บทที่ 2
เอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โลหะหนัก

โลหะหนัก คือ โลหะที่มีคุณสมบัติเหมือนกับโลหะอื่นๆ ทั่วไปในการนำไฟฟ้า นำความร้อน มีความวาว ความเหนียว การสะท้อนแสง และมีค่าเลขออกซิเดชันได้หลายค่า โดยจะมีความหนาแน่น มากกว่า 5 ขึ้นไป โลหะหนักส่วนใหญ่มีสมบัติทางกายภาพคล้ายคลึงกัน แต่สมบัติทางเคมีแตกต่างกันและสามารถรวมตัวกับสารประกอบอินทรีย์ได้สารประกอบใหม่ที่เสถียรกว่าเดิม และสะสมในสิ่งมีชีวิตได้ โดยขบวนการทางชีวภาพถ่ายทอดตามห่วงโซ่อาหาร ทำให้เกิดพิษของโลหะหนักขึ้นได้ (มนัส สถิรจินดา, 2538) โลหะหนักบางชนิดมีความจำเป็นต่อมนุษย์และสัตว์ แต่ในขณะเดียวกันก็อาจให้โทษได้เช่นเดียวกันถ้าเกิดความไม่สมดุลระหว่างสภาวะแวดล้อมกับการทำงานของแร่ธาตุในร่างกาย ตลอดจนปริมาณของโลหะหนักเหล่านี้ที่มีผสมอยู่ในอาหารอย่างผิดปกติ (มาลินี ลิ้มโภคา, 2527) โลหะที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต เรียกว่าเป็น Essential Element จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ในร่างกาย ถ้าขาดโลหะเหล่านี้จะทำให้เอนไซม์ในร่างกายทำงานไม่เต็มที่ แต่ถ้ามีปริมาณมากเกินไปก็จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และเกิดเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้ โดยการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อเริ่มตั้งแต่ปริมาณน้อย ๆ เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงขีดที่ร่างกายจะแสดงผลออกมาทันที ซึ่งเรียกว่าเป็นพิษเฉียบพลัน

การปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมนั้นมาจาก 2 แหล่งใหญ่ คือ จากขบวนการตามธรรมชาติ เช่น การผุพังของหิน พื้นผิวดิน การระเบิดของภูเขาไฟ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของเปลือกโลก เป็นต้น ซึ่งอาจทำให้โลหะหนักจากพื้นผิวโลกเกิดการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้ อีกแหล่งคือเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ ได้แก่ แหล่งอุตสาหกรรม เช่น โรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ ซึ่งอาจปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำหรือปล่อยแก๊สพิษสู่บรรยากาศ แหล่งเกษตรกรรม เช่น การใช้ยาปราบศัตรูพืช ได้แก่ ยากำจัดเชื้อรา ยาฆ่าหญ้า ยาฆ่าแมลง แหล่งชุมชน เช่น การใช้น้ำมันที่มีสารตะกั่วเป็นองค์ประกอบ การทิ้งขยะที่มีโลหะหนักปนอยู่ เป็นต้น ซึ่งโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมนั้นส่วนใหญ่มาจากกิจกรรมของมนุษย์ โดยเฉพาะแหล่งอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะหนัก (ศิริวรรณ ลาภทับทิมทอง, 2544)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แหล่งของโลหะหนัก ที่ปล่อยลงสู่ทะเล

1. จากบรรยากาศ (Atmospheric Input) เป็นแหล่งของธาตุโลหะจากธรรมชาติที่สำคัญที่ถูกปล่อยลงสู่ทะเล พวกโลหะที่ถูกปล่อยขึ้นสู่บรรยากาศ ไม่ว่าจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ หรือภูเขาไฟระเบิด สามารถทำปฏิกิริยาหรือมีกระบวนการควบแน่นก่อนตกลงสู่ทะเล โดยอาจจะตกลงมาทั้งในรูปของอนุภาคขนาดเล็ก (Particles) หรือตกลงมาพร้อมกับฝน (Precipitation) นอก จากนี้ โลหะบางชนิดที่ปล่อยขึ้นสู่บรรยากาศในรูปแก๊ส (Gases) หรือละออง (Aerosols) เช่น ซีลีเนียม (Selenium) ปรอท (Mercury) และโบรอน (Boron) ธาตุเหล่านี้จะใช้ระยะเวลาหนึ่งอยู่ในบรรยากาศก่อนที่จะตกลงสู่ทะเล ระยะเวลาที่อยู่ในบรรยากาศขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เช่น ตะกั่ว ใช้ระยะเวลาประมาณ 5 วัน

2. จากแม่น้ำลงสู่ทะเล (River Input) การเคลื่อนย้ายธาตุโลหะลงสู่ทะเล จากกระบวนการชะล้างของกระแสน้ำลงสู่แม่น้ำ เป็นแหล่งที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งในการนำเอาธาตุโลหะลงสู่ทะเล ปริมาณโลหะที่จะถูกพัดพาออกสู่ทะเลขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่แม่น้ำไหลผ่าน ในการเคลื่อนย้ายธาตุโลหะลงสู่ทะเลผ่านทางแม่น้ำ ส่วนหนึ่งของโลหะจะดูดซับกับอนุภาคของสารแขวนลอยแล้วตกตะกอนในบริเวณปากแม่น้ำ

3. จากแหล่งอื่น ๆ (Other Source) ได้มีการปล่อยโลหะจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือการนำเอาธาตุโลหะไปทิ้งในทะเลโดยตรง

แคดเมียม (Cadmium)

แคดเมียม เป็นโลหะหนักมีสีขาว ฟ้า วาว มีลักษณะเนื้ออ่อน สามารถบิดโค้งงอง่ายและถูกตัดได้ง่ายด้วยมีด มักอยู่ในรูปแท่ง แผ่น เส้นลวด หรือเป็นผงเส้นเล็ก ๆ ในอากาศที่มีความชื้น แคดเมียมจะถูกออกซิไดซ์เป็นแคดเมียมออกไซด์ ในธรรมชาติแคดเมียมมักจะอยู่รวมกับกำมะถันในรูปแคดเมียมซัลไฟด์และมักปนอยู่ในสินแร่ สังกะสี ตะกั่ว หรือทองแดง ฉะนั้นในการทำเหมืองสังกะสีจะได้แคดเมียมซึ่งเป็นผลพลอยได้ (By product) มีการนำโลหะแคดเมียม มาใช้ในวัสดุแผ่นเป็นส่วนผสมของอัลลอยด์ใช้ในการทำนิกเกิลแคดเมียม แบตเตอรี่ เป็นสารคงตัวในโพรีไวนิลคลอไรด์ ใช้ทำสีในพลาสติกและแก้ว เป็นส่วนอมาลกัม (Amlgam) ที่ใช้ในร้านทันตกรรม ผลิตภัณฑ์ที่มีแคดเมียมเป็นส่วนประกอบถ้าให้ความร้อนเกินจุดหลอมเหลว (321 องศาเซลเซียส) จะเกิดควันของแคดเมียม (Cadmium Fumes)

แหล่งสำคัญของการเติมแคดเมียมลงสู่ทะเลได้แก่ จากกระบวนการแยกตัวของเปลือกโลกใต้ทะเลและจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ จะอยู่ในรูปแบบดังนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

- ฝุ่น ละลอง และน้ำทิ้งจากการทำเหมืองแร่ ตะกั่วและสังกะสี หรือจากโรงงานผลิตแคดเมียมโดยตรง

- น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตแผงวงจรไฟฟ้า ซึ่งมีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 100-500 ppm

- ฝุ่น ละออง และน้ำทิ้งจากโรงงานถลุงโลหะและโรงงานถลุงเหล็กกระบวนการผลิตสังกะสีที่ไม่เป็นสนิม โดยมีการเคลือบโลหะที่มีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 0.2% การกัดกร่อนของโลหะเหล่านี้หลังการใช้ประมาณ 4-12 ปี จะเป็นการเพิ่มแคดเมียมลงสู่สิ่งแวดล้อม

- การสึกกร่อนของยางรถยนต์และจักรยานยนต์ ซึ่งมีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 20-90 ppm

- การผลิตปุ๋ยฟอสเฟต หินฟอสเฟตที่ใช้เป็นวัตถุดิบจะมีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 100 ppm

- การเผาไหม้ของถ่านหิน ในถ่านหินมีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.25-5.00 ppm ดังนั้นการเผาไหม้ถ่านหินเป็นการปล่อยแคดเมียมสู่บรรยากาศ

- น้ำทิ้งจากอาคารบ้านเรือนต่าง ๆ มีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่สูงถึง 30 ppm

การนำเอาแคดเมียมมาใช้ทำให้มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมทั้งในอากาศ น้ำ ดิน รวมทั้งในอาหาร เมื่อมีมาก ๆ จะเกิดการสะสม โดยเฉพาะในมนุษย์หรือสัตว์ ถ้ามีการสะสมของแคดเมียมในร่างกายมากอาจก่อให้เกิดพิษได้ (Fergusson, 1990)

แคดเมียมจะมีการสะสมที่ตับและไตโดยจับกับโปรตีนที่ชื่อว่า ไทโอนีน (Thionein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีกรดอะมิโนซิสเตอีนเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 30% โปรตีนไทโอนีนทำหน้าที่ควบคุมเมแทบอลิซึมของทองแดงและสังกะสี การเข้าสู่เซลล์ของแคดเมียมจะถูกต้านด้วยสังกะสี ทองแดง เหล็ก และแคลเซียม สังกะสีและทองแดงจะช่วยลดพิษของแคดเมียมได้ หากร่างกายได้รับแคดเมียมจากอาหารในปริมาณสูง จะมีผลกระทบทำให้เมตาบอลิซึมของทองแดงผิดปกติ แคดเมียมยังสามารถรวมตัวกับโปรตีนเฟอริติน (ferritin) ได้จึงทำให้การเก็บสะสมเหล็กในร่างกายลดน้อยลง และในภาวะที่ร่างกายขาดแคดเมียมจะมีการนำแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายได้มากขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ทองแดง (Copper)

ทองแดง (Cu) มีจุดหลอมเหลว 1,083 องศาเซลเซียส จุดเดือด 2,582 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 8.94 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีเลขออกซิเดชัน +1, +2 เป็นโลหะที่ใช้มากที่สุดโลหะหนึ่งในรูปของโลหะอิสระ เพราะมีสมบัติที่เยี่ยมหลายประการ เช่น มีการนำไฟฟ้าและความร้อนที่ดี ทนต่อการผุกร่อน แข็งแรง ดึงเป็นเส้นและแผ่นบาง ๆ ได้ดี ทองแดงบริสุทธิ์มีสีแดง มีความแวววาว มีความแข็งและความเหนียว โดยมีการขุดใช้มากมาย ทั้งในรูปของทองแดงอิสระและสารประกอบ ซึ่งส่วนใหญ่รวมกับเหล็ก กำมะถัน คาร์บอน และออกซิเจน
(ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2525)

แหล่งของทองแดงที่มาจากกิจกรรมของมนุษย์ ได้แก่ การกัดกร่อนทองเหลืองและท่อทองแดงโดยกรด น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และการใช้สารประกอบทองแดง เช่น Copper Sulphate เป็นสารกำจัดพืชน้ำ (Aquatic Algicide) หรือการนำมาใช้เป็นส่วนผสมของสีทาเรือเพื่อป้องกันเพรียงแทน TBT (Tributyl Tin) ซึ่งมีพิษรุนแรงและเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในทะเล มีผลต่อการพัฒนาส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ของพวกหอยทะเล หรือที่เรียกว่า Imposex ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบฮอร์โมนทำให้ระบบการสืบพันธุ์ล้มเหลว ทองแดงที่มาจากแหล่งอุตสาหกรรม เช่น โรงงานถลุงแร่ทองแดง โรงงานผลิตลวดทองแดง แผงวงจรไฟฟ้า โรงงานผลิตเหล็กและเหล็กกล้า และการเผาไหม้ของถ่านหิน เป็นต้น

ปรอท (Mercury)

ปรอทเป็นโลหะสีขาว เป็นของเหลวอุณหภูมิปกติ สามารถแยกระเหยกลายเป็นไอได้ ประโยชน์ของปรอท ได้แก่ ใช้ทำเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น เทอร์โมมิเตอร์ บารอมิเตอร์ ปั๊มดูดอากาศ และเครื่องมือที่ใช้วัดความดันโลหิต ใช้ในอุตสาหกรรมไฟฟ้า เช่น สวิตช์อัตโนมัติสำหรับตู้เย็นและไฟฟ้ากระแสตรง ซัลไฟด์ของปรอทใช้ทำสีแดงในอุตสาหกรรมเครื่องเคลือบดินเผา ออกไซด์ของปรอทใช้ในการทำสี เพื่อป้องกันมิให้แตกและลอกง่าย สำหรับนำไปใช้ทาใต้ท้องเรือ

รูปแบบของสารปรอทอินทรีย์ จะมีความเป็นพิษน้อยกว่าในรูปปรอทอนินทรีย์ พิษของสารปรอทต่อสาหร่ายทะเลขึ้นอยู่กับรูปฟอร์ม ปรอทที่อยู่ในแพลงก์ตอนพืชจะเป็นปรอทอนินทรีย์ แพลงก์ตอนพืชไม่สามารถเปลี่ยนรูปปรอทอนินทรีย์ให้เป็นปรอทอินทรีย์ได้ แต่แพลงก์ตอนพืชสามารถดึงปรอทในน้ำเข้ามาสะสมไว้ภายในเซลล์ หรือบริเวณผนังเซลล์ได้โดย ตรง ความเข้มข้นสะสม (Concentration Factor) ของสารปรอทในแพลงก์ตอนพืชจะแปรผันอยู่ในช่วงสองร้อยถึงหลายพันเท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรูปฟอร์มของสารปรอท (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2543) ส่วนสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและหอยทะเลสองฝา มีความสามารถในการดูดซึมสารปรอทได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หอยสองฝาเป็นตัวบ่งชี้สภาวะแวดล้อมได้ดี เนื่องจากหอยกินอาหารโดยการกรอง จึงมีโอกาสที่จะสะสมสารปรอทได้มาก

ในปลาทะเลส่วนใหญ่ จะมีสารปรอทเป็นองค์ประกอบอยู่ในกล้ามเนื้อประมาณ 150 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (0.15 ppm) ในปลา Cod (*Gadus morhua*) บริเวณทะเลเหนือมีการสะสมของสารปรอทอยู่ 0.15-0.20 ppm ส่วนในกรีนแลนด์มีการสะสมของสารปรอทอยู่เพียง 0.01-0.04 ppm ในปลาฉลามซึ่งอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งฟลอริดา พบมีสารปรอทสะสมอยู่ในตัวถึง 2.57 ppm ในปลาทะเลมากกว่า 33% มีการสะสมสารปรอทเกินกว่าระดับที่มนุษย์คารบริโภค คือ 1 ไมโครกรัมต่อกรัม (Clark, Frid, & Attrill ,1997) ในปลาทะเลบางชนิด เช่น ปลาโอ (*Thunnus* spp.) ปลา Swordfish (*Xiphias glacdius)* ปลา Marlin indical ที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติจะมีระดับความเข้มข้นของปรอทสูงกว่าปลาชนิดอื่น ในปลาทะเลกินเนื้อซึ่งถือเป็นผู้บริโภคสุดท้ายในทะเล ปลากลุ่มนี้จะมีระดับของปรอทสูงเนื่องจากกระบวนการ Bioaccumulation ปลาทะเลที่ว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลา มีอัตราเมทาบอลิซึมสูงและจะเปิดปากตลอดเวลาเพื่อรับออกซิเจนจากน้ำที่ไหลผ่านเหงือก ลักษณะเช่นนี้ทำให้ได้รับสารปรอทในรูป Methyl Mercury เข้าสู่ร่างกายเช่นกันและมีการสะสมเพิ่มขึ้นตามอายุ โดยปลาทะเลที่มีอายุมากจะมีการสะสมสารปรอทสูงกว่าอายุน้อย

