน Cd- binding protein ที่ได้ ด้วยวิธี SDS-PAGE

4. นำ Cd-binding protein ที่ได้ มาผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง นาน 60 วัน

5. ทดสอบลักษณะสมบัติและความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีของหนูทดลองว่าจำเพาะต่อ Cd-binding protcin โดยวิธี Western blot

6. ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd-binding protein สำรวจการแสดงออกของ Metal-binding protcin ในปลาทะเล ที่จับโดยใช้อวนลากแผ่นตะเฆ่ บริเวณเขตอุตสาหกรรม ได้แก่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและเขตนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University