ปลาสามารถรับสารปรอทได้โดยตรงจากอาหารที่กินและจากน้ำ อัตราการสะสมของสารปรอทก็จะขึ้นกับรูปของสารปรอท และปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิและความเค็ม เมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นการสะสมของสารปรอทสูงขึ้นตาม ความเค็มของน้ำก็มีอิทธิพลต่อการสะสมของสารปรอทในร่างกายปลา ปลาน้ำจืดจะสะสมเร็วกว่าน้ำกร่อย ส่วนปลาทะเลที่มีความเค็มปกติ (ประมาณ 30 ppt) จะมีอัตราการสะสมของสารปรอทภายในตัวได้ดีกว่าปากน้ำกร่อย เนื่องจากปลาทะเลจะต้องดื่มน้ำทะเล เพื่อปรับระดับความเข้มข้นภายในตัว (Osmoregulagion) จึงมีโอกาสรับสารปรอทจากน้ำโดยตรง ผลที่จะเกิดขึ้นต่อสัตว์น้ำเมื่อได้รับปรอทมีด้วยกันหลายประการ ได้แก่ ผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ กระบวนการทางสรีรวิทยา พฤติกรรม การกินอาหาร วงจรชีวิต การอพยพย้ายถิ่น และพันธุกรรมเป็นต้น

สารหนู (Arsenic)

สารหนูเป็นธาตุกึ่งโลหะ พบได้ทั่วไปในส่วนประกอบของหิน ถ่านหินและดิน ในสมัยโบราณสารหนูเป็นที่รู้จักกันในชื่อ Orpiment โดยพวกกรีกและโรมันเป็นผู้เรียกว่าสารหนู (Arsenic) คนจีนใช้สารหนูเป็นส่วนประกอบของยาสมุนไพรหลายชนิดเมื่อประมาณกว่า 2-3 พันปีมาแล้ว สารหนู (Arsenic) เป็นสารก่อมะเร็งที่มีน้ำหนักอะตอม 74.9216 พบสารหนูได้ 2 แบบคือ สารหนูอินทรีย์ (Organic) และสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic) สารหนูอินทรีย์เป็นพิษน้อยกว่าสาร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หนูอนินทรีย์ สารหนูเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติและด้วยฝีมือมนุษย์ ในธรรมชาติการชะล้างของหินและแร่ที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบ เช่น อาร์ซิโนไพไรต์ (FeAsS) ทำให้พบสารหนูทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในดิน พบได้ตั้งแต่ 0.1-40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม กิจกรรมการดำเนินชีวิตของมนุษย์ ทำให้สารหนูในสิ่งแวดล้อมเพิ่มปริมาณมากขึ้น เช่น การทำเหมืองแร่ การถลุงโลหะ การใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลงในการเกษตร อาร์เซนิกไตรออกไซด์ (Arsenic Trioxide) ถูกนำมาใช้ทางการค้าและการเกษตรทั่วโลกประมาณปีละ 50,000 ตัน โดยใช้เป็นวัตถุดิบของยากำจัดศัตรูพืช ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช น้ำยาถนอมเนื้อไม้ บางครั้งผสมในอาหารสัตว์ ในยาคนและยาสัตว์ รวมทั้งใช้ผสมโลหะทำอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ การปนเปื้อนสารหนูในทะเลส่วนใหญ่จะมาจากธรรมชาติ โดยเฉพาะในบริเวณที่มีการทำเหมืองแร่ Metalliferous

ในสาหร่ายทะเลมีองค์ประกอบของสารหนูอยู่ในรูป Carbohydrate Compound ในสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น สาหร่ายทะเล กุ้ง ปู และปลา มีการสะสมของสารหนู แต่การสะสมไม่เพิ่มขึ้นทางระบบของห่วงโซ่อาหาร พิษของสารหนูจะขึ้นอยู่กับรูปแบบ (Form) โดยสารหนูที่อยู่ในรูป Trivalent จะมีความเป็นพิษสูงกว่ารูป Pentavalent ในสัตว์ทะเลจะมีสารหนูเป็นองค์ประกอบอยู่ในรูป Arsenobutaine ซึ่งเป็นรูป Pentavalent ซึ่งไม่เป็นอันตราย ความเป็นพิษของสารหนูอนินทรีย์ ในรูป Arsenic trioxide ที่มีต่อมนุษย์เป็นที่รู้จักกันดี โดยมีค่า Lethal Dose อยู่ระหว่าง 50-300 มิลลิกรัม การสูดเอาสารหนูอนินทรีย์ สามารถทำให้เกิดมะเร็งในระบบทางเดินหายใจ การดื่มน้ำที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบอยู่อาจทำให้เกิดมะเร็งในถุงน้ำดี ตับ ไต และผิวหนังได้ (Neff, 1997)

ตะกั่ว (Lead)

ตะกั่วเป็นโลหะที่มนุษย์สนใจเรื่องความเป็นพิษมากที่สุด เนื่องจากการใช้ประโยชน์อย่างมากมาย โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมแบตเตอรี่รถยนต์และเรือดำน้ำ ใช้ตะกั่วเกือบร้อยละ 50 ของผลิตผลตะกั่วทั้งหมด และยังใช้ในรูปตะกั่วอินทรีย์ (Alkyl Lead) เป็นสารเคมีที่ใช้เติมในน้ำมันเบนซิน ใช้ในอุตสาหกรรมสี เช่น สีแดงของตะกั่วออกไซด์ (Red Lead) สีเหลืองจากตะกั่วโครเมต (Lead Chromate) สีขาวจากตะกั่วคาร์บอเนต (Lead Carbonate) และตะกั่วซัลเฟต (Lead Sulfate)

กระบวนการสลายตัวของหินโดยธรรมชาติเป็นแหล่งของตะกั่วจากธรรมชาติที่สำคัญ จากการประมาณปริมาณตะกั่วที่มาจากธรรมชาติมีถึง 24.5 x 10^3 ตัน/ปี ในจำนวนนี้กว่า 65% มาจากกระบวนการชะล้างกัดกร่อนของหินในธรรมชาติ (Clark et al., 1997)

จากการกระทำของมนุษย์ ตะกั่วที่เกิดขึ้นจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การทำเหมืองแร่ โรงงานถลุงแร่ตะกั่วหรือแร่ชนิดอื่น ตะกั่วในรูป Tetraalkyl Lead มีการนำมาใช้เติมในน้ำมันเชื้อเพลิงเพื่อป้องกันการน็อคของเครื่องยนต์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1923 การเผาไหม้ของเครื่องยนต์จากการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จุดระเบิดทำให้ตะกั่วในรูป Tetraalkyl lead กลายเป็นตะกั่วอนินทรีย์และถูกปล่อยสู่บรรยากาศ ปีละกว่า 450,000 ตัน การเผาไหม้จากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นแหล่งที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งในการปล่อยสารตะกั่วออกสู่สิ่งแวดล้อม บรรยากาศเป็นแหล่งรองรับสารตะกั่วที่ถูกปลดปล่อยออกมา จากนั้นก็จะเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งอื่น เช่น ดิน และน้ำ

ตะกั่วที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในทะเล โดยปกติจะไม่เป็นพิษเมื่อเปรียบเทียบกับโลหะชนิดอื่น ที่ความเข้มข้นของตะกั่วสูงถึง 0.8 ppm ในรูป Lead nitrate สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชได้ ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของธาตุอาหารในรูปไนเตรต ที่เป็นองค์ประกอบอยู่นั่นเอง (Clark et al., 1997) การสะสมตะกั่วในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Aphanothece halophytica พบว่าสาหร่ายตัวนี้สามารถสะสมตะกั่วในอัตราที่เร็วมาก การสะสมจะอิ่มตัวที่ 90 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งสาหร่าย ภายใน 1 ชั่วโมง ที่จุดอิ่มตัวนี้ ตะกั่วที่ถูกสะสมไว้สามารถใช้ EDTA ดูดซับออกมา แสดงให้เห็นว่าการสะสมตะกั่วของสาหร่ายเกิดขึ้นที่ผิวเซลล์เป็นส่วนใหญ่ สาหร่ายจะมีความสามารถในการสะสมตะกั่วลดลงเมื่ออายุมากขึ้น

หอยแมลงภู่ (*Mytilus* spp.) มีกลไกการลดความเป็นพิษ (Detoxifying Mechanism) ที่เกิดจากตะกั่ว โดยการเก็บสะสมตะกั่วในรูป Granule ในส่วนของ Digestive Gland จากเหตุผลดังกล่าว จึงมีการใช้หอยแมลงภู่เป็นตัวตรวจสอบการเกิดปัญหามลพิษที่เกิดขึ้นจากตะกั่ว โดยทั่วไปหอยจะมีตะกั่วสะสมอยู่ในปริมาณต่ำกว่า 1 ppm (น้ำหนักเปียก)

ปลาทะเลจะมีการสะสมตะกั่วในปริมาณน้อย โดยปกติจะอยู่ในช่วง 0.05-0.15 ppm (น้ำหนักเปียก) มีการศึกษาในแมวน้ำที่กินปลาเป็นอาหาร ไม่พบการสะสมของตะกั่วในร่างกาย ในนกทะเล พบระดับสารตะกั่วมากกว่า 100 ppm (น้ำหนักแห้ง) อยู่ในรูป Trialkyl Lead ในส่วนของตับ นกทะเลที่มีระดับของ Trialkyl Lead สะสมในตับเพียง 0.5 ppm จะทำให้เกิดพิษโดยทำให้ระบบประสาทกล้ามเนื้อไม่ทำงาน และตายในที่สุด

สถานการณ์คุณภาพน้ำชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโลหะหนักบางชนิดในดินตะกอนบริเวณอ่าวไทยตอนบน ระหว่าง พ.ศ. 2533-2542 ของสมกพ รุ่งสุภา สมบัติ อินทร์คง และเอนก โสภณ (2543) พบว่าโลหะหนักแคดเมียม และทองแดง ในบริเวณปากแม่น้ำสายต่างๆ จากปากแม่น้ำแม่กลอง ท่าจีน เจ้าพระยา และบางปะกงจนถึงปากแม่น้ำระยอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ขณะที่การสะสมของแคดเมียมและตะกั่วในหอยแมลงภู่ บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามขนาดของหอยแมลงภู่ และระยะเวลา (สุชาดา ถิ่นแถบ, 2543) ส่วนในหอยนางรมปริมาณแคดเมียมมี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แนวโน้มสะสมสูงขึ้นตามขนาดของหอยนางรม ขณะที่ปริมาณการสะสมสารตะกั่ว, ทองแดงและสังกะสี พบว่ามีปริมาณลดลงตามระยะเวลา โดยพบมีโลหะหนักสะสมในปริมาณสูงในช่วงฤดูฝนแล้วจะลดลงเมื่อหลังฤดูฝน (เพลิน ปุรณามระ, 2544) ซึ่งตะกอนดินในแม่น้ำบางปะกงพบว่าปริมาณแคดเมียม ทองแดง เหล็กและสังกะสีมีสูงในช่วงที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตรแล้วจะลดลงตามความลึก นั่นแสดงถึงการปนเปื้อนมีแนวโน้มสูงขึ้น (สุวรรณา ภาณุตระกูล และไพฑูรย์ มกกงไผ่, 2543) และจะออกสู่มวลน้ำหรืออยู่ในตะกอนแขวนลอยขนาดเล็กถูกพัดพาไหลมากับกระแสน้ำ

การตรวจคุณภาพน้ำของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล (2545) พบว่าคุณภาพน้ำในบริเวณเขตเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ประกอบด้วยสถานีปากแม่น้ำบางปะกง อ่าวชลบุรี อ่างศิลาศรีราชา จังหวัดชลบุรีและบริเวณปากแม่น้ำประแสร์ จังหวัดระยอง ปากแม่น้ำจันทบุรี และแม่น้ำตราด ปริมาณแคดเมียมมีค่าสูง จากการศึกษายังพบว่า สถานีในแม่น้ำหรือบริเวณใกล้ฝั่งค่าความเข้มข้นของโลหะหนักจะสูงและลดลงเมื่อออกห่างจากแม่น้ำหรือออกห่างจากฝั่ง นั่นแสดงว่าแหล่งที่มาของโลหะหนักมาจากต้นน้ำ ที่มีอยู่ตามธรรมชาติหรือการปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำจากกิจกรรมบนฝั่ง ขณะที่บริเวณเขตอุตสาหกรรม คือ อ่าวอุดม จังหวัดชลบุรี บริเวณบ้านหนองแฟบและนิคมอุตสาหกรรมปิโตรเคมี มาบตาพุด จังหวัดระยอง ในบริเวณแหลมฉบังโลหะหนักแคดเมียม ทองแดง นิเกิล ตะกั่ว และสังกะสี ในบริเวณแหลมฉบังมีแนวโน้มสูงกว่ามาบตาพุดส่วนใหญ่พบว่าในฤดูแล้งมีสูงกว่าฤดูฝน แต่ตะกั่ว ในสถานีใกล้ฝั่งในฤดูแล้งสูงกว่าในฤดูฝน ขณะที่สถานีไกลฝั่งความเข้มข้นในฤดูฝนมีค่าความเข้มข้นสูงกว่าฤดูแล้ง นั่นแสดงว่าแหล่งปนเปื้อนโลหะหนักในน้ำทะเลมาจากบนฝั่ง โดยบริเวณแหลมฉบัง และมาบตาพุดมีโรงงานอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ มากมายที่อาจจะเป็นสาเหตุให้มีโลหะหนักลงปนเปื้อนในแหล่งน้ำ และเมื่อสัตว์น้ำรับเอาโลหะหนักเข้าสู่ร่างกายอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัตว์น้ำเป็นโรคต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น เนื่องจากโลหะหนักไปมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์น้ำ ระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ มีความผิดปกติเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมทำให้สัตว์น้ำมีความไวหรือง่ายต่อการติดเชื้อ

ตัวชี้วัดทางชีวภาพ

ในปัจจุบันมีหลายคำจำกัดความที่ถูกนำมาใช้ในการอธิบายถึงนิยามของคำว่าตัวชี้วัดทางชีวภาพ เช่น Peakall (1994) ได้ให้คำจัดกัดความของตัวชี้วัดทางชีวภาพว่า ตัวชี้วัดทางชีวภาพหมายถึง การเปลี่ยนแปลงหรือการตอบสนองทางชีววิทยาตั้งแต่ระดับโมเลกุล ระดับเซลไปจนถึงลักษณะทางชีวิทยา และพฤติกรรม หลังจากที่ได้รับสารพิษในสิ่งแวดล้อม ในขณะที่ WHO (1993)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ได้ให้คำจำกัดความว่า ตัวชี้วัดทางชีวภาพ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของระบบชีววิทยา และอาจจะก่อให้เกิดอันตรายต่าง ๆ ได้ ตัวชี้วัดทางชีวภาพแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. ตัวชี้วัดทางชีวภาพของการสัมผัส (Biomarker of Exposure) เป็นตัวแสดงการสัมผัสบ่งชี้ว่ามีสารแปลกปลอม หรือ อนุพันธ์ ผลิตผลจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารภายนอกกับโมเลกุลเป้าหมายของเซลล์ได้เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งสามารถวัดได้ในสิ่งมีชีวิต เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ที่ประกอบด้วยปริมาณที่รับสัมผัส (Internal Dose) ขนาดที่ให้ผลทางชีวภาพ (Biologically Effective Dose) และผลทางชีววิทยา ที่ปรากฏในระยะแรก (Early Biologic Effect)

2. ตัวชี้วัดทางชีวภาพของความไวรับ (Biomarker of Susceptibility) คือตัวที่แสดงความสามารถที่มีมาแต่กำเนิด หรือได้รับภายหลัง ที่จะเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อการสัมผัสสารตัวใดตัวหนึ่งจากภายนอก

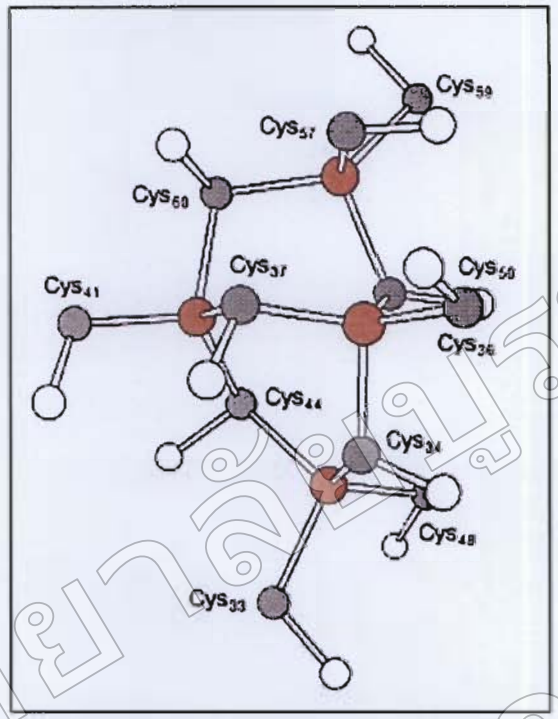
3. ตัวชี้วัดทางชีวภาพที่แสดงผล (Biomarker of Disease หรือ Biomarker of Effect) คือ การเปลี่ยนแปลงที่วัดได้ทางชีวเคมี สรีรวิทยา พฤติกรรม หรือการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ของสิ่งมีชีวิตตัวชี้วัดทางชีวภาพจะใช้ในการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล ระดับชีวเคมี หรือระดับเซลล์ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ในสิ่งมีชีวิต เช่นเนื้อเยื่อ เซลล์ และสารน้ำของร่างกาย แต่สำหรับการศึกษา MT ในสิ่งมีชีวิตนั้นจำแนกได้ว่าเป็นการศึกษาในระดับชีวเคมี โดยการศึกษาถึงการสร้าง MT ในสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ประเมินถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมนั้น สิ่งมีชีวิตกลุ่มแรกที่มีการศึกษาคือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในน้ำ (Dabrio et al., 2002)

Metal - binding protein

Metal - binding protein หรือ Metallothionein (MT) เป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดเล็กที่มีการจับกันของโลหะ และเป็นโปรตีนที่มีลักษณะพิเศษ คือ ประกอบด้วย Cysteine สูงประมาณ 30 % ของกรดอะมิโน มีมวลโมเลกุลต่ำและไม่มี Aromatic Amino Acid และ Histidine อยู่ในโมเลกุล ซึ่งในโมเลกุลของ MT นี้ Cysteine จะทำหน้าที่เป็นลิแกนให้โลหะมาจับ (Izawa, Moussa, Cherian, Gordon, & Chin, 1998; Minami, Ichida, & Kubo, 2002)

MT มีหน้าที่ทางชีวภาพมากมาย ซึ่งหน้าที่ที่ตรวจพบ คือ การลดความเป็นพิษของโลหะ เช่น แคดเมียมและปรอท การมีส่วนร่วมในการควบคุม จัดเก็บ และการจ่ายออกของไอออนของโลหะบางชนิด เช่น สังกะสีและทองแดง เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์ และที่สำคัญคือทำหน้าที่ขนส่งไอออนของโลหะไปยังโปรตีนอื่น ๆ เช่น Zinc Finger โปรตีนที่มีความสำคัญกับการจับตัวกันของดีเอ็นเอและควบคุมโปรตีนในสิ่งมีชีวิตเป็นต้น (Tapiro & Ten, 2003; Chen, 2002; Deed & Klerk, 1999; Roesijadi, 1994)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-1 ลักษณะโครงสร้างของ Metallothionein

การประยุกต์ใช้ Metal-Binding Protein เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันพบว่าโลหะหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งแคดเมียมเป็นสารที่มีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมค่อนข้างมาก โดยส่วนใหญ่จะอยู่รวมกับสังกะสี ตะกั่วและคอปเปอร์ซัลไฟด์ และแคดเมียมจะพบมากในวัสดุที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่สูง เช่น น้ำมันดิบและถ่านหิน (สุวัจน์ ธัญรส, 2549) นอกจากนี้ยังพบได้ในกิจกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำเหมือง การหลอมและการถลุงตะกั่ว และสังกะสี เป็นต้น จากลักษณะที่กล่าวมาจึงทำให้มีแคดเมียมเข้าไปปนเปื้อนในแหล่งน้ำต่าง ๆ มากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำทะเล เพราะทะเลเป็นแหล่งสะสมของเสียแหล่งสุดท้ายของมนุษย์ ทำให้สัตว์น้ำต่าง ๆ ได้รับแคดเมียมและเก็บสะสมแคดเมียมไว้ในตัวเป็นจำนวนมาก เมื่อนำสัตว์น้ำมารับประทานจึงมีโอกาสได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพในมนุษย์ได้ แคดเมียมและสารในกลุ่มโลหะหนักเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพ โดยอาจจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ กระบวนการทางสรีรวิทยา และพันธุกรรม เป็นต้น ดังนั้นการตรวจวัดโลหะหนักบริเวณแนวชายฝั่งทะเลเพื่อทำให้ทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของโลหะหนัก เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและจัดการการปนเปื้อนของโลหะหนักแนวชายฝั่งทะเลจึงกลายเป็นสิ่งที่น่าสนใจ แต่การ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตรวจสอบการปนเปื้อนโดยการวัดปริมาณโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมหรือสิ่งมีชีวิตโดยตรงนั้นทำได้ยากและที่สำคัญคือต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ดังนั้นการใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) เช่น MT จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรจะพิจารณาทั้งนี้ก็เนื่องจาก MT เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มี Cystein สูง และสามารถเลือกจับกับโลหะได้อย่างจำเพาะ ระดับความเข้มข้นของ MT จะเพิ่มขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับโลหะ เพราะ MT มีบทบาทสำคัญในการเมตาโบไลต์และปรับสมดุลของร่างกายให้เป็นปรกติ จากลักษณะดังกล่าว MT จึงถูกเสนอให้ใช้เป็นดัชนีชี้บ่งถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมได้

การเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ Metal - Binding Protein

MT สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย การเหนี่ยวนำจากโลหะ เช่น ทองแดง แคดเมียม และ ปรอท เป็นสาเหตุหลักที่พบในสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก MT มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย Cysteine มากกว่า 30 % จึงทำให้สามารถจับกับโลหะต่าง ๆ ได้ง่ายเพราะ Cystein ทำหน้าที่เป็นลิแกนให้โลหะมาจับ นอกจากการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ MT จะเกิดจากโลหะต่าง ๆ แล้ว Endotoxin สารเคมีต่าง ๆ Cytokines และสภาวะที่ทำให้เกิดความเครียดก็สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ MT ขึ้นได้ (Nostelbacher, Kirchgessner, & Stangl, 2000)

การสังเคราะห์ MT ในสิ่งมีชีวิตนอกจากจะเกิดจากปัจจัยดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว มีรายงานอีกหลายฉบับที่เสนอว่า อาหาร อายุ และระยะการพัฒนาการต่าง ๆ ล้วนมีผลต่อการสังเคราะห์ MT และ MT สามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิด แต่ที่พบว่ามีการสร้างและสะสม MT อยู่มาก คือ เซลล์ของตับ และเหงือก (Costa et al., 2000)

สำหรับการเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง MT ในสิ่งมีชีวิตในทะเลหลายชนิด เมื่อได้สัมผัสกับโลหะหลายชนิด เช่น แคดเมียม ปรอท ทองแดง และ เงิน จะนำไปสู่การเสนอให้การใช้ MT เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการติดตามและตรวจสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำและเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของโลหะหนักที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ MT ใน Form ต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะนำลักษณะที่สำคัญที่ตรวจพบใน MT นี้มาใช้สำหรับเป็นตัวชี้บ่งถึงการรับสัมผัสทางโลหะหนัก และที่สำคัญคือ ยังยืนยันได้ถึงหน้าที่หลักของ MT ในสิ่งมีชีวิตด้วยนั้น คือ บทบาทของ MT ในการกำจัดสารพิษและการปรับสมดุลของไอออนของโลหะในร่างกาย โดยการศึกษานี้ใช้จะใช้ปูม้า (*C. sapidus*) เป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตในน้ำ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า MT จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นเมื่อปูม้าได้รับแคดเมียม แต่ MT ที่ตรวจพบมี 2 Form คือ CdMT-I และ CdMT-II ซึ่ง CdMT-I จะสามารถจับกับ Cd ได้ดีกว่า CdMT-II และนอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเพิ่มเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ MT เมื่อให้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปูม้าได้รับสัมผัสคทองแดงซึ่งจากการศึกษาพบว่า เมื่อปูม้าได้รับทองแดงจะมีการสังเคราะห์ MT เกิดขึ้น โดย MT ที่ตรวจพบจะมีอยู่ 3 Form คือ CdMT-I, CdMT-II, และCdMT-III และหลังจากการทำการศึกษาลักษณะเฉพาะของ MT ที่พบใน Form ต่าง ๆ พบว่า CdMT-I และCdMT-II จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ Metabolism แต่สำหรับ CdMT-III จะเกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษ หรือ Detoxification ของคอปเปอร์ (Schlenk & Brouwer, 1993)

แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็มีรายงานเพิ่มอีกว่า ปัจจัยทางธรรมชาติ เช่น ความเค็มก็มีผลอย่างมากกับการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ MT ในสิ่งมีชีวิต กล่าวคือ ความเค็มจะมีผลต่อการเปลี่ยนรูป (Speciation) และ Bioavailability ของโลหะ และมีผลต่อการ Uptake โลหะของสิ่งมีชีวิตในน้ำ (Bianchini & Gilles, 2000; Bianchini et al., 2000) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าความเค็มจะมีผลโดยตรงที่จะคาบคุมปริมาณของโลหะที่จะเข้าไปจับกับ MT ซึ่งแสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่าความแปรปรวนหรือการเปลี่ยนแปลงความเค็มมีผลต่อความเข้มข้นของ MT ในสิ่งมีชีวิต (Monserrat et al., 2007)

การตรวจสอบ Metal - Binding Protein ในสิ่งมีชีวิต

การวัดปริมาณและการศึกษาถึงลักษณะเฉพาะของ Metal-Binding Protein เป็นสิ่งที่สำคัญเพราะจะทำให้เข้าใจถึงบทบาทและหน้าที่ของ Metal-Binding Protein ที่พบในสิ่งมีชีวิต แต่เนื่องจากการศึกษา Metal-Binding Protein ในปัจจุบันมีวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาถึงเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบได้อย่างถูกต้องและแม่นยำจึงถูกพัฒนาได้อย่างไม่หยุดยั้ง วิธีการตรวจสอบ Metal-Binding Protein ที่พบในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้แก่ Separation techniques และ Hyphenated system, Electrochemical methods, Quantification of Metal binding proteins mRNA และเทคนิคทางระบบภูมิคุ้มกันหรือ Immunological methods เป็นต้น (Dabrio et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตามเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่มีราคาแพง รวมทั้งปัญหาในเรื่องของความยุ่งยากในการสกัดตัวอย่าง และการที่โครงสร้างของ MT มีหลายแบบทำให้เกิดปัญหาอย่างมากในการตราจสอบ MT ในสิ่งมีชีวิต

สำหรับการตราจสอบ Metal-Binding Proteins เชิงปริมาณนั้นพื้นฐานของเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบจำแนกออกเป็น 3 วิธี คือ

1. เทคนิคทางเคมี เป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับการตรวจสอบสารเชิงปริมาณ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ Metal-Binding Protein ในสิ่งมีชีวิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Metal-Binding Proteins ในสัตว์น้ำ เช่น ปลา และกุ้ง เป็นต้น การตรวจสอบ Metal-Binding Protein

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เชิงปริมาณที่พบในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆไป มีหลายวิธีทั้งที่สามารถวัดปริมาณ Metal-Binding Protein ได้โดยตรงและโดยอ้อม จำแนกได้ดังนี้

- การวัด Metal-Binding Protein โดยอ้อมจะเป็นการวัดโลหะที่จับอยู่กับโปรตีน ซึ่งปริมาณที่ตรวจสอบได้จะเห็นจาก Total Saturation ของโมเลกุลโปรตีนกับไอออนของโลหะที่จับอยู่ การตรวจวัด Metal-Binding Protein โดยอ้อมสามารถตรวจวัดได้โดยใช้ atomic absorption spectrometry (AAS) หรือไม่ก็ใช้ Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) หรือ Electrothermal Atomic Absorpion Spectrometry หรือ Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) หรือ Induced Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-MS) เป็นต้น

- การตรวจสอบ Metal-Binding Protein โดยตรง ถึงแม้ว่าการวัดโดยอ้อมหลายวิธีจะถูกพัฒนา แต่การใช้วิธีตรวจสอบ Metal-Binding Protein โดยตรงก็ยังได้รับความนิยมในการพัฒนาสำหรับการตราจสอบ ApoMT (Apometal binding protein) แต่อาจจะมีความแตกต่างในเรื่องของ detector

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบ Metal-Binding Protein เชิงปริมาณโดยการวัดโดยตรงและโดยอ้อม พบว่า การตรวจสอบ Metal-Binding Protein ทางตรงจะใช้เวลานานมากกว่า แล้วก็จำเป็นที่จะต้องมีการทำบริสุทธิ์ หรือทำให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้วิธีใดในการตราจสอบนั้นก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษา การตรวจสอบ Metal-Binding Protein ทางตรงมีหลายวิธี เช่น Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis เป็นต้น

2. เทคนิคทางชีวโมเลกุล (Molecula technique)

การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบปริมาณ Metal Binding Protein ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา โดยจะตรวจสอบจากการวัดปริมาณของ Metal binding protein mRNA โดยใช้เทคนิค PCR, Nothern Blotting และ RT -PCR (Dabrio et al., 2002)

3. เทคนิคทางแอนติบอดี (antibody technique)

การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดีจะเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน เป็นปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล 2 ชนิด คล้ายกับกรณีของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรทแต่มีข้อแตกต่างบางประการ ได้แก่ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอย่างถาวรต่อแอนติบอดีและแอนติเจนประกอบด้วยพันธะต่าง ๆ ยกเว้นพันธะโควาเลนต์ (Noncovalent Interaction) ระหว่าง Epitope ของแอนติเจนกับบริเวณที่มีความแปรปรวนสูง (Hypervariable Region) หรือ พาราโทป (Paratope) ของแอนติบอดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความจำเพาะระหว่างปฏิกิริยาของแอนติบอดีและแอนติเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunoassay) รูปแบบต่าง ๆ ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งในการตรวจสอบแอนติบอดีหรือแอนติเจนก็ได้ สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ ตรวจระดับการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดี พิสูจน์ทราบโมเลกุลทางชีววิทยาหรือทางการแพทย์ที่ต้องการ Immunoassay รูปแบบต่าง ๆ จะมีความไวและความรวดเร็วแตกต่างกันไป บางชนิดใช้ตรวจในแง่คุณภาพ บางชนิดสามารถใช้วัดปริมาณได้ด้วย (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

เทคนิคทางแอนติบอดีจะใช้ในการศึกษาสารทดสอบต่าง ๆ ได้หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งการทดสอบด้วยแอนติบอดีประกอบด้วยหลากหลายวิธี ซึ่งมีรูปแบบและความไวต่างกัน ซึ่งเทคนิคทางแอนติบอดีที่ถูกนำมามาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารเชิงปริมาณที่พบในห้องปฏิบัติการ ทั่วไป ได้แก่

3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

เป็นวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้แทนสารกัมมันตภาพรังสี หรือสารเรืองแสง วิธีนี้สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีและแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจงมีความไวสูง ง่าย และรวดเร็ว การทดสอบโดยทั่วไปมักใช้วัสดุ (Solid Phase) เป็นตัวดูดซับแอนติเจนหรือแอนติบอดีไว้ก่อนและเมื่อปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจนเกิดขึ้นแล้ว ล้างส่วนของแอนติบอดีหรือ แอนติเจนส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกจึงทำได้สะดวก เพราะแอนติบอดีและแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากันจะติดอยู่กับวัสดุ จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีที่จำเพาะด้วยเอนไซม์ลงไป ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรทที่ใส่ลงไปภายหลัง ทำให้เกิดเป็นสารสีขึ้นเรียกการทดสอบว่า Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA มีหลายรูปแบบสามารถใช้ตรวจสอบแอนติบอดีหรือแอนติเจน โดยจะมีแนวทางปฏิบัติคล้าย ๆ กัน ซึ่งรูปแบบของ ELISA มีดังนี้

Indirect ELISA ใช้สำหรับตรวจสอบแอนติบอดี เช่น คัดเลือกไฮบริโดมาหรือตรวจแอนติบอดีต่อแอนติเจนในซีรัม วิธีนี้เหมาะสำหรับกรณีที่สามารถเตรียมแอนติเจนบริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในปริมาณน้อยระดับมิลลิกรัม เนื่องจากวิธีนี้มีความไวสูงสามารถตรวจสอบแอนติเจนได้ในระดับนาโนกรัม วิธีนี้เริ่มด้วยการตรึงแอนติเจนในหลุมจากนั้นบ่มแต่ละหลุมด้วยสารละลายที่มีแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบและล้างแอนติบอดีที่ไม่จับทิ้งไป จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีของสัตว์ที่ใช้ (เช่น แอนติบอดีตัวแรกมาจากหนู แอนติบอดีติดฉลากเอนไซม์จะเป็น Anti-Mouse Ig จากสัตว์ต่าง ๆ เช่น กระต่าย แพะ แกะ เป็นต้น) หรืออาจใช้ Protein A หรือ Protein G ติดฉลากด้วยเอนไซม์ด้วยก็ได้ หลังจากบ่มและล้าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เติมสารละลายสับสเตรท และสารหยุดปฏิกิริยา (Stop Solution) ความเข้มสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีตัวแรกที่จับกับแอนติเจนที่ถูกตรึงอยู่ที่หลุม

Indirect Competitive ELISA เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนที่อยู่ในสารละลายสามารถวัดปริมาณได้ ถ้ามีแอนติเจนที่ทราบเป็นมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ หรือสารละลายแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณลงในหลุมที่มีการตรึงแอนติเจนไว้แล้ว พร้อมกับเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นในความเข้มข้นที่เหมาะสม (แอนติบอดีที่ให้ค่าความเข้มข้น OD เกือบสูงสุด) และผ่านกระบวนการในการบ่มในแอนติบอดีติดฉลากเช่นเดียวกับ Indirect ELISA วิธีนี้ก่อให้เกิดการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่ตรึงอยู่ก้นหลุมกับแอนติเจนมาตรฐานในสารละลายที่เติมลงไปแยกจับกับแอนติบอดี ถ้าแอนติเจนในสารละลายมีมาก โอกาสที่แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนที่ตรึงอยู่ก้นหลุมก็ลดลงตามสัดส่วนซึ่งสามารนำมาสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับปริมาณแอนติเจนในสารละลายที่ต้องการตรวจหาได้

Indirect Sandwich ELISA เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนโดยตรง โดยทั่วไปจะมีความไวสูงกว่า Competitive ELISA เพราะแอนติเจนจะถูกรวมรวมจับโดยแอนติบอดี (Capture Antibody) ที่ตรึงอยู่ในหลุมก่อนที่จะมีการตรวจจับโดยแอนติบอดีอีกชุดหนึ่ง (แอนติบอดีตัวที่ 2 หรือ Deetector Antibody) และตามด้วยแอนติบอดีตัวที่ 3 ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Reported Antibody) ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตำที่ 2 วิธีนี้มีข้อจำกัดว่าแอนติบอดีตัวที่ 1 และแอนติบอดีตำที่ 2 ต่างต้องมาจากสัตว์ต่างชนิดกันและแอนติบอดีตัวที่ 3 ต้องไม่มีปฏิกิริยาข้ามไปจับแอนติบอดีตัวที่ 1 ซึ่งถ้าแอนติเจนมาตรฐานก็สามารถใช้วิธีตรวจหาปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างได้เช่นกัน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนติเจน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

3.2 Western blotting

วิธีการทดสอบโดยอาศัย Immunoblotting (Western blot) จะมีการแยกองค์ประกอบของแอนติเจนโดยอาศัยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลาง คือ Polyacrylamide Gel เป็นการใช้เทคนิคการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่เรียกว่า SDS Polyacrylamide Gel Gleetrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งจะแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล จากนั้นจะเคลื่อนย้ายโปรตีนที่แยกได้บนเจลสู่แผ่น Nitrocellulose ด้วยกระแสไฟฟ้าเช่นกัน โปรตีนแถบต่าง ๆ จะยึดติดกับแผ่น Nitrocellulose ซึ่งจะสามารถนำไปตรวจสอบด้วยการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

3.3 Dot Blotting

Dot Blotting เป็นวิธีตรวจแอนติเจนในสารผสมที่ทำให้ง่าย และทราบผลรวดเร็วเพียงแต่นำสารที่ต้องการมาหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose Membrane) เพื่อตรึง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แอนติเจนติดกับเมมเบรน แล้วบ่มกับแอนติบอดีเช่นเดียวกับวิธี Western Blot แต่ไม่จำเป็นต้องแยกแอนติเจนก่อน วิธีนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบแอนติเจนที่มีขนาดเล็กหรือเฮปเทน เช่น นิวโรเพปไทด์ขนาดเล็กซึ่งตามปกติไม่สามารถตรึงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสได้ โดยการผสมแอนติเจนกับโปรตีนต่าง ๆ เช่น BSA โดยใช้ไอของกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อให้แอนติเจนยึดกับ BSA (Bithigomgul, Stretton, & Cowden, 1991) เพปไทด์จึงสามารถถูกตรึงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสได้ ก่อนนำไปผ่านกระบวนการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกในการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีกับแอนติเจนต่าง ๆ เช่น กรณีทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb จำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เทคนิคทางแอนติบอดีถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับการตรวจสอบสารเชิงปริมาณ แต่ถึงอย่างไรตามการใช้เทคนิคทางแอนติบอดี ในการตรวจสอบก็ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการศึกษาด้วย ดังนั้นจึงควรจะมีการศึกษาถึงวิธีที่ใช้ทดสอบอยู่ว่าควรมีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบในขั้นตอนใด อย่างไรบ้าง เพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความแม่นยำและเชื่อถือได้ อย่างไรก็ตามการควบคุมคุณภาพการทดสอบยังคงใช้หลักการพื้นฐานเช่นเดียวกับการทดสอบทางห้องปฏิบัติการด้านอื่น ๆ เช่น ควบคุมการจัดเก็บตัวอย่างตรวจให้ถูกต้องเหมาะสม การทดสอบตามขั้นตอน และเทคนิคที่ถูกต้องและการรายงานผลการทดสอบที่ถูกต้อง

หากพิจารณาถึงระบบการทดสอบ จะเห็นว่าแต่ละวิธีจะต้องมีการทดสอบเพื่อหาความเหมาะสมในเรื่องเกี่ยวกับปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบ เช่น ความเข้มข้นของแอนติเจน หรือแอนติบอดี ความเข้มข้นของ Conjugate และความเข้มข้นของสับเสตรท รวมทั้งระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอน เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องชัดเจนที่สุด อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวมักได้มาจากบริษัทผู้ขายชุดทดสอบสำเร็จรูปแต่ละบริษัทในห้องปฏิบัติการซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์ควรทำการทดสอบ Positive Control และ Negative Control ควรมีการทำ Quality Control Chart เป็นต้น นอกจากทดสอบด้วย Positive Control และ Negative Control ของแต่ละการทดสอบซึ่งเป็นการควบคุมคุณภาพภายใน ควรทดสอบกับตัวอย่างตรวจควบคุมคุณภาพจากภายนอกด้วย

การผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบ Metal - Binding Protein ในสิ่งมีชีวิต

แอนติบอดี (Antibody, Ab)

แอนติบอดี คือ สาร Glycoprotein ที่ประกอบด้วย Polypeptide 82-96 % และคาร์โบไฮเดรต 4-18 % เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ Antigenic Determinant ที่แปลกปลอม และจะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ Antigenic Determinant นั้นเท่านั้น ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้จะกำจัดสารพิษ จุลชีพ ปรสิต และสารแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากร่างกายได้ นอกจากนี้ปฏิกิริยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อกันยังไปกระตุ้นให้เกิด Secondary Phenomena เช่น การตรึงคอมพลีเมนต์หรือกระตุ้นเซลล์มาสท์ให้หลั่งสาร Histamine เป็นต้น ปฏิกิริยาจำเพาะนี้สามารถเกิดขึ้นได้ไม่ว่าจะเป็นในร่างกาย หรือในหลอดทดลองซึ่งสามารถนำมาช่วยในการวินิจฉัยโรคได้

การผลิตแอนติบอดี (Antibody Production) (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การผลิตแอนติบอดี ในสิ่งมีชีวิตจะเริ่มจากการที่ร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นที่เรียกว่า แอนติเจน จากนั้นกระบวนการทางภูมิคุ้มกันของร่างกายจะทำการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น กล่าวคือ แอนติเจนจะกระตุ้น B-cell ที่จำเพาะแต่ละอิพิโทป บนแอนติเจนพร้อม ๆ กันหลายเซลล์ หรือหลาย ๆ Clone แอนติบอดีที่สร้างขึ้นพร้อม ๆ กันหลาย clone ซึ่งมีความจำเพาะต่อหลากหลายอิพิโทปจะเรียกว่า Polyclonal Antibody อย่างไรก็ตาม การสร้างแอนติบอดีเพื่อใช้ในงานวิจัยหรืออื่น ๆ สามารถสร้างและคัดเลือกแอนติบอดีที่สร้างจาก Clone เดียวหรือจำเพาะต่ออิพิโทปหนึ่ง ๆ ของแอนติเจน ซึ่งทำให้แอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะสูง เรียกแอนติบอดีว่า Monoclonal Antibody แอนติบอดีแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonalantibody ; PAb)

Polyclonal Antibody หมายถึง แอนติบอดีที่ผลิตจาก B-Cell หลาย ๆ Clone ซึ่งตอบสนองต่อแอนติเจนหลากหลายอิพิโทป ทำให้ได้แอนติบอดีผสมกันอยู่หลายชนิดที่จะจับกับแอนติเจนได้หลาย Epitope การผลิต Polyclonal Antibody ที่จำเป็นต่อ Antigen X อาจจะผลิตในสัตว์ทดลอง เช่น กระต่าย ม้า และแกะ แอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่าย เรียกว่า Rabbit anti-X Antibody แอนติบอดีที่ผลิตจากม้าเรียกว่า Horse anti-X Antibody เป็นต้น ขั้นตอนการผลิต Polyclonal Antibody เริ่มต้นจากการเตรียมแอนติเจนตามต้องการ จากนั้นฉีดแอนติเจนให้กับสัตว์ทดลองที่ต้องการและรอเวลาการสร้างแอนติบอดี จากนั้นฉีดแอนติเจนซ้ำ เพื่อให้สร้างแอนติบอดีปริมาณมาก ทำการเจาะเลือดสัตว์ทดลองและปั่นแยกซีรั่มเก็บไว้ใช้งานต่อไป

ในปัจจุบันแม้การผลิตแอนติบอดีในรูปโมโนโคลนอลแอนติบอดีทำได้ไม่ยากนักในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ก็ตาม การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีก็ยังมีการใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปเนื่องจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต้องมีขั้นตอนต่อจากการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีมากมาย และต้องพัฒนาวิธีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการ ซึ่งอาจต้องทดสอบหลายครั้งหลายรูปแบบ รวมทั้งต้องใช้การโคลนซ้ำ ใช้อุปกรณ์และเวลามาก และโมโนโคลนอลก็มีข้อเสียเนื่องจากมีตำแหน่งที่จำเพาะกับอิพิโทปเพียงอิพิโทปเดียวบนแอนติเจนจึงไม่สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับแอนติเจนส่วนใหญ่ที่มีอิพิโทปแต่ละชนิดเพียงตำแหน่งเดียวได้หรือจับกับแอนติเจนได้เพียงบางรูปแบบ เช่นจับแอนติเจนได้ในสภาพ

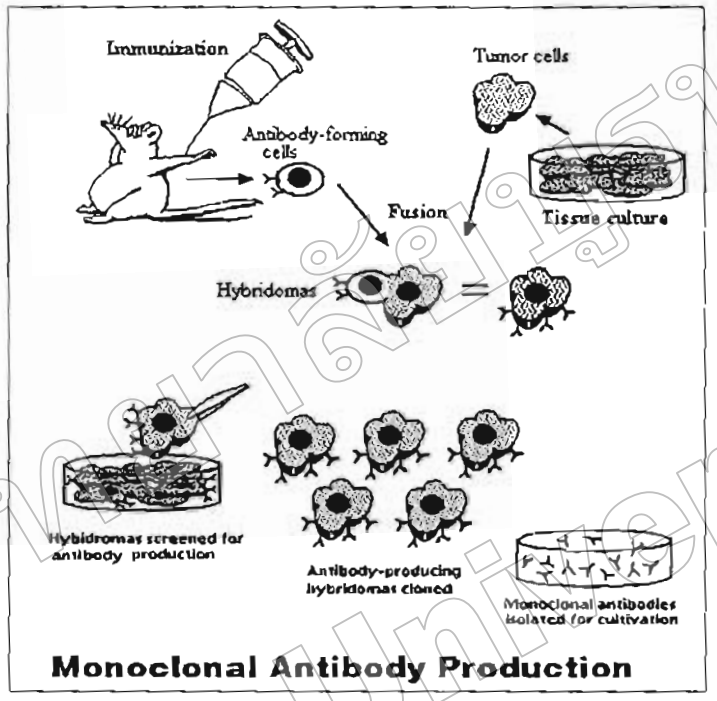
ปกติแต่ไม่จับกับแอนติเจนที่เสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ใน immunoassay บางชนิด โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่สามารถใช้กับเทคนิค dot blotting และ western blot ได้แต่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบแบคทีเรียในเนื้อเยื่อทาง immunohistochemistry ได้ ซึ่งโดยทั่วไปโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถใช้กับ immunoassay ได้ทุกรูปแบบ เนื่องจากประกอบด้วยประชากรจำนวนมากของแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิพิโทปต่าง ๆ ของแอนติเจน ดังนั้นการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจึงเป็นที่นิยมสำหรับใช้ในการวิจัยซึ่งไม่ต้องใช้แอนติบอดีจำนวนมากนัก หรือใช้เพื่อการเรียนการสอนเพราะการผลิตแอนติซีรัมทำได้ง่าย และการผลิตเชิงพาณิชย์ก็สามารถทำได้ในกระต่ายหรือสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

2. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonalantibody; MAb)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) เป็นการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงพัฒนาโดย Köhler และ Milstein พัฒนาขึ้นจากการหลอมรวมบีเซลล์จากหนูที่ตอบสนองต่อแอนติเจนกับเซลล์มะเร็งหรือไมอิโลมา (Myeloma) ได้เป็นเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา (Hybridoma) ภายหลังจากการโคลนจะสามารถหลั่งแอนติบอดีเพียงชนิดเดียซึ่งมีความจำเพาะสูง สามารถผลิตได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการ และนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย นอกจากการใช้เป็นตัวตรวจสอบใน Immuno Assay รูปแบบต่าง ๆ แล้วยังสามารถเลือกแอนติบอดีที่มีสมบัติเป็นเอนไซม์หรือใช้ในการรักษาโรคได้ด้าย ข้อดีของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีกประการหนึ่งที่ได้เปรียบการผลิตแอนติซีรัมคือ แอนติเจนที่ใช้ปลูกภูมิคุ้มกันไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์ อาจมีแอนติเจนที่ต้องการอยู่เพียงส่วนน้อยเท่านั้น แต่ในกระบวนการคัดเลือกจะต้องสามารถที่จะหาวิธีคัดเลือกไฮบริโดมาที่ต้องการให้ได้ ลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ดี คือแต่ละโคลนมีการสร้างแอนติบอดีชนิดเดียที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเพียงตำแหน่งเดียวบนแอนติเจน ทำให้สามารถศึกษาโปรตีนเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยต่าง ๆ ใช้ในการติดตามการแปรรูปแอนติเจนในขั้นตอนต่าง ๆ การประเมินปริมาณสารที่ต้องการ ตรวจสอบแอนติเจนหรือวินิจฉัยโรคทางการแพทย์และการวิจัยมากมาย

แต่อย่างไรก็ดีโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีข้อเสียบางประการ เนื่องจากคุณสมบัติที่ประกอบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่ออิพิโทปชนิดเดียวบนแอนติเจน ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่มักไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับแอนติเจนส่วนใหญ่ที่ไม่มีอิพิโทปซ้ำ ๆ กัน และไม่สามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ให้ทำงานเนื่องจากมีความหนาแน่นของอิพิโทปน้อย ไม่มากพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนบริเวณใกล้ ๆ กันได้ และนอกจากนี้การ

เปลี่ยนแปลงทางเคมีของแอนติบอดีหรือแอนติเจนเพียงเล็กน้อยก็สามารถก่อให้เกิดผลลบปลอม และผลไม่สม่ำเสมอ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



ภาพที่ 2-2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

แอนติเจน (Antigen ; Ag) (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

แอนติเจน หมายถึง สิ่งแปลกปลอมที่แตกต่างจากร่างกาย (Non-Self) และร่างกายเกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น ตัวอย่างของแอนติเจน เช่น จุลชีพ หรือองค์ประกอบของจุลชีพ โปรตีน สารเคมี ไกลโคโปรตีน และอนุภาคไวรัส เป็นต้น แอนติเจนที่สมบูรณ์จะมีคุณสมบัติสำคัญ 2 ประการ คือ ความสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เรียกว่า Immunogenicity กล่าวคือสารนั้นจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี และกระตุ้นการทำงานของ T Lymphocyte อย่างจำเพาะที่เรียกว่า Sensitized T Lymphocyte ในคุณสมบัตินี้จึงมักใช้คำว่า Immunogen แทนแอนติเจนด้วย คุณสมบัติที่สองคือ ความสามารถของสารที่จะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้น เช่น ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดี และหรือ Sensitized T Lymphocyte เรียกว่ามี Specific Reactivity การที่สารทำปฏิกิริยาจำเพาะดังกล่าวนิยมใช้คำว่า แอนติเจน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเป็นแอนติเจนของสาร (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

1. ขนาด โดยทั่วไปพบว่าสารที่มีขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 1,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนที่ดี มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ดี สารที่มีขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1,000 ดาลตัน มักไม่สามารถเป็นแอนติเจนได้ ตัวอย่างของสารที่เป็นแอนติเจนได้ดี เช่น โปรตีน Albumin, Flagellin, Toxin สารพวก Lipoprotein และ Polysaccharide เป็นต้น

2. โครงสร้าง โครงสร้างทางเคมีของสารมีส่วนสำคัญในการเป็นแอนติเจนที่ดี โดยพบว่าสารที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนจะเป็นแอนติเจนที่ดีมากกว่าสารที่มีโครงสร้างที่มีองค์ประกอบที่เหมือน ๆกันซ้ำ ๆ ตัวอย่างของสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน ได้แก่ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ส่วนตัวอย่างที่มีโครงสร้างของหน่วยย่อยซ้ำ ๆ กัน ได้แก่ ไขมัน และกรดนิวคลิอิก เป็นต้น

3. พันธุกรรม ความแตกต่างของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทำให้มีการตอบสนองต่อสารต่าง ๆ แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น สารชนิดหนึ่งอาจเป็นแอนติเจนที่ดีของสัตว์ชนิดหนึ่ง แต่ไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองในสัตว์อีกชนิดหนึ่งได้ อย่างไรก็ตามสารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะเป็นแอนติบอดีที่ดีมากกว่าสารจากสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน

4. วิธีการให้สาร การเป็นแอนติเจนที่ดีของสารหนึ่ง ๆ นั้นยังขึ้นกับวิธีการให้สารนั้นเข้าสู่ร่างกาย เช่น สารบางอย่างให้เข้าสู่ร่างกายทางเส้นเลือด (Intravascular) จะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดี แต่สารบางชนิดอาจต้องให้ทางผิวหนัง (Intradermal) จึงจะกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดี เป็นต้น นอกจากนี้วิธีการให้สารยังต้องพิจารณาถึงปริมาณของสารด้วย กล่าวคือแอนติเจนที่ให้ในแต่ละครั้งควรมีปริมาณที่พอเหมาะจึงจะกระตุ้นการตอบสนองได้ดี ถ้าใช้ปริมาณมากเกินไป หรือน้อยเกินไป อาจทำให้เกิดการไม่ตอบสนองที่เรียกว่า Immunological Tolerance ได้

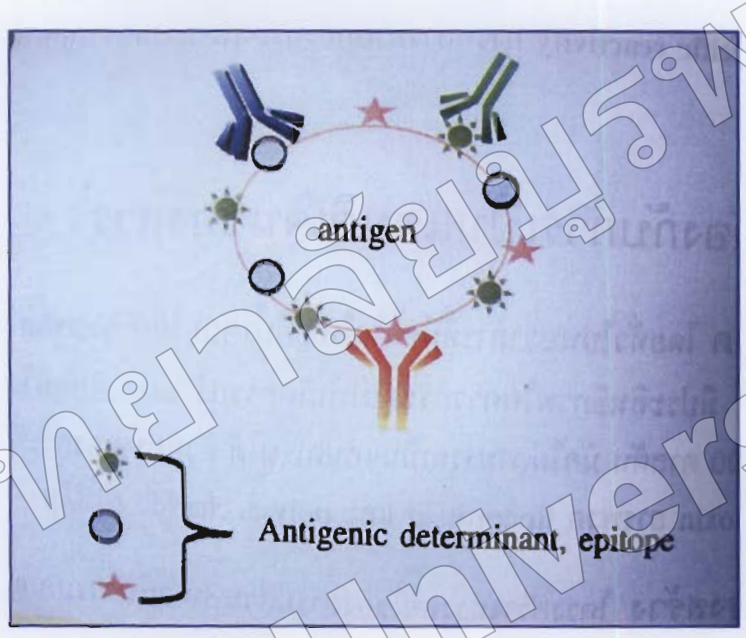
5. ความแปลกปลอม หรือความแตกต่างจากร่างกาย (Non-Self) สารที่มีความแตกต่างจากองค์ประกอบในตัวโฮสเองมาก ๆ จะสามารถกระตุ้นการตอบสนองได้ดี เนื่องจากภูมิต้านทานจะสร้างขึ้นตอบโต้ต่อสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ของตนเองเท่านั้น

โครงสร้างของแอนติเจน (กฤษณา จรรยาพูน, 2548)

แอนติเจนเป็นสารต่าง ๆ ที่จะมีโครงสร้างจำเพาะ ใน 1 โมเลกุลจะมีส่วนที่จำเพาะหรือหน่วยย่อย ๆ ที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีหนึ่ง ๆ หน่วยย่อย ๆ บนโมเลกุลของแอนติเจนนี้ เรียกว่า อิพิโทป หรือ antigenic determinant โดยทั่วไปแล้วอิพิโทปจะปรากฏอยู่ด้าน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นอกของโมเลกุล ดังนั้นแอนติเจน 1 โมเลกุลอาจทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติบอดีหลายชนิดขึ้นอยู่กับจำนวน อิพิโทป ที่แตกต่างกันบนโมเลกุลของแอนติเจนหนึ่ง ๆ (ภาพที่ 2-4 และ 2-5)



ภาพที่ 2-3 อิพิโทป หรือ antigenic determinant บนแอนติเจน ดังแสดงในรูป แอนติเจนนี้มี อิพิโทป ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะของแต่ละ อิพิโทป จึงมีแอนติบอดี 3 แบบต่อแอนติเจนนี้

รูปแบบของแอนติเจน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

กรณีของแอนติเจนขนาดใหญ่มากกว่า 5,000 กิโลดาลตัน สามารถใช้เป็นอิมมูโนเจนได้เลย แต่ถ้าเป็นแอนติเจนขนาดเล็กหรือแฮปเทน (Hapten) เช่น ฮอร์โมน สารสื่อประสาท ยา หรือโมเลกุลขนาดเล็กอื่น ๆ จำเป็นต้องนำไปเชื่อมกับโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งเป็นพาหะ (Carrier) โดยทั่วไปควรเป็นสารที่มีอิมมูโนเจนสูง ได้แก่โปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่นิยมได้แก่ Bovine Serum Albumin (BSA), Keyhole Limpet Haemocyanin (KLA) หรือโปรตีนจากไข่ขาว(Ovalbumin = OA) เป็นต้น (ตารางที่ 1) และสารที่ใช้เชื่อมต่อขึ้นอยู่กับกลุ่มที่ทำปฏิกิริยากับแฮปเทน สารที่ใช้ทั่วไปได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์ (Sithingorngul et al., 1989; 1991) ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่ NH_2 หรือ SH ของโปรตีนได้ดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-1 หมู่ต่าง ๆ ในโปรตีนพาหะที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับเพปไทด์หรือแฮปเทน โปรตีนแต่ละชนิดจะมีหมู่ที่สามารถเชื่อมต่อกับแอปเทนแตกต่างกัน (Coligan et al., 1997)

	น้ำหนักโมเลกุล	จำนวนหมู่/โมเลกุล			
	(kDa)	ε- NH_2	-SH	Phenol	Imidazole
Bovine serum albumin (BSA)	67	59	1	19	17
Ovalbumin (OA)	43	20	4	10	7
Tetanus Toxoide	150	106	10	81	14
Keyhole limpet hemocyanin(KLH)	>2,000	6.9	1.7*	7.0*	8.7*

* สำหรับ KLH จำนวนหมู่แสดงในรูปกรัมของกรดอะมิโน ใน 100 กรัมของ KLH

การเตรียมแอนติเจนเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

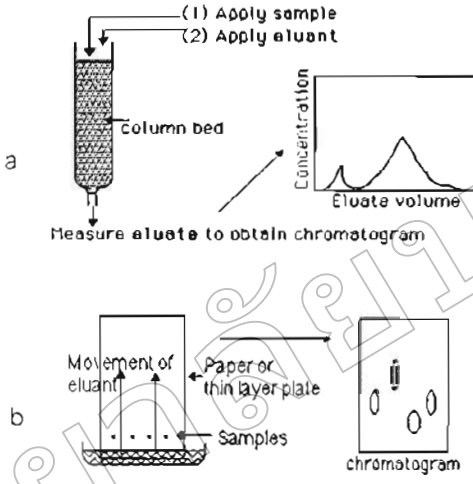
ความบริสุทธิ์ของแอนติเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง เพราะแอนติบอดีต่อสิ่งเจือปนในแอนติเจนอาจเป็นปัญหาในแง่ความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยทั่วไปไม่ควรมีสิ่งเจือปนเกิน 1-2% เพราะคาดว่าจะมีการสร้างแอนติบอดีต่อสิ่งเจือปนในระดับเดียวกัน แต่ในบางกรณีที่สิ่งเจือปนมีปริมาณน้อยแต่มีการเป็นอิมมูโนเจนสูง เป็นผลให้มีแอนติบอดีต่อสิ่งเจือปนสูงในซีรัมได้ ดังนั้นจึงต้องมีวิธีเตรียมแอนติเจนให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้เป็นอิมมูโนเจน ซึ่งการเตรียมแอนติเจนให้บริสุทธิ์อาจทำได้โดยวิธี chromatography รูปแบบต่าง ๆ หรือกรณีของโปรตีนอาจใช้ SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electroporesis) ซึ่งทำได้ง่ายและเสียค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

โครมาโตกราฟี (Chromatography)

Chromatography เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารที่ต้องการแยกมีความ สามารถในการละลายในตัวทำละลายทั้งสองชนิดไม่เท่ากัน สารที่ละลายได้ดีใน stationary phase จะเคลื่อนที่ ได้ช้ากว่าสารที่ละลายได้ดีใน mobile phase ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน จึงแยกออกจากกันได้

$$\text{Partition (Distribution) Coefficient (Kd)} = \frac{\text{concentration of solute in stationary phase}}{\text{concentration of solute in mobile phase}}$$

ผลลัพธ์ของการแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี เรียกว่า Chromatogram ดังภาพที่ 2-6



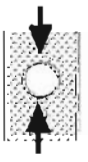
ภาพที่ 2-4 แสดงตัวอย่างของโครมาโตกราฟี 2 แบบ คือ (a) โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (Column chromatography) และ (b) โครมาโตกราฟีแบบแผ่นระนาบ (Planar chromatography)
(ที่มา:http://www.phys.uts.edu/au/subjects91326/Section3/section3.html)

Chromatography ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ได้แก่

1. Stationary phase
2. Mobile phase
3. สารผสมที่จะนำมาแยก (Sample mixture)

การเคลื่อนที่ของโมเลกุลสารถูกกำหนดโดยสมดุลระหว่างแรง 2 แรง

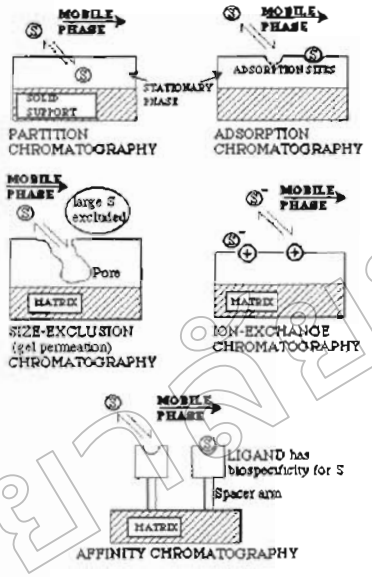
- แรงฉุดของ mobile phase ซึ่งจะพาโมเลกุลของสารเคลื่อนไปเร็วหรือช้าขึ้นกับคุณสมบัติการละลาย (Liquid chromatography) หรือการระเหย (Gas Chromatography)



- แรงเหนี่ยวรั้งของ Stationary phase ซึ่งจะดึงโมเลกุลของสารที่เกาะไว้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สมดุลของทั้งสองแรงนี้จะแตกต่างกันตามชนิดของโมเลกุลสาร จึงทำให้โมเลกุลของสารผสมนั้น เคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน จึงสามารถที่จะแยกสารผสมออกจากกันได้



ภาพที่ 2-5 แสดง Retension mechanism ในการแยกสารโดยวิธี Chromatography แบบต่าง ๆ

(S = สารที่ต้องการแยก, ลูกศรไปกลับ = แรงระหว่าง mobile phase และ stationary phase)

เทคนิค chromatography แบ่งออกเป็น 5 ชนิด

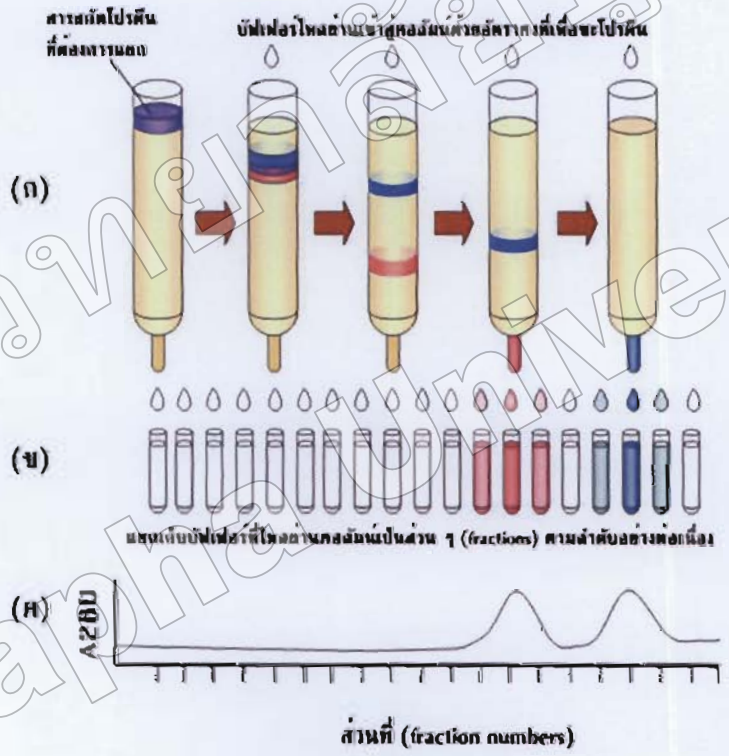
ตามความแตกต่างของ supporting medium, stationary phase และ mobile phase ดังนี้

1. Column Chromatography
   - Gel Filtration Chromatography
   - Ion Exchange Chromatography
   - Non-hydrophobic chromatography
   - Affinity Caphyhromatogr
2. Paper Chromatography
3. Thin Layer Chromatography
4. Gas Chromatography
   - gas liquid chromatography
   - gas solid chromatogrphy
5. High Pressure (Performance) Chromatography

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การแยกและทำชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ เป็นวิธีที่นิยมมากสำหรับการใช้แยกชีวโมเลกุล โดยเฉพาะโปรตีนให้บริสุทธิ์ วิธีนี้มีเฟสเคลื่อนที่ เป็นบัฟเฟอร์ หรือสารละลายและมีตัวค้ำจุนทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์รูปทรงกระบอกที่ปลายด้านก้นกระบอกเป็นปลายเปิดเล็ก ๆ ตัวค้ำจุนจะเป็นเม็ดเรซิน (resin) เล็ก ๆ ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ซึ่งจะเป็นหลักการพื้นฐานของการแยกแต่ละวิธี



ภาพที่ 2-6 การแยกโปรตีนด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ และการแยกเก็บปริมาตรเป็นส่วน ๆ :
ก) หยอดสารสกัดโปรตีนลงในคอลัมน์ จากนั้นทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ที่ไหลเข้าสู่คอลัมน์ผ่านเม็ดเรซินด้วยอัตราเร็วคงที่ที่เหมาะสม โปรตีนจะแยกออกจากกันได้ ตามปฏิสัมพันธ์ต่อเม็ด เรซินแบบต่าง ๆ ที่เลือกใช้
ข) สามารถที่แยกเก็บบัฟเฟอร์ที่ไหลออกมาเป็นส่วน ๆ (fractions) ได้
ค) ในขณะที่เก็บผ่านเครื่องแยกเก็บ (fraction collector) จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนอย่างคร่าว ๆ ในแต่ละส่วน ได้ด้วยการวัดดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ก็จะทราบว่าหลอดไหนมีโปรตีนมาก หรือน้อย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การแยกเกิดขึ้นเมื่อหยดสารสกัดของเซลล์หรือสารละลายที่มีโปรตีนละลายอยู่ลงในตัวคอลัมน์ โปรตีนต่างชนิดกันจะมีปฏิสัมพันธ์ (Interaction) กับเรซินในระดับที่ต่างกัน ดังนั้นเมื่อผ่านโปรตีนเข้าไปในคอลัมน์ โปรตีนจะถูกหน่วง (Retard) ไว้ด้วยเรซินในระดับที่ต่างกัน เมื่อผ่านบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะ (Elute) คอลัมน์ลงไป โปรตีนจะถูกชะออกมาเร็วช้าต่างกัน โปรตีนที่ถูกหน่วงไว้ด้วยแรงที่น้อยกว่าจะถูกชะออกมาก่อนโปรตีนที่ถูกหน่วงไว้ด้วยแรงที่มากกว่า ในโครมาโตกราฟีบางชนิดโปรตีนบางตัวอาจถูกหน่วงไว้จนแน่น ไม่ถูกชะออกมานอกจากจะมีการเปลี่ยนหรือปรับสมบัติหรือสภาวะของบัฟเฟอร์ใหม่ จึงจะสามารถชะออกมาได้ บัฟเฟอร์ที่ชะคอลัมน์ออกมาทางปลายเปิดเล็ก ๆ ของก้นกระบอกนั้นสามารถที่จะถูกเก็บเป็นส่วนปริมาตร (Fraction) ที่ละน้อยๆ ต่อเนื่องกันไปได้ โปรตีนที่ถูกแยกด้วยวิธีนี้อาจจะบริสุทธิ์ (Pure) หรือกึ่งบริสุทธิ์ (Partially Pure) จากโปรตีนอื่น ๆ ซึ่งมักจะถูกใช้ไปวิเคราะห์หาการทำงาน/กัมมันต์ (Activity) ของโปรตีนนั้นในห้องทดลองต่อไป ข้อมูลที่ได้มาสามารถที่จะประยุกต์ใช้อธิบายกลไกการทำงาน และความสำคัญภายในเซลล์ได้

โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ สามารถแบ่งตามคุณสมบัติของเรซิน และหลักการแยกชีวโมเลกุลโดยเฉพาะโปรตีนออกจากกัน ได้ 4 แบบ หลัก ๆ ดังต่อไปนี้

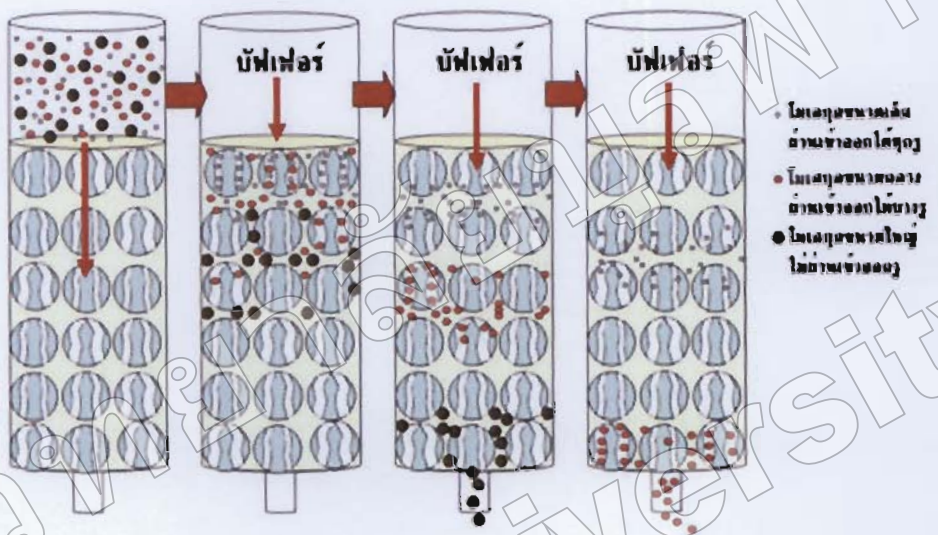
โครมาโตกราฟีแบบกรองผ่านเจล (Gel Filtration) เป็นโครมาโตกราฟีที่แยกชีวโมเลกุลตามขนาดที่แตกต่าง (Molecular Size or Molecular Weight) โดยเม็ดเรซินที่บรรจุในคอลัมน์จะมีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดต่าง ๆ เมื่อผ่านสารละลายชีวโมเลกุลหนึ่ง ๆ ลงในคอลัมน์ ชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนจะเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างเม็ดเรซินพร้อม ๆ กับบัฟเฟอร์โดยไม่ผ่านเข้าออกรูพรุน ในขณะที่โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนขนาดใดก็จะเคลื่อนที่เข้าออกรูพรุนนั้น ๆ ดังนั้นโมเลกุลที่ขนาดเล็กกว่าทุกรูพรุนก็จะกระจายตัวเคลื่อนที่เข้าออกรูพรุนทุกรู โมเลกุลที่มีขนาดกลาง ๆ ก็จะกระจายตัวเข้าออกบางรูเท่านั้น ทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ในคอลัมน์ช้าเร็วแตกต่างกัน นั่นคือ โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็กการแยกจึงเกิดขึ้น วิธีนี้นอกจากจะใช้แยกโมเลกุลที่มีขนาดต่างกันออกจากกันแล้ว ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการหาขนาดโมเลกุลของสารได้ หากมีการนำไปเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล ซึ่งภายในคอลัมน์ประกอบด้วย

1. Supporting medium: ตัวกลางเจลที่มีส่วนประกอบเป็นโพลิเมอร์ของสาร เช่น คาร์โบไฮเดรตมาเชื่อมโยงเป็น ตาข่ายร่างแห เกิดลักษณะเป็นรูพรุนที่ยอมให้สารโมเลกุลเล็กผ่านเข้าออกได้ แต่สารโมเลกุลใหญ่กว่าขนาดของรูพรุน จะไม่สามารถผ่านเข้าออกได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. Stationary phase: สารละลายที่กระจายอยู่ในรูพรุนของตัวกลางเจล

3. Mobile phase: สารละลายที่กระจายอยู่ในช่องว่างระหว่างเม็ดเจลหรือสารละลายที่ล้อมรอบเม็ดเจล



ภาพที่ 2-7 Gel Filtration Chromatography : เมื่อผ่านสารสกัดโปรตีนขนาดต่าง ๆ ลงไปในคอลัมน์ โมเลกุลขนาดเล็กจะเสียเวลาแพร่เข้าออกรูในเม็ดเรซินทำให้เคลื่อนที่ไปได้ช้า ในขณะที่โมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารูจะเคลื่อนผ่านไปในช่องว่างระหว่างเม็ดเรซิน จึงสามารถเคลื่อนที่ไปยังก้นคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว โมเลกุลขนาดกลางจะเสียเวลาแพร่ผ่านเข้าออกรูที่มีขนาดใหญ่บางรูเท่านั้นจึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก แต่ก็ช้ากว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นการแยกจึงเกิดขึ้น Kd (Distribution Coefficient) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย เป็นความสามารถในการแพร่กระจายของ สารในรูพรุนของเจล

$$Kd = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายที่ใช้ชะสารออกจากคอลัมน์ (Ve)} - \text{ปริมาตรสารละลายที่ล้อมรอบเม็ดเจล (Vo)}}{\text{ปริมาตรทั้งหมด (Vt)} - \text{ปริมาตรสารละลายที่ล้อมรอบเม็ดเจล (Vo)}}$$

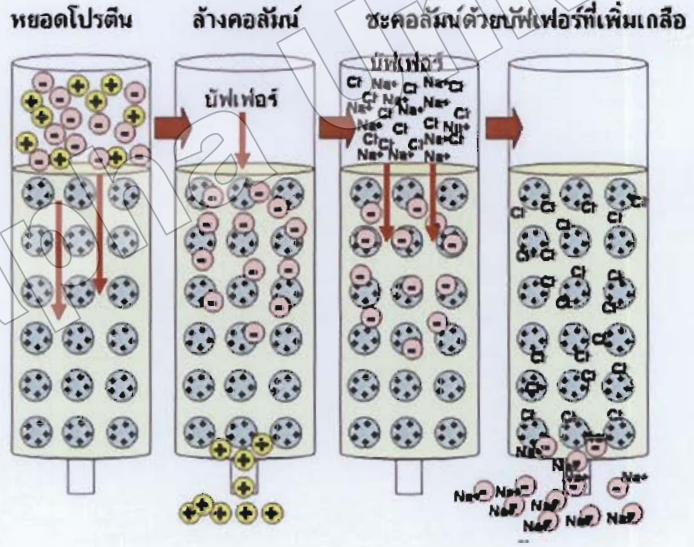
การหาน้ำหนักโมเลกุลโดย เทคนิค Gel Filtration Chromatography หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (Unknown) โดยการเขียนกราฟระหว่างค่า Kd และ log ของน้ำหนักโมเลกุล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(kDa) ของโปรตีนมาตรฐาน กราฟที่ได้เป็นกราฟเส้นตรง นำค่า Kd Unknown ที่คำนวณได้มาใช้หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของ Unknown จากกราฟนี้

โครมาโตกราฟีแบบแลกไอออน (Ion-exchange chromatography)

เป็นโครมาโตกราฟีที่แยกชีวโมเลกุลออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิที่อยู่ในโมเลกุล โดยโครมาโตกราฟีชนิดนี้ใช้เม็ดเรซินที่มีประจุบวก หรือลบ เมื่อผ่านสารละลายชีวโมเลกุลเข้าในคอลัมน์ ชีวโมเลกุลที่มีประจุสุทธิตรงข้ามกับประจุของ เรซินจะถูกเรซินจับไว้ด้วยพันธะไอออนิก ชีวโมเลกุลที่มีประจุสุทธิเดียวกับประจุของเรซินก็จะถูกผลัก และชะออกมาก่อนพร้อมกับบัฟเฟอร์ ชีวโมเลกุลที่จับอยู่กับเรซินจะจับอยู่ด้วยความแรงของพันธะที่ไม่เท่ากันเนื่องจากประจุสุทธิที่ต่างกัน และสามารถชะออกจากคอลัมน์ก่อนและหลังด้วยบัฟเฟอร์ตัวใหม่ที่มีสภาวะที่รบกวนพันธะไอออนิก เช่น การเพิ่มเกลือหรือไอออนที่รบกวนพันธะ หรือปรับสภาวะความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ทำให้ประจุสุทธิของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไปจนไม่สามารถจับกับเรซินก็จะถูกชะออกจากคอลัมน์ตามลำดับ



ภาพที่ 2-8 การแยกชีวโมเลกุลด้วย Anion-Exchange Chromatography : ขั้นแรกผ่านโปรตีนลงไปในคอลัมน์ให้โปรตีนที่ประจุตรงข้ามกับประจุของเรซินจับกับเรซิน จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ ตามด้วยการชะด้วยบัฟเฟอร์ที่เพิ่มเกลือเพื่อแลกเปลี่ยนไอออนให้โปรตีนหลุดออกมา หรือใช้บัฟเฟอร์ที่ มี pH ที่ ค่อย ๆ เปลี่ยนไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

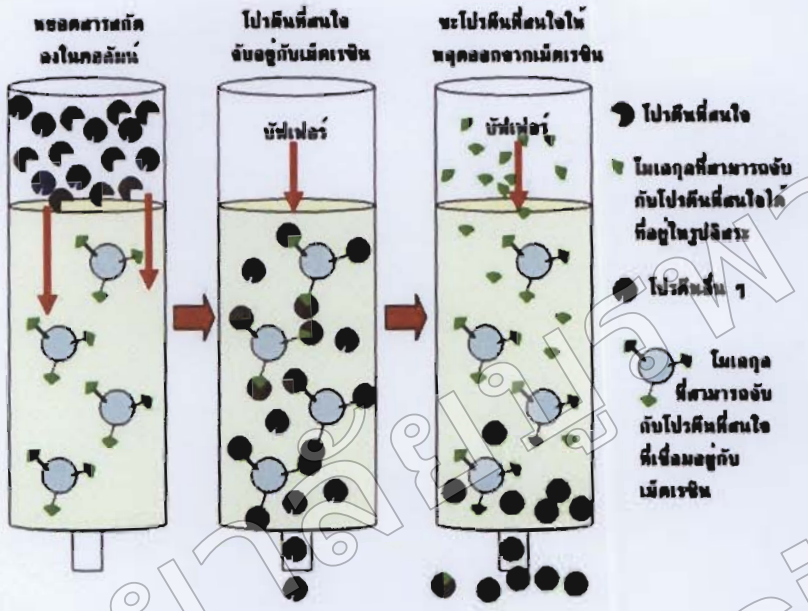
โครมาโตกราฟีแบบปฏิสัมพันธ์ไม่ชอบน้ำ (Non-hydrophobic chromatography)

เป็นโครมาโตกราฟีที่แยกชีวโมเลกุลออกจากกันโดยอาศัยสมบัติด้านความชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำ (Hydrophilicity/Hydrophobicity) ที่ไม่เท่ากัน โดยเรซินที่บรรจุในคอลัมน์จะเป็น Hydrophobic เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนลงในคอลัมน์ โปรตีนที่มีโครงสร้างด้านนอกที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Domain) จะถูกหน่วงไว้ไม่ให้เคลื่อนที่ด้วยปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำกับเม็ดเรซิน จึงเกิดการแยกขึ้น และสามารถชะออกจากคอลัมน์ก่อนและหลังด้วยบัฟเฟอร์ตัวใหม่ที่ปรับให้มีสภาวะที่ รบกวนการจับ เช่น การเพิ่มเกลือหรือไอออน

โครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (Affinity chromatography)

มีหลักการพื้นฐานว่า โปรตีนหรือชีวโมเลกุลบางตัวจะสามารถจับ หรือมีสัมพรรคภาพ (Affinity) กับสารหรือชีวโมเลกุลอื่น ๆ อย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เอนไซม์จับกับสับสเตรต (Substrate) หรือต้ายับยั้ง (Inhibitor) แอนติบอดีจับแอนติเจน เป็นต้น ดังนั้นหากนำ สับสเตรต ตัวยับยั้ง แอนติบอดี หรือสารใดก็ตามที่สามารถจับกับเอนไซม์หรือโปรตีนที่สนใจได้ มาเชื่อมเข้ากับเรซินแล้วบรรจุลงในคอลัมน์ เมื่อผ่านสารสกัดที่มีโปรตีนหรือเอนไซม์ดังกล่าวลงไปในคอลัมน์ เอนไซม์หรือโปรตีนนั้นก็จะถูกจับไว้ในคอลัมน์ในขณะที่ชีวโมเลกุลอื่น ๆ จะผ่านออกมา จากนั้นสามารถที่จะชะเอาโปรตีนหรือเอนไซม์นั้น ออกมาภายหลังด้วยการปรับ pH ของบัฟเฟอร์ การเพิ่มเกลือหรือไอออนเพื่อรบกวนการจับ หรือการเติมสารลงไปช่วยชะ เช่น เติมสับสเตรตอิสระลงไปแย่งจับเอนไซม์ให้หลุดออกมาจากสับสเตรตที่ถูกตรึง เป็นต้น ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก สามารถทำให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ในขั้นตอนเดียว ใช้เวลาน้อยและไม่ทำให้สูญเสียโปรตีนมาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



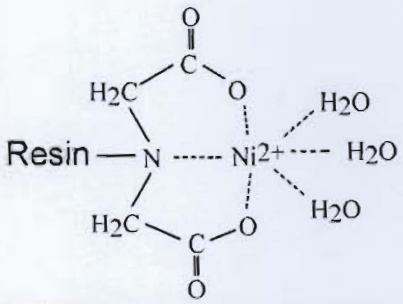
ภาพที่ 2-9 Affinity Chromatography : เริ่มจากหยอดสารสกัดลงในคอลัมน์ที่มีลิแกนด์ (Ligand ที่สามารถจับกับโปรตีนที่สนใจ) เชื่อมอยู่กับเม็ดเรซิน โปรตีนที่สนใจก็จะจับกับลิแกนด์นั้นและค้างอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่โปรตีนอื่น ๆ จะหลุดออกไปเมื่อทำการล้างคอลัมน์ จากนั้นก็เปลี่ยนบัฟเฟอร์เพื่อใช้ชะ (Elute) เอาโปรตีนที่สนใจออกมาโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีลิแกนด์อิสระอยู่เพื่อแย่งจับเอาโปรตีนที่สนใจให้หลุดออกจากคอลัมน์

Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)

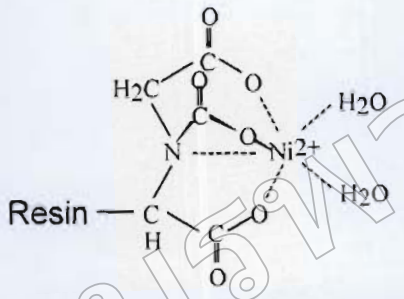
Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) หรือเรียกว่า Metal Chelate Chromatography (Powell, Siu, Inlow, & Flurkey, 2007) เป็นวิธี Affinity Chromatography อย่างหนึ่ง ที่อาศัยความจำเพาะระหว่าง Coordinate Covalent Binding ของ Amino Acids ที่จะทำให้โปรตีนสามารถจับกับโลหะที่เคลือบอยู่บนเรซินและบรรจุอยู่ในคอลัมน์ เช่น Cobalt, Nnickel, Copper, Zinc, Iron Ions แล้วชะโปรตีนออกมาเป็น Fraction ด้วยสารละลายที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับโปรตีนนั้น ๆ เช่น pH, Imidazole ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Resins สำหรับ IMAC



Nickel-IDA (Imino-DiAcetic acid) resin



Nickel-NTA (Nitrilo-TriAcetic acid) resin

ภาพที่ 2-10 HiTrap FF crude column ที่มีนิเกิลเคลือบอยู่บนเรซิน

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การเลือกสัตว์ทดลองที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับแหล่งของแอนติเจนและปริมาณของแอนติบอดีที่ต้องการ โดยเลือกสัตว์ที่มีวิวัฒนาการห่างจากสัตว์ที่ผลิตแอนติเจนให้มากที่สุดจึงจะตอบสนองการผลิตแอนติบอดีได้ดี สำหรับปริมาณไม่ค่อยมีปัญหามากนัก เพราะการผลิตแอนติบอดีในหนูเมาส์และแรทหลายตัวก็สามารถผลิตแอนติซีรัมได้ในระดับมิลลิลิตร ซึ่งมากพอสำหรับการทดลองต่าง ๆ ได้

โดยทั่วไปการผลิต PAb ในหนูเมาส์และหนูแรทก็เพียงพอสำหรับการวิจัยและทดลองทั่วไป เช่น การผลิตแอนติบอดีต่อเพปไทด์สังเคราะห์ปลาย C 8 หน่วยของ Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในฮีโมลิมป์ของสัตว์พวกครัสเตเชียน (Sithigorngul et al., 1999) และเพปไทด์สังเคราะห์ปลาย C 15 หน่วยของเพปไทด์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

CMG ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีลักษณะคล้าย CHH ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (Molt- Inhibiting Hormone) ที่ยับยั้งการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad Inhibiting Hormone) ของสัตว์พวกครัสเตเชียน (Sithigorngul et al., 2002) สามารถผลิต PAb ทั้งสองชนิดเพื่อใช้ตรวจหาตำแหน่งที่สร้างฮอร์โมนทั้งสองในก้านตากุ้งได้อย่างจำเพาะ และสามารถใช้แอนติบอดีในการติดตามเพปไทด์ในแฟรคชั่นต่าง ๆ ของการทำให้เพปไทด์บริสุทธิ์ในกระบวนการRP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Choromatography) ขั้นตอนต่าง ๆ ได้อย่างสะดวก (Sithigorngul et al., 1999) ซึ่งหนูเมาส์แต่ละตัวสามารถผลิตแอนติซีรัมได้มากกว่า 200 ไมโครลิตร/ครั้ง/เดือน โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์เพียง 1-2 มิลลิกรัมเท่านั้น ซึ่งมากพอสำหรับการทดลองต่าง ๆ มากมาย

ปริมาณของแอนติเจน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

ปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของสัตว์ทดลอง อายุของสัตว์ ควรใช้สัตว์ที่เริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ได้แก่ หนูเมาส์และหนูแรทอายุ 6 สัปดาห์ขึ้นไป กระต่ายประมาณ 2 เดือน ไม่ควรใช้สัตว์ที่มีอายุมากเกินไป เพราะอาจมีผลต่อการตอบสนองของแอนติเจน สำหรับปริมาณแอนติเจนที่ใช้ฉีดนั้นไม่มีเกณฑ์กำหนดตายตัว โดยทั่วไปโปรตีนประมาณ 10-100 ไมโครกรัมต่อหนู 1 ตัว ในแต่ละครั้ง ก็เพียงพอ การใช้แอนติเจนในกระต่าย อาจใช้เพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า การให้แอนติเจนฉีดซ้ำควรทิ้งระยะห่างประมาณ 2-4 สัปดาห์ ฉีด 3-4 ครั้ง และเก็บเลือดหลังจากการฉีดครั้งสุดท้ายประมาณ 7-14 วัน โดยทั่วไปการฉีดแอนติเจนน้อยมักให้แอนติบอดีที่มี affinity สูง การให้แอนติเจนปริมาณมากเกินไปนอกจากเป็นการสิ้นเปลืองแล้ว แอนติบอดีที่ได้อาจมี affinity ต่ำ และยังเสี่ยงต่อการสร้างแอนติบอดีต่อสิ่งเจือปนเพิ่มขึ้นด้วย

เส้นทางการฉีดและแอดจูแวนท์ (adjuvant) (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การฉีดแอนติเจนที่เป็นสารละลายโดยทั่วไปจะผสมแอดจูแวนท์ เพื่อส่งเสริมกระบวนการฟาโกไซโทซีสในเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจน และรักษาคาามเข้มข้นของแอนติเจนให้อยู่ในร่างกายให้นานขึ้น แอนจูแวนท์ที่นิยมใช้ทั่วไป ได้แก่ Freund'sadjuvant โดยครั้งแรกจะใช้ complete Fruend's adjuvant (CFA) ซึ่งมีเชื้อ *Mycrobacterium tuberculosis* ผสมอยู่เพื่อส่งเสริมการเกิดการอักเสบ (inflammation) และกระตุ้น ที- เซลล์ชนิด $CD4^+$ cell สำหรับการฉีดซ้ำครั้งต่อไปผสมแอนติเจนใน incomplete Freund's adjustvant (IFA) เพราะการผสมใน CFA จะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงมากอาจทำให้สัตว์เสียชีวิตได้

เส้นทางการฉีดที่ง่ายและสะดวก ได้แก่ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injuction) เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injuction) หรือเข้าช่องท้อง (intraperitonel injuction) ซึ่งแอนติเจนถูกพาไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตามระบบน้ำเหลืองสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณต่าง ๆ การฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous injuction) เพื่อให้แอนติเจนทางระบบเลือดเข้าสู่ม้ามสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี แต่เป็นวิธีที่เสี่ยงต่อการอุดตันของแอนติเจนที่ตกตะกอนบริเวณไตและอาการแพ้รุนแรงอาจทำให้สัตว์เสียชีวิตได้เช่นกัน สำหรับการฉีดเส้นทางอื่น ๆ เช่น ที่ฝ่าเท้า (footpad) ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าได้ผลดีกว่าบริเวณอื่น และเป็นการทรมานสัตว์โดยไม่จำเป็น

การเก็บซีรัม (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

วิธีการเก็บเลือดสามารถเก็บเลือดจากอวัยวะต่าง ๆ ตามความชำนาญและชนิดของสัตว์ เช่น หนูเมาส์และหนูแรท อาจเก็บโดยใช้เข็มดูดเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณหาง ซึ่งส่วนใหญ่มักประสบปัญหาเข็มอุดตันจากการแข็งตัวของเลือดหรือหลอดเลือดอุดตัน ทำให้เก็บเลือดได้ปริมาณน้อย การเก็บเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณตา (orbital) สามารถเก็บเลือดได้ค่อนข้างมากโดยใช้ pasture pipette ที่เคลือบด้วยซิลิโคลน (silicone) เพื่อชะลออัตราการแข็งตัวของเลือด สามารถเก็บเลือดจากหนูเมาส์ได้ครั้งละ 0.5-1 มิลลิลิตร/หนู 1 ตัว/ครั้ง ซึ่งหนูแรทจะเก็บได้นานถึง 3 มิลลิลิตร/ตัว/ครั้ง

เลือดที่ได้เมื่อเก็บในหลอดแก้วหรือพลาสติกจะแข็งตัวอย่างรวดเร็ว อาจบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน ก่อนปั่นแยกซีรัมออกจากฮีโมโกลบินติดมาด้วย ซึ่งโดยทั่วไปไม่มีผลต่อการนำซีรัมไปใช้ ซีรัมที่ได้ควรแบ่งเป็นส่วน ๆ และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า และนำมาใช้ทีละน้อย

แนวโน้มการประยุกต์ใช้ MT เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในประเทศไทย

เนื่องจาก MT ถูกเสนอให้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพได้ด้วยเหตุผลดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับในประเทศไทยการตรวจสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยใช้ MT เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพมีการศึกษาน้อยมากซึ่งการศึกษาที่มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ MT ในประเทศไทยจะเป็นการศึกษาถึงในปลานิลที่ได้รับปรอทเพื่อใช้ปลานิลเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพแสดงถึงการปนเปื้อนของปรอทในสิ่งแวดล้อม โดยในการศึกษาจะแบ่งปลานิลออกเป็น 12 กลุ่มและกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม กลุ่มทดลองจะประกอบด้วยกลุ่มที่ได้รับสารเมอคิวริกคลอไรด์โดยการฉีดเข้าช่องท้อง การได้รับโดยการกิน และการผสมกับน้ำที่ใช้เลี้ยง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าพบว่าปลาทุกตัวในกลุ่มที่ได้รับการสัมผัสน้ำที่มีความเข้มข้น 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเสียชีวิตทั้งหมดภายในวันแรกของการทดลองรอยโรคหลักทางจุลพยาธิวิทยาประกอบด้วย การเสื่อมของเซลล์เยื่อบุท่อไต การเพิ่มขึ้นของหน่วยไตใหม่และการเกิดผลึกในท่อไต การเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลาโนแมคโครฟาจ (MMCs) ใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ม้าม การลดลงของไขมันที่สะสมในเซลล์ตับ การเสื่อมของเซลล์ตับ ร่วมกับการฝ่อของตับอ่อนในตับ จากการตรวจสอบด้วยวิธีออโตเมทัลโลกราฟฟี พบโลหะปรอทสะสมอยู่ในเซลล์เยื่อบุท่อไตเซลล์ MMCs ในม้าม และที่ตับอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณปรอทที่วัดได้ โดยปริมาณและตำแหน่งที่พบการสะสมของปรอทแตกต่างกันตามวิธีและขนาดของเมอคิวริกคลอไรด์ ที่ได้รับ ในกลุ่มที่เลี้ยงปลาในน้ำที่มีปรอท และได้รับขนาดสูง จะพบการสะสมของปรอทในปริมาณมากกว่าการให้ด้วยวิธีอื่น และขนาดที่ได้รับต่ำกว่า การตรวจหาการแสดงออกของ MT ด้วยวิธี Immunohistochemistry พบการแสดงออกเฉพาะในเซลล์เยื่อบุท่อไต เซลล์ MMCs ในม้าม และตับอ่อนของปลาในกลุ่มที่เลี้ยงไว้ในน้ำที่มีความเข้มข้นของเมอคิวริกคลอไรด์ เท่ากับ 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 9 และ 6 ของการทดลองตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า สามารถใช้รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา การย้อมพิเศษด้วยวิธีออโตเมทัลโลกราฟฟี และการแสดงออกของ MT ด้วยวิธี Immunohistrochemistry เพื่อศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของโลหะหนักปรอทในปลานิลได้ (อนุเทพ รังสีพิพัฒน์, อรัญญา พลพรพิสิฐ และนพดล พิพารัตน์, 2552)

การศึกษาปริมาณ MT ในสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์น้ำนั้นอาจจะเกิดการคลาดเคลื่อนได้ในขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบ การเปรียบเทียบปริมาณ MT ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นร่วมกับการตราจวัดโลหะหนักในตัวสัตว์ด้วยจะทำให้มีความแม่นยำมากขึ้น การใช้ MT เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพจะเหมาะสมสำหรับการติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนของแคดเมียมที่พบในแหล่งน้ำได้ แต่ถึงอย่างไรก็ใช้ MT เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพก็เพียงแค่การตรวจสอบเบื้องต้น เพื่อป้องกันปัญหามลพิษทางน้ำที่อาจจะเกิดขึ้นก็จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาและตราจสอบรวมทั้งการประเมินผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และที่สำคัญควรประเทศไทยควรจะมีมาตรฐานและข้อมูลพื้นฐานของโลหะหนักที่พบในสิ่งแวดล้อมแต่ละชนิดด้วย เพราะการเทียบมาตรฐานกับต่างประเทศอาจจะทำให้ค่าที่ตรวจสอบได้ไม่ตรงกับความเป็นจริง

นอกจากนี้รัฐบาลหรือหน่วยงานที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบโลหะหนักหรือสารพิษก็ควรจะปฏิบัติงานอย่างจริงจัง และทำด้วยความซื่อสัตย์ รวมทั้งมีกฎหมายและบทลงโทษที่รุนแรงสำหรับผู้ที่กระทำความผิดในกรณีที่มีการปล่อยของเสียออกสู่สิ่งแวดล้อม

การใช้ Metal-Binding Protein เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพเพื่อแสดงถึงการปนเปื้อนของโลหะหนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคดเมียมนั้นในปัจจุบันพบว่ามีการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบในสัตว์น้ำหลายชนิด ดังเสนอในตารางที่ 2-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-2 แสดงถึงตัวอย่างการตรวจสอบปริมาณ Metal-Binding Protein สำหรับใช้เป็นตัวชี้วัดถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ

ลำดับ	References	ชนิดของสัตว์น้ำ	ผลการศึกษา
1	Yudkovski et al., 2008	Striped sea bream (*Lithognathus mormyrus*)	เมื่อตรวจสอบปริมาณ Metal-Binding Protein ในปลา *L. mormyrus* ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอิสราเอล จาก 2 แหล่ง คือ บริเวณที่มีสารมลพิษ และบริเวณที่มี และไม่มีสารมลพิษ โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่า ในปลาบริเวณที่มีสารมลพิษ จะตรวจพบปริมาณ Metal-Binding Protein สูงกว่าปลาที่อยู่ในบริเวณไม่มีมลพิษถึง 10 เท่า
2	Oliveira et al., 2008	Golden grey mullet (*Liza aurata*)	เมื่อทำการศึกษาปริมาณ Metal-Binding Protein ในปลา Golden grey mullet ในบริเวณ mullet ในบริเวณ Ria de Aveiro ซึ่งเป็นบริเวณชายฝั่งของทะเลสาบในประเทศโปรตุเกส พบว่าในสถานีที่ 4 คือ Rio Novo do จะเป็นสถานีที่ตรวจพบปริมาณ Metal-Binding Protein ในปลาสูงที่สุด คือ ≈ 627.7 µg ต่อ น้ำหนักเปียก ทั้งนี้ก็เนื่องจากบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่อยู่ในเขตอุตสาหกรรม และมีปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ Zn, Cu, Hg และ Cd สูงกว่าในบริเวณอื่น ๆ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ศรีภุล กันทาใจ (2003) ทำการผลิตพอลีโคลนัลแอนติซีราต่อสายเปปไทด์สังเคราะห์ 3 สาย ตามลำดับกรดอะมิโนใน 3 บริเวณที่แตกต่างกันบนสายพริออนโปรตีนของแกะ เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาเซลล์ลูลาร์พริออนโปรตีนในสัตว์เศรษฐกิจของประเทศไทย คือ ปลาดุก หมู และวัว และทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) โดยอาศัยความสามารถในการจับคอปเปอร์อิออน (Cu[superscript 2+] ion) ของพริออนโปรตีน ตรวจสอบโปรตีนที่สกัดได้โดยการย้อมด้วย Coomassie blue หรือด้วยเทคนิค Immunoblot หลังจากย้อม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

พริออนโปรตีนด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 3 ตัวหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีทางการค้า (MAb L42) พบว่าในสารสกัดหยาบของสมองหมู และวัวมีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 และ 40 kDa ในขณะที่ในสมองปลาพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 40 และ 42 kDa เมื่อผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี IMAC แล้วย้อมด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีAb PII พบว่าสามารถแยกพริออนโปรตีนได้สองส่วน คือ ในส่วนของการชะด้วย 10 mM imidazole ซึ่งพบแถบโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับแถบโปรตีนที่ได้จากสารสกัดหยาบในตัวอย่างสัตว์ทั้งสามชนิด แต่ในส่วนของการชะด้วย EDTA พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa ในตัวอย่างของหมูและวัวแต่ไม่พบในปลา

สุวิมล อุทารพงศา (2003) ทำการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน และความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรังของแคดเมียมต่อปลาตะเพียนขาวัยอ่อนในระยะเวลา 96 ชั่วโมงและ 3 เดือน เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Metal binding protein mRNA (MTmRNA) ในตับและไตปลา พบว่าความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้เกิดการตายร้อยละ 50 (LC_{50}) ภายใน 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง คือ 3.81, 3.41, 3.23 และ 2.88 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ คำนวณหาค่าความเข้มข้นเพื่อใช้ศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรังได้เท่ากับ 0.012, 0.06 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการแสดงออกของยีน MTmRNA ที่มีความเข้มข้น 0.012 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตับเท่ากับ 4.20 เท่า และในไตเท่ากับ 4.16 เท่า การแสดงออกของยีน MTmRNA ที่ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตรในตับเท่ากับ 4.43 เท่า และในไตเท่ากับ 3.34 เท่า การแสดงออกของยีน MTmRNA ที่มีความเข้มข้น 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตับเท่ากับ 4.93 เท่า และในไตเท่ากับ 5.57 เท่า ซึ่งการแสดงออกของยีน MTmRNA ในตับสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อประเมินการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม

อภิรดี เมืองเดช (2545) ศึกษาปริมาณโลหะตะกั่ว แคดเมียม สังกะสีและปรอท ในหอยแครง (*Anadara granosa*) บริเวณปากแม่น้ำบางปะกง และบริเวณชายฝั่งทะเล ตั้งแต่บางทรายถึงตำบลคลองตำหรุ จังหวัดชลบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่าง 6 ครั้ง ตั้งแต่เดือน ธันวาคม 2542 มกราคม มีนาคม เมษายน มิถุนายน กรกฎาคม 2543 พบว่า ค่าเฉลี่ยสูงสุดของโลหะตะกั่วและแคดเมียมพบในเดือนธันวาคม 2542 และมกราคม 2543 โดยมีค่าเท่ากับ 0.435 และ 0.835 µg /g, wet weight

Crooker et al. (2003) ศึกษาตำแหน่งของ Calcium, Heavy Metal และ MT บนเซลล์ Hepatopancreas ของกุ้งลอปสเตอร์ (*Homarus americanus*) โดยใช้ Confocal Microscopy, Centrifugal Elutriation และ Metal Binding Protein-Specific Antibody ที่พัฒนามาจากสัตว์ในกลุ่ม Mollusks ซึ่งมีปฏิกิริยาข้ามกับกลุ่ม Crustaceans พบว่าสามารถหาตำแหน่งของ MT บนเซลล์ Hepatopancreas ของกุ้งลอปสเตอร์ได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Dabrio et al. (2002). ทำการศึกษาเทคนิคต่าง ๆ ในการตรวจสอบ MT ได้แก่ Electroanalytical Techniques, UV-Vis Spectrophotometry, Metal Saturation Assay และ Immunological Techniques และศึกษาเทคนิคการแยก MT ได้แก่ Indirect Method (Atomatic Absorption Spectrometry; AAS, Induce Coupled Plasma Emission Spectrometry; Icp-AES) และ Direct Method (Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis)

Demuynck et al. (2006) ศึกษาการตอบสนองของโปรตีน MT เทคนิคทางภูมิคุ้มกันและโมเลกุล ในหนอน (*Eisenia fetida*) ที่สัมผัสแคดเมียม ด้วยวิธี Dot Immunobinding assay (DIA) โดยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจาก สายเปปไทด์ 14-mer ของ MT หนอน (*Eisenia fetida*) และศึกษาระดับของการแสดงออก ด้วยวิธี Northern Blotting โดยใช้ความจำเพาะของ Probe

Honda et al. (2005) ศึกษาการทำโปรตีน MT ที่สกัดจากปลาอะเมซอน (*Colossoma macropomum*) และยีสต์ (*Saccharomyces cerevisae*) ที่ได้รับแคดเมียม ให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Affinity Chromatography โดย MT ที่สกัดจากปลาอะเมซอนใช้คอลัมน์ที่มี Ni^{2+} - loaded resin และ ชะโปรตีนด้วย Imidazol ส่วน MT ที่สกัดจากยีสต์ใช้คอลัมน์ที่มี Cu^{2+} - loaded resin และ ชะด้วย EDTA พบว่าสามารถแยก MT ให้บริสุทธิ์ได้ ซึ่งมีขนาดโปรตีนประมาณ 10 kDa.

Olafson and Thompson (1974) ศึกษาการแยก Cd-Binding Protein ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel Filtration พบว่าสามารถแยก Cd-Binding Protein จาก Atlantic Grey Seal (*Halichoerus grypus*) พบโปรตีนขนาด 9 kDa , Pacific Fur Seal (*Callorhinus ursinus*) พบโปรตีนขนาด 10 kDa และ ปลาCopper Roek (*Sebastodes caurinus*)) พบโปรตีนขนาด 11 kDa

Park et al.(2002) ศึกษาการใช้ gel filtation (Sephadex G-75), DEAE-Sepharose, Sepharose 12 และHPLC ในการแยก Cd-Binding Protein จากหอย Asian periwinkle (*Littorina brevicula*) พบว่า Cd-Binding Protein ที่แยกได้ มีโปรตีนขนาด 15 kDa

Serra et at. (1995) ศึกษาการสะสมของตัวของแคดเมียมและ Cd-Binding Protein ในหอยสองฝา *Scapharca inaequivalvis* บริเวณไต เหงือก อวัยวะภายใน แมนเทิล เท้า กล้ามเนื้อ และเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งพบว่าไตเป็นบริเวณที่พบการสะสมของแคดเมียมมากที่สุด (725.70 µg /g น้ำหนักแห้ง) หลังให้หอยรับสัมผัสน้ำทะเลที่มี แคดเมียมอยู่ 0.5 µg Cd/ml และการสะสมของตัวแคดเมียมพบในช่วงฤดูร้อนมากกว่าฤดูหนาว

Wu et al. (2005) ใช้ MT เป็นตรวจชี้วัดทางชีวภาพในการตรวจวัดการปนเปื้อนของโลหะหนัก โดยดูการสะสมของแคดเมียมและสังกะสีในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ด้วยเทคนิค

Gel Filtration Chromatography ซึ่งพบว่าระดับของ MT เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลากุ้งสัมผัสกับแคดเมียมและสังกะสี

Yudkovski et al. (2008) ใช้แอนติบอดีทางการค้าที่จำเพาะต่อ Cod MT และ Mammalian Actin และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Lithognathus mormyrus* MT (ที่ผลิตขึ้น) ตรวจสอบการแสดงออกของ MT ในปลา *L. mormyrus* ที่สัมผัสสารแคดเมียม ด้วยวิธี ELISA พบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Lithognathus mormyrus* MT (ที่ผลิตขึ้น) สามารถตรวจปริมาณของ MT ในปลา *L.mormyrus* ได้เช่นเดียวกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University